

**SKRINING AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI  
ENDOSIMBION SPONS LAUT YANG DIKOLEKSI DARI  
PULAU KOTOK KECIL, KEPULAUAN SERIBU, DKI JAKARTA**

***SCREENING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY  
OF ENDOSYMBIONT BACTERIA ISOLATED FROM MARINE  
SPONGES COLLECTED FROM KOTOK KECIL ISLAND,  
SERIBU ISLANDS, DKI JAKARTA***

**SKRIPSI SARJANA SAINS**

**Oleh**

**ALVIRA NOER EFFENDI**



**FAKULTAS BIOLOGI  
UNIVERSITAS NASIONAL  
JAKARTA  
2019**

## **FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS NASIONAL**

Skripsi, Jakarta Agustus 2019

Alvira Noer Effendi

### **SKRINING AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ENDOSIMBION SPONS LAUT YANG DIKOLEKSI DARI PULAU KOTOK KECIL, KEPULAUAN SERIBU, DKI JAKARTA**

x + 44 halaman, 6 tabel, 5 gambar, 20 lampiran

Saat ini telah banyak dilakukan penelitian dan pengembangan bahan alam sebagai sumber antimikrobal, salah satu diantaranya adalah bakteri endosimbion spons. Indonesia memiliki keanekaragaman bakteri endosimbion spons, namun belum banyak penelitian yang dilakukan untuk mengungkap potensi medisinalnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba bakteri endosimbion yang diisolasi dari spons yang dikoleksi dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Pengujian potensi antimikroba dilakukan dengan skrining uji kualitatif metode Gibex yang dimodifikasi dan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Hasil penelitian menunjukkan dari 5 sampel spons yang dikoleksi dari perairan sekitar Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta diperoleh 15 isolat bakteri endosimbion. Terdapat 4 isolat bakteri endosimbion yang potensial sebagai sumber senyawa antimikroba, yaitu yang berasal dari spons *Petrosia* sp. (isolat 1K1), *Petrosia nigricans* (isolat 5K2), *Dasychalina* sp. (isolat 2K2), dan *Cinachyrella australiensis* (isolat 3K1). Filtrat hasil fermentasi isolat bakteri endosimbion dalam media NB menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Zona hambat rata-rata terbesar filtrat NB bakteri endosimbion terhadap *Candida albicans* sebesar 19,2 mm (isolat 1K1) dan 14,2 mm (isolat 5K2), terhadap *Escherichia coli* sebesar 11,8 mm (isolat 5K2), terhadap *Streptococcus mutans* sebesar 9,1 mm (isolat 3K1), dan 8,1 mm (isolat 2K2). Zona hambat rata-rata terbesar ekstrak etil asetat bakteri endosimbion terhadap *C. albicans* sebesar 9,2 mm (isolat 3K1), 8,3 mm (isolat 1K1), dan 8,1 mm (isolat 2K2). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa jenis-jenis spons di Kepulauan Seribu mengandung bakteri endosimbion yang potensial untuk dikembangkan menjadi sumber senyawa antibakteri.

Kata kunci : Aktivitas antimikroba, bakteri endosimbion, metode Gibex

Daftar bacaan : 41 (2002-2019)

**SKRINING AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI  
ENDOSIMBION SPONS LAUT YANG DIKOLEKSI DARI  
PULAU KOTOK KECIL, KEPULAUAN SERIBU, DKI JAKARTA**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
SARJANA SAINS DALAM BIDANG BIOLOGI**

**Oleh**

**ALVIRA NOER EFFENDI  
153112620150023**



**FAKULTAS BIOLOGI  
UNIVERSITAS NASIONAL  
JAKARTA  
2019**

Judul Skripsi : SKRINING AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI  
ENDOSIMBION SPONS LAUT YANG DIKOLEKSI DARI  
PULAU KOTOK KECIL, KEPULAUAN SERIBU,  
DKI JAKARTA

Nama Mahasiswa : Alvira Noer Effendi

Nomor Pokok : 153112620150023

MENYETUJUI

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

  
Prof. Dr. Ernawati Sinaga, M.S., Apt.

  
Dra. Noverita, M.Si.

Dekan



  
Drs. Imran SL Tobing, M.Si

Tanggal Lulus : 31 Agustus 2019

## KATA PENGANTAR

*Alhamdu lillahi rabbil 'alamin*

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya disetiap detiknya, yang selalu memberikan kekuatan dan semangat tanpa batas kepada penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Skrining Aktivitas Antimikroba Bakteri Endosimbion Spons Laut yang Dikoleksi dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta”** sebagai salah satu persyaratan memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang biologi di Fakultas Biologi Universitas Nasional Jakarta.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih dan apresiasi sebesar-besarnya kepada pihak yang selalu membantu, menemani, dan mendukung dikala susah dan senang dalam pengambilan data, pengolahan data, menulis, menyusun, dan menyempurnakan skripsi ini.

1. Ibu, Ayah, Alif, dan Nenek tercinta yang tanpa lelah dan bosan, selalu berdoa, mendukung, memberikan nasihat, dan semangat kepada penulis sehingga penulisan dapat berjalan lancar.
2. Prof. Dr. Ernawati Sinaga, M.S., Apt. selaku pembimbing pertama yang sudah penulis anggap sebagai guru dan ibu sendiri serta yang telah mendanai dan memfasilitasi penelitian ini. Beliau selalu memberikan inspirasi, motivasi, meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan bimbingannya secara langsung maupun tersirat untuk kesempurnaan selama pengambilan data maupun penulisan skripsi.
3. Dra. Noverita, M.Si. selaku pembimbing kedua yang sudah penulis anggap sebagai guru dan ibu sendiri serta yang telah mendanai dan memfasilitasi penelitian ini. Beliau memberikan inspirasi, motivasi, menyemangati ketika penulis merasa bosan, meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan bimbingan selama pengambilan data maupun penulisan skripsi.
4. Mas Adi (Chairil Rohadi), selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika UNAS atas kesabaran dan bantuannya untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Dra. Endang Wahjuningsih, M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah mendampingi dan memberikan arahan selama perkuliahan.

6. Drs. Yeremiah Rubin Tjamin, M.S. selaku koordinator proposal bantuannya dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Drs. Imran S.L. Tobing, M.Si. selaku dekan Fakultas Biologi Universitas Nasional.
8. Teman-teman FABIONA angkatan 2015 yang penulis sayangi. Uci, Annas, Lia, Rina, Arum, Nisa, Ita, Ariyani, Iwa, Devi, Yuli, Bismi, Dian, Aulia, Fath, Ojan, Richard, Kevin, Bilal, Dika, dan Syaf. Mereka selalu memberikan rasa kebersamaan, keceriaan selama perkuliahan, dan waktu luang yang tak terlupakan.
9. Drs. Ari Mutanto, M.Pd., Kak Yuni, Kak Chasna, Kak Teuku, Kak Agus, Kak Putu, Arfa'a, Farhan, Dhea, Eki, Wildan, Aldi, Silvi, Ilham, Difa, Izkia, Yohana, dan Fathiyah yang selalu ada, memberikan ilmu, dan keceriaan tiada tara.
10. Vina, Sofi, Anna, Azmi, Otun, Aci, Nanda, Dimas, Kevin, dan Dwi yang selalu ada, memberikan saran, nasihat, dan memberikan keceriaan tiada henti.
11. Kak Bunga, Kak Elly, Kak Windi, dan Kak Ifadah yang secara bersamaan melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Nasional.
12. *Marine Conservation Club* (MCC) UNAS dan Kelompok Studi Ekologi Perairan (KSEP) UNAS atas pengalaman organisasi dan suka-duka yang dilalui hingga memberi penulis pengalaman yang sangat berharga.
13. Seluruh pihak, dosen, dan staf Fakultas Biologi Universitas Nasional yang telah memberikan dukungan, yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi dari kesempurnaan baik dalam hal materi ataupun teknik penulisannya. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan bimbingan, saran, dan kritik yang membangun untuk dapat memperbaiki skripsi ini, sehingga dapat memberikan manfaat yang bersifat keilmuan bagi penulis dan pembaca.

Jakarta, Agustus 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. METODE PENELITIAN .....	5
A. Tempat dan waktu penelitian .....	5
B. Instrumen penelitian .....	5
1. Alat .....	5
2. Bahan .....	6
C. Cara kerja penelitian .....	6
1. Persiapan alat .....	7
2. Pembuatan media dan reagensia .....	8
3. Pengambilan spons .....	10
4. Identifikasi spons .....	10
5. Isolasi bakteri endosimbion spons .....	10
6. Karakterisasi morfologi dan sel bakteri endosimbion spons .....	11
7. Persiapan suspensi mikroba uji .....	12
8. Fermentasi dan ekstraksi bakteri endosimbion .....	12
9. Uji kualitatif Gibex yang dimodifikasi .....	12
10. Uji difusi cakram Kirby-Bauer .....	13
11. Karakterisasi biokimia bakteri endosimbion potensial .....	13
D. Analisis data .....	15
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	17
A. Jenis spons yang digunakan .....	17
B. Bakteri endosimbion yang ditemukan .....	18
C. Hasil skrining aktivitas antimikroba metode Gibex yang dimodifikasi .....	21

	Halaman
E. Hasil skrining aktivitas antimikroba metode difusi cakram Kirby-Bauer .....	23
F. Karakterisasi biokimia bakteri endosimbion potensial .....	26
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN .....	29
A. Kesimpulan .....	29
B. Saran .....	29
DAFTAR PUSTAKA .....	31
LAMPIRAN .....	35





## DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>Naskah</b>	
Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV).....	5
Tabel 2. Jumlah bakteri endosimbion yang diperoleh dari spons.....	18
Tabel 3. Karakteristik morfologi isolat bakteri endosimbion.....	19
Tabel 4. Hasil skrining 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode metode Gibex .....	21
Tabel 5. Rataan diameter zona hambat 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer .....	24
Tabel 6. Hasil karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion .....	26
<b>Lampiran</b>	
Tabel 1. Diameter zona hambat 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer .....	37
Tabel 2. Hasil uji ANOVA isolat bakteri endosimbion filtrat NB terhadap mikroba uji .....	37
Tabel 3. Hasil uji ANOVA isolat bakteri endosimbion ekstrak etil asetat terhadap mikroba uji.....	38
Tabel 4. Hasil uji Tukey isolat bakteri endosimbion ekstrak etil asetat terhadap mikroba uji .....	38

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

### Naskah

Gambar 1. Skema alur penelitian .....	7
Gambar 2. Tahapan isolasi dan pemurnian bakteri endosimbion spons.....	11
Gambar 3. Spons yang dikoleksi dari Pulau Kotok Kecil .....	17
Gambar 4. Hasil karakterisasi morfologi koloni isolat bakteri endosimbion.....	20
Gambar 5. Hasil zona hambat beberapa isolat bakteri endosimbion filtrat NB dan ekstrak etil asetat .....	25

### Lampiran

Gambar 1. Karakterisasi morfologi koloni dan sel isolat bakteri endosimbion 1K1-4K4.....	39
Gambar 2. Karakterisasi morfologi koloni dan sel isolat bakteri endosimbion 5K1-5K3.....	40
Gambar 3. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap mikroba dari saliva.....	40
Gambar 4. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap <i>E. coli</i> .....	40
Gambar 5. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap <i>S. mutans</i> .....	41
Gambar 6. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap <i>C. albicans</i> .....	41
Gambar 7. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap <i>E. coli</i> .....	41
Gambar 8. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap <i>E. coli</i> .....	42
Gambar 9. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap <i>S. mutans</i> .....	42
Gambar 10. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap <i>S. mutans</i> .....	42
Gambar 11. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap <i>C. albicans</i> .....	42
Gambar 12. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap <i>C. albicans</i> .....	42
Gambar 13. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 1K1 .....	43
Gambar 14. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 2K2 .....	43
Gambar 15. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 3K1 .....	43
Gambar 16. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 5K2 .....	44

## BAB I. PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia. Tiga juta jiwa kematian diakibatkan oleh infeksi pernapasan, yaitu 1,4 juta kematian akibat diare, 1,3 juta kematian akibat tuberkulosis, dan kematian akibat HIV/AIDS mencapai angka 1 juta jiwa (WHO, 2016). Pemakaian antibiotik merupakan cara yang ampuh digunakan dalam penanggulangan penyakit infeksi tersebut. Namun saat ini, resistensi antibiotik merupakan salah satu ancaman kesehatan publik global paling serius menurut WHO (2014).

WHO melalui *Global Antimicrobial Surveillance System* (GLASS) telah melakukan survei terhadap 52 negara, menyatakan bahwa terdapat peningkatan resistensi terhadap antibiotik. Resistensi pada penisilin untuk mengobati pneumonia berkisar antara 0% – 51%, sedangkan resistensi terhadap *ciprofloxacin* dari bakteri *Escherichia coli* terkait infeksi saluran kemih berkisar antara 8% – 65% (WHO, 2018). Fakta tersebut menjelaskan perlunya penemuan senyawa antibiotik baru, antara lain yang berasal dari bahan alam.

Pemanfaatan biodiversitas yang umumnya dieksplorasi adalah wilayah daratan, sedangkan wilayah lautan belum dieksplorasi secara optimal. Indonesia memiliki 75% wilayah perairan yang berada dipersilangan samudra Hindia dan samudra Pasifik (Hanim dan Noorman, 2017). Hal tersebut menunjukkan kekayaan potensi sumber daya laut Indonesia yang dapat dikelola dan dimanfaatkan untuk masa depan bangsa, salah satunya adalah spons.

