

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SPONS ASAL PERAIRAN PULAU BANTONG, BOLAANG MONGONDOW TIMUR

(*Antibacterial Activity of Sponges from the Waters of Bantong Island, East Bolaang Mongondow*)

Gian Losung¹, Fitje Losung^{1*}, Rosita A.J. Lintang¹, Sandra O. Tilaar¹, Stenly Wullur¹, HenkyManoppo²

1. Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK, Unsrat Manado
2. Program Studi Budidaya Perairan, FPIK, Unsrat Manado

*Penulis Korespondensi: Vera Losung; vera.losung@yahoo.com

ABSTRACT

Sponges are one of the marine biota that produce bioactive compounds with various structural variations and one of their biological activities is as an antibacterial. This study aimed to examine the antibacterial activity of the crude sponge extract and fractions of the sponge fractionated by the liquid-liquid partition method. This antibacterial test was carried out on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria using the disc diffusion method (Kirby-Bauer method). The final result of this study showed that crude extracts from all types of sponge samples had antibacterial activity with the diameter of the inhibition zone on *S. aureus* bacteria media: *Acanthostrongylophora ingens* (14.3 mm), *Liosina paradoxa* (7.5 mm), *Stylotella aurantium* (14.1 mm); on media of *E. coli* bacteria: *A. ingens* (11.1 mm), *L. paradoxa* (7.3 mm), *S. aurantium* (12 mm). In the antibacterial test of the sponge fractions carried out on samples of *S. aurantium* sponges also showed that all fractions had antibacterial activity with the diameter of the inhibition zone on *S. aureus* bacterial media: N-hexane fraction (7.6 mm), ethyl acetate fraction (12 mm), methanol fraction (8 mm); on *E. coli* bacteria media: N-hexane fraction (9.3 mm), ethyl acetate fraction (15.5 mm), methanol fraction (8.5 mm).

Keywords: Sponge, Antibacterial, *A. ingens*, *L. paradoxa*, *S. aurantium*

ABSTRAK

Spons merupakan salah satu biota laut penghasil senyawa bioaktif dengan berbagai variasi struktur dan salah satu aktivitas biologisnya adalah sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar spons dan fraksi-fraksi spons yang difraksinasi dengan metode partisi cair-cair. Pengujian antibakteri ini dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi cakram (metode Kirby-Bauer). Hasil akhir dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar dari semua jenis sampel spons memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat pada media bakteri *S. aureus*: *Acanthostrongylophora ingens* (14.3 mm), *Liosina paradoxa* (7.5 mm), *Stylotella aurantium* (14.1 mm); pada media bakteri *E. coli*: *A. ingens* (11.1 mm), *L. paradoxa* (7.3 mm), *S. aurantium* (12 mm). Pada pengujian antibakteri fraksi-fraksi spons yang dilakukan pada sampel spons *S. aurantium* juga menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat pada media bakteri *S. aureus*: fraksi N-heksan (7.6 mm), fraksi etil asetat (12 mm), fraksi metanol (8 mm); pada media bakteri *E. coli*: fraksi N-heksan (9.3 mm), fraksi etil asetat (15.5 mm), fraksi metanol (8.5 mm).

Kata Kunci: Spons, Antibakteri, *A. ingens*, *L. paradoxa*, *S. aurantium*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara maritim terbesar dengan dua pertiga bagian wilayahnya berupa lautan, sehingga memiliki sumber daya biota laut yang sangat melimpah (Cahyaningrum *et al.*, 2015). Salah satu bentuk pemanfaatan biota laut adalah bioprospeksi senyawa bioaktif untuk menemukan kandidat obat baru yang dapat mengatasi mikroorganisme patogen (Wibowo, 2015). Beberapa biota laut yang diketahui sebagai sumber senyawa bioaktif, diantaranya adalah spons, coelenterata, echinodermata, moluska, alga dan lain-lain (Hu *et al.*, 2011).

