

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI METANOL DARI EKSTRAK BAKTERI SM4 YANG BERSIMBIOSIS DENGAN SPONS *Stylissa massa*

Received:
22nd August 2022,
Accepted:
08th August 2023
Published:
15th September 2023

DOI: 10.32938/jcsa.v1i2.3164

Fransiskus Xaverius Naimuni¹, Jefry Presson^{1*}, Sefrinus Maria Dolfi Kolo¹ dan Lukas Pardosi²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor, Kefamenanu, Indonesia.

²Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor, Kefamenanu, Indonesia.

*Email: pressontimor@gmail.com

Abstrak

Spons *Stylissa massa* merupakan salah satu sumber daya laut Indonesia yang berpotensi sebagai sumber antibakteri. Bakteri telah diketahui berasosiasi dengan spons dan memiliki kemampuan antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi metanol pada bakteri simbiosis spons *Stylissa massa* dan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Metode yang digunakan untuk isolasi spons adalah metode pengenceran berseri dan fraksinasi menggunakan 2 pelarut yaitu metanol dan diklorometan. Sedangkan Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram sedangkan identifikasi senyawa menggunakan GC-MS. Penelitian ini menggunakan isolat Bakteri SM4 ekstrak metanol dan menunjukkan adanya kemampuan terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Analisis GC-MS menghasilkan 50 puncak dengan 3 senyawa dominan yaitu senyawa *Phthalic acid*, 2-isopropylphenyl methyl ester sebanyak 5,17%, senyawa m-Toluic acid, TMS derivative sebanyak 4,37% dan senyawa 2,4 Dihydroxybenzaldehyde, 2 TMS derivative sebanyak 3,17. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol isolat bakteri SM4 terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E.coli* tergolong sangat kuat, dengan diameter zona hambat berturut-turut adalah 10,92 dan 11,62 mm.

Kata kunci: Antibakteri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Spons, *Stylissa massa*

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan kawasan kepulauan terbesar di dunia yang terdiri atas sekitar 18.000 pulau besar dan kecil. Indonesia memiliki wilayah laut yang luas sekitar 3,1 juta km teritorial laut, serta Luas laut Zona Ekonomi Eksklusif (ZEE) 2,7 juta km. Indonesia dikenal sebagai negara yang memiliki kekayaan dan keanekaragaman hayati (biodiversitas) laut terbesar di dunia. Keanekaragaman yang dimiliki berupa ekosistem pesisir seperti mangrove, terumbu karang, padang lamun, beserta golongan biota laut lainnya seperti perikanan, moluska, krustacea, spons, alga dan kura-kura.

Nusa Tenggara Timur (NTT) merupakan salah satu provinsi kepulauan di Indonesia yang memiliki luas laut sekitar 200.000 km, dengan hamparan laut yang luas menjadikan laut NTT kaya akan potensi sumber daya laut¹. Berdasarkan data Dinas Kelautan dan perikanan provinsi NTT pada tahun 2016, laut NTT memiliki 500 jenis trumbu karang, 300 jenis ikan dan 3 jenis kura-kura. Hal ini yang

menjadikan Sumber daya laut utama NTT adalah Perikanan, Rumput laut, Trumbu karang dan Spons.

Spons merupakan salah satu biota laut yang sangat mungkin sebagai sumber senyawa bahan alam antara lain adalah flavonoid, terpenoid, peptide steroid, asetogenin, alkaloid dan senyawa nitrogen. Senyawa-senyawa ini memiliki aktivitas farmakologis seperti antifouling, antitumor, antiinflamasi, antivirus, antibakteri dan anti malaria². Spons juga menjadi salah satu alternatif utama akhir-akhir ini karena dapat berasosiasi dengan berbagai mikroba dan juga sebagai sumber senyawa bioaktif. Oleh karena itu pemanfaatan mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons lebih menguntungkan karena bakteri penghasil metabolit sekunder ini bersifat bioaktif dan lebih mudah dikulturkan dalam skala laboratorium dalam waktu yang relatif singkat³.

