

**UJI ANTIBAKTERI DARI KOMBINASI BIOAKTIF *Vibrio sp.*  
YANG BERASOSIASI DENGAN SPONGE *Geodia sp.*  
DAN *Haliclona sp.* TERHADAP BAKTERI PATOGEN  
*Staphylococcus aureus* DAN *Shigella disenteriae***

**LAPORAN SKRIPSI  
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh :  
**WAHYU WULANDARI**  
NIM. 0910832003



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2011**

**UJI ANTIBAKTERI DARI KOMBINASI BIOAKTIF *Vibrio sp.*  
YANG BERASOSIASI DENGAN SPONGE *Geodia sp.*  
DAN *Haliclona sp.* TERHADAP BAKTERI PATOGEN  
*Staphylococcus aureus* DAN *Shigella disenteriae***

**LAPORAN SKRIPSI  
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAGEMAN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh :  
**WAHYU WULANDARI**  
NIM. 0910832003



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2011**

**UJI ANTIBAKTERI DARI KOMBINASI BIOAKTIF *Vibrio sp.*  
YANG BERASOSIASI DENGAN SPONGE *Geodia sp.*  
DAN *Haliclona sp.* TERHADAP BAKTERI PATOGEN  
*Staphylococcus aureus* DAN *Shigella disenteriae***

Oleh :  
**WAHYU WULANDARI**  
NIM. 0919832003

Dosen Penguji I

Ir. Bambang Budi Sasmito MS  
NIP. 19570119 198601 1 001  
Tanggal :

Dosen Penguji II

Eko Waluyo S.Pi, MSC  
NIP.  
Tanggal :



Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Elok Zubaidah, MP  
NIP. 19590821 199303 2 001  
Tanggal :

Mengetahui,  
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal :

**Wahyu Wulandari. 0910832003.** Uji Antibakteri Dari Kombinasi Bioaktif *Vibrio sp.* Yang Berasosiasi Dengan Sponge *Geodia sp.* dan *Haliclona sp.* Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Shygella dysenteriae* (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS** dan **Dr. Ir. Elok Zubaidah, MP**)

---

Pembentukan senyawa bioaktif pada hewan invertebrate khususnya sponge ditentukan oleh prekursor berupa enzim, nutrient, serta hasil simbiose dengan biota lain yang mengandung senyawa bioaktif seperti bakteri, kapang, zooxanthela dan beberapa jenis dinoflagelata yang dapat memacu pembentukan senyawa bioaktif pada hewan tersebut (Suryati, 2000).

Penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa bakteri laut dari genus *Vibrio* merupakan sumber potensial sebagai antibiotika, Radjasa et al (2007) menyatakan bahwa bakteri *Vibrio* yang telah diisolasi dari sponge *Haliclona sp* mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen *Alteromonas hidrophila* yang merupakan *causative agent* pada penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) yang banyak menyerang ikan mas (Pringgengies, 2010).

Meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang telah ada, harus diimbangi dengan penemuan obat baru. Hal ini mendorong untuk ditemukannya produk alternatif pengganti yang lebih baik, murah, memiliki efek samping yang lebih kecil, dan tersedia secara kontinu dalam jumlah besar sehingga resistensi bisa diatasi. Penggunaan kombinasi antibakteri menurut indikasi yang tepat dapat memberi manfaat klinis yang besar. Kombinasi yang dilakukan diharapkan menghasilkan efek yang sinergis satu sama lain (Melviani, 2010).

Berdasarkan hal tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui aktivitas antibakteri senyawa metabolit bakteri *Vibrio sp* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* secara kombinasi terhadap *Staphylococcus aureus* multiresisten dan *Shigella dysenteriae*.

Penelitian ini berlangsung pada bulan September 2010 sampai Februari 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode diskriptif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan gambaran atau deskripsi yang sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta adanya senyawa bioaktif dalam sponge, sifat serta hubungannya dengan bakteri yang bersimbiosis, serta kemampuannya dalam menghambat bakteri pathogen secara kombinasi. Tujuan yang kedua dalam penelitian ini adalah untuk mempelajari komponen bioaktif dari kombinasi metabolit bakteri *Vibrio sp* simbiosis dengan menggunakan metode Elektroforesis SDS-Page.

Dari hasil penelitian, bakteri yang ditemukan berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* adalah species *Vibrio alginolyticus* yang ditunjukkan dengan prentase yang berbeda melalui uji biokimia. Dalam aktifitas antibakteri dengan metode cakram menunjukkan bahwa kombinasi metabolit kurang efektif terhadap bakteri target. Hal ini dapat diketahui dari hasil zona hambat yang relative lebih kecil yang didukung dengan hasil SDS PAGE yang menunjukkan banyaknya senyawa yang hilang dari kombinasi yang dilakukan bila dibandingkan dengan tanpa kombinasi.

Kombinasi Metabolit *V.alginolyticus* simbiosis dari kedua sponge diketahui tidak dapat menghambat *S. aureus* secara efektif. Sehubungan dengan hal tersebut maka disarankan: Penelitian lebih lanjut mengenai jenis senyawa serta kombinasinya dengan bahan dan pelarut yang dapat saling bersinergi sehingga dapat meningkatkan efektivitas antibakteri yang digunakan.