Spons merupakan hewan multiseluler filum *Porifera* yang tidak memiliki organ dan jaringan, namun memiliki pori pada tubuhnya (ostia) dan saluran sirkulasi air pada rongga pusat (oskulum) (Thomas *et al.*, 2016). Spons memiliki kerangka internal berupa spikula. Spons hidup menempel pada substrat bebatuan, karang, dan sedimen pasir yang berada di dasar laut. Salah satu hal yang menarik dari spons adalah kemampuan filtrasinya, contohnya spons jenis *Geodia barretti* dapat menyaring hingga 1.000 liter air per kilogram jaringan setiap hari. Spons dapat mengambil 95% bakteri dan 90% karbon organik terlarut dalam air melalui pori-porinya serta mengubahnya

menjadi partikel tersuspensi dan bahan terlarut yang dapat dijadikan sebagai bahan makanan untuk hewan lain (FAO, 2017).

Spons dan mikroba laut memiliki hubungan simbiosis mutualisme, yaitu kerjasama dalam pemenuhan nutrisi. Sebagai contoh yang terjadi pada sianobakteri, selain membantu spons dalam pemenuhan energi melalui proses fotosintesis, sianobakteri juga berfungsi membantu proses fiksasi nitrogen, sedangkan sianobakteri menggunakan tubuh spons sebagai tempat hidup (Pita *et al.*, 2016). Hampir 50% kebutuhan energi spons disuplai oleh sianobakteri, terutama untuk spons-spons yang hidup di daerah tropis.

Spons memiliki potensi besar dalam menghasilkan senyawa aktif sebagai bahan baku obat namun dalam pemanfaatannya belum optimal. Salah satu contoh senyawa aktif dari *Ircinia* sp. berfungsi sebagai antibiotik, analgesik, dan anti-inflamasi (Dhinakaran dan Lipton, 2012). *Corticium* sp. mengandung senyawa alkaloid steroidal berupa *plakinamine M*, pada konsentrasi 15,8 µg/mL mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (Lu *et al.*, 2013). *Xestospongia* sp. menghasilkan dua senyawa aktif, yaitu *amphimedine* yang berfungsi sebagai senyawa antitumor dan *neoamphimedine* yang berfungsi menghambat enzim topoisomerase II dalam replikasi DNA (Ponder *et al.*, 2011) serta berpotensi sebagai senyawa antikanker (Li *et al.*, 2014).

Pemanfaatan spons yang berlebihan untuk mencari senyawa bioaktif baru dapat mengakibatkan “*overfishing*” yang merugikan sistem ekologi biota laut karena pertumbuhannya yang lambat. Spons jenis *Amphimedon* sp. hanya mengalami pertumbuhan  $(3,01 \pm 1,60) - (3,43 \pm 1,08)$  cm<sup>3</sup>/harinya, sedangkan *Liosina paradoxa* hanya tumbuh 3,40 cm<sup>3</sup>/harinya (Sankar *et al.*, 2016; Trianto *et al.*, 2013). Oleh karena itu, pemanfaatan mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons akan lebih baik karena mikroba endosimbion spons merupakan penghasil senyawa-senyawa bioaktif, dapat dikulturkan dalam skala laboratorium, dapat diperbanyak dalam waktu yang relatif singkat, dan mengurangi penggunaan spons secara langsung.

Cita *et al.* (2016), melakukan penelitian aktivitas antibakteri dari bakteri endosimbion spons *Xestospongia testudinaria*, menghasilkan zona hambat sebesar  $1,963 \pm 0,35$  cm terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, dan terhadap bakteri *P. aeruginosa* MDR sebesar  $2,34 \pm 0,95$  cm, hal tersebut sebanding dengan

kloramfenikol sebagai kontrol positif. Asgabaldan *et al.* (2017), juga menyatakan adanya aktivitas bakteri endosimbion PSP-39-04 spons *Haliclona* sp. (Syn *Reniera* sp.) dengan zona hambat sebesar  $2,120 \pm 0,026$  cm terhadap bakteri *P. aeruginosa*,  $1,713 \pm 0,031$  cm terhadap bakteri *Enterobacter cloacae*,  $1,590 \pm 0,026$  cm terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii*, dan sebesar  $1,310 \pm 0,026$  cm terhadap *Staphylococcus aureus* MRSA.

Penelitian terkait dengan antimikroba spons di Kepulauan Seribu masih terbatas terhadap jenis tertentu, seperti *Aplysina aerophoba* dan *Callyspongia aerizusa* (Fajrina *et al.*, 2018; Rumampuk *et al.*, 2017), demikian pula informasi mengenai aktivitas antimikroba bakteri endosimbion spons masih sangat kurang. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini untuk eksplorasi bakteri endosimbion spons yang berasal dari pulau-pulau di perairan Kepulauan Seribu.

Skrining aktivitas antimikroba pada penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* sebagai perwakilan bakteri Gram positif, *Escherichia coli* sebagai perwakilan bakteri Gram negatif, dan *Candida albicans* sebagai perwakilan khamir patogen. Penggunaan mikroba ini diharapkan dapat mewakili mikroba lain yang juga menyebabkan penyakit seperti yang dilakukan pada penelitian Rahman *et al.* (2017) dan Manandhar *et al.* (2019).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba bakteri endosimbion yang diisolasi dari spons yang dikoleksi dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Pengujian potensi antimikroba dilakukan dengan skrining uji kualitatif metode Gibex (*The Global Institute for BioExploration*) yang dimodifikasi dan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Dari hasil penelitian ini diharapkan akan diperoleh informasi dan data baru tentang potensi antimikroba bakteri endosimbion spons yang diperoleh dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta.



## BAB II. METODE PENELITIAN

### A. Tempat dan waktu penelitian

Pengambilan sampel spons dilakukan di Pulau Kotok Kecil dan isolasi bakteri endosimbion spons dilakukan di Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, Jakarta. Identifikasi spons dilakukan di Pusat Penelitian Oseanografi - LIPI dan pengujian aktivitas antimikroba dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Nasional. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Juli 2019.

### B. Instrumen penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endosimbion spons, mikroba uji, dan aktivitas antimikroba yang digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba bakteri endosimbion. Definisi operasional variabel dari penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)**

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel (DOV)	Sumber	Satuan
1	Bakteri endosimbion spons	Bakteri hasil isolasi dari spons	Spons	-
2	Mikroba uji	Mikroba uji yang digunakan dalam skrining aktivitas antimikroba	Laboratorium	-
3	Aktivitas antimikroba	Zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa-senyawa bioaktif bakteri endosimbion	Hasil pemeriksaan laboratorium	mm

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Self-Contained Underwater Breathing Apparatus* (SCUBA), *cool box*, inkubator, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), kulkas, mikroskop cahaya, rak tabung reaksi, tabung reaksi, labu Erlenmeyer,

gelas ukur, gelas piala, cawan Petri, mikropipet, tip, pipet volume, timbangan, kompor listrik, sentrifugator, tabung sentrifugasi, gelas objek, jarum Ose, vortex, jangka sorong, gunting, bunsen, dan corong pisah.

## 2. Bahan

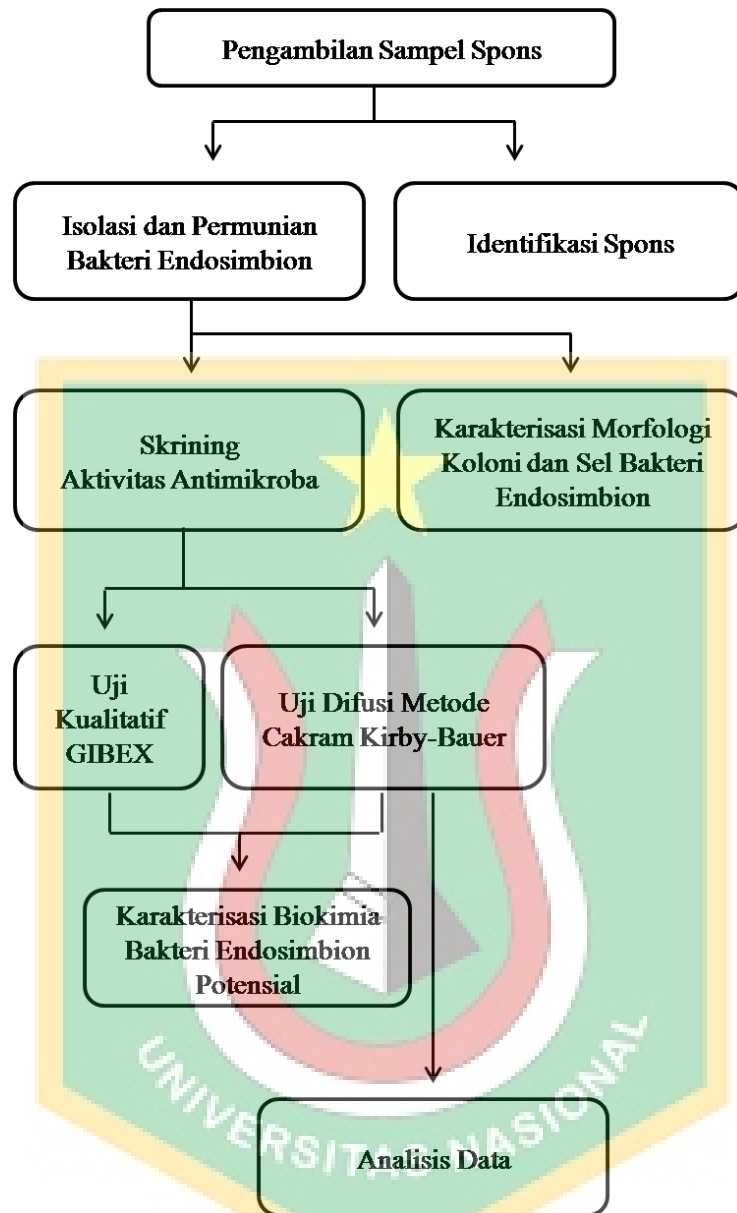
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- a. Spons hasil koleksi dari pulau Kotok Kecil Kepulauan Seribu, DKI Jakarta.
- b. Mikroba uji: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* ATCC 45175 koleksi Lab. Mikrobiologi UNAS, dan *Candida albicans* ATCC koleksi Lab. Biologi Oral Pusat Penelitian Sains Oral Universitas Indonesia.
- c. Saliva dari perempuan berusia 22 tahun dalam kondisi sedang berpuasa.
- d. Media, bahan kimia, dan bahan lain: media NA (*Natrium Agar*), NB (*Nutrient Broth*), media PDB (*Potato Dextrose Broth*), media PDA (*Potato Dextrose Agar*), media MHA (*Mueller-Hinton Agar*), media LB (*Lactosa Broth*), larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), antibiotik streptomisin, antibiotik nitrat ekonazol, larutan etil asetat, air laut steril, cakram ukuran 6 mm, cakram ukuran 9.6 mm, alkohol 70%, alkohol 96%, akuadestilata, NaCl, NaClO, kapas, kertas label, tisu, *aluminum foil*, sarung tangan, masker, larutan gentian violet, larutan lugol, larutan air fukhsin, media *Methyl Red Voges Proskauer* (MRVP), media *Sulphide Indol Motility* (SIM), media sitrat, reagen Kovac's, reagen Barritts, media gula-gula (glukosa, maltosa, manitol, laktosa, sakarosa, dan arabinosa), indikator merah metil, dan indikator brom timol biru.

## C. Cara kerja penelitian

Tahapan kerja pada penelitian ini terdiri dari persiapan alat dan bahan, pengambilan sampel spons, identifikasi spons, isolasi dan pemurnian bakteri endosimbion, identifikasi morfologi koloni dan sel bakteri endosimbion spons, persiapan suspensi mikroba uji, skrining aktivitas antimikroba dengan dua metode yaitu uji kualitatif metode Gibex yang dimodifikasi dan metode difusi cakram Kirby-Bauer, dan karakterisasi aktivitas biokimia bakteri endosimbion potensial. Skema alur penelitian dapat dilihat pada gambar 1.





Gambar 1. Skema alur penelitian

## 1. Persiapan alat

Semua peralatan yang akan digunakan terlebih dahulu disterilkan dengan cara dicuci dan ditiriskan hingga kering, kemudian untuk cawan Petri dan pipet volume dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Untuk alat seperti tabung reaksi, labu Erlenmeyer, dan medium disterilkan dengan sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

## **2. Pembuatan media dan reagensia**

### **a. NA (*Nutrient Agar*) air laut**

Cara membuat NA adalah dengan melarutkan 28 gram serbuk NA per 1 L dalam gelas piala kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut, kemudian media dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

### **b. NB (*Nutrient Broth*) air laut**

Cara membuat NA adalah dengan melarutkan 8 gram serbuk NB per 1 L dalam gelas piala kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut, kemudian media dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

### **c. MHA (*Mueller-Hinton Agar*)**

Cara membuat MHA adalah dengan melarutkan 38 gram serbuk MHA per 1 L dalam gelas piala kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut, kemudian media dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

### **d. PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Cara membuat MHA adalah dengan melarutkan 39 gram serbuk PDA per 1 L dalam gelas piala kemudian dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk hingga larut, kemudian media dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

### **e. LB (*Lactosa Broth*)**

Media LB digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Pembuatan media LB yaitu dengan melarutkan 13 g serbuk LB ke dalam 1 liter akuadestilata, yaitu memanaskan media sampai mendidih. Proses sterilisasi dilakukan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### **f. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida)**

Larutan MTT digunakan untuk membuktikan ada atau tidaknya mikroba hidup dalam media uji. Media yang ditumbuhi mikroba akan menghasilkan warna ungu ketika direaksikan dengan larutan ini, akan tetapi jika media tersebut tidak terdapat mikroba, maka tidak akan menghasilkan warna ungu sehingga warna tetap kuning.