Peneliti terdahulu⁴ telah melakukan isolasi menggunakan *X. testudinaria* yang diambil dari perairan

Sorong, ditemukan senyawa metabolit dengan isolate Xp 4,2 yang mempunyai aktivitas terhadap bakteri gram negatif yaitu *Klebsiella pneumonia* dan *Escherichia coli* dengan nilai diameter hambatan >20. Ekstrak metanol dari spons *Agelas clathrodes* dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmaris* dan bersifat bakterisida terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode dilusi⁵. Hasil penelusuran literatur menunjukkan bahwa eksplorasi kemampuan antibakteri *Stylissa massa* masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penting untuk melakukan kajian tentang kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri Spons *Stylissa massa*.

2. Metodologi

2.1 Bahan

Sampel yang digunakan adalah spons *Stylissa massa*, pelarut metanol, media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB) Media Muller Hinton (MHA) aquades, Alkohol 70 %, tisu, kapas, aluminium foil, wrapping, spritus, bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

2.2 Alat

Alat yang digunakan yaitu Oven, pinset, mortal, alu, gelas kimia, mikro pipet, jarum ose, Bunsen, cawan petri, Erlenmeyer, rak dan tabung reaksi, timbangan analitik, inkubator, hot plate, batang pengaduk, autoklaf, jangka sorong, corong pisah, shaker dan alat Kromatografi Gas - Spektroskopi massa (GC-MS).

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel

Spons *Stylissa massa* diambil dari perairan Oenggae, Pulau Rote, Nusa Tenggara Timur. Sampel diambil pada kedalaman 6 meter dengan jarak 600 meter dari garis pantai. Penyelaman dilakukan pada pukul 10:00 – 12:00 WIB Tanggal 31 Agustus 2019. Sampel kemudian dibersihkan dari material asing dan organisme lain lalu dimasukkan ke dalam kotak cool box, selanjutnya sampel disimpan dalam alat pendingin beku (*freezer*) agar tidak rusak.

2.3.2 Preparasi Sampel

Sampel spons diambil kemudian dicuci menggunakan aquades kemudian dipotong seperti dadu, dan dihaluskan menggunakan mortal.

2.3.3 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan pengenceran berseri. Sebanyak 1 g sampel ke dalam 9 mL aquades steril, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , sampel digojok atau divortex hingga homogen. Sebanyak 1 mL hasil pengenceran 10^{-1} , dipindahkan ke dalam 9 mL aquades steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} sampel digojok atau divortex hingga homogen. Hasil pengenceran

diambil 35 μ l kemudian ditanam ke permukaan media nutrient agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam⁶.

2.3.4 Uji Antagonis Bakteri Symbion Terhadap Bakteri Patogen

Suspensi bakteri symbion dibuat dengan dengan mengambil isolat menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Suspensi bakteri symbion yang telah disiapkan, dipipet 10 mikroliter lalu ditetesi pada kertas cakram yang telah ditempatkan di permukaan media uji. Media uji kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengujian antibakteri pada spons ini tujuannya adalah untuk menapis spons yang memiliki potensi menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antibakteri. Pengujian ini dilakukan dengan cara melihat aktivitas hambat bakteri symbion terhadap bakteri uji. Bakteri target yang digunakan adalah bakteri patogen *Escherichia coli* dan juga *Staphylococcus aureus*⁷.

2.3.4 Kultur Bakteri dan Ekstraksi Senyawa Bioaktif Isolat Bakteri SM4

Isolat bakteri terpilih SM4 ditumbuhkan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian diambil 1 lup ose isolat SM4 dan dikulturkan ke media NB, selanjutnya di shaker selama 72 jam.

2.3.5 Fraksinasi Ekstrak Bakteri

Ekstrak difraksinasi dengan teknik partisi cair-cair menggunakan pelarut metanol dengan pemisahan menggunakan corong pisah. Ekstrak tersebut kemudian diuapkan menggunakan hot plate hingga mendapat ekstrak kental yang kemudian di pakai untuk uji aktivitas antibakteri⁸.