Spons merupakan biota laut yang paling banyak diteliti dalam pencarian produk alami sebagai bahan baku obat karena kaya akan senyawa bioaktif (Angkouw dan Mangindaan, 2013). Dilaporkan bahwa sekitar 32% senyawa bioaktif yang diisolasi dari biota laut berasal dari spons (Blunt *et al.*, 2015). Rhandour *et al.* (2016) menyatakan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh spons mengandung berbagai macam senyawa, seperti alkaloid, tanin, steroid, saponin dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas farmakologis seperti antitumor, antioksidan, antibakteri, antijamur, antivirus dan antiinflamasi (Rhandour *et al.*, 2016).

Sebagian besar antibiotik yang secara komersil digunakan saat ini merupakan antibiotik sintetik yang rentan memicu resistensi patogen, terutama bakteri (Purwanto *et al.*, 2014). Berbeda dengan antibiotik sintetik, antibiotik alami cenderung tidak menyebabkan resistensi bakteri, sehingga efektif untuk melawan bakteri resisten (Azmi *et al.*, 2016). Selain itu, penggunaan obat-obatan alami juga memiliki efek samping yang lebih kecil terhadap penggunaannya dibandingkan dengan obat sintetik (Nisar *et al.*, 2017). Oleh karena itu, eksplorasi untuk menemukan antibakteri alami yang baru perlu dilakukan, salah satunya dengan memanfaatkan biota laut khususnya spons.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Seluruh rangkaian kegiatan dalam penelitian ini, mulai dari pengambilan sampel hingga pengerjaan di laboratorium dilakukan pada bulan Agustus – November 2021. Sampel spons diambil dari perairan pulau Bantong, Bolaang Mongondow Timur, kemudian penelitian dilanjutkan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Pengambilan dan Penanganan Sampel

Pengambilan sampel spons dilakukan pada kedalaman sekitar 5-10 meter dan sampel diambil dengan cara mengangkat spons langsung dari substratnya. Sampel spons yang diperoleh, dimasukkan ke dalam ember berisi air laut kemudian dibawa ke daratan. Selanjutnya sampel spons dimasukkan ke dalam kotak berisi es batu kemudian dibawa ke Laboratorium.

Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel spons dilakukan secara makroskopis, yaitu dengan mengamati bentuk luar, konsistensi tubuh (tekstur) dan warna spons (Amir dan Budiyanto, 1996). Jenis sampel kemudian ditentukan dengan melihat dan membandingkan morfologi spons yang didapat dengan spons yang telah teridentifikasi dan dideskripsikan.

Alat dan Bahan

Beberapa peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: 1 set rotary vacuum evaporator, autoclave, freeze dryer, corong pisah, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, mikropipet, kertas cakram, timbangan analitik dan laminar air flow. Bahan-bahan yang digunakan, yaitu: metanol, etil asetat, N-heksan, akuades, nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), ceftriaxone dan amoxicillin.

Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan menggunakan metanol. Sampel spons dipotong-potong kecil seukuran dadu,

dimasukkan ke dalam botol kemudian ditambahkan dengan metanol sampai semua bagian dari sampel terendam. Setelah 24 jam, disaring menggunakan kertas whattman untuk mendapatkan ekstrak spons. Ekstrak metanol spons kemudian dievaporasi menggunakan rotary vacuum evaporator sampai volume akhir kira-kira mencapai 20% dari volume awal.

Maserat metanol spons yang masih merupakan ekstrak kasar dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan pelarut N-heksan dengan perbandingan (1:1). Selanjutnya dikocok-kocok dan diamkan hingga terbentuk lapisan N-heksan dan lapisan metanol. Lapisan N-heksan dan lapisan metanol dipisahkan dan ditampung dalam wadah yang berbeda, kemudian lapisan N-heksan dievaporasi hingga kering sehingga diperoleh fraksi N-heksan. Selanjutnya lapisan metanol dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan dipartisi dengan pelarut etil asetat yang prosedurnya sama seperti sebelumnya. Setelah itu, lapisan etil asetat dan lapisan metanol dipisahkan dan ditampung dalam wadah yang berbeda kemudian dievaporasi hingga kering sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi metanol.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas, seperti tabung reaksi, erlenmeyer dan cawan petri dicuci bersih, kemudian dikeringkan dengan posisi terbalik. Setelah kering, dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 150° C selama kurang lebih 120 menit. Untuk media padat (nutrient agar) dan media cair (nutrient broth), disterilkan dengan autoclave pada suhu 120° C selama kurang lebih 20 menit.

