

Eksplorasi Jamur Simbion Pada Spons Demospongiae yang Dikoleksi dari Perairan Kupang Penghasil Bahan Antibakteri Multidrug Resistant (MDR)

Aditya Andika* Agus Trianto* Adi Santoso*

**Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Email : dityandikah@gmail.com*

Abstrak

Spons laut merupakan salah satu avertebrata laut yang mengandung senyawa bioaktif dengan bioaktivitas lebih kuat dibandingkan senyawa-senyawa yang dimiliki oleh tumbuhan darat. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut paling banyak ditemukan pada kelas Demospongia. Pencarian senyawa antibiotik baru untuk menanggulangi bakteri MDR sudah menjadi tugas para peneliti. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi jamur simbion spons sebagai sumber senyawa bioaktif antibakteri MDR *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Spons diambil dari perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur. Terdapat 34 sampel spons yang berhasil diisolasi. Isolasi jamur simbion dilakukan dengan cara menanam spons ke dalam cawan petri yang berisikan media. Purifikasi jamur simbion menggunakan metode goresan. Hasil purifikasi hanya didapatkan 11 isolat jamur dari 34 sampel spons dan yang berhasil diisolasi sampai akhir adalah isolat berikut ; (K.14.45, K.14.47, K.14.40, K.14.50, K.14.35, K.14.46, K.14.30, K.14.06, K.14.43, K.14.08, K.14.29). Uji kuantitatif dilakukan dengan metode *overlay* dan yang berhasil aktif adalah isolat jamur simbion K.14.43. Kemudian dilakukan kultur jamur. Setelah itu dilakukan maserasi dan evaporasi. Kemudian dilakukan uji kuantitatif ekstrak jamur dengan metode difusi agar. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak jamur simbion Spons kelas Demospongia dengan konsentrasi 500 µg/disk mampu menghambat pertumbuhan bakteri MDR *E. coli* 2.25 ± 0.495 dan 2.78 ± 0.071 untuk bakteri MDR *S.aureus*. Hasil identifikasi spons K.14.43 adalah jenis spons *Xetospongia* sp. Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa jamur simbion Spons memiliki potensi sebagai mikroorganisme penghasil senyawa antibakteri MDR.

Kata Kunci : *senyawa bioaktif, spons, antibakteri MDR, jamur simbion*

PENDAHULUAN

Lautan merupakan sumber dari kelompok besar bahan hayati laut dengan struktur yang unik. Bahan hayati laut tersebut terakumulasi pada hewan-hewan invertebrata pada ekosistem terumbu karang, seperti spons, tunikata, bryozoa, moluska dan karang lunak. Beberapa metabolit sekunder yang dimiliki invertebrata laut tersebut menunjukkan adanya aktivitas farmakologi yang merupakan kandidat-kandidat baru untuk bahan obat-obatan (Proksch, 2002).

Sekarang ini perkembangan resistensi terhadap antimikroba dan munculnya patogen multiresisten telah membangkitkan kepedulian kalangan medis di dunia. Hal ini telah

menjadi permasalahan yang sangat penting untuk diselesaikan. Bakteri *multidrug resistant* adalah bakteri yang telah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri resisten dikaitkan dengan angka perawatan rumah sakit yang lebih tinggi, masa perawatan rumah sakit yang lebih lama, serta tingkat kesakitan dan kematian yang lebih tinggi (Sastroasmoro, 2005). Penanganan bakteri patogen multiresisten di dalam bidang kesehatan serta pemanfaatan senyawa antibiotik baru yang ramah lingkungan telah menjadi pekerjaan rumah yang harus segera ditangani secara multidisiplin dan serius (Hunt and Vincent, 2006).

Spons merupakan organisme multiseluler tak bertulang belakang yang potensial dijadikan bahan eksplorasi pencarian senyawa baru antikanker karena spons merupakan penghasil senyawa bioaktif antiviral maupun senyawa sitotoksik (Garson, 1994). Jumlah struktur senyawa yang telah didapatkan dari spons laut sampai bulan Mei 1998 adalah 3500 jenis senyawa yang diambil dari 475 jenis dari dua kelas yaitu *Calcarea* dan *Demospongiae* (Soest dan Braekman, 1999).