2.3.6 Uji Antibakteri

Sebanyak 15 mL nutrient agar (NA) dimasukkan ke cawan petri yang sudah steril, media dibiarkan hingga memadat, selanjutnya digoreskan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada permukaan media. Kertas cakram steril direndam pada larutan uji ekstrak metanol kemudian di tempelkan ke permukaan agar. Sebagai kontrol negatif digunakan metanol dan kontrol positif digunakan cakram kloramfenikol. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Selanjutnya cawan medium uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri diukur dimeternya menggunakan jangka sorong⁹.

2.3.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif Antibakteri

Fraksi metanol dari ekstrak bakteri SM4 dianalisis menggunakan GC- MS. Instrument dan kondisi kromatografi yang dilakukan pada system GC –MS QP 2010 plus. Sampel 8 μ l diinjeksikan ke mesin AOC-20i. Suhu yang digunakan pada oven adalah 80°C dengan suhu injeksi 250°C. Kecepatan aliran 1,46 mL/menit dan kecepatan linear 44,5cm/detik. Gas pembawa ialah helium bertekanan 100 kPa dan total laju 588,8mL/menit dan spilt rasio sebesar 400. Semua

komponen akan dielusasi dan di deteksi menggunakan detektor massa. Spektrum komponen senyawa yang sudah diketahui akan tersimpan di library NIST yang akan menentukan namasenyawa dan berat molekul¹⁰.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Karakteristik Spons

Spons diambil dari Perairan Oenggae, Pulau Rote Nusa Tenggara Timur (NTT) pada kedalaman 2–10 meter. Sampel yang diambil lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik yang telah diisi air laut dan dimasukkan ke dalam cool box. Sampel yang diambil di Pulau Rote, merupakan spons *Stylissa Massa*. Telah dijelaskan bahwa spons *Stylissa massa* adalah spons yang memiliki tubuh yang keras seperti batu dan memiliki warna orange dengan ukuran panjang tubuh 7-20 cm dan diameter 5– 11 cm.



Gambar 1. Spons *Stylissa massa* Oenggae-Pulau Rote

3.2 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Simbion

Bakteri simbion adalah jenis bakteri yang dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan induknya. Metabolit sekunder dapat diperoleh dengan cara mengisolasi bakteri simbion tersebut. Tujuan dari isolasi adalah untuk memperoleh isolat bakteri simbion pada sampel spons laut¹¹. Berdasarkan hasil isolasi diperoleh isolat dengan kode SM4 dari *Stylisa massa*.



Gambar 2. Isolat Bakteri SM4

Jenis bakteri SM4 yang diperoleh dari hasil isolasi spons *Stylissa massa* diidentifikasi berdasarkan morfologi, ukuran, warna dan bentuk koloni (Tabel 1). Dasar isolasi tersebut memungkinkan adanya perbedaan spesifik aktivitas dari masing masing isolat yang akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Hasil isolasi dan pemurnian bakteri simbion ditampilkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri SM4 yang Diisolasi dari Spons *Stylissa massa*

Kode Isolat	Warna	Bentuk Koloni	Elevasi	Ukuran	Tepi Koloni
SM4	Kuning	Bulat	Datar	Kecil	Rata

Berdasarkan data pada Tabel 1, jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu, secara umum karakteristik morfologi dari mikroba yang berasosiasi dengan spons *Stylissa massa* memiliki kemiripan. Hasil karakterisasi morfologi mikroba yang berasosiasi dengan spons *Stylissa massa* dalam penelitian terdahulu¹² memperlihatkan bentuk koloni tidak beraturan, warna kuning, ukuran kecil, tepi koloni bergelombang dan ketinggiannya datar. Penelitian lain¹¹ juga menunjukkan hasil yang mirip dengan peneliti sebelumnya. Hasil karakterisasi morfologi isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons *Stylissa massa* memiliki warna koloni yang bervariasi mulai dari orange, kuning hingga putih. Selain itu berbentuk bundar dengan inti ditengah, tepian isolat tampak licin, tidak beraturan dan berlekuk dengan elevasi cembung, hingga elevasi seperti tetesan timbul dan berbukit bukit.