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur yang tak terhingga kepada Dzat pencipta yang menguasai kehidupan seluruh makhluk yang ada di alam semesta dunia dan akhirat, ialah Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi ini dengan judul " Uji Antibakteri Dari Kombinasi Bioaktif *Vibrio sp.* Yang Berasosiasi Dengan Sponge *Geodia sp.* dan *Haliclona sp.* Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Shygella dysentriae*". Laporan skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Selama melaksanakan penelitian hingga penyusunan laporan akhir, penulis banyak memperoleh bantuan dan dukungan dari berbagai pihak yang tak terhitung nilainya. Dalam kesempatan ini, penulis ingin memberikan ungkapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak tersebut. Adapun berbagai pihak tersebut adalah :

1. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing I atas segala ilmu, petunjuk dan pengalaman yang sangat luar biasa mulai dari usulan skripsi sampai dengan terselesaikannya laporan ini.
2. Dr. Ir. Elok Zubaidah, MP selaku dosen pembimbing II yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, dorongan, dan pengarahan yang sangat bermanfaat dalam perjalanan penulis hingga akhir pembuatan laporan ini.
3. Kedua orang tua penulis atas pengorbanan, inspirasi dan kasihnya serta filsafat kehidupan yang diberikan serta doa yang tak pernah putus

Malang, 10 Mei 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Hipotesis .....	4
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Tempat dan Waktu .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Biologi Sponge.....	5
2.1.1 <i>Haliclona sp.</i> .....	6
2.1.2 <i>Geodia sp.</i> .....	7
2.2 Senyawa Aktif Antibakteri pada Sponge.....	8
2.3 Bakteri yang Berasosiasi dengan Sponge.....	8
2.4 Struktur Bakteri dan Fungsinya .....	10
2.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri .....	12
2.6 <i>Vibrio sp.</i> .....	14
2.7 Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder.....	15
2.8 Kombinasi Antibakteri.....	18
2.9 Biologi <i>S.aureus</i> .....	19
2.10 Biologi <i>S.dysentriae</i> .....	20

2.11 Uji Aktifitas Antimikroba .....	22
2.12 SDS-PAGE ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrilamide Gel Elektroforesis</i> ) 23	
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Materi Penelitian .....	25
3.1.1 Bahan Penelitian .....	25
3.1.2 Alat Penelitian .....	25
3.2 Metode Penelitian .....	26
3.2.1 Metode Deskriptif .....	26
3.3 Prosedur Penelitian .....	27
3.4 Pembuatan Sampel dari Sponge Segar .....	29
3.5 Pembuatan Media .....	30
3.6 Pengenceran dan Penanaman.....	33
3.7 Isolasi Bakteri .....	33
3.8 Identifikasi Bakteri .....	34
3.8.1 Pengujian Secara Makroskopis .....	34
3.8.2 Pengujian Secara Mikroskopis .....	35
3.8.3 Pengujian Secara Fisiologis .....	36
3.9 Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri.....	39
3.10 Pemanenan Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder.....	38
3.11 Uji Cakram .....	40
3.12 Analisa SDS PAGE .....	41
3.13 Parameter Uji .....	43
3.14 Analisis Data .....	43
3.15 Jadwal Penelitian .....	44
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>45</b>
4.1 Isolasi Bakteri.....	45
4.2 Identifikasi Bakteri.....	46
4.3 Fase Pertumbuhan Bakteri.....	49
4.4 Aktifitas Antibakteri Metabolit <i>V. Alginolyticus</i> Secara Kombinasi dari Sponge <i>Haliclona sp.</i> Dan <i>Geodia sp.</i> .....	50
4.4.1 Kombinasi Metabolit Primer dari <i>V.alginolyticus</i> simbion <i>Haliclona</i> <i>sp</i> dan <i>Geodia sp.</i> Terhadap <i>S.aureus</i> dan <i>S.dysentriae</i> .....	51
4.4.2 Kombinasi Metabolit Sekunder dari <i>V.alginolyticus</i> simbion <i>Haliclona sp</i> dan <i>Geodia sp.</i> Terhadap <i>S.aureus</i> dan <i>S.dysentriae</i> ..	53

4.5 Perbandingan Hasil Cakram Aktifitas Antibakteri Metabolit *V. Alginolyticus* Symbion Sponge *Haliclona sp.* Dan *Geodia sp.* Secara Kombinasi dan Tanpa Kombinasi Dengan *S.aureus*..... 56