Pembuatan Media Cair (NB)

Media cair dibuat dengan cara melarutkan nutrient broth sebanyak 1,3 gram ke dalam 100 ml air kemudian dipanaskan hingga terbentuk larutan jernih berwarna kuning. Setelah itu, media didinginkan dan dibagikan ke dalam 10 tabung sehingga masing-masing tabung berisi media NB sebanyak 10 ml. Semua tabung yang sudah berisi media, disumbat dengan kapas

kemudian disterilkan dengan autoclave selama 20 menit pada suhu 120° C.

Kultur Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk pengujian antibakteri ini adalah *E. coli* dan *S. aureus*. Sebanyak 200 µL suspensi dari masing-masing bakteri diambil menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media cair. Kedua bakteri tersebut disuspensikan ke dalam media cair pada dua tabung yang berbeda kemudian tabung disumbat kembali dengan kapas dan diinkubasi selama 24 jam.

Pembuatan Media Padat (NA)

Komposisi bahan yang digunakan untuk pembuatan media padat adalah 3,2 gram nutrient agar, 240 ml air dan agar sebanyak 2 spatula. Media dibuat menggunakan dua erlenmeyer untuk dua bakteri, sehingga masing-masing erlenmeyer berisi media NA sebanyak 120 ml. Masing-masing erlenmeyer yang sudah berisi media, ditutup dengan aluminium foil kemudian dipanaskan hingga bahan-bahan terlarut dengan sempurna. Media kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 20 menit pada suhu 120° C.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri ini menggunakan metode difusi cakram (metode Kirby-Bauer). Kertas cakram (*paper disk*) yang digunakan berdiameter 6 mm. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada pengujian ini adalah 100.000 ppm (100mg/ml) dan banyaknya ekstrak pada tiap kertas cakram adalah 30 µl. Pengujian antibakteri ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan pada masing-masing sampel uji dan pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi.

Sebagai pembanding, pengujian antibakteri ini juga menggunakan kontrol positif yang dibuat dari dua jenis antibiotik, yaitu Amoxicillin untuk bakteri *S. aureus* dan Ceftriaxone untuk bakteri *E. coli*, sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan metanol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jenis-jenis Sampel

Sampel spons yang diperoleh dari perairan pulau Bantong, Bolaang

Mongondow Timur terdiri dari tiga jenis, yaitu: *Acanthostrongylophora ingens*, *Liosina paradoxa* dan *Stylotella aurantium* (Gambar 1).



Gambar 1. Jenis-jenis sampel spons: (1) *A. ingens*; (2) *L. paradoxa*; (3) *S. aurantium* (Dokumentasi pribadi)

Hasil Ekstraksi (Maserasi)

Ekstraksi yang dilakukan secara maserasi ini bertujuan untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa aktif yang terkandung dalam spons. Sarker *et al.* (2006) menyatakan bahwa maserasi cenderung tidak menyebabkan degradasi senyawa termolabil karena dilakukan pada suhu ruangan.

Metanol digunakan sebagai pelarut dalam maserasi ini karena memiliki titik didih yang rendah sehingga memudahkan pada proses pemekatan (Saidi *et al.*, 2018). Maserat spons hasil maserasi, dievaporasi dengan tujuan untuk menguapkan sebagian pelarut sehingga didapatkan ekstrak spons dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Berat ekstrak kasar dari masing-masing sampel spons setelah dievaporasi tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Berat basah sampel dan berat ekstrak

No.	Sampel	Berat Basah Sampel (gr)	Berat Ekstrak Kasar (gr)
1.	<i>A. ingens</i>	238	122
2.	<i>L. paradoxa</i>	267	95
3.	<i>S. aurantium</i>	243	128

Hasil Partisi

Partisi dilakukan untuk menarik komponen-komponen senyawa sesuai

dengan kepolarannya. Ekstraksi cair-cair ini menggunakan dua pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda sehingga tidak saling bercampur. Senyawa yang terlarut dalam maserat akan terdistribusi di antara dua pelarut sesuai dengan tingkat polaritasnya. Partisi ini dilakukan pada sampel spons *S. aurantium*. Dari hasil partisi, diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi N-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Ketiga fraksi tersebut dievaporasi hingga kering kemudian ditimbang untuk mengetahui berat ekstrak dari masing-masing fraksi (Tabel 2).

