

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Spons

Spons diambil dari Perairan Oenggae, Pulau Rote Nusa Tenggara Timur (NTT) pada kedalaman sekitar 2-10 meter. Sampel spons yang diambil dicuci bersih kemudian disimpan didalam *coolbox*. Spons asal perairan Oenggae pulau Rote merupakan *Stylissa massa* (**Gambar 2**) memiliki bentuk yang tebal, berwarna oranye, permukaan yang tak teratur. Soest *et al.*, (2012) mengatakan *Stylissa massa* memiliki warna kuning muda sampai dengan oranye, berukuran panjang 7-20 cm, dan diameter 5-11 cm. Hal ini juga sependapat dengan Efendi (2019) pada penelitiannya menyatakan spons *Stylissa massa* merupakan spons yang berwarna kuning dengan ukuran 5-10 cm dan diameter 5-8 cm.

4.2 Uji Antagonis Bakteri Simbion Terhadap Bakteri Patogen

Uji Antagonis dilakukan dengan cara menguji aktivitas isolat bakteri simbion spons terhadap bakteri patogen. Proses uji antagonis dilakukan dengan menyiapkan biakkan bakteri uji kemudian diinokulasikan masing-masing ke dalam media nutrient agar, dan diletakkan kertas cakram steril yang telah direndam dalam hasil suspensi isolat bakteri simbion. Pengujian aktivitas antibakteri dari isolat bakteri SM4 terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar cakram.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari isolat bakteri SM4 dilihat dengan terbentuknya zona hambat di sekitar isolat bakteri simbion yang membuktikan bahwa isolat bakteri SM4 memiliki potensi dalam menghasilkan suatu senyawa bioaktif antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (**Tabel 1**).

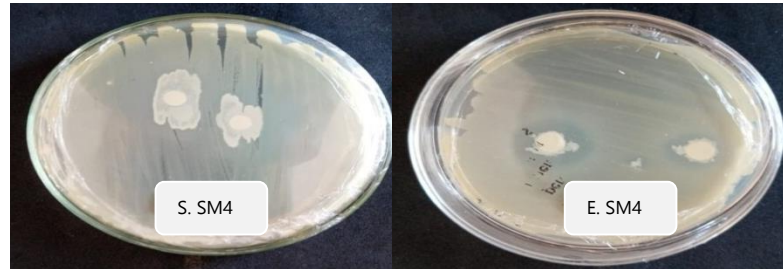
Tabel 1. Hasil Uji Antagonis Isolat SM4 dari Spons *Stylissa massa*.

No	Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	SM4	10,53	11,60

Berdasarkan data pada tabel 1, isolat bakteri SM4 yang bersimbiosis dengan spons *Stylissa massa* menunjukkan adanya potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri uji, dengan nilai zona hambat rata-rata terhadap bakteri uji gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan gram negatif (*Escherichia coli*) berturut-turut sebesar 10,53 mm dan 11,60 mm.

Zona bening di sekitar cakram (**Gambar 9**) mengindikasikan adanya kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Isolat bakteri SM4 yang bersimbiosis dengan spons *Stylissa massa* menunjukkan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji sebagai bentuk aktivitas antagonis yang dilakukan dengan menghasilkan kandungan senyawa yang bersifat antimikroba. Pardosi *et al.*, (2022) dalam penelitiannya menggunakan isolat bakteri SM4 dari

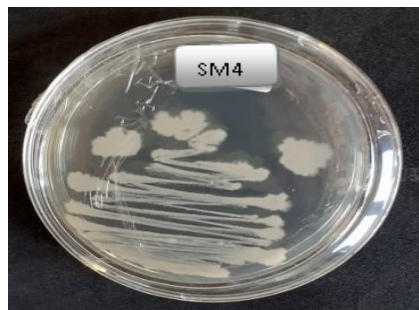
spons *Stylissa massa* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.