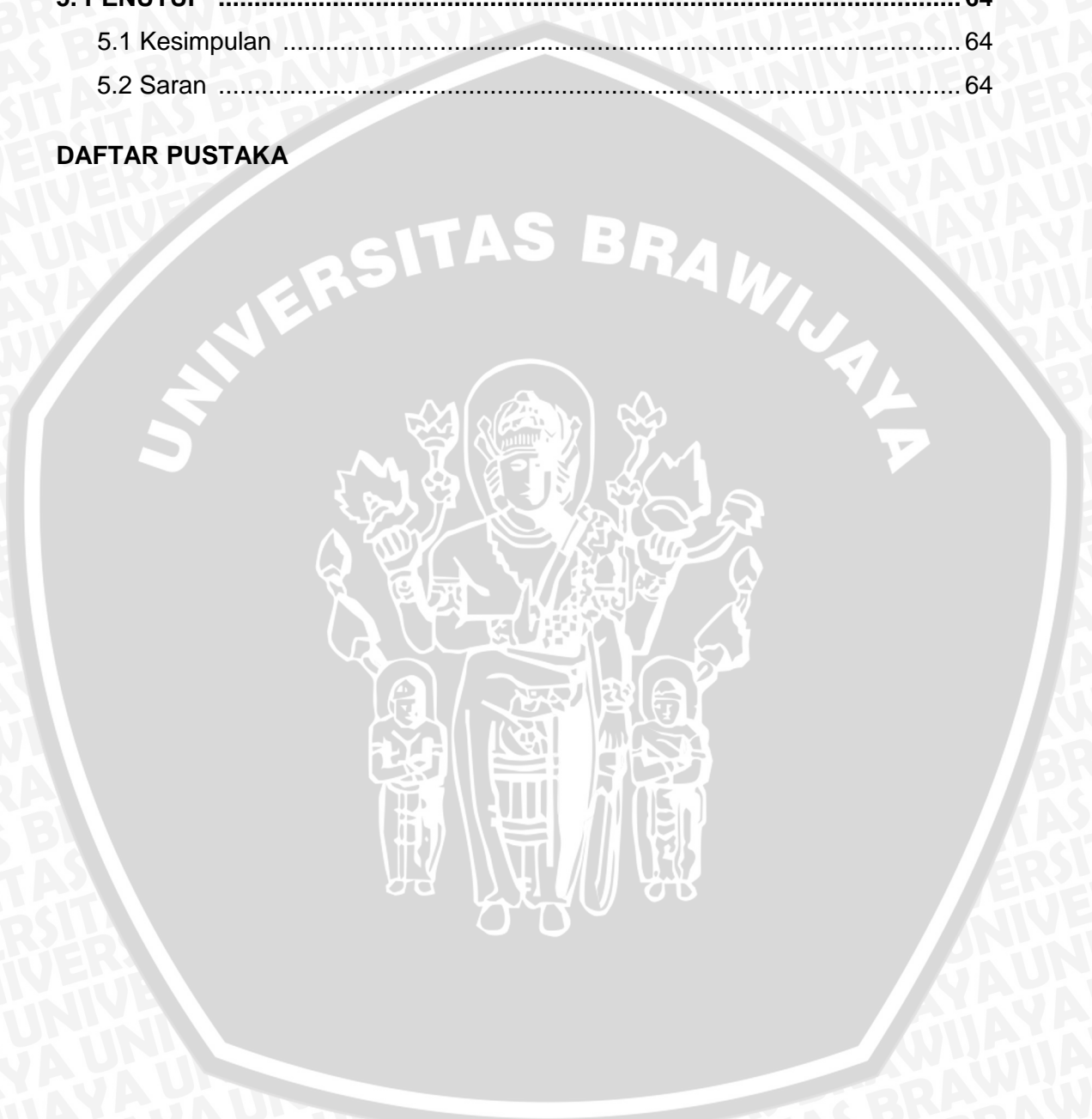
4.6 SDS PAGE..... 59

**5. PENUTUP ..... 64**

5.1 Kesimpulan ..... 64

5.2 Saran ..... 64

**DAFTAR PUSTAKA**





## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perbedaan Relatif Sifat Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif .....	11
Tabel 2. Komposisi TCBSA per liter .....	32
Tabel 3. Komposisi Medium <i>Tryptone Soya Agar</i> (TSA) .....	31
Table 4. Jadwal Penelitian .....	44
Tabel 5. Hasil Identifikasi Bakteri <i>Vibrio sp.</i> .....	46
Tabel 6. Uji Antibakteri pada Metabolit Primer <i>V. alginolyticus</i> dengan Metode Difusi Cakram Terhadap Bakteri <i>S.aureus</i> dan <i>S.dysentriae</i> .....	51
Tabel 7. Uji Antibakteri pada Metabolit Sekunder <i>V. alginolyticus</i> dengan Metode Difusi Cakram Terhadap Bakteri <i>S.aureus</i> dan <i>S.dysentriae</i> .....	54
Tabel 8. Hasil Uji Cakram Aktifitas Antibakteri Metabolit <i>Vibrio algynoliticus</i> simbion sponge <i>Haliclona sp.</i> dan <i>Geodia sp.</i> terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
Tabel 9. Hasil <i>Microbact System</i> Bakteri <i>Vibrio sp.</i> .....	58
Tabel 10. Senyawa yang Ada Pada metabolit Primer dan Sekunder .....	61

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>Haliclona</i> sp. di habitat aslinya .....	6
Gambar 2. <i>Geodia</i> sp. di habitat aslinya .....	7
Gambar 3. Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif .....	11
Gambar 4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
Gambar 5. <i>Shigella dysentriae</i> .....	21
Gambar 6. Flowcahrt Skema Kerja Penelitian.....	28
Gambar 7. <i>Vibrio alginolyticus</i> simbion <i>Geodia</i> sp .....	45
Gambar 8. <i>Vibrio alginolyticus</i> simbion <i>Haliclona</i> sp .....	45
Gambar 9. <i>Vibrio</i> sp. simbion <i>Haliclona</i> sp .....	46
Gambar 10. <i>Vibrio</i> sp. simbion <i>Geodia</i> sp.....	46
Gambar 11. Kurva Pertumbuhan <i>Vibrio Alginolyticus</i> .....	49
Gambar 12. Uji Cakram terhadap <i>S.aureus</i> dengan metabolit primer .....	52
Gambar 13. Uji Cakram terhadap <i>S.dysentriae</i> dengan metabolit primer.....	52
Gambar 14. Uji Cakram terhadap <i>S.aureus</i> dengan metabolit sekunder.....	55
Gambar 15. Uji Cakram terhadap <i>S.disentriae</i> dengan metabolit sekunder .....	55
Gambar 16. Hasil Uji Biokimia dengan <i>Microbact system</i> .....	57
Gambar 17. Analisa SDS PAGE .....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Media ..... 69