Pembuatan larutan MTT yaitu dengan menimbang 5 mg serbuk MTT dan melarutkannya dalam akuadestilata.

**g. SIM (*Sulphide Indol Motility*)**

Media SIM digunakan untuk uji Indol. Media SIM dibuat dengan melarutkan 30 g serbuk SIM ke dalam 1 L air laut. Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas. Media selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

**h. MRVP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)**

Media MRVP digunakan untuk uji merah metil dan uji Voges-Proskauer. Pembuatan media MRVP dilakukan dengan melarutkan serbuk 17 g serbuk MRVP dalam 1 L air laut. Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 5 mL dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

**i. Sitrat (*Simon Citrate*)**

Media *Simon Citrate* digunakan untuk uji asam sitrat. Pembuatan media *Simon Citrate* dilakukan dengan melarutkan 24 g serbuk *Simon Citrate* ke dalam 1 L air laut. Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 5 mL dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

**j. TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)**

Media TSIA dibuat untuk uji TSIA. Media TSIA dibuat dengan melarutkan 65 gram serbuk TSIA ke dalam 1 L air laut. Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas. Media selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah disterilkan, media dimiringkan sedikit sehingga terbentuk bagian yang tegak (*butt*) dan bagian yang miring (*slant*).

**k. Gula-gula**

Media gula digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menfermentasi jenis gula tertentu. Media gula dibuat dengan mencampurkan 5 g pepton dan 2,5 g NaCl ke dalam 500 mL air laut. Campuran tersebut dilarutkan sambil dipanaskan sampai mendidih. Media selanjutnya dituang ke setiap gelas piala sebanyak 100 mL masing-

masing gelas piala dimasukkan 1 jenis gula yang diujikan (glukosa, sakarosa, laktosa, arabinosa, manitol, dan maltosa) sebanyak 1 g. Selanjutnya ke dalam setiap media dicampurkan dengan indikator *brom cresol purple* sebanyak 0,4 mL. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung bersisi tabung Durham sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas. Media selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### **3. Pengambilan spons**

Pengambilan sampel spons dilakukan dengan menyusuri dasar laut pada kedalaman  $\pm 5 - 20$  m dengan alat SCUBA. Spons kemudian dimasukkan ke dalam kantong steril dan diberi air laut steril untuk menghindari adanya kontaminasi serta dilakukan dokumentasi (foto).

### **4. Identifikasi spons**

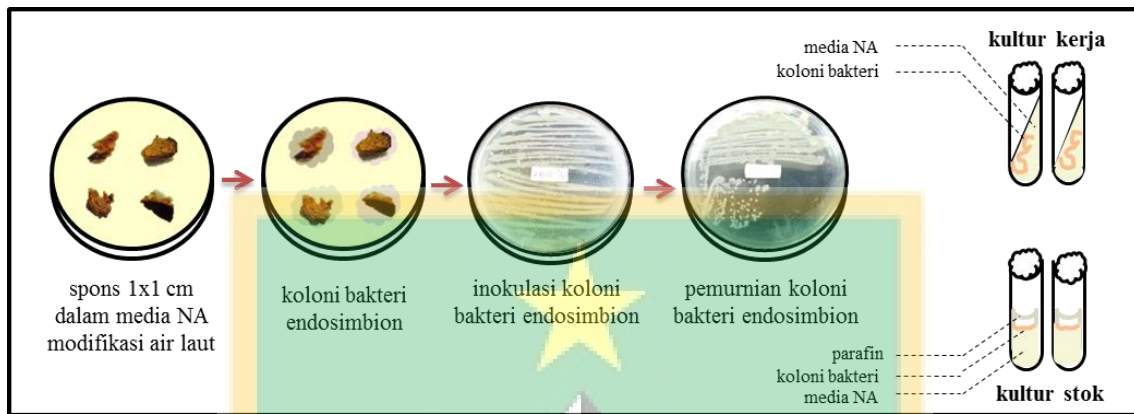
Identifikasi spons dilakukan berdasarkan lokasi penemuan, bentuk luar, tekstur, dan permukaan (bergerigi, berbulu, berpori kasar/halus, dsb), dan warna. Identifikasi ini dilakukan di Pusat Penelitian Oseanografi - LIPI.

### **5. Isolasi bakteri endosimbion spons**

Sampel spons dipotong kecil dengan ukuran 1x1 cm menggunakan *scalpel* steril, kemudian direndam dalam air laut steril selama 2 menit, setelah itu direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit dan terakhir direndam kembali dalam air laut steril selama 2 menit. Sampel kemudian diletakkan di dalam cawan Petri yang berisi media NA air laut dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Koloni bakteri akan tumbuh di sekitar sampel spons seperti yang dilakukan oleh Mohan *et al.* (2016).

Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan menginokulasikan isolat bakteri endosimbion pada media NA air laut di cawan Petri dengan metode penipisan Koch dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C (Cita *et al.*, 2016). Pengerjaan isolasi ini dilakukan di dalam LAF, hal ini dilakukan dalam kondisi aseptik (Santos *et al.*, 2010). Biakan murni kemudian dibagi menjadi dua, yaitu sebagai kultur kerja (pada medium NA miring) dan kultur stok (pada medium NA tegak yang diberi

parafin) yang keduanya disimpan pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  dalam kulkas dan akan digunakan untuk penelitian lebih lanjut (Tedford, 2016) (Gambar 2).



**Gambar 2. Tahapan isolasi dan pemurnian bakteri endosimbion spons**

## 6. Karakterisasi morfologi dan sel bakteri endosimbion spons

Koloni isolat bakteri endosimbion yang telah murni dikarakterisasi berdasarkan ukuran, warna, bentuk, tepian (*margin*), dan kemiringan (*elevation*) koloninya. Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan kelompok Gram positif atau Gram negatif pada bakteri endosimbion seperti yang dilakukan oleh Asgabaldan *et al.* (2017).

Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat kering terlebih dahulu. Kaca objek yang telah direndam dalam alkohol 70% dilewatkan di atas api spiritus untuk menghilangkan lemak. Setelah itu diambil cuplikan bakteri endosimbion spons dan diletakkan di atas kaca objek setipis mungkin. Proses ini dilakukan secara aseptik di dalam LAF. Setelah itu dilakukan fiksasi, yaitu dengan melewatkan preparat di atas api sebanyak 3 kali, hal ini bertujuan untuk mematikan, merekatkan bakteri endosimbion, dan memudahkan pewarnaan. Preparat kemudian ditetesi dengan zat warna gentian violet sampai menutupi seluruh permukaan dan dibiarkan 5-7 menit, setelah itu dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetaskan larutan lugol dan dibiarkan 45-60 detik, setelah itu dicuci dengan air mengalir. Preparat kemudian ditetesi dengan zat warna air fuksin selama 1-2 menit, setelah itu dicuci dengan air mengalir, lalu dikeringkan. Untuk mengamati bentuk dan warna bakteri, preparat ditetesi dengan minyak imersi,

dan digunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x (Asagabaldan *et al.*, 2017; Ayitso dan Onyango, 2016).

## **7. Persiapan suspensi mikroba uji**

Mikroba uji *E. coli*, *S. mutans*, dan *C. albicans* ATCC diremajakan pada media NA dan PDA steril. Mikroba uji diinokulasikan sebanyak 1 Ose ke dalam media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk bakteri dan 48 jam untuk jamur, pengerjaan dilakukan dalam kondisi aseptik di dalam LAF. Suspensi mikroba uji kemudian diinokulasikan menggunakan jarum Ose ke dalam media NB (bakteri) atau PDB (jamur), dihomogenkan menggunakan vortex. Kekeruhan mikroba uji ini diseragamkan dengan menggunakan standar Mc Farland 0,5 (kepadatan mikroba  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) pada latar belakang hitam dan cahaya terang. Standar Mc Farland dibuat dengan mencampur 0,5 mL 0,048M BaCl<sub>2</sub> dan 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Eduardo *et al.*, 2018).

Teknik inokulasi mikroba dilakukan menggunakan *swab* steril. *Swab* steril dicelupkan ke dalam suspensi mikroba uji, ditiriskan dengan cara ujung *swab* ditekan perlahan, dan diputar pada dinding dalam tabung untuk membuang kelebihan cairan. *Swab* kemudian digoreskan di atas permukaan agar di dalam cawan Petri.

## **8. Fermentasi dan ekstraksi bakteri endosimbion**

Fermentasi bakteri endosimbion dilakukan sebagaimana yang dilakukan Murniasih *et al.* (2018). Biakan bakteri endosimbion murni dikultur masing-masing sebanyak 10 mL pada media NB air laut dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Setelah itu kultur dipanen, sebagian hasil fermentasi di sentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, sedangkan sebagian lainnya diekstraksi dengan etil asetat perbandingan 1 : 1 seperti yang dilakukan oleh Putra *et al.* (2017).

## **9. Uji kualitatif Gibex yang dimodifikasi**

Menurut Raskin dan Skubel (2019), uji kualitatif Gibex merupakan prosedur yang cepat dan aman untuk skrining zat antimikroba. Uji kualitatif ini dilakukan menggunakan senyawa kimia MTT sebagai indikator adanya aktivitas antimikroba dengan menghasilkan warna kuning sampai dengan ungu.

Masing-masing ekstrak (filtrat NB dan ekstrak etil asetat) diambil sebanyak 50  $\mu\text{L}$  menggunakan mikropipet dan diteteskan ke cakram berukuran 9,6 mm dan dengan 2 kali ulangan. Cakram yang telah ditetesi ekstrak dikeringkan selama 15 menit secara aseptik dengan *blower* dalam LAF. Setelah kering, cakram berisi ekstrak dimasukkan ke dalam plastik *zip lock* dan disimpan pada suhu 1-4°C (Raskin dan Skubel, 2019).

Cakram berisi ekstrak dimasukkan ke dalam *well-plate* 6x4 menggunakan pinset steril, kemudian ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  larutan LB (untuk uji antibakteri)/ 600  $\mu\text{L}$  larutan PD+LB (untuk uji antifungi) dan 50  $\mu\text{L}$  mikroba uji, lalu dihomogenkan. Setelah itu *well-plate* direkatkan dengan menggunakan *seal* plastik untuk menghindari terjadinya kontaminasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam kemudian diamati kekeruhan dan perubahan warna setelah ditetesi MTT. Hasil positif (terdapat aktivitas antimikroba) dibuktikan dengan beningnya larutan dan larutan berwarna kuning setelah ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  MTT per *well-plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C. Warna kuning tersebut menandakan adanya senyawa antimikroba kuat dari bakteri endosimbion, sedangkan warna ungu menandakan adanya enzim dehidrogenase dari mitokondria mikroba uji yang mengubah warna kuning MTT menjadi ungu (Raskin dan Skubel, 2019).

#### **10. Uji difusi cakram Kirby-Bauer**

Pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer dilakukan sebagaimana yang dilakukan oleh Murniasih *et al.* (2018). Mikroba uji digoreskan secara merata ke dalam cawan Petri yang berisi media MHA kemudian kertas cakram steril yang telah ditetesi 25  $\mu\text{L}$  ekstrak bakteri endosimbion hasil fermentasi diletakkan di atas permukaan media MHA dengan 2 kali ulangan. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut etil asetat dan NB serta sebagai kontrol positif digunakan antibiotik streptomisin (bakteri) dan nitrat ekonazol (jamur). Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan mm.

#### **11. Karakterisasi biokimia bakteri endosimbion potensial**

Bakteri endosimbion potensial diidentifikasi berdasarkan aktivitas biokimianya dengan uji indol, metil merah, vogues proskeur, sitrat, dan fermentasi gula-gula

(glukosa, galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sukrosa) seperti yang dilakukan oleh Mohan *et al.* (2016).

#### **a. Reaksi indol**

Beberapa jenis bakteri dapat membentuk indol dari triptofan selama pertumbuhannya. Bakteri endosimbion tertentu seperti *E. coli* mempunyai enzim triptofanase yang dapat memecah asam amino triptofan menjadi indol, asam piruvat dan  $\text{NH}_3$ . Indol yang dihasilkan dapat dideteksi dengan penambahan 3 tetes reagen Ehlich atau Kovac's, yakni dengan terbentuknya cincin merah dipermukaan medium, dan bila tidak terbentuk indol ditandai dengan cincin kuning. Medium yang digunakan dalam tes ini adalah SIM (*Sulphide Indol Motility*). Medium ini bersifat semisolid, sehingga dapat terdeteksi bakteri endosimbion memiliki flagel atau tidak. Bakteri endosimbion diinokulasikan sebanyak 1 Ose ke dalam tabung reaksi berisi medium SIM kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24 jam, lalu diamati (Hemraj *et al.*, 2013).

#### **b. Reaksi merah metil**

Bakteri endosimbion diinokulasikan sebanyak 1 Ose ke dalam tabung reaksi berisi medium MRVP kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Beberapa jenis bakteri menghasilkan asam organik sebagai produk akhir dalam fermentasi glukosa. Asam yang dihasilkan akan menurunkan pH menjadi rendah, sehingga 3 tetes indikator merah metil akan berwarna merah (tes positif). Jika asam yang dihasilkan bukan produk akhir dan dikonversi lagi menjadi senyawa lain maka pH medium mendekati 6 dan warna indikator menjadi kuning (tes negatif) (Hemraj *et al.*, 2013).

#### **c. Reaksi Vogues-Proskauer**

Bakteri endosimbion diinokulasikan sebanyak 1 Ose ke dalam tabung reaksi berisi medium MRVP kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Beberapa jenis bakteri tidak mengakumulasi asam dalam fermentasi glukosa, melainkan dikonversi membentuk asetil metil karbinol. Adanya asetil metil karbinol dapat dideteksi dengan penambahan 3 tetes reagen Barritts, yakni dengan terbentuknya senyawa berwarna merah muda dalam medium (tes positif) (Hemraj *et al.*, 2013).