Tabel 2. Berat kering fraksi-fraksi spons *S. aurantium*

No.	Fraksi	Berat Kering Ekstrak (gr)
1.	N-heksan	0,510
2.	Etil asetat	0,860
3.	Metanol	1,190

Hasil Pengujian Antibakteri

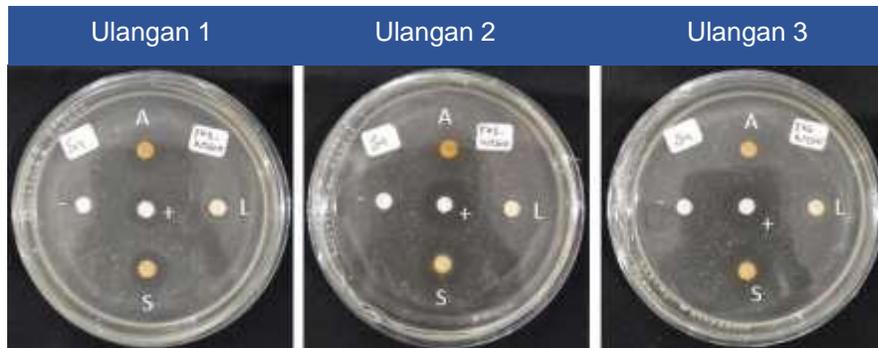
Bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap antibakteri (Gultom, 2014). Oleh karena itu, pengujian antibakteri ini menggunakan dua jenis bakteri, yaitu *S. aureus* yang mewakili bakteri Gram-positif dan *E. coli* yang mewakili bakteri Gram-negatif.

Hasil yang diperoleh ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram (gambar 2;3). Hal ini menunjukkan bahwa adanya kepekaan bakteri terhadap

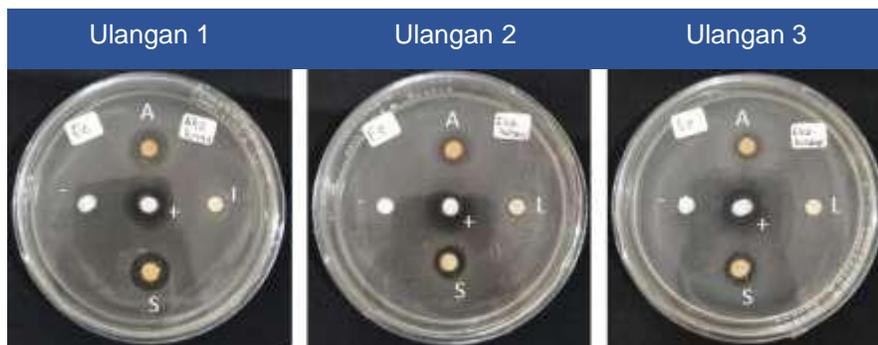
ekstrak kasar dan fraksi-fraksi spons *S. aurantium*. Zona bening atau zona hambat yang terbentuk tersebut diukur

menggunakan mistar dalam satuan millimeter (Tabel 3;4).

Media bakteri: *S. aureus*



Media bakteri: *E. coli*



Ket: A = *A. ingens* S = *S. aurantium* + = Kontrol positif
 L = *L. paradoxa* - = Kontrol negatif

Gambar 2. Pengujian antibakteri ekstrak kasar spons (Dokumentasi pribadi)