Lampiran 2. Pengambilan Sample Ke Pulau Gili Probolinggo ..... 70

Lampiran 3. Isolasi Bakteri..... 71

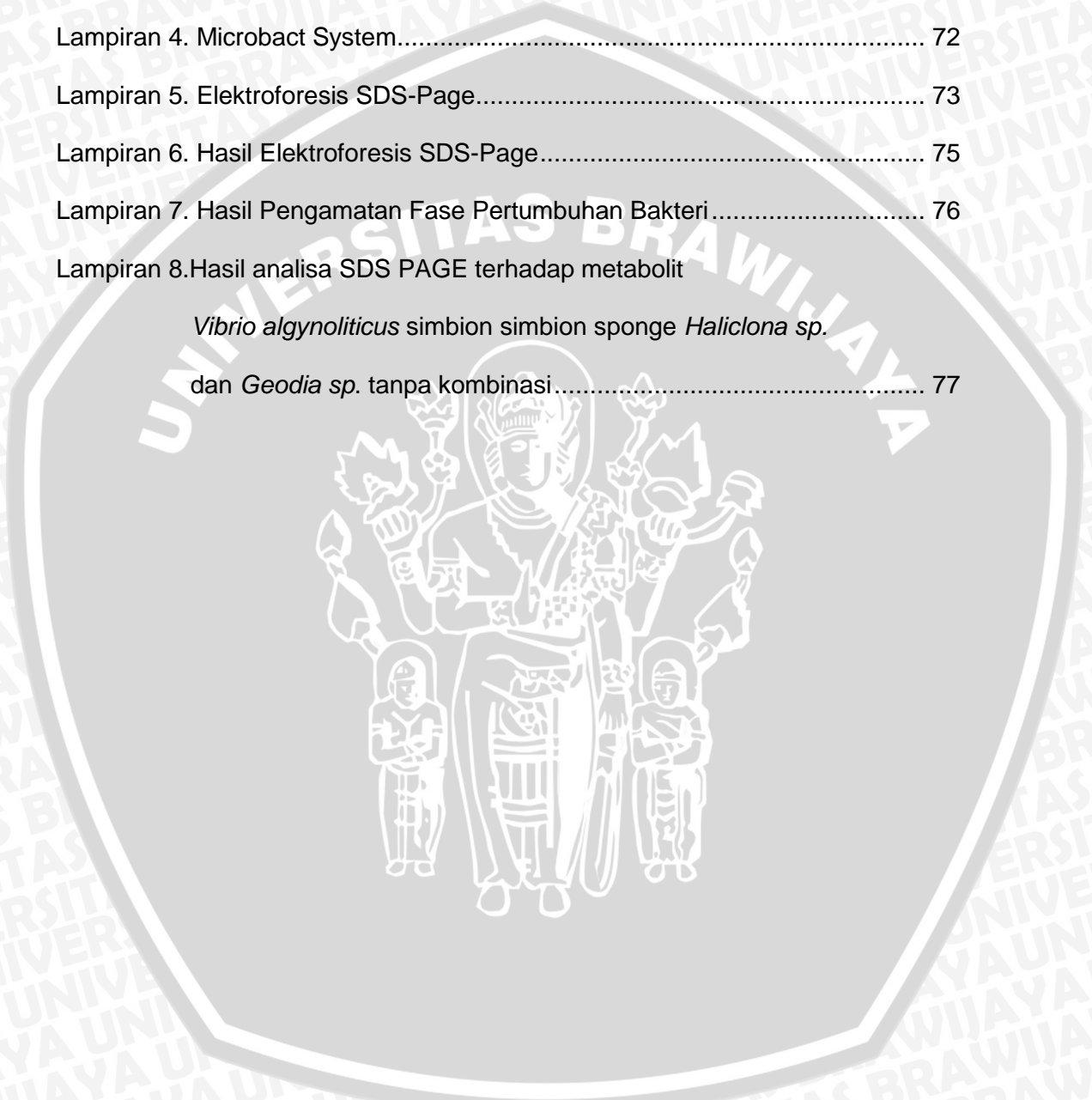
Lampiran 4. Microbact System..... 72

Lampiran 5. Elektroforesis SDS-Page..... 73

Lampiran 6. Hasil Elektroforesis SDS-Page..... 75

Lampiran 7. Hasil Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri..... 76

Lampiran 8. Hasil analisa SDS PAGE terhadap metabolit  
*Vibrio alginolyticus* simbiosis dengan spons *Haliclona sp.*  
 dan *Geodia sp.* tanpa kombinasi ..... 77



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sponge merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang presentasinya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat. Pemanfaatan sponge laut sekarang cenderung lebih meningkat, terutama untuk mencari senyawa bioaktif baru dan memproduksi senyawa bioaktif tertentu (Suparno, 2005)

Tingginya keanekaragaman hayati laut dan uniknya struktur metabolik sekunder yang dihasilkannya, merupakan dua hal yang menjadi daya tarik para ilmuwan dalam melakukan penelitian terhadap sumber hayati laut . Salah satu penelitian yang telah dilakukan terdahulu yaitu tentang khasiat sponge *Geodia sp* yang diambil dari perairan di pulau Gili Probolinggo menunjukkan bahwa terdapat zona hambat terhadap bakteri *E.coli* dari hasil ekstraksi dengan kloroform (Faikoh, 2010).

Pembentukan senyawa bioaktif pada hewan invertebrate khususnya sponge ditentukan oleh prekursor berupa enzim, nutrient, serta hasil simbiose dengan biota lain yang mengandung senyawa bioaktif seperti bakteri , kapang, dan beberapa jenis dinoflagelata yang dapat memacu pembentukan senyawa bioaktif pada hewan tersebut (Suryati, 2000).

Penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa bakteri laut dari genus *Vibrio* merupakan sumber potensial sebagai antibiotika, Radjasa et al (2007) menyatakan bahwa bakteri *Vibrio* yang telah diisolasi dari sponge *Haliclona sp* mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen *Alteromonas*

*hidrophila* yang merupakan *causative agent* pada penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) yang banyak menyerang ikan mas (Pringgencies, 2010).

Meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang telah ada, harus diimbangi dengan penemuan obat baru. Hal ini mendorong untuk ditemukannya produk alternatif pengganti yang lebih baik, murah, memiliki efek samping yang lebih kecil, dan tersedia secara kontinu dalam jumlah besar sehingga resistensi bisa diatasi. Penggunaan antibakteri menurut indikasi yang tepat dapat memberi manfaat klinis yang besar. Kombinasi yang dilakukan diharapkan menghasilkan efek yang sinergis satu sama lain (Melviani, 2010).

Berdasarkan hal tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui aktivitas antibakteri senyawa metabolit bakteri *Vibrio sp* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* secara kombinasi terhadap *Staphylococcus aureus* multiresisten dan *Shigella dysenteriae*.

Bakteri target yang digunakan adalah *S. aureus* yang merupakan bakteri yang dapat menimbulkan infeksi pada setiap jaringan atau alat tubuh manusia dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. Bakteri lain yang digunakan sebagai bakteri target adalah *Shigella dysenteriae*. Habitat alamiah *Shigella* terbatas pada saluran pencernaan manusia dan primata lainnya dimana sejumlah spesies menimbulkan disentri basiler (Jawetz. 2008).

Pengujian kandungan senyawa dari *Vibrio sp.* symbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* dilakukan dengan SDS PAGE karena diduga metabolit yang dihasilkan mengandung senyawa protein. Hal ini ditegaskan dalam Murniasih (2010), bahwa senyawa peptide sebagai antibakteri telah diisolasi dari sponge *Hyatella sp* dari bakteri symbion *Vibrio sp.*

## 1.2 Rumusan Masalah

Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh sponge laut telah banyak diketahui manfaatnya. Manfaat tersebut antara lain adalah sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antivirus, antifouling dan menghambat aktivitas enzim (Suparno, 2005). Dari uraian tersebut di dapat permasalahan sebagai berikut :

- Adakah bakteri *Vibrio sp.* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp.*?
- Apakah kombinasi metabolit *Vibrio sp.* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp.* memiliki senyawa antibakteri yang bersinergi?
- Bagaimana efek aktifitas antibakteri kombinasi metabolit *Vibrio sp* simbiosis sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* terhadap bakteri target?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk:

- Mengidentifikasi *Vibrio sp.* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* segar dengan menggunakan metode isolasi
- Menguji aktifitas antibakteri kombinasi bakteri *Vibrio sp.* yang bersimbiosis dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.*
- Mengidentifikasi komponen bioaktif secara kombinasi yang terkandung dalam sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp.* segar dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*) dengan mengetahui berat molekulnya

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Diduga bakteri *Vibrio sp.* berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.*
2. Diduga kombinasi dari metabolit *Vibrio sp.* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* Dan *Geodia sp.* yang memiliki respon aktifitas antibakteri tertentu yang besinerji
3. Diduga senyawa bioaktif yang teridentifikasi sebagai senyawa antibakteri adalah golongan protein.

### 1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

- Memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga, dan institusi lain mengenai manfaat kombinasi metabolit *Vibrio sp.* simbiosis sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* sebagai antibakteri.
- Masyarakat dapat memanfaatkan bakteri *Vibrio sp.* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* sebagai alternatif bakterisidal alami yang sangat potensial serta aman bagi ekosistem hayati laut.

### 1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Pada bulan September 2010 – Februari 2011.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Sponge

Sponge merupakan suatu hewan invertebrata laut, termasuk dalam filum Porifera, kelas Demospongia. Salah satu spesies dari kelas Demospongia adalah *Haliclona sp.* Sponge umumnya hidup di laut dengan cara menempel pada permukaan batu atau benda lainnya mulai zona litoral (sekitar pantai) hingga kedalaman 8.500 meter permukaan laut. Di Indonesia, sponge dikoleksi dari perairan Jepara, perairan Labuhan Bajo, Flores, serta perairan pada provinsi NTB dan Sulawesi. Sponge merupakan sumber penghasil senyawa bioaktif terbesar diantara invertebrata lainnya (Sijabat, 2009).

Pada umumnya sponge mampu memompa air 10 kali volume tubuhnya dalam waktu satu menit. Sehingga tidak salah kalau hewan ini disebut filter feeder yang paling efisien dibanding hewan laut lainnya. Bentuk tubuh sponge seperti tabung atau jambangan bunga yang bersifat **simetris radial**. Di dalam tubuhnya terdapat rongga tubuh yang disebut **spongosol**. Dalam fase hidupnya, sponge mengalami dua bentuk, yaitu **polip (hidup berenang bebas)**. Ini terjadi pada **fase larva**. Lalu yang kedua **sessil (hidup menetap)** setelah dewasa (Amir dan Budiyanto. 1996).

Dalam Wijarni dan Afriani (1984), reproduksi dilakukan secara aseksual dan seksual. Reproduksi secara aseksual dengan pembentukan kuncup (*budding*), sedangkan reproduksi secara seksual yaitu dengan cara pertemuan sel telur dan sperma yang zigote. Untuk menjaga kelangsungan hidup dan pertahanan dirinya, sponge menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder.