#### **d. Reaksi sitrat**

Beberapa jenis bakteri dapat menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya dalam medium bila tidak terdapat karbohidrat. Kemampuan ini tergantung



pada adanya enzim sitrat permease yang dapat memindahkan sitrat ke dalam sel. Sitrat selanjutnya akan dipecah oleh enzim sitrase menjadi asam osalat dan asam asetat, kemudian dikonversi secara enzimatik menjadi asam piruvat dan CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> akan bereaksi dengan sodium dan air menjadi sodium karbonat, sehingga medium menjadi basa, menyebabkan warna indikator brom timol biru dalam medium menjadi biru (tes positif). Sebanyak 1 Ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium sitrat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam (Hemraj *et al.*, 2013).

**e. Reaksi TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)**

Reaksi ini digunakan untuk membedakan jenis bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*. Medium TSIA mengandung 3 macam gula, yaitu laktosa 1%, sukrosa 1%, dan glukosa 0,1%. Selain itu juga terdapat sodium tiosulfat sebagai substrat penghasil H<sub>2</sub>S (hidrogen sulfida). Sebanyak 1 Ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium TSIA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam seperti yang dilakukan oleh Anwar (2018).

**f. Fermentasi gula**

Bakteri dapat memfermentasi berbagai jenis gula (glukosa, maltosa, manitol, laktosa, sakarosa, dan arabinosa), akan tetapi kemampuan dalam fermentasi serta bentuk produk akhir yang dihasilkan tergantung pada jenis enzim yang dimiliki oleh setiap bakteri. Biakan isolat bakteri endosimbion diinokulasikan ke dalam masing-masing medium gula lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam (Hemraj *et al.*, 2013).

**D. Analisis data**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jenis mikroba uji yang digunakan antara lain *E. coli*, *S. mutans*, dan *C. albicans*. Jumlah ulangan dilakukan sebanyak 2 kali. Analisis stasistik dilakukan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) metode ANOVA dan analisis beda rataaan menggunakan metode *Tukey*.



### BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Jenis spons yang digunakan

Spons yang diperoleh dari Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu sebanyak lima jenis spons. Kelima jenis spons tersebut adalah *Petrosia* sp., *Dasychalina* sp., *Cinachyrella australiensis*, *Stylissa massa*, dan *Petrosia nigricans* (Gambar 3).



**Gambar 3.** Spons yang dikoleksi dari Pulau Kotok Kecil: (A) *Petrosia* sp.; (B) *Dasychalina* sp.; (C) *Cinachyrella australiensis*; (D) *Stylissa massa*; (E) *Petrosia nigricans*

Spons *Petrosia* sp. maupun *Petrosia nigricans* merupakan spons yang hidup di kedalaman 5-45 m pada substrat keras. *Petrosia* sp. memiliki tekstur yang lebih keras sedangkan *Petrosia nigricans* memiliki tekstur yang lebih lunak. Warna yang dimiliki kedua spons ini bergantung pada sianobakteria yang bersimbiosis serta keadaan lingkungan sekitarnya, yaitu ungu sampai dengan cokelat (Chelossi *et al.*, 2004).

Spons *Dasychalina* sp. yang ditemukan pada kedalaman 5-25 m ini memiliki warna luar ungu dan warna dalam keabu-abuan sampai kuning kecokelatan. Spons ini

memiliki tekstur keras dan rapuh serta berduri dan lendir pada bagian permukaannya. Hal tersebut juga dilaporkan oleh Hooper dan Soest (2002). yang menyatakan bahwa spons jenis ini memiliki cabang dengan diameter sekitar 18 mm tertutupi oleh duri.

Spons *Cinachyrella australiensis* memiliki warna luar abu-abu tertutupi pasir dan kuning pada bagian dalamnya. Spons jenis ini umumnya memiliki permukaan yang agak keras dan duri pada bagian dalamnya. Menurut Reef Guide (2016), spons ini dapat berukuran sampai dengan 7,5 cm di kedalaman 0-5 m.

Sementara spons *Stylissa massa* merupakan spons yang berwarna kuning dengan ukuran 5-10 cm dan diameter 5-8 cm, hal tersebut juga sependapat dengan Hooper dan Soest (2002). Menurutnya, *S. massa* memiliki warna kuning muda sampai dengan oranye, berukuran panjang 7-20 cm, dan diameter 5-11 cm.

## B. Bakteri endosimbion yang ditemukan

Dari 5 sampel spons yang dikoleksi dari perairan sekitar Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta diperoleh 15 isolat bakteri endosimbion. Jumlah masing-masing isolat bakteri endosimbion dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Jumlah bakteri endosimbion yang diperoleh dari spons**

No	Jenis spons	Jumlah isolat bakteri endosimbion	Kode isolat bakteri endosimbion
1	<i>Petrosia</i> sp.	2	1K1 dan 1K2
2	<i>Dasychalina</i> sp.	3	2K1, 2K2, dan 2K3
3	<i>Cinachyrella australiensis</i>	4	3K1, 3K2, 3K3, dan 3K4
4	<i>Stylissa massa</i>	3	4K1, 4K2, dan 4K3
5	<i>Petrosia nigricans</i>	3	5K1, 5K2, dan 5K3

Berdasarkan hasil pemurnian isolat bakteri endosimbion yang telah dilakukan, diperoleh 15 isolat bakteri endosimbion yang memiliki perbedaan morfologi koloni dari masing-masing sampel spons. Spons dengan jumlah isolat terbanyak adalah *Cinachyrella australiensis* dengan 4 isolat (3K1, 3K2, 3K3, dan 3K4). Spons *Petrosia* sp. memiliki jumlah isolat bakteri endosimbion paling sedikit, yaitu 2 isolat (1K1 dan

1K2). Sementara spons *Dasychalina* sp., *Stylissa massa*, dan *Petrosia nigricans* masing-masing memiliki 3 isolat bakteri endosimbion.

Adanya perbedaan ini dipengaruhi oleh spesies spons dan kondisi lingkungan di sekitar spons. Hal ini juga didukung oleh Webster dan Thomas (2016), keberagaman bakteri yang berasosiasi dengan spons bergantung pada spesies spons. Selanjutnya menurut Mehbub *et al.*, (2014), keberadaan mikroba endosimbion dalam tubuh spons berperan dalam pemenuhan nutrisi dan pembentukan spikula spons.

Isolat bakteri endosimbion yang telah murni kemudian dikarakterisasi morfologi koloninya berdasarkan ukuran, warna, bentuk, tepian (*margin*), dan kemiringan (*elevation*) koloninya dan juga dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui kelompok bakteri tersebut (Tabel 3).

**Tabel 3. Karakteristik morfologi isolat bakteri endosimbion**

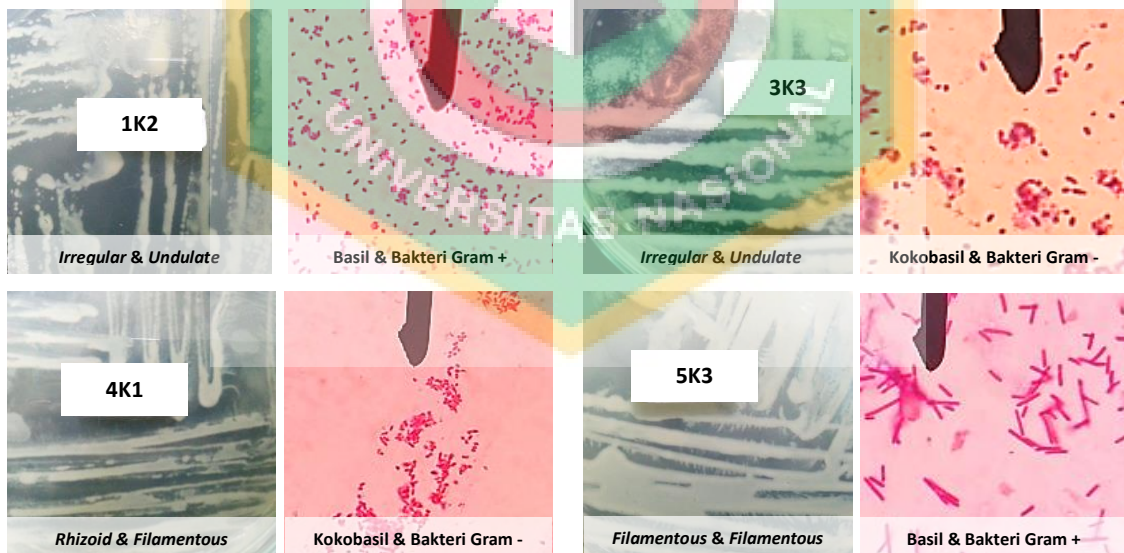
No	Kode Isolat Bakteri Endosimbion	Makroskopis				Mikroskopis		
		Form	Elevation	Margin	Warna	Gram	Bentuk	Spora
1	1K1	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Krem	+	Basil	+
2	1K2	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih	+	Kokobasil	-
3	2K1	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	Putih	-	Kokobasil	-
4	2K2	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih	-	Kokobasil	-
5	2K3	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih	-	Kokobasil	-
6	3K1	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	Putih	+	Kokobasil	-
7	3K2	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih	-	Kokobasil	-
8	3K3	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih	+	Kokobasil	-
9	4K1	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	Putih	-	Kokobasil	-
10	4K2	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih	+	Kokobasil	-
11	4K3	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih	+	Kokobasil	-
12	4K4	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	Putih	+	Kokobasil	-
13	5K1	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih	-	Kokobasil	-
14	5K2	<i>Filamentous</i>	<i>Flat</i>	<i>Erose</i>	Putih	+	Kokobasil	-
15	5K3	<i>Filamentous</i>	<i>Flat</i>	<i>Filamentous</i>	Putih	+	Basil	+

Hasil pengamatan karakterisasi morfologi koloni bakteri endosimbion secara umum memperlihatkan warna koloni umumnya berwarna putih dan krem dengan *elevation* “*flat*”, artinya koloni bakteri endosimbion memiliki penampakan dari samping

yang tipis. Bentuk koloni bervariasi (*irregular, circular, rhizoid, dan filamentous*), dengan *margin* yang juga bervariasi (*undulate, entire, filamentous, dan erose*).

Spons *Petrosia* sp. memiliki isolat bakteri endosimbion dengan bentuk koloni *irregular*, tepi *undulate*, serta warna krem dan putih. Spons *Dasychalina* sp. memiliki isolat bakteri endosimbion dengan bentuk dan tepi yang berbeda-beda. Spons *Cinachyrella australiensis* memiliki isolat bakteri endosimbion dengan bentuk *rhizoid* dan *irregular* dengan tepi *filamentous* dan *undulate*. Spons *Stylissa massa* memiliki isolat bakteri endosimbion dengan bentuk *rhizoid, circular, dan irregular* dengan tepi *filamentous* dan *entire*. Spons *Petrosia nigricans* memiliki isolat bakteri endosimbion dengan bentuk koloni *circular* dan *filamentous* dengan tepi *entire, erose, dan filamentous*.

Hasil pewarnaan Gram yang dilakukan, dari 15 isolat, terdapat 8 isolat kelompok bakteri Gram positif dan 7 isolat bakteri Gram negatif dengan dominasi bentuk sel kokobasil tanpa spora. Beberapa contoh makroskopis koloni bakteri endosimbion dan pewarnaan Gram ditunjukkan pada gambar 4 dan makroskopis koloni serta pewarnaan Gram seluruh isolat dapat dilihat pada gambar lampiran 1 dan 2.



**Gambar 4.** Hasil karakterisasi morfologi koloni isolat bakteri endosimbion

### C. Hasil skrining aktivitas antimikroba metode Gibex yang dimodifikasi

Skrining kualitatif Gibex yang dimodifikasi dilakukan terhadap filtrat NB dan ekstrak etil asetat. Hasil skrining metode Gibex menunjukkan isolat bakteri memiliki aktivitas antimikroba yang berbeda terhadap setiap mikroba uji yang digunakan. Reaksi tersebut ditunjukkan dengan terjadinya perubahan media yang awalnya bening menjadi keruh dan tetap bening serta perubahan warna setelah ditetesi MTT dari kuning menjadi ungu, ungu terang, dan beberapa isolat tetap mempertahankan warna kuning. Hasil skrining disajikan dalam tabel 4 dan gambar dapat dilihat pada gambar lampiran 2-5.

