

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang terkenal sebagai negara kepulauan terbesar di dunia, terletak di daerah tropis dengan keanekaragaman hayati organisme laut tertinggi (Rintelen *et al.*, 2017). Keanekaragaman biota laut juga mencerminkan keanekaragaman struktur senyawa bioaktif. Senyawa metabolit sekunder hanya dihasilkan oleh organisme tertentu. Hasil kajian literature pada tahun 2018 memaparkan bahwa senyawa bioaktif baru yang dapat diperoleh dari biota laut seperti spons, tunikata dan mikroorganisme. Selain itu, senyawa bahan alam laut yang di laporkan terjadi peningkatan senyawa baru yang berhasil diisolasi dari bakteri, fungi, yang dimana secara berurutan mengalami peningkatan 22%, 61% dan 85% (Setiawan & Hendri, 2022). Diantara sekian banyak biota laut, Salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa metabolit terbanyak adalah spons.

Spons merupakan organisme laut invertebrata yang termasuk dalam filum *Porifera*. Sebagai salah satu hewan primitif, spons memiliki sifat hidup menetap dan berfungsi sebagai filter feeder. Selain itu, spons diketahui menghasilkan berbagai senyawa aktif yang memiliki potensi besar sebagai bahan baku obat-obatan, sehingga menarik perhatian dalam penelitian farmasi dan bioteknologi (Sadarun *et al.*, 2018; Sahidin *et al.*, 2018). Spons merupakan tempat hidup bagi mikroorganisme yang dapat mencapai 40% dari volume massa spons (Kim *et al.*, 2013). Spons dikenal sebagai mikroorganisme yang besar, yang terdiri dari persentase yang signifikan 50-60% dari biomassa spons (P. Li *et al.*, 2023). Hal ini terlihat dari lebih dari 6.000 zat bioaktif yang telah diisolasi dari biota laut selama 3 dekade terakhir dan 40% berhasil diisolasi dari fungi (Imorhf *et al.*, 2002; Engel *et al.* 2002).

Beberapa senyawa metabolit dari mikroba simbiosis spons laut termasuk 8-O-metyltetrangomycin dari fungi *Streptomyces* sp. (Jabila Mary *et al.*, 2021), diethyl phthalate dari fungi *Brevibacterium casei* strain, asam lemak, asam oleat, dan senyawa fenolik yang berhasil diekstraksi dari bakteri *Vibrio* sp. dan *Bacillus* sp. Beberapa penelitian melaporkan bahwa Spons mengandung senyawa kimia yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis, seperti antivirus, antijamur, antibakteri, antimalaria, antiinflamasi, analgesik, antiproliferasi, antioksidan, anti-inflamasi, anti-supresif (Mahfur, Kamila, *et al.*, 2023; Shady *et al.*, 2019; Shady *et al.*, 2021) aktivitas sitotoksik, (Shaala & Youssef, 2021) antioksidan (Hikmawan *et al.*, 2020) antioksidan (Handayani & Artasasta, 2021) antimikroba (Goel *et al.*, 2021). Walaupun eksplorasi spons sebagai sumber senyawa bioaktif berpotensi mengancam kelangsungan



hidup spons karena keterbatasannya, hal ini dapat dihindari dengan mengisolasi mikroorganisme simbiotik yang hidup bersimbiosis dengan spons laut, seperti fungi (Brinkmann *et al.*, 2017; Handayani & Artasasta, 2017; Hikmawan *et al.*, 2020).