Tabel 3. Diameter zona hambat ekstrak kasar spons

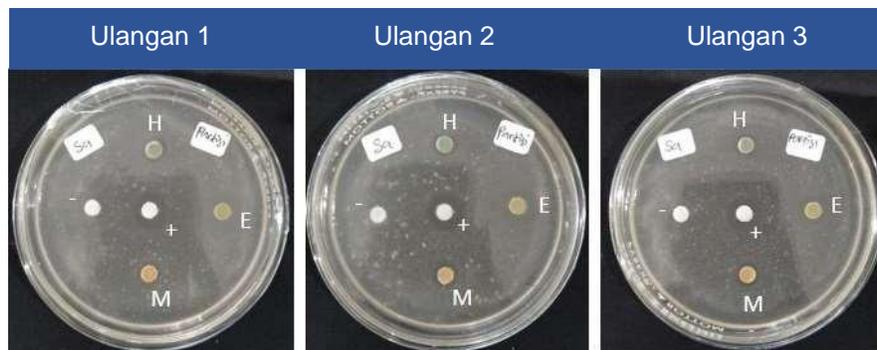
Sampel	Bakteri Uji							
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	Rata-rata (mm)	I (mm)	II (mm)	III (mm)	Rata-rata (mm)
<i>A. ingens</i>	14	15	14	14,3	12,5	11	10	11,1
<i>L. paradoxa</i>	8,5	7	7	7,5	7	8	7	7,3
<i>S. aurantium</i>	13	15,5	14	14,1	14	11	11	12
Kontrol (+)	13	16,5	13,5	14,4	17,5	19	14	16,8
Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0	0	0

Konsentrasi tiap ekstrak: 100.000 ppm
 Banyaknya ekstrak dalam kertas cakram: 30 µl
 Diameter kertas cakram: 6 mm

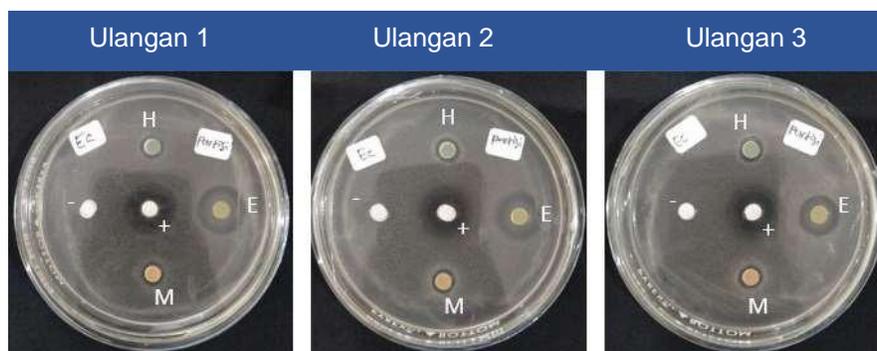
Hasil pengujian antibakteri ekstrak kasar spons menunjukkan bahwa ketiga sampel uji memiliki aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji. Pada media bakteri *S. aureus*, aktivitas tertinggi dihasilkan oleh sampel spons *A. ingens* dengan diameter zona hambat 14.3 mm. Hal yang berbeda diperlihatkan pada media bakteri *E. coli* dimana aktivitas tertinggi dihasilkan oleh sampel spons *S. aurantium* dengan diameter zona hambat 12 mm. Hal tersebut dikarenakan perbedaan tingkat sensitivitas bakteri terhadap antibakteri. Jika dibandingkan dengan sampel spons *A. ingens* dan *S. aurantium*, aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh sampel spons *L. paradoxa*, terbilang sangat kecil untuk kedua jenis bakteri uji.

Kontrol (+) yang dibuat dari amoxicillin untuk media bakteri *S. aureus* memperlihatkan diameter zona hambat yang tidak jauh berbeda dengan sampel spons *A. ingens* dan *S. aurantium*, namun tidak untuk sampel spons *L. paradoxa* yang memiliki aktivitas paling kecil. Berbeda dengan amoxicillin, ceftriaxone yang digunakan sebagai kontrol (+) pada media bakteri *E. coli* memperlihatkan aktivitas yang cukup jauh berbeda dengan ketiga sampel uji. Kemudian untuk kontrol negatif yang terbuat dari metanol tidak memperlihatkan adanya aktivitas. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas yang ditimbulkan oleh ekstrak kasar adalah murni dari senyawa yang terkandung di dalam spons.