3.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Isolat Bakteri Potensi SM4

Medium agar yang telah dibuat dan memadat selanjutnya dijadikan sebagai tempat untuk membiakkan bakteri uji yaitu *S. aureus* dan *E. coli*. Kedua bakteri kemudian digoreskan pada medium yang telah disediakan dan diletakkan kertas cakram di atasnya yang sebelum itu telah direndam dalam sampel larutan uji ekstrak metanol, kontrol positif (kloromfenikol 30 µg) dan kontrol negatif (pelarut metanol). Campuran bakteri dan sampel tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam, pada suhu 37°C, setelah itu diukur zona diameter sampel terhadap bakteri uji dengan menggunakan jangka sorong. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol SM4 spons *Stylissa massa* menggunakan metode difusi cakram. Kekuatan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya zona bening disekitar cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol terhadap bakteri uji di tunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Pengukuran diameter zona hambat sampel terhadap bakteri uji

Ulangan	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	9,90	11,90
2	9,97	12,36
3	12,89	9,12
Rata-rata	10,92	11,16
Kontrol Positif	18,76	19,94
Kontrol Negatif	0	0

Berdasarkan data pada Tabel 1 di atas menunjukkan bahwa ekstrak senyawa bioaktif yang dihasilkan dari isolate bakteri SM4 dengan menggunakan pelarut metanol dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Gambar 3).

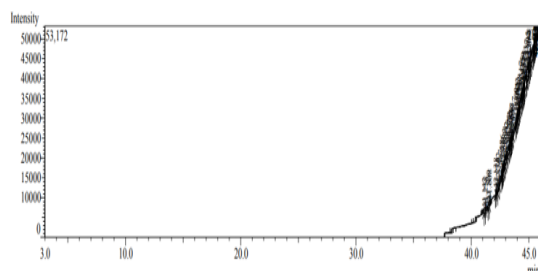


Gambar 4. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol menunjukkan adanya kemampuan daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara berturut – turut adalah 10,92 mm dan 11,16 mm.

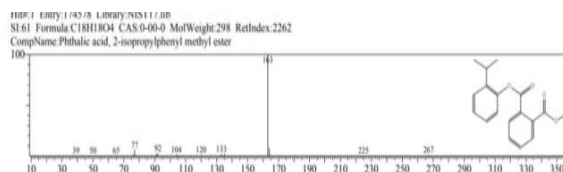
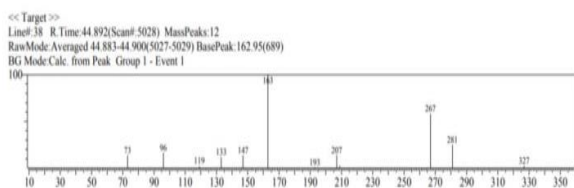
3.4 Analisis Senyawa Bioaktif dengan GCMS

Hasil analisis senyawa bioaktif antibakteri ekstrak metanol SM4 pada Spons *Stylissa massa* menggunakan instrument GC – MS ditunjukkan pada gambar berikut (Gambar 4).



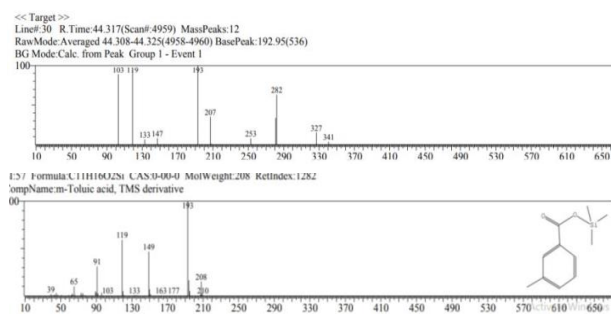
Gambar 4. Kromatogram ekstrak diklorometana spons *Stylissa massa*