Gambar 9. Hasil Uji Antagonis Isolat Bakteri SM4

4.3 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Simbion

Isolasi bakteri simbion bertujuan untuk memisahkan bakteri dan mendapatkan biakan murni dari sampel. Burgess *et al.*, (2003) mengatakan bakteri simbion merupakan mikroorganisme yang dapat mensintesis senyawa metabolit sekunder yang sama dengan organisme inangnya. Metabolit sekunder dapat diperoleh dengan cara mengisolasi bakteri simbion tersebut. Salah satu isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari spons *Stylissa massa* adalah isolat dengan kode SM4 yang ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 10. Isolat bakteri SM4 (Dokumentasi pribadi)

Bakteri simbion SM4 yang diisolasi dari spons *Stylissa massa* dikarakterisasi berdasarkan bentuk koloni, ukuran, warna dan morfologi yang dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. 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

Isolat bakteri simbion yang berasosiasi dengan spons memiliki karakteristik morfologi yang memperlihatkan warna koloni yang dihasilkan yaitu orange, kuning, dan putih dengan bentuk bundar dengan inti ditengah. Tepian isolat berbentuk licin,

tak beraturan, dan berlekuk dengan elevasi cembung, elevasi seperti tetesan, timbul, dan berbukit bukit (Pahriyani & Wardani, 2020).

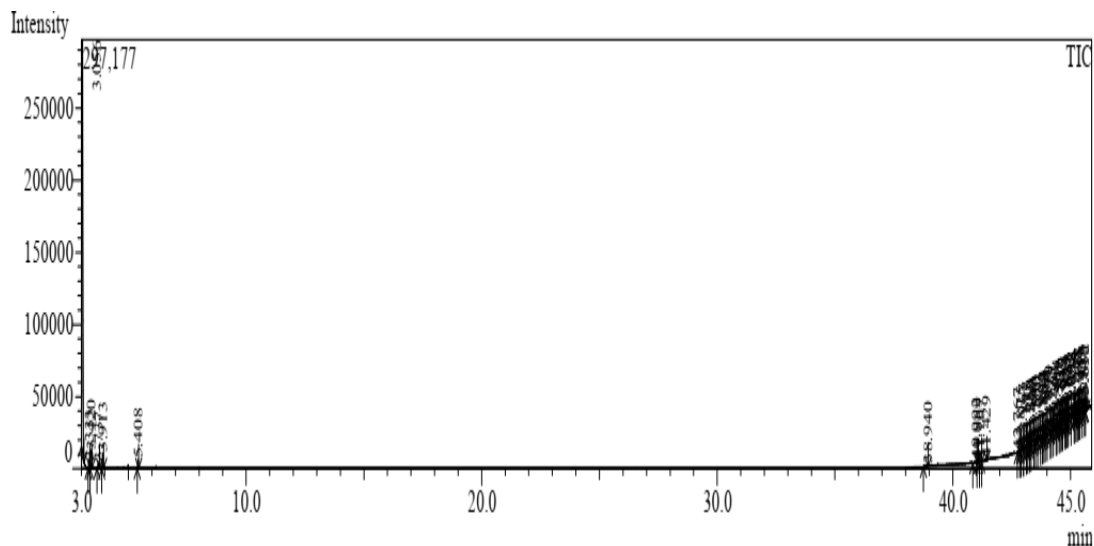
4.4 Ekstraksi Metabolit Sekunder dari Isolat Bakteri SM4

Proses ekstraksi metabolit sekunder dari isolat bakteri SM4 menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Isolat SM4 yang telah berhasil disolasi dari spons diinokulasikan kedalam 1 L medium cair (Natrium Broth) kemudian dishaker selama 72 jam. Proses pemisahan menggunakan metode fraksinasi dengan pelarut organik diklorometana (semipolar) dengan corong pisah sehingga senyawa tidak saling tercampur karena mempunyai kepolaran yang berbeda. Perbedaan polaritas pada pelarut organik yang digunakan dalam pemisahan dapat memudahkan isolasi senyawa metabolit sekunder dan identifikasi pada tahap berikutnya (Dash *et al.*, 2009)

Ekstraksi metabolit sekunder yang diperoleh menghasilkan ekstrak diklorometana isolat bakteri SM4 dan diuapkan menggunakan *hot plate* dengan suhu yang dikontrol untuk mendapatkan ekstrak kental. Hasil fraksinasi yang diuapkan menghasilkan ekstrak kental dengan beratnya sebesar 26,79 gram. Produksi metabolit sekunder oleh bakteri simbiosis spons memiliki kesamaan dengan inangnya dan memiliki potensi sebagai antibakteri (Radjasa *et al.*, 2007).

4.5 Analisis Senyawa Bioaktif Antibakteri dengan GCMS

Analisis senyawa bioaktif antibakteri ekstrak diklorometana SM4 dari spons *Stylissa massa* dengan instrumen GCMS ditunjukkan pada gambar berikut.