Baru-baru ini beberapa investigasi menunjukkan bahwa spons dan karang lunak merupakan sumber jamur laut yang melimpah. Beberapa peneliti mengatakan bahwa ada beberapa spons dan karang lunak yang mengakumulasi bakteri dan jamur didalam tubuhnya. Namun sampai saat ini belum jelas apakah ada jamur spesifik yang hidup pada biota tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jamur laut sangat kaya akan keanekaragaman senyawa kimia dimana dijadikan sebagai bahan alami yang sangat berpotensi sebagai sumber obat baru namun saat ini belum banyak yang menelitinya (Wiese, 2011).

Perairan Teluk Kupang, Nusa Tenggara Timur merupakan salah satu kawasan Indonesia yang memiliki potensi yang kaya akan keanekaragaman biota laut seperti *soft coral*, *tunicate* dan spons. Kondisi ini tidak saja berpotensi untuk tujuan pengembangan pariwisata dan budidaya laut tetapi juga dapat dijadikan sebagai sumber kajian ilmiah berkaitan dengan sumber senyawa bioaktif baru dalam industri farmasi. Penelitian tentang potensi bahan hayati yang dimiliki spons pernah dilakukan pada tahun 2009 di Perairan Teluk Kupang, dimana hasilnya menyatakan bahwa spons menghasilkan senyawa antikanker. Selain itu, tim peneliti berhasil mengeksplorasi sebanyak 80 jenis spons dan salah satunya merupakan endemik Perairan Teluk Kupang yang diidentifikasi sebagai *Candidaspongia sp.* Diharapkan hasil dari penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai potensi yang tidak hanya dimiliki oleh spons namun juga potensi yang dimiliki oleh mikroba simbiosis spons khususnya jamur simbiosis spons sebagai penghasil bahan antibakteri MDR.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2014 – Mei 2015. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Demospongiae* yang diambil dari Perairan Teluk Kupang, Nusa Tenggara Timur.

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimental laboratoris. Penelitian ekperimental merupakan penelitian yang bertujuan untuk menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengenalkan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental dan satu atau lebih kondisi perlakuan serta membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Suryabrata, 1983).

Metode pengambilan sampel spons dilakukan dengan metode *sampling purposif* (Arikunto, 1993) menyatakan bahwa metode *sampling purposif* merupakan metode pengambilan sampel yang dilakukan dengan mengambil subjek bukan berdasarkan strata, random, atau daerah namun berdasarkan atas adanya tujuan tertentu.

Pengambilan jamur simbiosis spons dilakukan dengan membersihkan permukaan spons dengan menyemprotnya menggunakan air laut steril. Kemudian sampel spons dipotong kecil menggunakan *cutter* steril lalu ditanam kedalam cawan petri yang berisi media padat MEA secara aseptis kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam untuk mendapatkan biakan jamur simbiosis spons.

Uji Aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode *overlay* (Terkina *et al.*, 2006). Jamur simbiosis yang akan diuji ditanam 1 jamur pada 1 cawan petri yang sudah berisikan media padat Zobell 2216E laut. Selanjutnya cawan petri dibungkus dengan *plastic wrap* dan diinkubasi selama 2 hari. Pada hari ke-2 bakteri uji yang telah ditanam dan ditumbuhkan selama 1 x 24 jam pada media cair Zobell 2216E laut sambil digoyang menggunakan *shaker*. Bakteri uji diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam 100 mL *soft agar* Zobell 2216E laut. Selanjutnya *soft agar* yang telah berisi bakteri uji dituang ke media MEA laut yang telah ditumbuhi jamur simbiosis spons lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 x 24 jam. Jamur simbiosis spons yang aktif terlihat dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

Spora dari sampel jamur simbiosis ditumbuhkan selama 2-3 hari. Setelah tumbuh dengan baik sekitar 2-3 hari, spora dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL media MEB. Kultur cair ini selanjutnya dipindah ke dalam Erlenmeyer berukuran 200 mL yang berisi MEB. Kultur dilakukan selama 1-2 minggu.

Sebelum diekstrak, media kultur disaring dengan menggunakan kain kasa. Ekstraksi miselium dilakukan dengan cara sebagai berikut : sebelum diekstrak dengan pelarut miselium dikeringkan. miselium yang sudah kering diekstrak dengan metode maserasi yaitu perendaman sampel selama 1x24 jam sebanyak 3 kali dengan pelarut metanol sebanyak 250 mL. Ekstrak miselium kemudian dipekatkan dalam rotavapor vakum hingga diperoleh ekstrak kasar miselium.