Senyawa yang memiliki kelimpahan besar adalah senyawa dengan rumus molekul $C_{18}H_{18}O_4$ dengan waktu retensi 44,895 menit (Gambar 5). Data spektrum menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 267 diikuti puncak – puncak fragmentasi pada m/z 163 dan 133. Data spektrum Phthalic acid, 2-isopropylphenyl methyl ester dengan nama IUPAC 1-metil 2[2(propan-2-ilfenil)] benzena – 1,2 dikarboksilat sebanyak 5,17%. Senyawa ini banyak terdapat pada Rumput Teki yang efektif sebagai anti inflamasi, anthelmintik, antioksidan, antimikroba dan sifat aktivitas antikanker termasuk dalam golongan Flavanoid dengan mekanisme kerja diantaranya menghambat sintesis asam nukleat menghambat fungsi membran sitoplasma dan menghambat metabolisme energi dari bakteri. Seperti infeksi, panas, cedera dan terkena racun¹³.



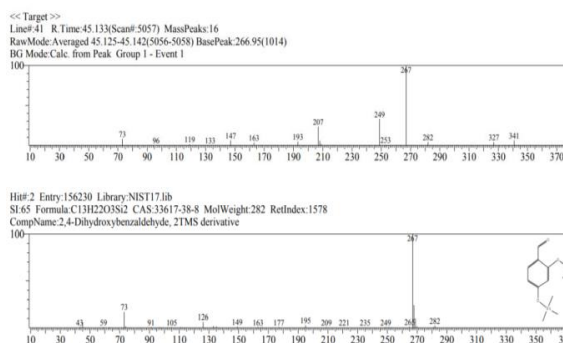
Gambar 5. Spektra massa pada waktu retensi 44.895

Puncak dengan waktu 44.895 menit merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{11}H_{16}O_2Si$. Data spektrum menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 207 diikuti puncak puncak fragmentasi pada m/z 193, 133 dan 119. Perbandingan data spektrum yang diperoleh dengan data spektrum pada library yang lebih mendekati adalah senyawa m-Toluic acid, TMS derivat dengan nama IUPAC Asam metil benzoat sebanyak 4,37% dengan spektra seperti Gambar 5. Senyawa m-Toluic acid, TMS derivat kebanyakan terdapat di tumbuhan seperti pada daun jengkol yang sudah pernah diisolasi dan senyawa ini mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, antibakteri, antifouling, antivirus, antiparasit dan lainnya termasuk dalam golongan fenolik metil galat. Flavonoid juga termasuk dalam salah satu senyawa fenol yang memiliki metabolisme sekunder pada tumbuhan yang berfungsi sebagai antioksidan. Mekanisme kerja senyawa fenol adalah mendenaturasi protein sel bakteri, sehingga menyebabkan semua aktivitas metabolisme sel bakteri terhenti⁸.



Gambar 6. Spektra massa pada waktu retensi 44.317

Waktu retensi 45.317 merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{13}H_{22}O_3Si_2$. Data fragmentasi pada m/z 267, 249, 163 dan 73. Data spektrum yang diperoleh pada library yang mendekati adalah 2,4 Dihydroxybenzaldehyde, 2TMS derivat sebanyak 3,56% dengan spektrum seperti Gambar 6.



Gambar 7. Spektra massa pada waktu retensi 45.135

Senyawa 2,4 Dihydroxybenzaldehyde, 2 TMS derivat kebanyakan terdapat di Jeroan Teripang sehingga berpotensi sebagai Sumber antioksidan alami kategori sedang dan aktivitas antibakteri, termasuk dalam golongan saponin dapat menghambat atau membunuh dengan cara berinteraksi dengan membran sterol. Efek utama saponin adalah adanya pelepasan protein dan enzim dalam sel¹⁴.