**Tabel 4. Hasil skrining 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode metode Gibex**

Kode Isolat Bakteri Endosimbion	Saliva		<i>E. coli</i>		<i>S. mutant</i>		<i>C. albicans</i>	
	filtrat NB	ekstrak etil asetat	filtrat NB	ekstrak etil asetat	filtrat NB	ekstrak etil asetat	filtrat NB	ekstrak etil asetat
1K1	1 (+)	1 (+)	2 (+)	0 (+)	1 (++)	0 (-)	1 (++)	2 (++)
1K2	1 (+)	1 (+)	2 (+)	1 (+)	1 (++)	0 (-)	2 (++)	2 (++)
2K1	1 (-)	1 (+)	2 (+)	1 (+)	1 (-)	0 (-)	3 (++)	1 (+)
2K2	1 (-)	0 (-)	1 (-)	1 (+)	1 (-)	0 (-)	3 (+++)	1 (+)
2K3	1 (-)	1 (+)	1 (+)	1 (+)	2 (+)	0 (-)	3 (++)	0 (+)
3K1	1 (+)	1 (+)	1 (++)	2 (++)	2 (++)	0 (-)	2 (++)	2 (+++)
3K2	2 (+)	1 (+)	1 (-)	2 (++)	2 (+)	1 (+)	3 (++)	2 (+++)
3K3	1 (-)	1 (+)	1 (+)	1 (++)	2 (+)	0 (-)	1 (+)	2 (+++)
4K1	2 (+)	1 (+)	2 (+)	1 (+)	2 (+)	1 (++)	2 (+++)	2 (+++)
4K2	1 (+)	0 (-)	2 (+)	2 (++)	2 (+)	0 (-)	2 (++)	2 (+++)
4K3	1 (-)	0 (-)	0 (-)	2 (++)	2 (+)	0 (-)	2 (+++)	2 (+++)
4K4	2 (-)	1 (+)	1 (-)	1 (+)	2 (+)	0 (-)	2 (+++)	1 (++)
5K1	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)	2 (++)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
5K2	1 (+)	3 (+++)	1 (+)	2 (++)	2 (+)	2 (+++)	0 (+)	3 (+++)
5K3	2 (+)	2 (++)	1 (-)	1 (+)	2 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
-	1 (+)	1 (+)	1 (-)	1 (+)	2 (-)	0 (+)	0 (-)	0 (-)
+	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)

#### Keterangan

##### Kekeruhan

-	Keruh	=	Tidak ada aktivitas antimikroba
+	Agak keruh	=	Sedikit aktivitas antimikroba
++	Sedikit bening	=	Aktivitas antimikroba sedang
+++	Bening	=	Aktivitas antimikroba tinggi

##### Warna MTT

0	Ungu gelap	=	Tidak ada aktivitas antimikroba
1	Ungu	=	Sedikit aktivitas antimikroba
2	Ungu terang	=	Aktivitas antimikroba sedang
3	Kuning	=	Aktivitas antimikroba tinggi

Berdasarkan tabel 4, dapat dilihat bahwa secara umum filtrat NB maupun ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang lebih baik terhadap *C. albicans* yang ditandai dengan media yang tetap bening setelah diinkubasi selama satu hari dan warna yang tetap kuning setelah ditetesi MTT. Kemampuan isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* ini disebabkan oleh kemampuan isolat bakteri endosimbion dalam memecah sel *C. albicans*. Menurut Alioes *et al.* (2018) bakteri endosimbion memiliki potensi antifungi yang dapat mendenaturasi ikatan protein pada membran sel *C. albicans* sehingga membran sel menjadi lisis dan senyawa-senyawa bioaktif bakteri endosimbion dapat menembus ke dalam inti sel.

Hasil uji GIBEX terhadap mikroba dari saliva menunjukkan bahwa hanya ekstrak etil asetat isolat bakteri endosimbion 5K2 yang memiliki aktivitas antibakteri cukup kuat daripada isolat bakteri endosimbion filtrat NB maupun ekstrak etil asetat lainnya. Hal ini ditandai dengan media yang tetap bening (kekeruhan +++ ) dan warna media yang tetap kuning setelah ditetesi MTT (bernilai 3).

Hasil uji GIBEX terhadap *E. coli* menunjukkan tidak adanya aktivitas antibakteri yang cukup kuat. Hal tersebut disebabkan oleh senyawa-senyawa bioaktif isolat bakteri endosimbion tidak cukup kuat untuk menghambat ataupun mematikan pertumbuhan *E. coli*. Pernyataan ini juga diperkuat oleh Suryati *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa bakteri Gram negatif ini memiliki lapisan-lapisan dinding sel yang lebih kompleks daripada bakteri Gram positif. Lapisan tersebut antara lain lipopolisakarida, protein, dan fosfolipid.

Hasil uji GIBEX terhadap *S. mutans* menunjukkan bahwa hanya ekstrak etil asetat isolat bakteri endosimbion 5K2 yang memiliki aktivitas antibakteri cukup kuat daripada isolat bakteri endosimbion filtrat NB maupun ekstrak etil asetat lainnya. Hal ini ditandai dengan media yang tetap bening (kekeruhan +++ ) dan warna media menjadi ungu terang setelah ditetesi MTT (bernilai 2).

Hasil uji GIBEX terhadap *C. albicans* menunjukkan bahwa ekstrak filtrat NB isolat bakteri endosimbion 2K1, 2K2, 2K3, 3K2, 4K1, 4K3, dan 4K4 memiliki aktivitas antifungi cukup kuat daripada isolat bakteri endosimbion filtrat NB lainnya. Hal ini ditandai dengan media yang tetap bening setelah dua hari inkubasi dan atau warna yang tetap kuning setelah ditetesi MTT (bernilai 3). Ekstrak etil asetat isolat bakteri



endosimbion 3K1, 3K2, 3K3, 4K1, 4K2, 4K3, dan 5K2 juga memiliki aktivitas antifungi yang cukup kuat terhadap *C. albicans* yang ditandai dengan media yang tetap bening setelah satu hari inkubasi dan atau warna yang tetap kuning setelah ditetesi MTT (bernilai 3).

Berdasarkan hasil skrining metode Gibex dapat disimpulkan bahwa dari 15 isolat bakteri endosimbion, terdapat 11 isolat yang cukup potensial, yaitu isolat 2K1, 2K2, 2K3, 3K1, 3K2, 3K3, 4K1, 4K2, 4K3, 4K4, dan 5K2. Hal tersebut dipilih berdasarkan warna media yang tetap bening setelah diinkubasi selama satu hari (kekeruhan ++++) dan atau warna media yang tetap kuning setelah ditetesi MTT (bernilai 3). Selain itu, ekstrak filtrat NB memiliki jumlah isolat bakteri endosimbion dengan aktivitas antimikroba sedang sampai kuat yang lebih banyak dibandingkan dengan isolat ekstrak etil asetat. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh pelarut yang digunakan. Sifat semi polar yang dimiliki etil asetat tidak mampu untuk menarik senyawa-senyawa bioaktif yang dimiliki oleh isolat bakteri endosimbion spons, sedangkan filtrat NB yang disentrifugasi dapat menyaring senyawa-senyawa bioaktif bakteri endosimbion lebih kuat dibandingkan ekstrak etil asetat. Hal tersebut sependapat dengan pernyataan Ode *et al.* (2019), bahwa tingkat kepolaran dari suatu pelarut memengaruhi persentase rendeman ekstrak yang diperoleh. Suatu senyawa hanya larut pada pelarut yang memiliki tingkat kesamaan polaritas. Penelitian Hutagalung *et al.* (2014), menunjukkan bahwa spons *Stylotella aurantium* dan *Haliclona molitba* pada pelarut akuadestilata memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut metanol.

#### **E. Hasil skrining aktivitas antimikroba metode difusi cakram Kirby-Bauer**

Seluruh filtrat NB dan ekstrak etil asetat diuji skrining metode difusi cakram Kirby-Bauer untuk memastikan hasil yang diperoleh secara kuantitatif. Pengujian metode difusi cakram Kirby-Bauer ini dilakukan terhadap tiga mikroba uji, yaitu *E. coli*, *S. mutans*, dan *C. albicans*. Adapun rataan hasil skrining disajikan dalam tabel 5, diameter zona hambat secara keseluruhan terdapat pada tabel lampiran 1, dan gambar zona hambat terdapat pada gambar lampiran 6-11.

**Tabel 5. Rataan diameter zona hambat 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer**

Kode Isolat Bakteri Endosimbion	<i>E. coli</i> (mm)		<i>S. mutant</i> (mm)		<i>C. albicans</i> (mm)	
	filtrat NB	ekstrak etil asetat	filtrat NB	ekstrak etil asetat	filtrat NB	ekstrak etil asetat
1K1	6,0	6,0	6,5	6,0	<b>19,2</b>	<b>8,3</b>
1K2	6,0	6,0	6,2	6,0	6,0	6,2
2K1	6,0	6,0	6,3	6,0	6,0	7,0
2K2	6,5	6,0	<b>8,1</b>	6,4	6,0	<b>8,1</b>
2K3	6,2	6,3	6,5	6,0	6,0	6,9
3K1	7,5	7,2	<b>9,1</b>	6,0	6,0	<b>9,2</b>
3K2	7,2	6,0	6,0	7,1	6,0	6,0
3K3	6,7	6,0	6,4	6,0	6,0	7,1
4K1	6,0	6,0	6,9	7,0	6,0	6,0
4K2	6,2	6,7	6,0	6,0	6,0	6,0
4K3	6,0	6,0	6,6	6,0	6,0	7,0
4K4	6,2	6,2	6,7	6,0	6,0	7,3
5K1	6,4	6,9	7,0	6,3	6,0	7,6
5K2	<b>11,8</b>	6,0	6,5	6,2	<b>14,2</b>	7,2
5K3	6,0	6,0	7,0	6,0	6,0	7,0
-	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
+	12,4	13,3	11,5	11,5	17	12,5

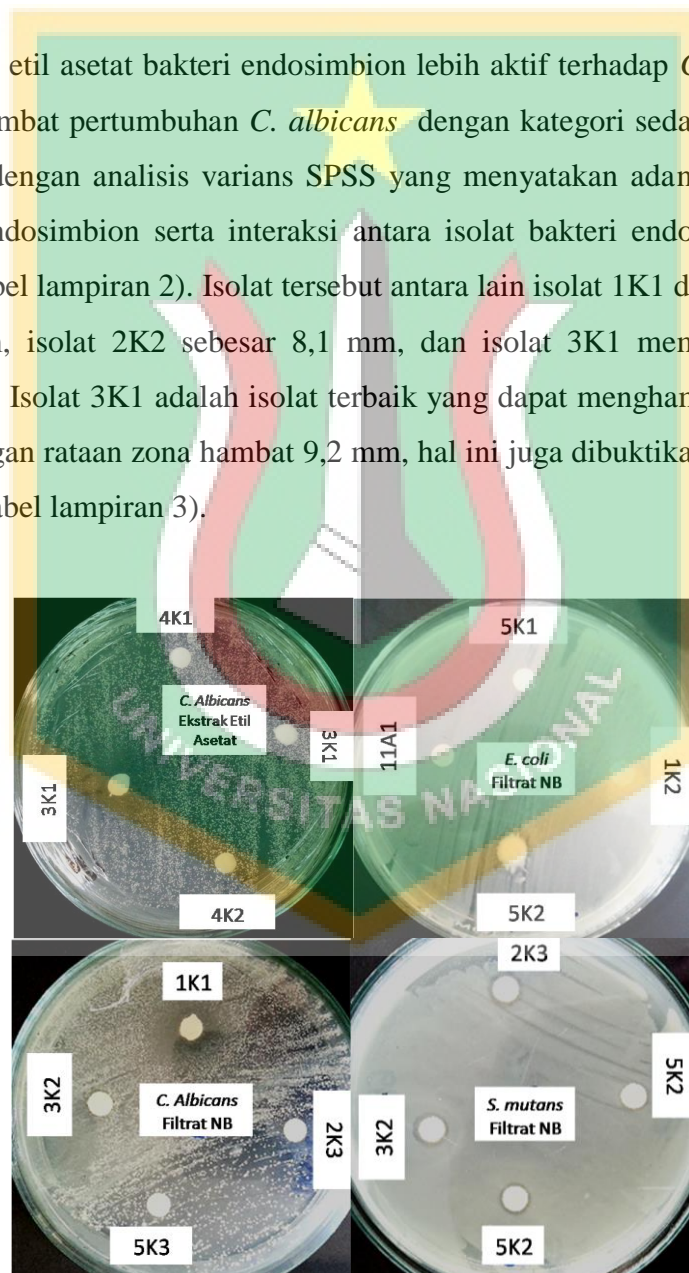
Keterangan: Rataan diameter diatas sudah termasuk diameter cakram 6,0 mm

Berdasarkan hasil metode difusi cakram Kirby-Bauer isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji pada tabel, dapat dilihat bahwa secara umum filtrat NB memiliki aktivitas yang lebih baik terhadap *E. coli* dan *S. mutans*, sedangkan beberapa isolat ekstrak etil asetat hanya memiliki aktivitas terbaik terhadap *C. albicans*. Hal tersebut ditunjukkan dari rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa-senyawa bioaktif bakteri endosimbion. Senyawa tersebut berdifusi ke dalam media tumbuh untuk menghambat pertumbuhan mikroba uji. Berdasarkan zona hambat pertumbuhan mikroba uji yang diperoleh dalam penelitian ini dibuat klasifikasi kekuatan antimikroba menjadi tiga kelompok. Rataan diameter zona hambat >11 mm dikategorikan kuat, 8-11 mm dikategorikan sedang, dan rata-rata diameter zona hambat <8 mm dikategorikan lemah. Contoh gambar zona hambat diperlihatkan dalam gambar 5.

Secara umum, filtrat NB bakteri endosimbion memiliki aktivitas antimikroba yang beragam. Keberagaman zona hambat ini dibuktikan juga dengan hasil analisis varians SPSS yang menunjukkan adanya interaksi masing-masing isolat bakteri endosimbion (Tabel lampiran 1). Aktivitas antimikroba kuat terhadap *C. albicans* dan

*E. coli* karena memiliki rataannya zona hambat >11 mm. Hal tersebut terdapat pada isolat bakteri endosimbion 1K1 dengan rataannya zona hambat 19,2 mm dan isolat 5K2 dengan rataannya zona hambat 14,2 mm terhadap *C. albicans*. Sementara pada *E. coli* terdapat pada isolat 5K2 dengan rataannya zona hambat 11,8 mm. Aktivitas antimikroba sedang dengan rataannya zona hambat 8-11 mm pada filtrat NB dimiliki oleh isolat 3K1 dengan rataannya zona hambat 9,1 mm dan isolat 2K2 dengan rataannya zona hambat 8,1 mm terhadap *S. mutans*.