Inokulasi bakteri MDR *E. coli* dan *S. aureus* ke dalam Zobell 2216E cair dan diinkubasi selama 2x24 jam. Kemudian bakteri patogen diambil sebanyak 100 µl menggunakan mikropipet dan dituangkan ke media Zobell 2216E tawar dalam cawan petri kemudian diratakan dengan menggunakan spreader. Inkubasi selama 30 menit. Paper disk yang sudah steril dimasukan kedalam Zobell 2216E tawar lalu ditetaskan ekstrak jamur simbiosis spons dengan mikropipet pada konsentrasi 125 µg/disk, 250 µg/disk, dan 500 µg/disk. Setelah itu inkubasi 1x24 jam pada suhu 37°C.

Spons sampel terpilih dijadikan fragmen spons dengan memotongnya menjadi kecil ukuran 1 x 1cm. Fragmen spons dimasukkan ke dalam *appendorf* kemudian ditetesi dengan larutan pemutih sebanyak 1 - 1,5 ml. Campuran tersebut didiamkan selama 2 menit agar fragmen pada spons dapat hancur sampai fragmen spons terbentuk mineral skeleton. Selanjutnya, mineral skeleton pada spons akan terpisah dari larutan pemutih dan mengendap dibawah *eppendorf*. Kemudian, suspensi spikula tersebut ditempatkan pada preparat mikroskop dan ditutup cover. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x. hasil pengamatan didokumentasikan sebanyak 3 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji *overlay* menunjukkan adanya potensi jamur simbiosis spons Demospongiae sebagai antibakteri terhadap bakteri uji MDR *E.coli* dan *S.aureus* pada uji *overlay* ini menunjukkan dari 11 isolat jamur simbiosis spons terdapat 3 isolat jamur simbiosis spons yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri MDR *E.coli* dan *S.aureus*. Seperti yang dikatakan oleh Wiese (2011) bahwa jamur laut yang diisolasi dari spons kaya akan senyawa kimia yang bisa dijadikan sebagai bahan alami yang sangat berpotensi sebagai sumber obat baru.

Isolat yang memiliki zona hambat berspektrum luas (aktif terhadap bakteri jenis gram negatif dan gram positif) ada 1 isolat jamur simbiosis yaitu K.14.43. Dan isolat yang memiliki zona hambat spektrum sempit (hanya aktif terhadap salah satu bakteri uji saja) yaitu,

K.14.46 dan K.14.47 yang hanya aktif terhadap bakteri *E.coli* saja. seperti yang dikatakan oleh Volk dan Wheeler (1993), antibakteri berdasarkan kemampuan daya bunuhnya digolongkan menjadi dua, yaitu : (1) Antibakteri spektrum luas, yaitu antibakteri yang dapat membunuh membunuh bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. (2) Antibakteri spektrum sempit, yaitu antibakteri yang hanya mampu membunuh salah satu bakteri gram positif atau gram negatif saja.

Ekstraksi yang dilakukan adalah dengan metode maserasi, proses maserasi ini dilakukan dengan cara perendaman jamur yang sudah di kultur massal dengan menggunakan pelarut metanol. Penggunaan pelarut metanol ini dikarenakan metanol memiliki tingkat polaritas yang tinggi, metanol juga memiliki titik didih yang rendah yaitu 65°C dan mempunyai harga yang relatif murah dan mudah dijangkau. Diharapkan dengan penggunaan pelarut metanol ini didapatkan metabolit sekunder yang baik yang terdapat pada jamur terserap dengan baik oleh metanol ini. Pelarut metanol ini adalah pelarut yang sering juga digunakan dalam proses isolasi senyawa organik karena dapat melarutkan golongan metabolit sekunder (Muniarsih, 2003).