Media bakteri: *S. aureus*



Media bakteri: *E. coli*



Ket: H = Heksan M = Metanol + = Kontrol positif
 E = Etil asetat - = Kontrol negatif

Gambar 3. Pengujian antibakteri fraksi-fraksi spons *S. aurantium*

Tabel 4. Diameter zona hambat fraksi-fraksi spons *S. aurantium*

Fraksi	Bakteri Uji							
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	Rata-rata (mm)	I (mm)	II (mm)	III (mm)	Rata-rata (mm)
N-heksan	8	8	7	7,6	9	9	10	9,3
Etil asetat	14	12	10	12	17,5	15	14	15,5
Metanol	7,5	8,5	8	8	8	8,5	9	8,5
Kontrol (+)	12	13	11	12.5	19	18	19	18,6
Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0	0	0

Konsentrasi tiap fraksi: 100.000 ppm
 Banyaknya fraksi dalam kertas cakram: 30 µl
 Diameter kertas cakram: 6 mm

Hasil pengujian antibakteri fraksi-fraksi spons *S. aurantium* menunjukkan bahwa ketiga fraksi memiliki aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji. Aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh fraksi etil asetat memperlihatkan diameter zona hambat yang jauh lebih besar dibandingkan dengan kedua fraksi lainnya, baik pada media bakteri *S. aureus* maupun *E. coli*. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa semi-polar yang terkandung dalam spons *S. aurantium* adalah yang paling berpotensi sebagai antibakteri. Pada media bakteri *S. aureus*, fraksi etil asetat juga menunjukkan diameter zona hambat yang tidak jauh berbeda dengan antibiotik amoxiciliin (+).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak kasar dari semua jenis sampel spons memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat pada media bakteri *S. aureus*: *A. ingens* (14.3 mm), *L. paradoxa* (7.5 mm), *S. aurantium* (14.1 mm); pada media bakteri *E. coli*: *A. ingens* (11.1 mm), *L. paradoxa* (7.3 mm), *S. aurantium* (12 mm).
2. Semua fraksi spons *S. aurantium* memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat pada media bakteri *S. aureus*: fraksi N-heksan (7.6

mm), fraksi etil asetat (12 mm), fraksi metanol (8 mm); pada media bakteri *E. coli*: fraksi N-heksan (9.3 mm), fraksi etil asetat (15.5 mm), fraksi metanol (8.5 mm).

DAFTAR PUSTAKA

Amir, I., Budiyanto, A. 1996. Mengenal spons laut (Demospongiae) secara umum. *Oseana*, XXI (2), 15-31.

Angkouw, E.D., Mangindaan, R.E.P. 2013. A study on the cytotoxic activity of marine sponges on the embryo development of sea urchin *Diadema savigny*. *Aquatic Science & Management*, Edisi Khusus 1, 107-113.

Azmi, A., Skwarczynski, M., Toth, I. 2016. Toward the development of synthetic antibiotics: designs inspired by natural antimicrobial peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 23 (15), 1-16.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., Prinsep, M.R. 2015. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 32, 116-211.

Cahyaningrum, P.L., Swantara, I.M.D., Mahardika, I.G. 2015. Toksisitas isolat dari ekstrak metanol spons *Clathria (Thalysias)* sp. terhadap larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia*, 3(1), 50-55.

- Gultom, E.S. 2014. Aktifitas ekstrak bakteri yang berasosiasi dengan spons haliclona sp. dan axinellid sp. sebagai antibakteri. Tesis, FMIPA, Universitas Sumatera Utara.
- Hu, G.P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.G., Wu, J.H., Lan, X.J., Zhu, X., Lin, Y.C., Chen, S.P. 2011. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9, 514-525.
- Nisar, B., A. Sultan & S.L. Rubab. 2017. Comparison of medicinally important natural product versus synthetic drugs- a short commentary. *Nat. Prod. Chem. Res.* 6: 308.
- Purwanto, U.M.S., F.H. Pasaribu & M. Bintang. 2014. Isolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) dan potensinya sebagai penghasil senyawa antibakteri. *Current Biochemistry*, 1(1): 51-57.
- Rhandour, Z., M. Tarbaoui, M. Oumam, B. El-Amraoui, A. Bennamara & A. Abourriche. 2016. Extraction and recovery of bioactive metabolites from marine sponge "*Ircinia spinulosa*". *World Journal of Innovative Research*, 1(2): 9-13.
- Saidi, N., B. Ginting, Murniana dan Mustanir. 2018. Analisis metabolit sekunder. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Sarker, S.D., Z. Latif dan A.I. Gray. 2006. Natural products isolation. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Wibowo, J.T. 2015. Resistensi bakteri patogen dan strategi mengatasi bakteri resisten. *Oseana*, XL (3): 11-17.