### 2.1.1 *Haliclona sp.*

Menurut Sijabat (2009), *Haliclona sp.* adalah salah satu spesies dari kelas Demospongia. Bentuk sponge ini seperti tabung, mempunyai bagian terbuka yang disebut oskulum dan bagian dalam yang disebut spongocoel, sebagian jaringan sponge sudah terdiferensiasi, tetapi tidak memiliki otot, saraf, dan organ dalam. Sponge jenis ini lebih mirip koloni sel ketimbang organisme bersel banyak. Sponge hanya mempunyai empat tipe sel, yaitu choanocytes yang berfungsi sebagai sistem pencernaan, porocytes untuk membuat pori-pori, flat epidermal yang berperan membentuk kulit, dan amoebocyte yang berperan sebagai alat transportasi makanan dan sekresi spikula.



**Gambar 1. *Haliclona sp.* di habitat aslinya**

Menurut Tomascik et al, (1997), klasifikasi *Haliclona sp.* adalah sebagai

berikut :

- Kingdom : Animalia
- Phylum : Porifera
- Kelas : Demospongia
- Ordo : Haplosclerida
- Famili : Chalinidae
- Genus : *Haliclona*
- Spesies : *Haliclona sp.*

### 2.1.2 *Geodia* sp.

*Geodia* termasuk kelas Demospongia yang merupakan kelompok sponge yang terdominan di antara Porifera masa kini. Mereka tersebar luas di alam, serta jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Mereka sering berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa (*Dictyoceratida*, *Dendroceratida* dan *Verongida*) spikulanya hanya terdiri serat spongin, serat kollagen atau spikulanya tidak ada. (Suparno, 2005).



**Gambar 2. *Geodia* sp. di habitat aslinya**

Menurut Tomascik; *et al*, (1997), klasifikasi *Geodia* sp. adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Porifera
Kelas	: Demospongia
Subkelas	: tectactinomorpha
Ordo	: Arthroporida
Famili	: Geodiae
Genus	: <i>Geodia</i>

### 2.2 Senyawa Aktif Antibakteri pada Sponge.

Selama beberapa abad (sejak dua abad yang lalu) telah diketahui bahwa spons memiliki potensi bioaktif yang besar. Richter pada tahun 1907 (diacu

dalam Thakur & Müller 2004) menemukan bahwa spons mandi yang dibakar ditemukan senyawa iodine. Sementara yang pertama kali mencari produk senyawa alami spons secara sistematis adalah Bergman dan Fenney (1951, diacu dalam Thakur & Müller 2004), yang berhasil mengisolasi 3 nukleosida dari spons Karibia *Chryptotethya crypta* Laubenfels, 1949. Sejak itu bermacam senyawa obat-obatan telah ditemukan dari produk alami spons atau pun analognya. Senyawa antibakteri telah diisolasi dari spons laut jenis: *Discodermia kiiensis*, *Cliona celata*, *Lanthella basta*, *Lanthella crardis*, *Psammaplysilla purpurea*, *Agelas sceptrum*, *Phakelia flabellata*. (Ireland et al. 1989; Munro et al. 1989 dalam Ismet, 2007).

Sponge adalah salah satu biota laut yang mengandung berbagai metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat (Satari, 1999). Hal ini ditegaskan bahwa isolat dari sponge ini dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, antimikroba dan antiparasit (Amir dan Budiyanto, 1996).

### 2.3 Bakteri yang Berasosiasi dengan Sponge

Interaksi antara organisme yang hidup dilingkungan akuatik sangat beragam dan berperan penting pada interaksi yang dimainkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme banyak ditemukan tumbuh secara komensal di permukaan juga di dalam berbagai binatang akuatik, beberapa diantaranya terdapat di organ pencernaannya dimana sejumlah bakteri sering terdapat (Assoniwora, 2010).

Pembentukan senyawa bioaktif pada sponge sangat ditentukan oleh prekursor berupa enzim, nutrien serta hasil simbiosis dengan biota lain yang mengandung senyawa bioaktif seperti bakteri, kapang dan beberapa jenis *dinoflagellata* yang dapat memacu pembentukan senyawa bioaktif pada hewan tersebut (Scheuer, 1978 dalam Suryati et al, 2000). Senyawa terpenoid dan

turunannya pada berbagai jenis invertebrata termasuk sponge atau beberapa spesies dinoflagellata dan zooxanthelae yang memiliki senyawa – senyawa yang belum diketahui, yang kemudian diubah melalui biosintesis serta fotosintesis menghasilkan senyawa bioaktif yang spesifik pada hewan tersebut (Faulkner dan Fenical, 1977 dalam Suryati et al, 2000).

Sponge juga diketahui memiliki mikroba simbiosis yang berasosiasi dalam jumlah yang sangat besar. Mikroba ini diketahui hidup di permukaan tubuh dan dalam matriks tubuh sponge. Pada proses pengambilan makanan, mikroba dari lingkungan perairan sekitarnya ikut tersaring dan masuk ke dalam tubuh sponge. Diduga sebagian besar mikroba ini tetap hidup dalam tubuh sponge tersebut. Dugaan ini diperkuat oleh fenomena bahwa kepadatan mikroba simbiosis berubah seiring variasi perubahan lingkungan. Jumlah mikroba simbiosis yang berasosiasi dengan sponge diperkirakan mencapai 40% biomassa sponge. Oleh karena itu, beberapa penelitian berusaha membuktikan bahwa senyawa aktif dan antimikroba yang dihasilkan oleh sponge juga merupakan hasil metabolisme mikroba simbiosis pada sponge. Beberapa senyawa bioaktif sponge yang diketahui dihasilkan oleh mikroba simbiosis adalah senyawa norharman (senyawa  $\beta$ -carboline dari kelompok alkaloid), yang memiliki aktivitas antibakterial, dari bakteri simbiosis pada sponge *Hymeniacidon perlewe*, senyawa decalactone baru dari fungi simbiosis pada sponge *Xestospongia exigua*, 2-metil thio-1,4-naftoquinon dari bakteri simbiosis pada *Dysidea avarai*, sorbilactone A dari fungi *Penicillium chrisogenum* pada sponge *Ircinia fasciculata*, dan banyak senyawa lainnya (Thakur & Müller 2004 dalam Ismet 2007).