Setelah didapatkan filtrat hasil maserasi kemudian dilakukan teknik evaporasi atau penguapan dengan menggunakan *rotary evaporator*, penggunaan *rotary evaporator* ini bertujuan untuk menguapkan pelarut dan memperoleh senyawa hasil ekstraksi yang diinginkan. Suhu yang digunakan dalam proses ini adalah 37°C dengan tujuan agar tidak merusak senyawa bioaktif yang terdapat pada filtrat apabila menggunakan suhu yang tinggi. hasil dari proses ini adalah mendapat ekstrak kasar dari pelarut yang berbentuk pasta dan memiliki warna kekuningan pada ekstrak.

Hasil yang didapatkan dari 250ml pelarut metanol didapatkan 1,532g ekstrak kasar hal ini juga dipengaruhi dari hasil rendemen yang didapatkan dari ekstrak. Rendemen yang didapatkan dari isolat K.14.43 ini adalah 4.6% yang artinya kelarutan senyawa yang terlarut pada pelarut sebesar 4.6%. Data hasil ekstraksi dari isolat jamur K.14.43 disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Berat ekstrak kasar dari isolat K.14.43

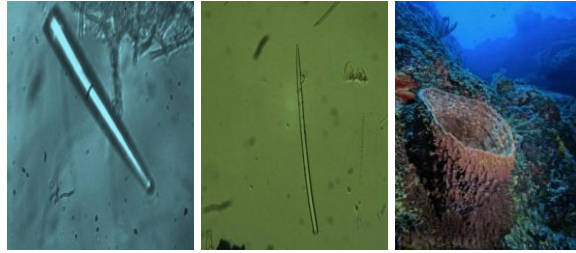
	Berat	Volume	Berat	Rendemen	
Isolat	Basah	Filtrat	Ekstrak	Esktrak	Warna
	(gr)	(ml)	(mg)	(%)	
K.14.43	33.06	300	1.532	4.6	Kuning

Uji aktivitas antibakteri MDR ekstrak kasar dari isolat K.14.43 diperoleh zona hambat terbesar pada konsentrasi ekstrak 500 µg/disk dalam menghambat bakteri *E.coli* strain MDR sebesar 2.25 mm, sedangkan dalam menghambat bakteri *S.aureus* strain MDR sebesar 2.78 mm. Pengamatan dan pengukuran zona hambat dilakukan 2 kali yaitu pada 24 jam dan 48 jam. Dan hasil terbaik ditunjukkan pada pengamatan ke-48 jam pada masing-masing bakteri uji MDR. Perbesaran zona hambat hanya berbeda sedikit diantara kedua uji bakteri MDR, yang terbaik ada pada bakteri uji *S.aureus* strain MDR ini lebih besar 0.23 mm dibandingkan dari bakteri uji *E.coli*.

Zona hambat rata-rata yang terbentuk dari konsentrasi 125, 250 µg/disk, menunjukkan hanya 1 mm kurang berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil penggolongan ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Ernawati (2007), kekuatan antibiotik atau antibakteri jika zona hambatnya lebih dari 20 mm berarti aktivitasnya sangat kuat, 10-20 mm memiliki aktivitas kuat, 5-10 mm memiliki aktivitas sedang, zona hambat di bawah 5 mm atau kurang berarti aktivitas antijamurnya lemah. Pada semua konsentrasi ekstrak menunjukkan aktivitas antibakteri yang lemah ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dalam spons isolat K.14.43 tergolong lemah walaupun aktif di semua konsentrasi ekstrak dan semua bakteri uji MDR.

Sampel spons K.14.43 identifikasi dengan membandingkan morfologi adalah jenis spons *Xestospongia* sp. Ciri-ciri sampel spons *Xestospongia* sp. sesuai dengan Collin *et al.*, (2005) yaitu memiliki bentuk seperti tong, mempunyai dinding yang tebal. Ungu sampai coklat merah dibagian dalamnya, berwarna coklat dibagian dialamnya. Mempunyai permukaan dengan tonjolan bulat atau garis seperti pisau. Mudah rapuh dan hancur. Oscula terdapat pada bagian dalam vas mempunyai ukuran 2-3 mm lebarnya. Biasanya ditemukan di lingkungan terumbu karang.