Fungi simbion pada spons dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder, hal ini dikarenakan adanya transfer genetik Simbiosis antara fungi dan spons terjadi pada sitoplasma sel tubuh spons (Casertano *et al.*, 2020). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa simbiosis ini berpotensi menghasilkan senyawa dengan aktivitas antibakteri dan sitotoksik (Brinkmann *et al.*, 2017). Beberapa fungi yang ditemukan dalam simbiosis dengan spons antara lain *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, dan *Penicillium* sp. (Setyowati *et al.*, 2018). Fungi menghasilkan berbagai metabolit sekunder, termasuk senyawa fenolik, poliketida, terpena, dan steroid, yang berkontribusi terhadap sifat antimikrobanya. Senyawa-senyawa ini menunjukkan aktivitas antibakteri, antivirus, dan antijamur, menjadikan fungi sebagai sumber antimikroba alami (Gemechu, 2024). Pada penelitian yang dilakukan oleh Kacombo *et al* (2018), fungi yang berasosiasi dengan spons memiliki aktivitas antibakteri dapat dilihat dengan adanya zona hambat yang terbentuk dengan diameter zona hambatan sebesar 9 mm pada bakteri *S. aureus* dan *E.coli* sebesar 6 mm yang dikategorikan sedang, sedangkan untuk zona hambat yang terbentuk pada jamur *Candida albicans* sebesar 15,8 mm termasuk dalam kategori kuat. Penelitian sebelumnya yang mengeksplorasi aktivitas antimikroba dari bakteri simbion spons telah dilaporkan oleh Abubakar *et al.*, (2012), baru 45.71% yang berhasil diisolasi dari spons. Selain itu juga, terdapat fungi simbion spons yang dilaporkan mampu menghambat beberapa pertumbuhan mikroba seperti bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan daya hambat (6.1 mm), *Staphylococcus aureus* 12.3 mm, *Escherichia coli* 20.7mm, *Candida albicans* 13.4 mm (Orfanoudaki *et al.*, 2021).

Berdasarkan uraian diatas, maka diharapkan fungi simbion yang diisolasi dari spons laut yang berasal dari perairan wilayah pulau maginti, Kabupaten Muna Barat, Sulawesi Tenggara, Indonesia, dapat dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

1.2. Rumusan Masalah



1. Apakah fungi simbion yang diisolasi dari spons dari perairan Pulau Sulawesi Tenggara, Indonesia memiliki aktivitas antibakteri.
2. Bagaimana identifikasi molekuler fungi simbion dari spons sebagai senyawa antibakteri.

1.3. Tujuan Penelitian

1. Memperoleh dan Mengetahui isolat fungi simbiosis spons (*Spongia porifera*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.
2. Mendapatkan karakteristik molekuler Isolat fungi simbiosis spons sebagai penghasil senyawa antibakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Aspek pengembangan ilmu

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang manfaat Fungi Simbiosis yang diisolasi dari spons laut sebagai penghasil senyawa antibakteri.
- b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan rujukan penelitian terkait senyawa bioaktif yang dapat berfungsi sebagai antibakteri.

1.4.2 Aspek Aplikasi

- a. Memanfaatkan potensi senyawa bioaktif dari fungi simbiosis yang diisolasi dari spons laut sebagai antibakteri.
- b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat tentang penggunaan isolat fungi simbiosis spons sebagai antibakteri.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1. RANCANGAN PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental di laboratorium

2.2. LOKASI DAN WAKTU

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi, Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin Makassar 2024.

2.3. ALAT DAN BAHAN

2.3.1 Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: autoklaf (Memmert SN30), BSC, lemari asam (LPI), Oven (Memmert UN55), Inkubator shaker (IKA HS 501), sentrifugasi (Joan Lab), Ultrasonic cleanser (BK-2000), *rotary evaporator* (Heidolph G3), Penangas air (Memmert), timbangan digital, kompor listrik, lampu UV 254 nm dan 366 nm, cawan petri (Pyrex), cawan porselin (Pyrex), corong pisah (Pyrex), chamber, desikator, gelas kimia (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), mikropipet (Dragon Lab), plat silika gel 60 RP-18 F₂₄₅^S, plat silika gel 60 F₂₅₄.