Ekstrak etil asetat bakteri endosimbion lebih aktif terhadap *C. albicans* karena mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* dengan kategori sedang. Hasil tersebut juga diperkuat dengan analisis varians SPSS yang menyatakan adanya interaksi antar isolat bakteri endosimbion serta interaksi antara isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji (Tabel lampiran 2). Isolat tersebut antara lain isolat 1K1 dengan rataannya zona hambat 8,3 mm, isolat 2K2 sebesar 8,1 mm, dan isolat 3K1 memiliki rataannya zona hambat 9,2 mm. Isolat 3K1 adalah isolat terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dengan rataannya zona hambat 9,2 mm, hal ini juga dibuktikan dengan uji beda rataannya Tukey (Tabel lampiran 3).



**Gambar 5.** Hasil zona hambat beberapa isolat bakteri endosimbion filtrat NB dan ekstrak etil asetat

Berdasarkan hasil metode difusi cakram Kirby-Bauer, membuktikan bahwa isolat filtrat NB memiliki senyawa-senyawa bioaktif yang berpotensi dalam menghambat aktivitas bakteri dan atau fungi, sedangkan isolat ekstrak etil asetat berpotensi dalam menghambat aktivitas fungi. Kedua ekstrak ini, filtrat NB maupun ekstrak etil asetat, umumnya dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Menurut Pita *et al.* (2016), senyawa-senyawa bioaktif khususnya metabolit sekunder mikroba spons juga memberikan pertahanan spons melawan predator.

#### F. Karakterisasi biokimia bakteri endosimbion potensial

Dari 4 isolat bakteri endosimbion spons yang memiliki aktivitas Jenis-jenis isolat bakteri endosimbion yang diperoleh dapat diketahui dengan karakterisasi berdasarkan aktivitas biokimia, seperti fermentasi berbagai macam gula (glukosa, laktosa, maltosa, manitol, dan sakarosa), reaksi merah metil, reaksi Voges-Proskauer, reaksi indol, reaksi sitrat, dan reaksi TSIA. Hasil karakterisasi biokimia isolat bakteri endosimbion dapat dilihat dalam tabel 6 dan gambar dapat dilihat pada gambar lampiran 12-15.

**Tabel 6. Hasil karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion**

No	Uji Biokimia	Kode Isolat Bakteri Endosimbion			
		1K1	2K2	3K1	5K2
1	Glukosa	-	+	+	-
2	Laktosa	-	-	-	-
3	Maltosa	+	+	+	-
4	Manitol	+	+	+	-
5	Sakarosa	+	+	+	+
6	Arabinosa	-	-	-	-
7	Merah metil	-	+	+	-
8	Voges-Proskauer	-	+	+	-
9	Indol	-	-	-	-
10	Sitrat	-	+	+	-
11	TSIA	B/B	B/A	B/A	B/B

Keterangan : + (hasil positif); - (hasil negatif); A/A (meragikan semua gula); B/A (hanya meragikan glukosa); dan B/B tidak dapat meragikan gula.

Berdasarkan tabel di atas, diketahui bahwa isolat 1K1 dapat memfermentasi maltosa, manitol, dan sakarosa. Uji TSIA pada isolat bakteri endosimbion 1K1 menghasilkan warna merah pada bagian tegak dan miring, hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tidak dapat meragikan semua gula. Reaksi biokimia lainnya yang diujikan seperti reaksi merah metil, Voges-Proskauer, indol, dan sitrat memberikan hasil negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat 1K1 tidak menghasilkan produk akhir asam organik sehingga tidak dapat membentuk asetil metil karbinol, tidak memiliki enzim triptofanase yang dapat memecah triptofan menjadi indol, dan tidak dapat menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon dalam medium.

Isolat bakteri endosimbion 2K2 dan 3K1 dapat memfermentasi glukosa, maltosa, manitol, dan sakarosa pada uji gula-gula, namun pada reaksi TSIA, isolat 2K2 hanya dapat meragikan glukosa. Reaksi biokimia lainnya yang diujikan seperti reaksi merah metil, Voges-Proskauer, dan sitrat menunjukkan hasil positif. Hal ini membuktikan bahwa isolat 2K2 menghasilkan produk akhir asam organik sehingga dapat membentuk asetil metil karbinol dan dapat menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon dalam medium, sedangkan pada uji indol, isolat 2K2 memberikan hasil negatif, yang artinya isolat bakteri endosimbion 2K2 tidak memiliki enzim triptofanase yang dapat memecah triptofan menjadi indol.

Isolat bakteri endosimbion 5K2 berdasarkan tabel 6, hanya dapat memfermentasi sakarosa dan pada uji TSIA menghasilkan warna merah pada bagian *slant* dan *butt*, hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tidak dapat meragikan semua gula. Reaksi biokimia lainnya yang diujikan seperti reaksi merah metil, Voges-Proskauer, indol, dan sitrat memberikan hasil negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat 1K1 tidak menghasilkan produk akhir asam organik sehingga tidak dapat membentuk asetil metil karbinol, tidak memiliki enzim triptofanase yang dapat memecah triptofan menjadi indol, dan tidak dapat menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon dalam medium.



## BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Dari 5 sampel spons yang dikoleksi dari perairan sekitar Pulau Kotok Kecil, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta diperoleh 15 isolat bakteri endosimbion.
2. Terdapat 4 isolat bakteri endosimbion yang potensial sebagai sumber senyawa antimikroba, yaitu yang berasal dari spons *Petrosia* sp. (1 isolat), *Petrosia nigricans* (1 isolat), *Cinachyrella australiensis* (1 isolat), dan *Dasychalina* sp. (1 isolat).
3. Zona hambat rata-rata terbesar filtrat NB bakteri endosimbion terhadap *C. albicans* sebesar 19,2 mm (isolat 1K1) dan 14,2 mm (isolat 5K2), terhadap *E. coli* sebesar 11,8 mm (isolat 5K2), terhadap *S. mutans* sebesar 9,1 mm (isolat 3K1), dan 8,1 mm (isolat 2K2).
4. Zona hambat rata-rata terbesar ekstrak etil asetat bakteri endosimbion terhadap *C. albicans* sebesar 9,2 mm (isolat 3K1), 8,3 mm (isolat 1K1), dan 8,1 mm (isolat 2K2).

### B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, disarankan beberapa hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji lanjutan aktivitas antimikroba terhadap isolat bakteri endosimbion dengan metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari ekstrak bakteri endosimbion.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas antimikroba dari bakteri endosimbion yang diperoleh dengan berbagai jenis pelarut yang berbeda kepolarannya serta beberapa tingkat konsentrasi bakteri endosimbion.
3. Perlu dilakukan analisis fitokimia untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terdapat pada masing-masing ekstrak bakteri endosimbion potensial.
4. Perlu dilakukan identifikasi molekuler untuk mengidentifikasi bakteri endosimbion yang diperoleh.





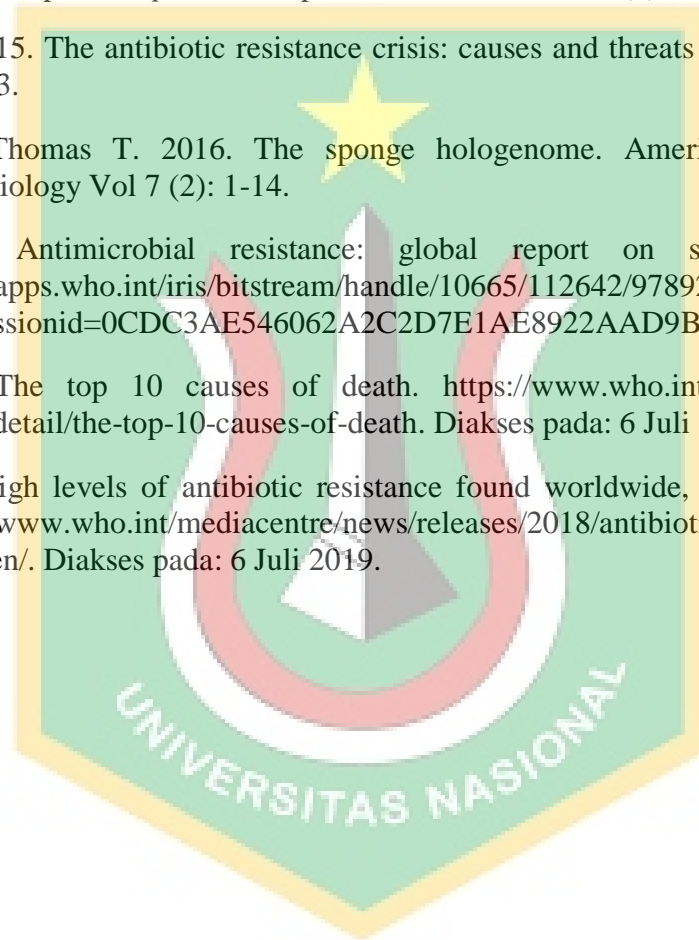
## DAFTAR PUSTAKA

- Alioes Y, Kartika A, Zain EA, *et al.* 2018. Uji potensi antijamur *Candida albicans* ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.) dibandingkan dengan sediaan daun sirih yang beredar di pasaran secara *in vitro*. *Jurnal Kimia Riset* Vol 3 (2): 108-115.
- Anwar T. 2018. Determination of prevalence and antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from household and restaurant kitchen utensils of Dhaka, Bangladesh. Thesis. Department of Mathematics and Natural Sciences. BRAC University. Dhaka, Bangladesh.
- Asagabaldan MA, Ayuningrum D, Kristiana R, *et al.* 2017. Identification and antibacterial activity of bacteria isolated from marine sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. against multi-drug resistant human pathogen. *Earth Environment Science* Vol 55 (1): 1-11.
- Ayitso AS, Onyango DM. 2016. Isolation and identification by morphological and biochemical methods of antibiotic producing microorganisms from the gut of *Macrotermes michaelseni* in Maseno, Kenya. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol 4 (4): 27-33.
- Chelossi E, Milanese M, Milanoc A, *et al.* 2004. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Vol 309 (1): 21-33.
- Cita YP, Radjasa OK, 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* Vol 14 (2): 206-211.
- Dhinakaran DI, Lipton AP. 2012. Antimicrobial potential of the marine sponge *Sigmadocia pumila* from the South Eastern Region of India. *World Journal of Fish and Marine Sciences* Vol 4 (4): 344-348.
- Eduardo LG, Ramirez BS, Maribel CF, *et al.* 2018. Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. *African Journal of Microbiology Research* Vol 12 (31): 736-740.
- Fajrina A, Bakhtra DDA, Irenda Y. 2018. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat spons *Aplysina aerophoba* pada *Helicobacter pylori* dan *Shigella dysenteriae*. *Jurnal Farmasi Higea* Vol 10 (2): 134-142.
- FAO. 2017. Sponges and their role in the marine environment. <http://www.fao.org/3/a-i7775e.pdf>. Diakses pada: 6 Juli 2019.

- Hanim L, Noorman MS. 2017. Kebijakan kelautan dalam rangka menjaga dan mengelola sumber daya alam laut sebagai upaya mewujudkan indonesia sebagai poros maritim dunia. *Maritim* Vol 25 (1): 1-12.
- Hemraj V, Diksha S, Avneet G. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Science* Vol 1 (1): 1-7.
- Hooper JNA, Soest RWMV. 2002. *Systema porifera. a guide to the classification of sponges* Kluwer Academic or Plenum Publishers. New York.
- Hutagalung RA, Victor, Karjadidjaja M, *et al.* 2014. Extraction and characterization of bioactive compounds from cultured and natural sponge, *Haliclona molitba* and *Stylotella aurantium* origin of Indonesia. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* Vol 4 (1): 14-18.
- Li L, Abraham AD, Zhou Q, *et al.* 2014. An improved high yield total synthesis and cytotoxicity study of the marine alkaloid neoamphimedine: an ATP-competitive inhibitor of topoisomerase II $\alpha$  and potent anticancer agent. *Marine Drugs* Vol 12 (1): 4833-4850.
- Lu Z, Koch M, Harper MK, *et al.* 2013. Plakinamine M, a steroidal alkaloid from the marine sponge *Corticium* sp. *Journal of Natural Products* Vol 76 (1): 2150–2152.
- Manandhar S, Luitel S, Dahal RK. 2019. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Journal of Tropical Medicine* Vol 1 (1): 1-5.
- Mehbub MF, Lei J, Franco C, *et al.* 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs* Vol 12 (1): 4539-4577.
- Mohan G, Thangappanpillai AKT, Ramasamy B. 2016. Antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of sponge endosymbiotic bacteria, *Bacillus* sp. at Agatti Island, Lakshadweep Archipelago *Biotechnology Reports* Vol 11 (1): 44-52.
- Murniasih T, Wibowo JT, Putra MY, *et al.* 2018. Pengaruh nutrisi dan suhu terhadap selektivitas potensi antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan spons. *Jurnal Kelautan Tropis* Vol 21 (1): 65-70.
- Ode MF, Ramli M, Sahidin. 2019. Kajian bioaktivitas antibakteri dan senyawa metabolit sekunder spons laut *Haliclona* sp. dari perairan Tanjung Tiram Moramo Utara, Sulawesi Tenggara. *Sapa Laut* Vol 4 (1): 13-22.
- Pita L, Fraune S, Hentschel U. 2016. Emerging sponge models of animal-microbe symbioses. *Frontiers in Microbiology* Vol 7 (2102): 1-8.