Setelah hasil pengamatan morfologi didapatkan spons K.14.43 yaitu *Xestospongia* sp. dilanjutkan dengan pengamatan spikula spons dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 100x dan 400x. Hasil pengamatan spikula spons, memperlihatkan bahwa spons memiliki bentuk spikula *strongyloxea* dan *strongyle* setelah membandingkan data hasil spikula dengan *Siliceous Spicules and Skeleton Frameworks in Sponss: Origin, Diversity, Ultrastructural Patterns, and Biological Functions* (Uriz *et al.*, 2003). Gambar hasil pengamatan spikula spons *Xestospongia* sp. dan sampel spons K.14.43 tersaji pada Gambar 1.



(a)

(b)

(c)

Gambar 1. (a) Spikula Spons *Xestospongia* sp. *Strongyloxea* pada perbesaran 100x dibawah mikroskop , (b) Spikula Spons *Xestospongia* sp. pada perbesaran 400x *strongyle* dibawah mikroskop, (c) Foto sampel spons K.14.43.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat jamur K.14.46 dan K.14.47 memiliki potensi sebagai antibakteri untuk bakteri *E.coli* sedangkan untuk isolat jamur K.14.43 memiliki potensi antibakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

Untuk aktivitas antibakteri MDR *E. coli* dan *S.aureus* yang diperoleh dari ekstrak jamur simbiosis spons isolat K.14.43 pada konsentrasi 500 µg/disk 2.25 ± 0.495 untuk bakteri uji MDR *E.coli* dan 2.78 ± 0.071 untuk bakteri uji MDR *S.aureus*.

Berdasarkan identifikasi secara mikroskopis dan morfologi, spons K.14.43 adalah jenis spons *Xestospongia* sp. dalam kelas Demospongiae.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada dosen-dosen Ilmu kelautan Universitas Diponegoro yang telah memberikan pengarahan dan petunjuk dalam jurnal ilmiah ini serta semua pihak yang telah memberikan bantuan dan fasilitas dalam penulisan jurnal ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

Arikunto, 1993, Prosedur Penelitian, Suatu Pendekatan Praktek, Edisi Kesembilan, Rineka Cipta, Jakarta.

Collin .R., Diaz .M. C., Norenburg. J., Rocha. R. M., Sanchez. J. A., Schulze .J. A., Schwartz .M., and Valdes .A.. 2005 . Photographic Identification Guide to Some Common Marine Invertebrates of Bocas Del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science*, Vol. 41, No. 3, 638-707.

Ernawati. 2007. Penapisan dan Fraksinasi Senyawa Antibakteri dari Rumput Laut Bulu Ayam. Institut Pertanian Bogor, Bogor, 88 hlm.

- Garson, M.J.1994. The Biosynthesis of Spons Secondary Metabolites: Why is Important, *Time and Space*. van Soent, van Kempen and Brackma (Eds).1994. Balkema, Rotterdam, 427-440.
- Hunt, B., and A.C.J. Vincent. 2006. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceu-ticals. *Ambio*, 35(2):57-64.
- Muniarsih. 2003. Metabolit Sekunder dari Spons Sebagai Bahan Obat-Obatan Oseana. 28(3):27-33
- Proksch, P., R.A. Edrada and R. Ebel. 2002. Drugs from the Seas – Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*59 : 125-124 hlm.
- Sastroasmoro, S. 2005. Using Cyprofloxantin in Indonesia. *Indonesia HTA*. 1-28 hlm.
- Soest R.W.M. Van, Braekman J.C., 1999 - Chemosystematics of Porifera: a review. *Mem. Queensl. Mus.*, 44: 569-598.
- Suryabrata, S. 1983. Metode Penelitian. PT. Radjawali, Jakarta.
- Terkina, I.A., V.V. Parfenova, and T.S. Ahn. 2006. Antagonistic activity of actinomycetes of Lake Baikal. *Biochemistry and Microbiology*. 42 : 173-176 hlm.
- Uriz .M.-J., Turon Xavier., Mikel A. Becerro., and Agell Gemma. 2003. Siliceous Spicules and Skeleton Frameworks in Spons: Origin, Diversity, Ultrastructural Patterns, and Biological Functions. *Microscopy Research And Technique* 62:279–299 hlm.
- Volk, W.A and M.F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Edisi Kelima. Jilid 1. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Wiese J, Birgit Ohlendorf, Martina Blümel, Rolf Schmaljohann and Johannes F. Imhoff. 2011. Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Spons *Tethyaaurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites.*Mar. Drugs*.9 ; 562 – 564.