Semua mikroorganisme yang ditemukan berasosiasi dalam *sponge host* didefinisikan sebagai asosiasi mikroorganisme. Mikroba-mikroba ini dalam waktu yang bersamaan ada didalam sponge yaitu mikroba yang tumbuh secara permanen di dalamnya. Jadi, istilah simbiosis ini digunakan untuk mikroorganisme

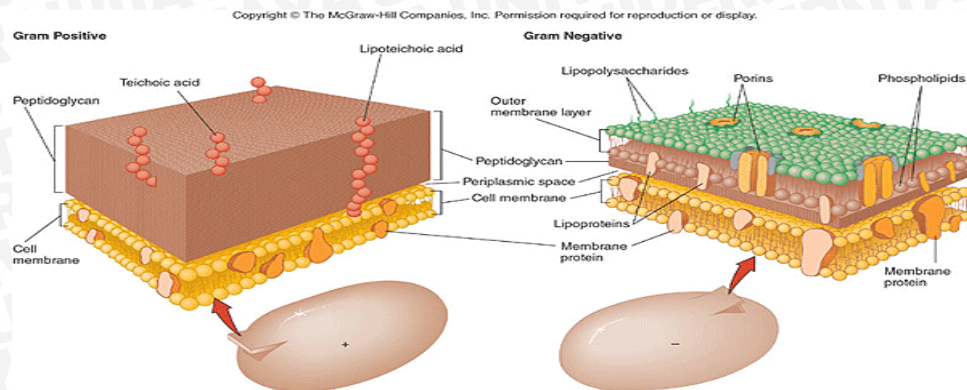
yang selalu ditemukan dalam asosiasinya pada *hosting spesies* yang sama, tetapi tidak berarti bahwa simbiosis tersebut secara khusus hanya ada dalam sponge tertentu (Riata, 2010).

#### 2.4 Struktur Bakteri dan Fungsinya

Telah dijelaskan oleh Abubakar (2009) bahwa produk alami laut sebagai hasil metabolik sekunder kemungkinan dihasilkan oleh kehadiran mikroorganisme pada jaringan sponge sebagai simbiosis, baik simbiosis intraseluler ataupun ekstraseluler. Senyawa-senyawa organik tersebut dapat ditransportasikan karena adanya kerjasama antara simbiosis dan inangnya. Kehadiran kedua pasangan simbiosis ini juga menjadi syarat untuk menghasilkan metabolik sekunder seperti senyawa bioaktif yang bersifat antimikroba.

Dalam Fardiaz (1989), dua grup bakteri prokariot telah dikenal berdasarkan susunan selnya, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Pada bakteri gram positif, 90% dari dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan, sedangkan lapisan tipis lainnya adalah asam teikoat. Asam teikoat mengandung unit-unit gliserol atau ribitol yang terikat satu sama lain oleh ester fosfat, dan biasanya mengandung gula lainnya dan D-alanin. Karena asam teikoat bermuatan negatif, lapisan ini juga mempengaruhi muatan negatif pada permukaan sel. Beberapa antibiotik seperti penisilin dan sikloserin dapat mencegah sintesis peptidoglikan pada sel yang sedang tumbuh. Karena bakteri gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal, maka bakteri ini lebih sensitif terhadap penisilin dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif juga lebih sensitif terhadap enzim lisozim yang dapat memecahkan ikatan antara N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat. Selama pertumbuhan sel, terjadi sintesis dinding sel baru sebelum sel melakukan pembelahan pada bakteri gram positif, sintesis dinding sel hanya terjadi di bagian

tengah tempat terbentuknya sekat (septum), sedangkan pada bakteri gram negatif sintesa dinding sel baru terjadi selang-seling dengan dinding sel yang lama.



**Gambar 3. Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif**  
([www.google.com](http://www.google.com))

Lebih jelas tentang perbedaan antara bakteri gram positif dan gram negatif dijelaskan pada tabel 1.

**Tabel 1. Perbedaan Relatif Sifat Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif**

No.	Sifat	Perbedaan relative	
		Bakteri gram positif	Bakteri gram negative
1.	Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah (1-4%)	Kandungan lipid tinggi (11-22%)
2.	Ketahanan terhadap penisilin	Lebih sensitive	Lebih tahan
3.	Penghambatan oleh pewarna basa (misalnya violet kristal)	Lebih dihambat	Kurang dihambat
4.	Kebutuhan nutrient	Kebanyakan spesies relatif kompleks	Relatif sederhana
5.	Ketahanan terhadap perlakuan fisik	Lebih tahan	Kurang tahan

Sumber : Fardiaz, 1989

Salah satu mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu antibiotik adalah merusak membran sel, dimana fosfolipid sebagai komponen utama membran sel dihidrolisis sehingga membran sel tidak dapat lagi mempertahankan bentuk sel. Akibatnya terjadi kebocoran membran sel dan

bakteri mengalami hambatan pertumbuhan atau bahkan kematian. Penelitian yang telah dilakukan oleh Nofiani (2009) menunjukkan bahwa senyawa golongan flavonoid mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dimana mekanisme penghambatannya berupa perusakan membran sel. Gugus OH berperan penting dalam pelepasan ion  $H^+$  yang menyerang gugus fosfat sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat.