- Ponder J, Yoo BH, Abraham AD, *et al.* 2011. Neoamphimedine circumvents metnase-enhanced DNA topoisomerase II $\alpha$  activity through ATP-competitive inhibition. *Marine Drugs* Vol 9 (1): 2397-2408.
- Pratiwi L, Fudholi A, Martien R, *et al.* 2016. Ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai sumber zat bioaktif penangkal radikal bebas. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* Vol 1 (1): 71-82.
- Putra R, Ismed F, Handayani D. 2017. Isolasi dan karakterisasi senyawa antibakteri dari fraksi etil asetat bakteri *Bacillus* sp.3 (A1) yang bersimbiosis dengan spon laut *Haliclona fascigera*. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* Vol 4 (2): 23-29.
- Rahman FA, Haniastuti T, Utami TW. 2017. Skrining fitotokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* Vol 3 (1): 1-7.
- Reef Guide. 2016. Golf ball sponge. <https://reefguide.org/golfballsponge.html>. Diakses pada 22 Agustus 2019.
- Rini AF. 2017. Potensi bakteri penghasil senyawa bioaktif yang berasosiasi dengan spons sebagai biokontrol vibrosis pada udang vanamee. Thesis. Mikrobiologi. Institute Pertanian Bogor, Bogor.
- Raskin I, Skubel S. 2019. The Global Institute for BioExploration (Gibex): Screens to nature manual 2019 School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers, The State University of New Jersey.
- Rumampuk YBJ, Wowor PM, Mambo CD. 2017. Uji daya hambat ekstrak spons laut (*Callyspongia Aerizusa*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. *Jurnal e-Biomedik (eBm)* Vol 5 (2): 1-7.
- Sankar RK, Chadha NK, Roy SD, *et al.* 2016. Growth and survival of marine sponges, *Stylissa massa* (Carter, 1887) and *Liosina paradoxa* (Thiele, 1899) in sea and land based culture systems. Article in *Indian Journal of Fisheries* Vol 63 (4): 55-60.
- Santos OCS, Pontes PVML, Santos JFM, *et al.* 2010. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology* Vol 161 (1): 604-612.
- Suryati N, Bahar E, Ilmiawati. 2018. Uji efektivitas antibakteri ekstrak *aloe vera* terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in vitro*. *Jurnal Kesehatan Andalas* Vol 6 (3): 518-522.
- Tedford AR. 2016. Isolation and identification of bacterial endosymbionts in the brooding brittle star *Amphipholis squamata*. *Honors Theses and Capstones* Vol 273: 1-12.

- Thomas T, Moitinho-Silva L, Lurgi M, *et al.* 2016. Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications* Vol 7 (11870): 1-12.
- Triana O, Sarjono PR, Mulyani NS. 2017. Isolasi bakteri endofit pada rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. *Var Rubrum*) penghasil senyawa antioksidan. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* Vol 20 (1): 25-29.
- Trianto A, Nissa RN, Wijayanti DP, *et al.* 2013. Laju pertumbuhan dan kelulushidupan transplan spons *Amphimedon* sp. *Ilmu Kelautan* Vol 18 (4): 225-230.
- Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: causes and threats *P&T* Vol 40 (4): 277-283.
- Webster NS, Thomas T. 2016. The sponge hologenome. *American Society for Microbiology* Vol 7 (2): 1-14.
- WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. pp. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf;jsessionid=0CDC3AE546062A2C2D7E1AE8922AAD9B?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=0CDC3AE546062A2C2D7E1AE8922AAD9B?sequence=1)
- WHO. 2016. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Diakses pada: 6 Juli 2019.
- WHO. 2018. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>. Diakses pada: 6 Juli 2019.





**LAMPIRAN**



**Tabel lampiran 1. Diameter zona hambat 15 isolat bakteri endosimbion terhadap mikroba uji dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer**

Kode Isolat Bakteri Endosimbion	<i>E. coli</i> (mm)				<i>S. mutant</i> (mm)				<i>C. albicans</i> (mm)			
	NB		Etil Asetat		NB		Etil Asetat		NB		Etil Asetat	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1K1	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	6,0	6,0	6,0	20,0	18,0	8,1	8,5
1K2	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,3	6,0	6,0	6,0	6,0	6,3	6,2
2K1	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	7,0
2K2	7,0	6,0	6,0	6,0	8,0	8,2	6,7	6,0	6,0	6,0	8,1	8,2
2K3	6,0	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,9	6,9
3K1	6,0	7,0	6,0	7,0	9,1	9,1	6,0	6,0	6,0	6,0	9,3	9,1
3K2	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0
3K3	7,0	6,0	6,0	6,0	6,8	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,9	7,3
4K1	6,0	6,0	6,0	6,0	6,7	7,0	6,0	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0
4K2	6,0	6,0	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
4K3	6,0	6,0	6,0	6,0	6,8	6,4	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	8,0
4K4	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	6,4	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	7,5
5K1	6,0	7,0	7,0	6,0	8,0	6,0	6,6	6,0	6,0	6,0	7,4	7,8
5K2	12,0	11,6	6,0	6,0	7,0	6,0	6,3	6,0	14,0	14,3	8,0	6,4
5K3	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	8,0	6,0
-	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
+	12,5	12,3	13,1	13,5	11,4	11,5	11,5	11,4	17,0	16,9	12,5	12,5

Keterangan : Rataan diameter diatas sudah termasuk diameter cakram 6,0 mm

**Tabe lampiran 2. Hasil uji ANOVA isolat bakteri endosimbion filtrat NB terhadap mikroba uji**

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Zona hambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	222.819 <sup>a</sup>	16	13.926	3.497	.000
Intercept	4359.744	1	4359.744	1094.745	.000
Isolat_bakteri_endosimbion	213.286	14	15.235	3.825	.000
Mikroba_uji	9.533	2	4.766	1.197	.308
Error	290.717	73	3.982		
Total	4873.280	90			
Corrected Total	513.536	89			

a. R Squared = .434 (Adjusted R Squared = .310)

**Tabel lampiran 3. Hasil uji ANOVA isolat bakteri endosimbion ekstrak etil asetat terhadap mikroba uji**

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Zona hambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	230,770 <sup>a</sup>	18	12,821	31,309	,000
Intercept	4747,812	1	4747,812	11594,426	,000
Isolat_bakteri_endosimbion	210,663	16	13,166	32,153	,000
Mikroba_uji	20,107	2	10,054	24,552	,000
Error	33,988	83	,409		
Total	5012,570	102			
Corrected Total	264,758	101			

a. R Squared = ,872 (Adjusted R Squared = ,844)

**Tabel lampiran 4. Hasil uji Tukey isolat bakteri endosimbion ekstrak etil asetat terhadap mikroba uji**

**Zona hambat**

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Isolat bakteri endosimbion	N	Subset		
		1	2	3
-	6	6,0000		
1K2	6	6,0500		
3K2	6	6,1667	6,1667	
4K2	6	6,1667	6,1667	
2K1	6	6,2500	6,2500	
4K1	6	6,3333	6,3333	
3K3	6	6,3667	6,3667	
5K2	6	6,4000	6,4000	
4K4	6	6,4333	6,4333	
2K3	6	6,4667	6,4667	
4K3	6	6,5667	6,5667	
5K3	6	6,6500	6,6500	
5K1	6	6,7000	6,7000	
1K1	6	6,7500	6,7500	
2K2	6	6,8667	6,8667	
3K1	6		7,4000	
+	6			12,4167
Sig.		,621	,093	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,409.

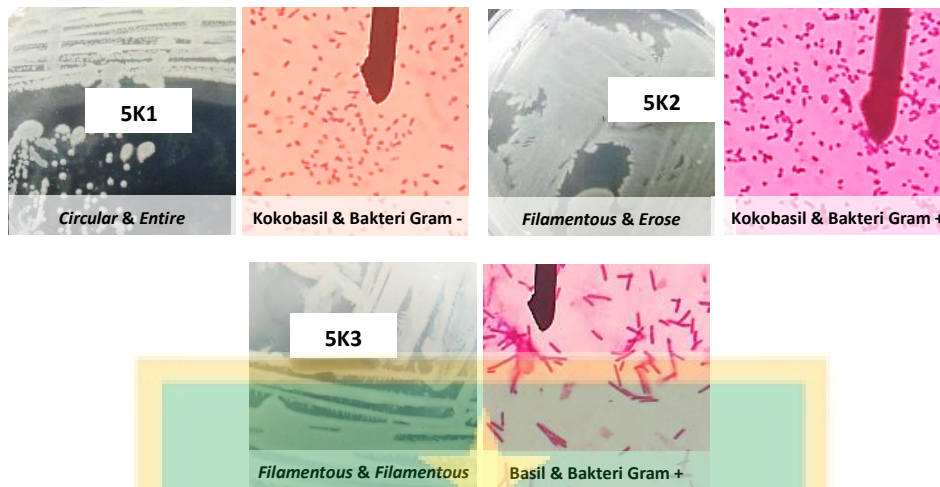
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = 0,05.

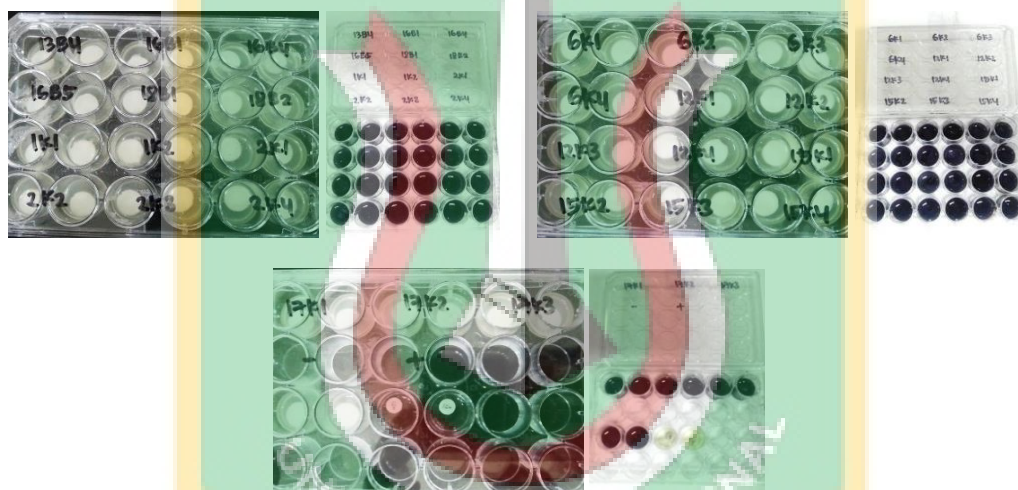




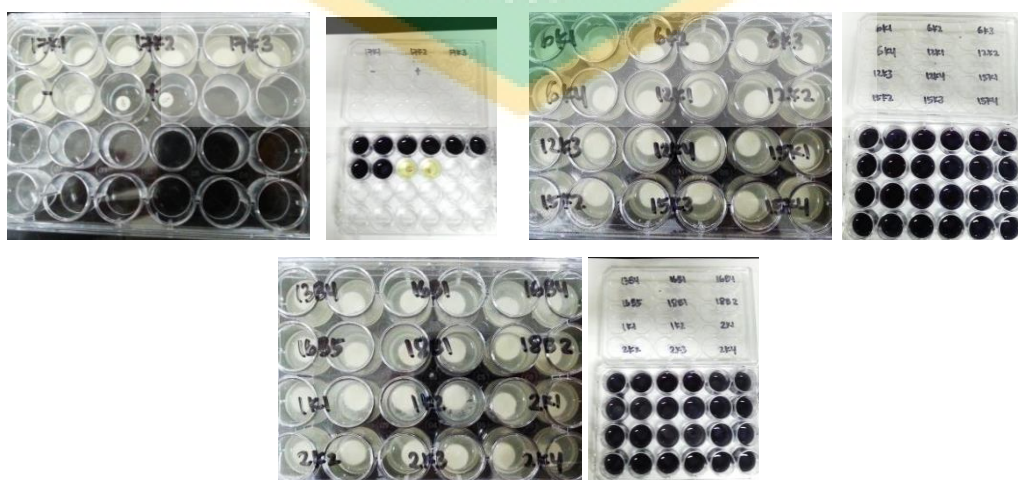
Gambar lampiran 1. Karakterisasi morfologi koloni dan sel isolat bakteri endosimbion 1K1 – 4K4



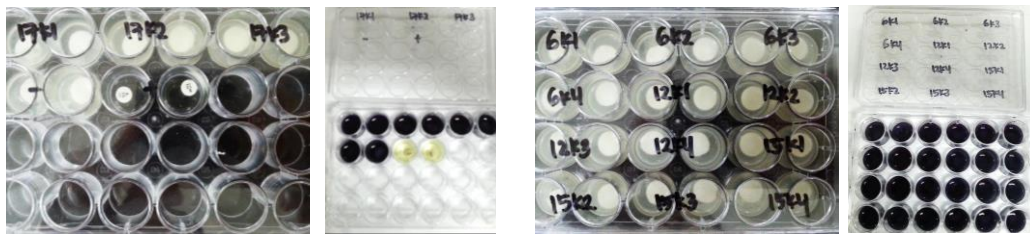
Gambar lampiran 2. Karakterisasi morfologi koloni dan sel isolat bakteri endosimbion spons 5K1 - 5K3