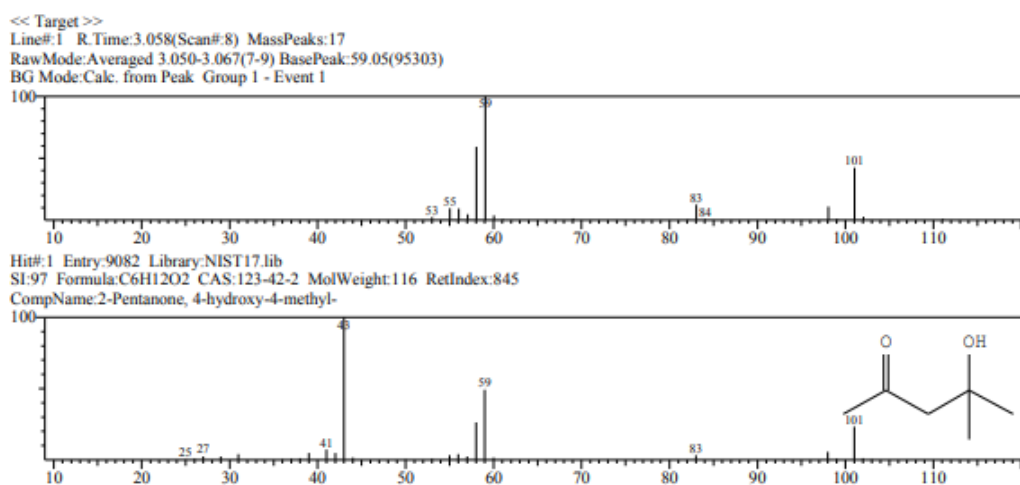


dilakukan karena belum sesuai dengan database library MS sehingga diperlukan spektra tambahan seperti H-NMR dan C-NMR. Analisis puncak yang memiliki kecocokan dengan database NIST17.lib ditunjukkan pada Tabel 3.

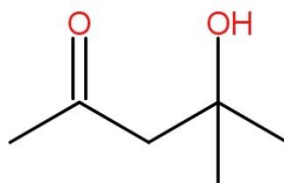
Tabel 3. Senyawa Bioaktif Antibakteri ekstrak diklorometana spons *Stylissa massa*

No	Senyawa	Rumus Molekul	Berat Molekul	Peak	Waktu	% Area
1	2-Pentanone, 4-hydroxy- 4-methyl	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	43, 59, 101	3.050	51,30
2	o-Xylene	C ₈ H ₁₀	106	77, 91, 106	3.420	2,79
3	2,4-Dihydroxy-benzaldehyde	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	282	73, 163, 267	45.517	1,22

Berdasarkan tabel diatas, senyawa dengan kelimpahan paling besar adalah senyawa dengan rumus molekul C₆H₁₂O₂ dan berada pada puncak retensi 3,050 menit. Data spektrum menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 116 diikuti puncak-puncak fragmentasi pada m/z 101, 89, 53, dengan membandingkan data spektrum yang diperoleh dengan data spektrum pada library, yang lebih mendekati adalah senyawa 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl sebanyak 51,30 % dengan spektrum seperti **gambar 12** dan struktur senyawa seperti **gambar 13**. Suparno, (2012) dalam penelitiannya mengidentifikasi senyawa 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl dari spons *Petrocia nigricans* sebagai senyawa antibakteri.