4. Kesimpulan

Ekstrak metanol SM4 pada spons *Stylissa massa* asal pulau Rote NTT yang dianalisis menggunakan GC-MS menghasilkan 3 senyawa Phthalic acid, 2 isopropylphenyl methyl ester, m-Toluic acid, TMS derivat, 2,4 Dihydroxybenzaldehyde, 2TMS derivat dengan kelimpahan berturut turut 5,17%, 4, 37 % dan 3,14%. Hasil uji aktivitas antibakteri metanol SM4 terhadap bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* tergolong sangat kuat yang dibuktikan dengan diameter zona hambatnya 10,92 dan 11,16 mm.

Daftar Pustaka

- (1) BPS. 2019. "Badan Pusat Statistik, Nusa Tenggara Timur. 2018 Keanekaragaman Biota Laut Dalam Angka Tahunan. BPS NTT." 2(2): 12.
- (2) Pasodung, Aditya et al. 2018. "Uji Aktivitas Antibakteri Spons Plakortis Sp. Yang Dikoleksi Dari Perairan Bunaken." Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis 6(1): 44.
- (3) Cita, Yatnita Parama, Achmad Suhermanto, Ocky Karna Radjasa, and Pratiwi Sudharmono. 2017. "Antibacterial Activity of Marine Bacteria Isolated from Sponge Xestospongia Testudinaria from Sorong, Papua." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7(5): 450–54.
- (4) Cita, Y. P., Radjasa, O. K., & Sudharmono, P. (2016). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri X2 Yang Berasosiasi Spons Xestospongia Testudinaria Dari Pantai Pasir Putih Situbondo Terhadap Bakteri Pseudomonas Aeruginosa. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 14(2), 206–211.
- (5) Medeiros, Maria Augusta et al. 2006. "(-)-Agelasidine A from Agelas Clathrodes." Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 61(7–8): 472–76.
- (6) Samirudin, Shaiful Anwarrudin, Aswan Akbardin Layn, Nur Arfa Yanti. 2018. "Screening Bakteri Yang Bersimbiosis Dengan Jenis Spons Petrosia Sp. Sebagai Penghasil Antibakteri Dari Perairan Tamann Nasional Wakatobi." 7(1): 43.
- (7) Setyati, Wilis Arie et al. 2016. "Skrining Dan Seleksi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Ekstraseluler Sebagai Agen Bioremediasi Bahan Organik Dan Biokontrol Vibriosis Pada Budidaya Udang." Jurnal Kelautan Tropis 19(1): 11.
- (8) Nuria, Maulita Cut, Zumrotul Chabibah, Syahar Banu, and Risha Fillah Fithria. 2014. "Penelusuran Potensi Fraksi N- Heksandan Etil Asetat Dari Ekstrak Metanol Daun Gugur Ketapang." e-Publikasi Ilmiah Fakultas Farmasi Unwahas Semarang 2: 163–73.
- (9) Fajrina, A., Dinni, D., Bakhtra, A., & Irenda, Y. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Spons Aplysina Aerophoba Pada Helicobacter Pylori Dan Shigella Dysenteriae. Jurnal Farmasi Higea, 10(2), 134–142.
- (10) Mahmiah, G. W. Sudjarwo, and F. Andriyani. 2017. "Skrining Fitokimia Dan Analisis GC-MS Hasil Fraksi Heksana Kulit Batang Rhizophora Mucronata L." Seminar Nasional Kelautan XII (2016): 44–51.
- (11) Pahriyani, A., & Wardani, E. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Symbion Dari Spons Laut Yang Berpotensi Sebagai Antimikroba.
- (12) Efendi. (2019). Skrining Aktivitas Antimikroba Bakteri Endosymbion Spons Laut Yang Dikoleksi Dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, Dki Jakarta.
- (13) Abu-Serag, N. A., N. I. Al-Garaawi, A. M. Ali, and M. A. Alsirrag. 2019. "Analysis of Bioactive Phytochemical Compound of (Cyperus Aucheri Jaub.) by Using Gas Chromatography -Mass Spectrometry." IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 388(1): 0–11.
- (14) Oktaviani, Dewi, Yeni Mulyani, and Emma Rochima. 2015. "Aktivitas Antioksidan Dan Antibakteri." VI(2): 1–6.