2.3.2 Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spons, air laut steril, aquadest, asam sulfat 10% (H₂SO₄), aluminium klorida (AlCl₃), alkohol 70%, *chloramphenicol*, etil asetat, n-heksan, methanol, media Potato Dextrose Agar (PDA), media Nutrient Agar (NA), media Potato Dextrose Broth (PDB) dan Ekstrak yeast, kit Quik-DNA Magbead plus kit, kit May Tag Hs Red Mix 2x, Mikroba uji (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Candida albican*).

2.4. PROSEDUR KERJA

2.4.1. Pengambilan Sampel

Sampel spons diambil di wilayah Perairan Pulau Maginti, Kab.Muna Barat, Provinsi Sulawesi Tenggara dengan kedalaman 4-10 meter dibawah permukaan laut dengan menggunakan Teknik Free diving dengan titik koordinat (garis lintang -4,841776) dan (garis bujur 122,18977).

2.4.2 Determinasi Sampel

Sampel spons yang diperoleh dari perairan Pulau Maginti, Kab. Muna Barat, Provinsi Sulawesi Tenggara, Indonesia. Dilakukan Determinasi di gi Laut, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas sar, untuk memastikan identitas spons.

i Simbion Spons

1 fungi simbion yang bersimbiosis dengan spons dilakukan baran menurut Madigan (2012). Sebanyak 1 gram sampel sterilisasi permukaannya di potong kecil-kecil lalu dimasukan



10 mL air laut steril lalu di vorteks, sehingga diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan untuk seri 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Dari masing-masing seri pengenceran kemudian diambil 100 μ L dan disebarkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media PDA dan diinkubasi pada ruang selama 5 sampai 7 hari (Castly *et al.*, 2018).

2.4.4. Pemurnian Isolat Fungi Simbion

Setiap isolat fungi simbion yang tumbuh dipilih dan di pisahkan satu-satu, masing- masing dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi medium PDA, dengan menggunakan jarum Ose kemudian di inkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari dan diamati bentuk, permukaan dan warna koloni.

2.4.5. Uji Antagonis Isolat Fungi Simbion

Dilakukan skrining uji aktivitas antibakteri dengan uji antagonis dengan metode blok agar menggunakan bakteri uji yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UNHAS diantaranya *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Media agar isolat fungi simbion yang telah diinkubasi selama 7 hari dipotong menggunakan perforator media menjadi potongan kecil, kemudian diletakkan pada media *Nutrient agar* yang mengandung bakteri uji. Kemudian diamati diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar blok agar setelah masa inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 25°C (Rante *et al.*, 2022).

2.4.6 Fermentasi dan Ekstraksi Metabolik Sekunder Isolat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04

Isolat aktif yang diperoleh dari hasil uji antagonis dibuat larutan Starter dalam erlenmeyer 250 ml dan mengandung 150 ml media *Potato dextrose yeast* dan Inkubasi pada suhu 25°C selama 6 hari, dilakukan dengan menggunakan metode inkubasi shaker (Mahfur, Mahbub, et al., 2023). Selanjutnya Larutan Starter dipindahkan sebanyak 10% ke dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi 200 ml dan 10% dimasukkan dalam media PDY. Selanjutnya Cairan fermentasi dan sampling dimasukan kedalam Sheker incubator dengan kecepatan 150 rpm selama 12 hari dan cairan fermentasi di sheker selama 20 hari. Setelah cukup masa fermentasi, media fermentasi disonikasi untuk memecah dinding sel fungi sehingga diperoleh senyawa metabolik sebagai antibakteri. Setelah proses sonikasi, selanjutnya media fermentasi disaring untuk memisahkan supernatan dan biomassa. Supernatan diekstraksi dengan etil asetat sebanyak dua kali dengan perbandingan 1:1 V/V , dalam corong pisah selama 30 menit hingga terdapat pemisahan antara fase etil dan fase air, sedangkan untuk biomassa di



étode maserasi menggunakan pelarut metanol, selanjutnya r hingga mendapatkan ekstrak kental lalu disimpan dalam ikukan pengujian selanjutnya (Rante et al 2022).