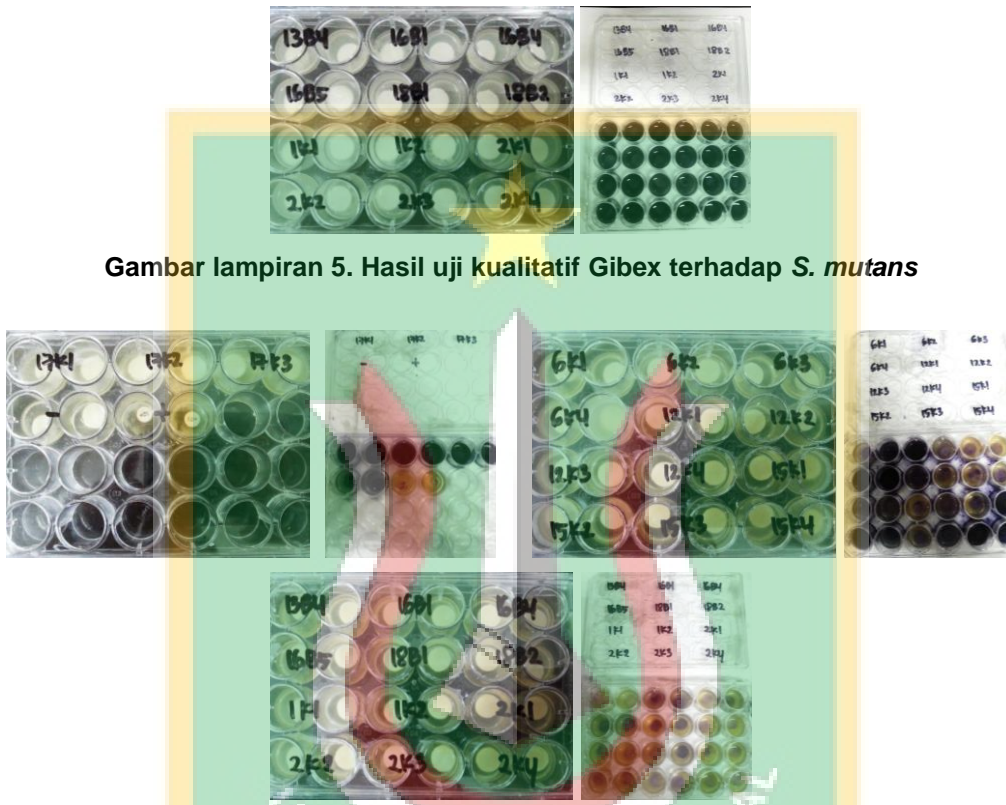
Gambar lampiran 3. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap mikroba dari saliva



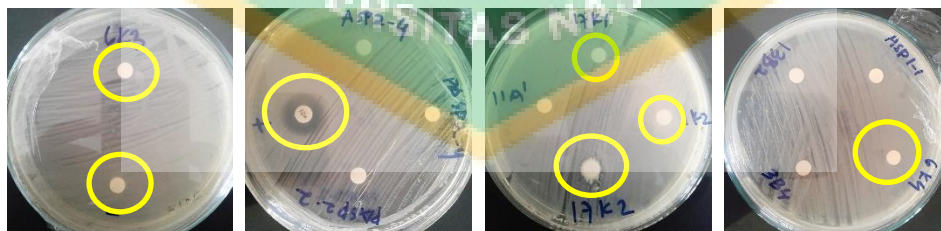
Gambar lampiran 4. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap *E. coli*



Gambar lampiran 5. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap *S. mutans*

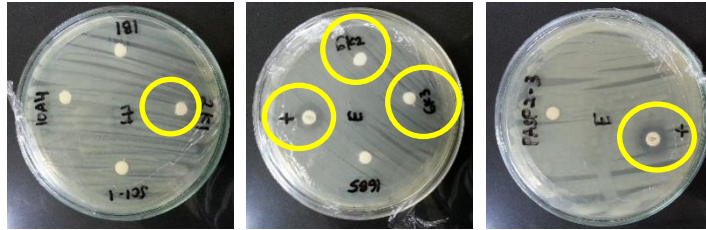


Gambar lampiran 6. Hasil uji kualitatif Gibex terhadap *C. albicans*



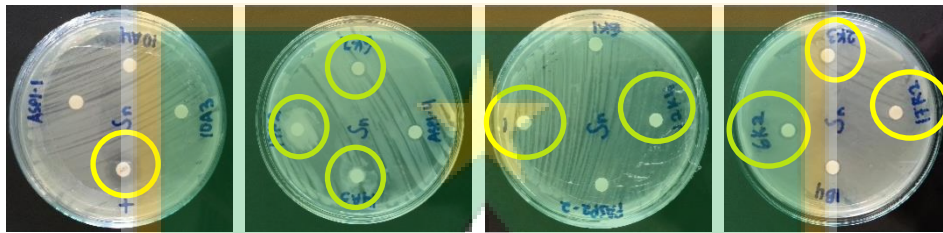
Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

Gambar lampiran 7. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap *E. coli*



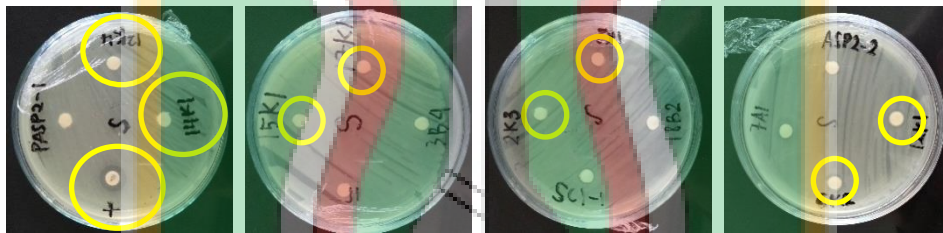
Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

**Gambar lampiran 8. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap *E. coli***



Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

**Gambar lampiran 9. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap *S. mutans***



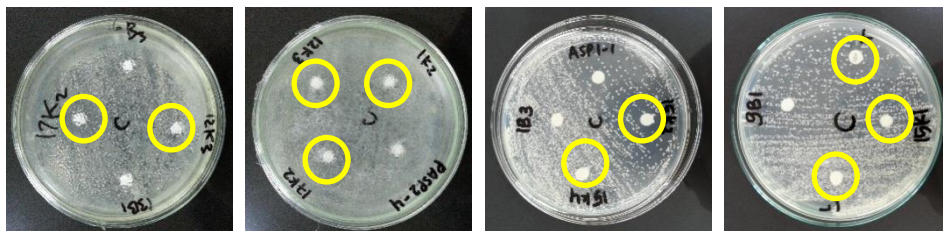
Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

**Gambar lampiran 10. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap *S. mutans***



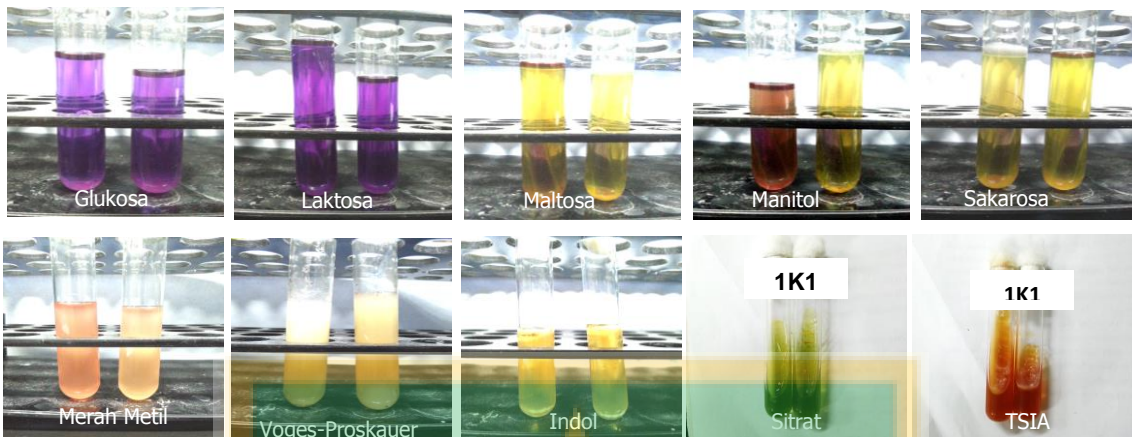
Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

**Gambar lampiran 11. Diameter zona hambat filtrat NB terhadap *C. albicans***

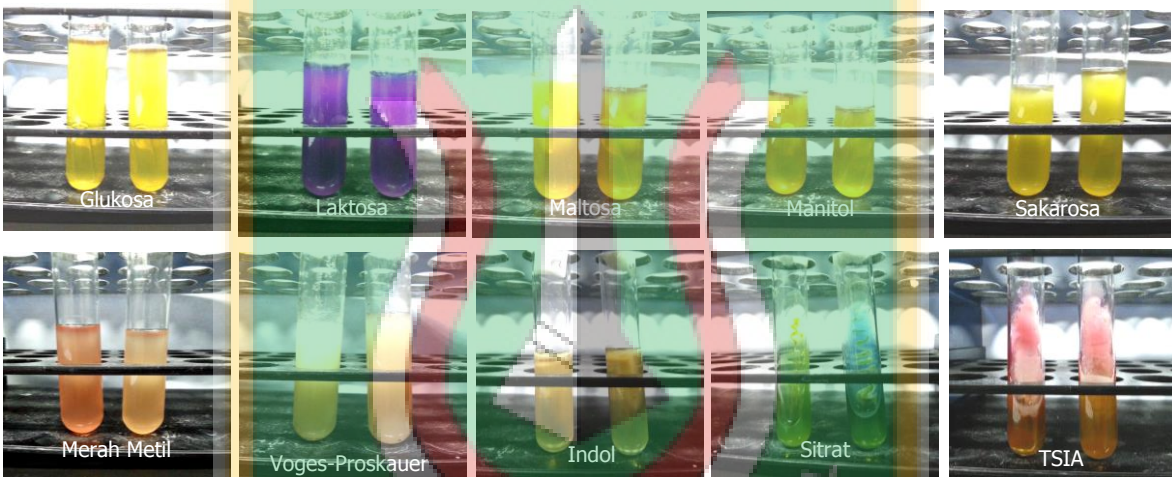


Ket: Lingkaran kuning adalah isolat bakteri endosimbion spons Pulau Kotok Kecil

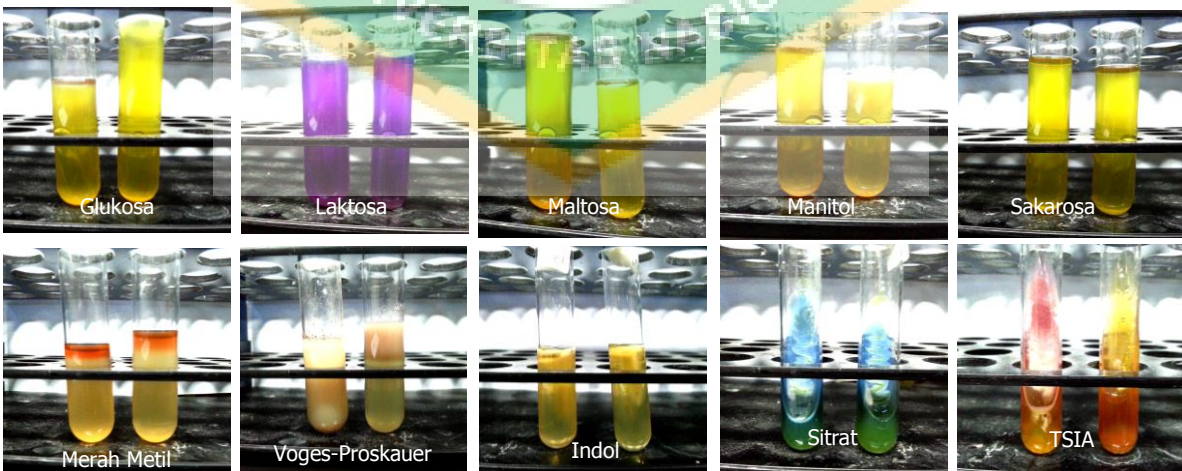
**Gambar lampiran 12. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat terhadap *C. albicans***



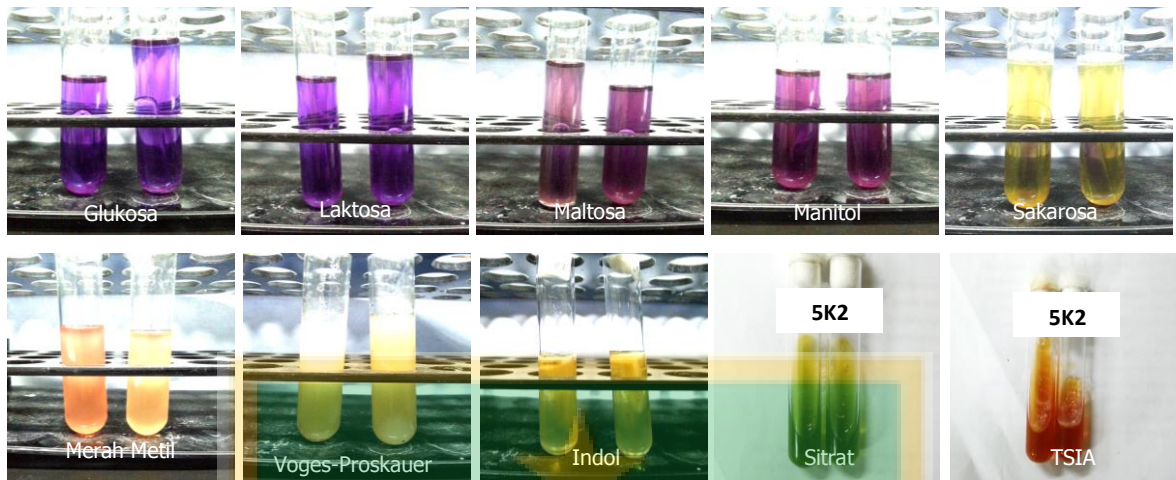
**Gambar lampiran 13. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 1K1**



**Gambar lampiran 14. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 2K2**



**Gambar lampiran 15. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 3K1**



**Gambar lampiran 16. Karakterisasi aktivitas biokimia isolat bakteri endosimbion 5K2**