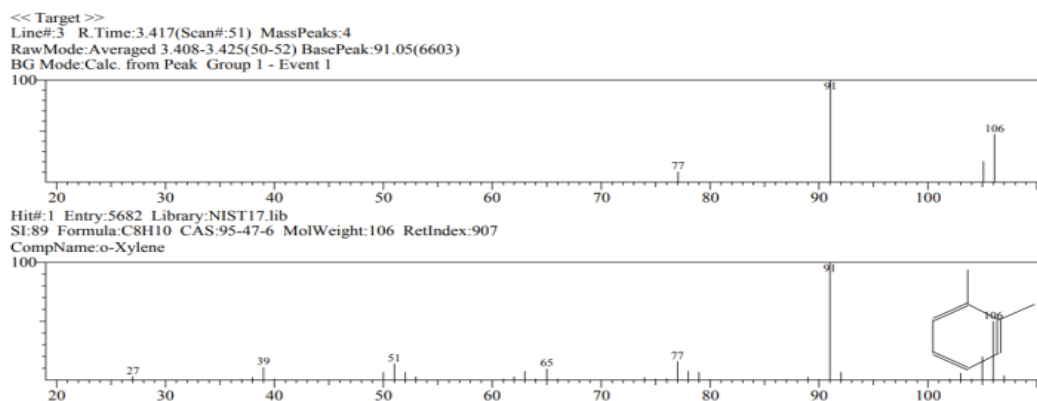


Gambar 12. Spektra massa pada waktu retensi 3.058

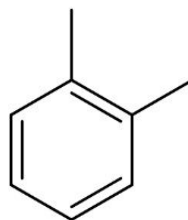


Gambar 13. Struktur Senyawa 2-Pentanone,4-hydroxy-4-methyl

Senyawa dengan rumus molekul C_8H_{10} berada pada puncak dengan waktu retensi 3.420. Data spektrum menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 106 dengan puncak-puncak fragmentasi pada m/z 106, 98, dan 77, dengan membandingkan data spektrum yang diperoleh dengan data spektrum pada library, yang lebih mendekati adalah senyawa Oxylene dengan nama IUPAC Benzene, 1,2-dimethyl sebanyak 2,79 % dengan spektrum pada **gambar 14** dan struktur senyawa seperti **gambar 15**. Identifikasi senyawa O-xylene dari ekstrak metanol kulit batang *Eucalyptus alba* diketahui berpotensi sebagai antijamur (Metboki, 2018).



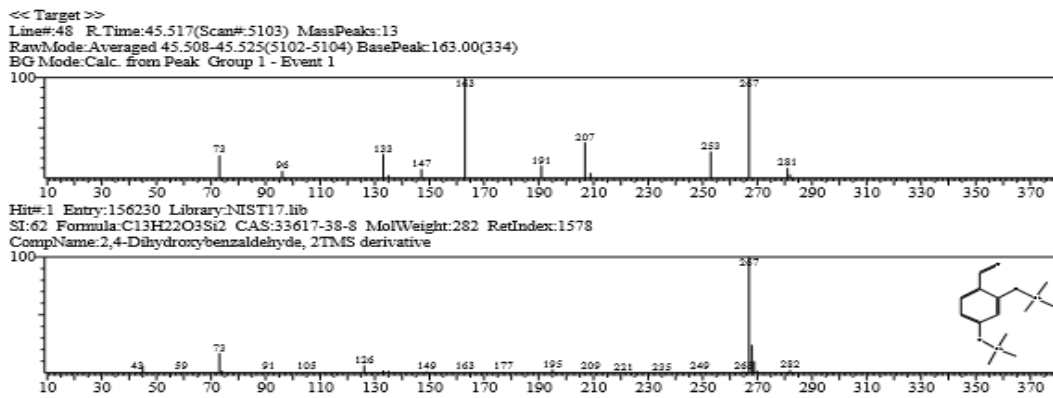
Gambar 14. Spektra massa pada waktu retensi 3.420



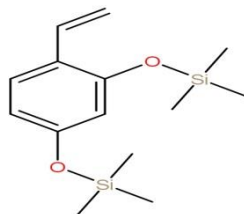
Gambar 15. Struktur Senyawa Oxylene

Senyawa dengan rumus molekul $C_{13}H_{22}O_3Si_2$ berada pada puncak dengan waktu retensi 45.517. Data spektrum menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 282 dengan puncak-puncak fragmentasi pada m/z 267, 163, dan 73, dengan membandingkan data spektrum yang diperoleh dengan data spektrum pada library, yang lebih mendekati adalah senyawa dengan nama IUPAC 2,4 dihydroxybenzaldehyde sebanyak 1,22 % dengan spektrum pada **gambar 16** dan

struktur senyawa seperti **gambar 17**. Syafni *et al.*, (2012) berhasil mengisolasi senyawa 2,4 dihydroxybenzaldehyde dari fraksi etil asetat ekstrak metanol daun, batang dan akar paku *Trichomanes chinense L. (Hymenophyllaceae)* dan menunjukkan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar terhadap *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera Inaba* dan *Salmonella thypimuriu*. Sintesis senyawa 2,4 dihydroxy-benzaldehyde berbasis schiif menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, antijamur, dan antibakteri terhadap *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonei*, dan *Neisseria gonorrhoeae* (Murtaza *et al.*, 2016).