Antibakteri

asetat isolat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04, ekstrak air mgt 3-03 dan mgt 4-04 , ekstrak biomassa isolat fungi simbion

mgt 3-03 dan mgt 4-04 dan ekstrak etil spons mgt 3 dan mgt 4 yang diperoleh dibuat konsentrasi 10%,5%,2,5% dan 1,25%. dan dilakukan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar. Sebanyak 20 μL dari setiap ekstrak ditetaskan pada kertas cakram diameter 6 mm. Setelah pelarut menguap, masing-masing kertas cakram diletakkan dipermukaan medium nutrient agar yang telah diinokulasi mikroba uji pada cawan terpisah untuk masing-masing bakteri uji. Diameter zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi diukur diameternya (Boluiri,2016).

2.4.8. Identifikasi Profil Metabolit Sekunder ekstrak Isolat Fungi Simbion mgt 3-03 dan ekstrak isolat fungi simbion mgt 4-04

Pada pengujian ini digunakan plat silika gel 60 RP-18₂₅₄^s sebagai fase diam dan fase gerak digunakan eluen N-heksan : etil asetat (4 :1 v/v). Lempeng KLT yang akan digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan pada suhu 110°C selama 30 menit. Masing-masing ekstrak spons, ekstrak etil asetat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04 dan ekstrak air isolat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04 ditotolkan pada lempeng dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan beberapa menit hingga kering lalu dimasukkan ke dalam chamber yang sudah jenuh dengan cairan pengelusi. Kemudian lempeng KLT dikeluarkan dan diamati dibawah lampu UV 254 dan 366 nm, serta pereaksi semprot yang digunakan asam sulfat 10% (Mahfur et al.,2023).

1.4.8.1 KLT- Biautografi ekstrak etil asetat isolat fungi simbion mgt 3-03 dan ekstrak etil asetat isolat fungi simbion mgt 4-04

Pada pengujian ini dilakukan KLT-bioautografi kontak langsung untuk identifikasi senyawa antibakteri ekstrak etil asetat isolat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04. Digunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ dengan eluen n-heksan: etil asetat (4:1). Plat yang digunakan dijenuhkan terlebih dahulu pada suhu 110 °C selama 30 menit. Kemudian ekstrak etil asetat mgt 3-03 dan mgt4-0 ditotolkan pada plat dan dielusi. Setelah dielusi pada plat KLT diletakkan diatas media nutrient agar yang telah diinokulasikan bakteri uji dan didiamkan selama 1 jam untuk memungkinkan proses difusi terjadi. Selanjutnya plat diangkat dari media Na diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati diameter zona hambat yang terbentuk (Widayanti & Widjajanti, 2018).

2.4.9 Identifikasi Molekuler *Polimerasi Chain Reaction* (PCR)

2.4.9.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan kit Quick-DNA Magbead Plus Kit. Isolat fungi simbion mgt 3-03 dan mgt 4-04, diambil dan alam buffer lisis sesuai petunjuk kit yang digunakan. Masukkan buffer lisis yang disediakan dalam kit ke dalam sampel vial. Vial kemudian dikawatirkan. Buffer ini berfungsi untuk membantu memecah melepaskan DNA ke dalam larutan. Selanjutnya dilakukan uji kamar untuk waktu yang ditentukan berdasarkan petunjuk



Kit. Kemudian tambahkan beads magnetik yang disediakan dalam kit ke dalam larutan lisis. Beads ini berfungsi untuk mengikat DNA sehingga memudahkan pemisahan DNA dari komponen lain. Aduk atau vorteks untuk memastikan beads terdistribusi merata, letakkan tabung ekstraksi di rak magnetik yang disediakan. Beads magnetik tertarik ke dinding tabung, sedangkan larutan yang mengandung DNA berada diluar area magnetik. Buang larutan yang tidak mengandung DNA (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Selanjutnya lakukan pencucian DNA dengan menambahkan buffer pencuci (alkohol) kedalam tabung untuk membersihkan beads dari kontaminan yang mungkin ada dan cuci beberapakali sesuai petunjuk kit. Tambahkan buffer elusi yang disediakan dalam kit ke beads magnetik untuk mengeluarkan DNA dari beads dan pindahkan larutan DNA ke tabung baru. Setelah DNA terisolasi diperiksa kualitas DNA menggunakan nanodrop untuk mengetahui ada tidaknya kontaminan (Stackebrandt & Goebel, 1994).

2.4.9.2 Amplifikasi Gen 18S rRNA

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak gen ITS (Internal Transcribed Spacer) rDNA. Amplifikasi pada sampel DNA hasil isolat menggunakan primer ITS 1 (forward) dan primer ITS 4 (reverse) dengan urutan basa ITS1: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3' dan ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TATGC-3'. Adapun Komposisi larutan untuk PCR master mix yaitu terdiri atas 12,5 μ l My Taq HS Red Mix (2x), 1 μ l primer ITS1 10 μ M, 1 μ l primer ITS4 10 μ M, 25 μ l dd H₂O dan 10 μ l DNA template setiap larutan dihomogenisasi hingga tercampur rata. Untuk mengamplifikasi daerah ITS rDNA proses PCR dilakukan dengan kondisi tiap siklus yaitu tahap predenaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 10 menit, aneling pada suhu 52 °C selama 15 menit, DNA ekstensi pada 72 °C selama 15 menit untuk total 35 siklus dan langkah ekstensi akhir pada 4 °C selama 5 menit (Kumari *et al.*, 2021)., (Stackebrandt & Goebel, 1994).

2.4.9.3 Elektroforesis Gel Agarosa

Produk amplifikasi di visualisasi pada gel agarosa 0.8%. Adapun pembuatan gel agarosa dilakukan dengan menimbang gel agarosa sebanyak 0.8 gram dimasukkan dalam beaker gelas dan ditambahkan 100 mL buffer TBE (Tris-Borate-EDTA). Selanjutnya panaskan campuran agarosa dan buffer pada hot plate, aduk sesekali dan hati-hati untuk mencegah agarosa mendidih. Tuang larutan agarosa yang telah larut ke dalam gel casting tray yang telah dipasang dengan gel comb diposisi yang benar dan biarkan gel agarosa mengeras pada suhu kamar. Setelah gel mengeras, lepaskan comb dengan hati-hati untuk menghindari gelembung (Stackebrandt & Goebel, 1994).



Selanjutnya ditempatkan dalam ruang elektroforesis dan isi ruang dengan buffer TBE hingga menutupi gel sepenuhnya. Selanjutnya gunakan pipet untuk memuat sampel yang telah dicampurkan loading buffer ke dalam sumbu dengan hati-hati agar tidak melampaui batas sumbu. Sambungkan

elektroda ke sumber listrik dengan tegangan 80volt dan biarkan elektroforesis berjalan hingga loading buffer mencapai ujung gel. Setelah elektroforesis selesai matikan sumber listrik dan angkat gel dari ruangan elektroferesis dan lakukan visualisasi gel dibawah UV transilluminator dan diamati pita-pita DNA yang tampak pada gel (Stackebrandt & Goebel, 1994).

2.4.9.5 Analisis Filogenik

Data hasil sekuensing gen ITS rDNA isolat fungi simbion mgt 3-03 dan isolat fungi simbion mgt 4-04 dianalisis menggunakan BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) pada NCBI dengan menggunakan program MEGA 11.0 (*Free Charge*). Pohon filogenik dikontruksi dengan membandingkan sekuen gen yang diperoleh dari Genbank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan algoritme Neighbour Joining (*Tamura et al.2013*).





Optimized using
trial version
www.balesio.com