Gambar 16. Spektra massa pada waktu retensi 45.517



Gambar 17. Struktur senyawa 2,4 dihydroxybenzaldehyde

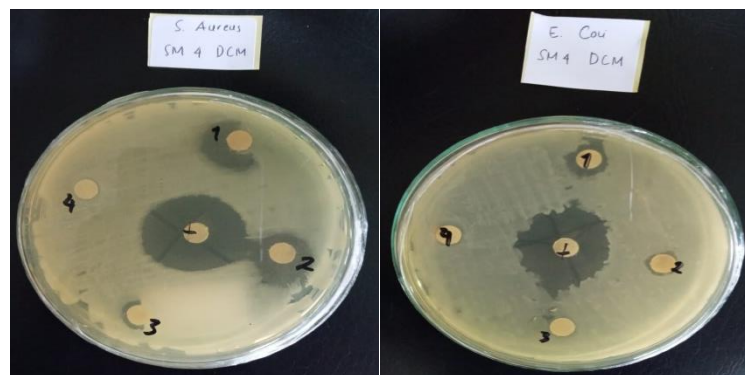
4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Diklorometana Isolat Bakteri Potensi SM4

Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram dilakukan terhadap 2 mikroba uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Media agar yang telah dibuat digunakan untuk pembiakan bakteri uji yang digunakan. Bakteri uji yang telah dibiakkan digores pada media yang telah disiapkan, dan diletakkan kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak diklorometana SM4, kontrol positif (kloramfenikol) dan kontrol negatif (pelarut diklorometana) kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong. Adapun hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak diklorometana SM4 disajikan dalam **tabel 4**.

Tabel 4. Pengukuran diameter zona hambat sampel terhadap bakteri uji

Ulangan	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>E. Coli</i>	<i>S. Aureus</i>
1	15,27	14,12
2	9,22	14,50
3	9,60	9,20
Rata-rata	11,36	12,60
Kontrol Positif	18,64	19,40
Kontrol Negatif	0	0

Berdasarkan data dari **tabel 4** diatas, ekstrak senyawa bioaktif dari isolat bakteri SM4 menggunakan pelarut diklorometana dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan rata-rata zona hambat berturut-turut adalah 11,36 dan 12,60 mm dan diklasifikasikan sebagai zona hambat sangat kuat. Davis & Stout, (1971) mengatakan kekuatan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri dikelompokkan menjadi lemah, sedang dan sangat kuat. Zona hambat sebesar 0-5 mm untuk kategori lemah, 5-10 mm untuk kategori sedang dan 10-20 mm untuk kategori sangat kuat. Aktivitas antibakteri yang dihasilkan ditandai dengan adanya zona bening disekitar cakram (**gambar 18**) pada bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

**Gambar 18.** Uji aktivitas antibakteri fraksi DCM SM4 terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Fraksi diklorometana isolat SM4, hasil pengujian lebih potensial menghambat bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dibandingkan gram negatif *Escherichia coli*. Menurut Wang *et al.*, (2015) bakteri gram negatif biasanya memiliki membran luar terorganisir dan lebih kompleks dari pada bakteri gram positif, dan kehadiran membran luar yang tersusun atas lipopolisakarida yang padat membuat bakteri gram negatif lebih tahan terhadap desinfektan daripada bakteri gram positif. Menurut Gultom, (2014), hal ini disebabkan karena bakteri gram positif tidak memiliki membran luar seperti bakteri gram negatif dan memiliki kandungan senyawa campuran gula dan polipeptida yaitu peptidoglikan yang pembentukannya dapat

dihambat oleh senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Ekstrak diklorometana isolat bakteri SM4 dari spons *Stylissa massa* menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang disebabkan oleh senyawa kimia yang berpotensi sebagai agen antibakteri seperti Senyawa 2-Pentanone,4-hydroxy-4-methyl, senyawa o-xylene (benzene, 1,2 dimethyl) dan senyawa 2,4 dihydroxybenzaldehyde.

Pengujian ini menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol. Kloramfenikol merupakan antibiotik bakteriostatik spektrum luas yang aktif melawan mikroorganisme aerob dan anaerob, bakteri gram positif dan gram negatif yang digunakan sebagai kontrol positif untuk membandingkan diameter zona hambat yang terbentuk (Cahyono, 2013). Diameter zona hambat kontrol positif pada kedua bakteri uji lebih besar dari diameter ekstrak dan kontrol negatif. Diameter zona hambat kontrol positif dari bakteri *Escherichia coli* yaitu sebesar 18,64 mm dan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 19,40 mm. Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan pelarut diklorometana. Kontrol negatif digunakan untuk menunjukkan apakah diklorometana berpengaruh pada ekstrak. Pada penelitian ini, kontrol negatif tidak mempengaruhi skrining antibakteri yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat, sehingga dapat diketahui zona hambat yang terbentuk disebabkan karena adanya senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak diklorometana isolat SM4 terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli*.