## 2.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Mikroba di lingkungan pada umumnya berada dalam populasi campuran, sulit ditemukan mikroba dijumpai sebagai spesies tunggal. Untuk itu dibutuhkan metode isolasi agar dapat mencirikan dan mengidentifikasi suatu mikroorganisme tertentu. Pertama kali harus dapat dipisahkan dari mikroorganisme lainnya yang dijumpai dalam habitatnya, lalu ditumbuhkan menjadi biakan murni.

Dalam Suwandi (1999), dijelaskan bahwa identifikasi menggunakan beberapa jenis media sekaligus memerlukan banyak waktu dan biaya, karena itu menggunakan satu jenis media yang paling selektif dan spesifik akan sangat membantu dan lebih efisien. Untuk dapat memilih dengan tepat media yang digunakan diperlukan pengetahuan mengenai komposisi media dan peranan setiap bahan dalam media.

Terdapat dua metode untuk memperoleh biakan murni yaitu teknik cawan gores dan cawan tuang. Kedua teknik ini berdasarkan pada pengenceran organisme sehingga dapat dipisahkan hanya spesies tertentu berada sebagai sel tunggal. Dengan demikian dapat diperoleh ciri-ciri kultural, morfologis, fisiologis, maupun serologis (Karlina, 2009).

Ditegaskan oleh Kamiso et al (2005), bahwa identifikasi dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni, pengamatan fisiologis, dan pengujian sel biokimia

secara lengkap. Mikroorganisme memiliki sifat tersebut untuk mengidentifikasi karakteristik biokimianya. Hal tersebut dinamakan “sidikjari” biokimia yang dikendalikan oleh aktivitas enzimatik sel, dan kemampuan untuk menanggapi bioenergetik, biosintesis, dan biodegradasi. Jumlah total semua reaksi kimia tersebut ditetapkan sebagai metabolisme sel, dan transformasi biokimia yang terjadi diluar dan dalam sel serta dibangun oleh katalis biologi yang disebut enzim. Hampir semua aktivitas biokimia dalam sel mikroorganisme melibatkan peran katalis biologi enzim, terutama dalam reaksi reduksi dan oksidasi, hidrolisis, serta transfer energi.

Identifikasi adalah pemeriksaan untuk membedakan atau mengidentifikasi suatu jenis bakteri dengan menggunakan media penunjang. Media penunjang untuk uji biokimia bakteri harus disesuaikan dengan jenis bakteri apakah tergolong gram positif atau negatif. Cara untuk mengidentifikasi bakteri sama halnya dengan cara mengkultur yaitu dengan memindahkan spesimen ke dalam suatu media (Feliatra, 1999).

Menurut Fatiqin (2009), identifikasi bakteri dapat dilakukan melalui beberapa tahapan, diantaranya adalah pengamatan secara makroskopis dari morfologi dan pertumbuhan pada koloni uji, pengecatan gram serta mengamati hasil reaksi biokimia yang terjadi pada bakteri. Salah satu metode terbaru untuk identifikasi pada tingkat reaksi biokimia adalah metode Mikrobact. Pengujian biokimia dengan menggunakan mikrobact ini sangat tergantung dari oksidase test yang harus dilakukan sebelumnya. Apabila pengujian oksidase positif, maka diuji dengan mikrobact 12E dan 12B, sedangkan yang hasilnya menunjukkan oksidase negatif, maka pengujian menggunakan dengan mikrobact 12E saja. Kemudian hasil akhir pengujian didapat dengan cara membandingkan dengan warna yang ada dalam tabel, dan memasukkan datanya ke komputer yang telah diprogram dalam file mikrobact.



## 2.6 *Vibrio sp.*

*Vibrio sp* merupakan salah satu bakteri patogen. Bakteri ini bersifat gram negatif, fakultif anaerobik, fermentatif, bentuk sel batang dengan ukuran panjang antara 2-3  $\mu\text{m}$ , menghasilkan katalase dan oksidase serta bergerak dengan satu flagella pada ujung sel. *Vibrio* merupakan patogen yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat yang saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan.

Pada umumnya *Vibrio sp.* Ditemukan di habitat-habitat akuatik, sebagian pada air laut, lingkungan estuarian dan berasosiasi dengan hewan laut. Bakteri ini juga ditemukan pada permukaan dan kandungan intestinal hewan laut. Hidup pada kisaran salinitas yang luas dan beberapa spesies ditemukan pada habitat air tawar (Bauman *et al*,1984).

Menurut Feliatra (1999), klasifikasi *Vibrio sp* adalah sebagai berikut :

Divisi	: Bakteri
Klas	: Schizomicetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Vibrionaceae

*Vibrio sp.* yang diisolasi dari *Leiognathus nuchalis* bersifat terhadap *Pasteurela piscicida* karena menghasilkan protein dengan berat molekul kurang dari 5 kDa. Protein tersebut diduga bacteriocin (Isnansetyo, 2005).

## 2.7 Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder

Secara ekologis, sponge terdapat pada beragam kondisi habitat. Ini menimbulkan pertanyaan mengenai mekanisme adaptasi sponge, yang merupakan hewan sederhana, terhadap kondisi lingkungan habitat. Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa sponge memiliki pertahanan diri secara kimiawi (metabolit sekunder). Senyawa-senyawa kimiawi tersebut bermanfaat

untuk mempertahankan diri dari tekanan kompetitor, reaksi antagonisme, infeksi maupun predasi oleh organisme laut lainnya. Sponge menghasilkan dua jenis metabolit selama masa pertumbuhan dan perkembangannya, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah metabolit yang dibentuk selama masa pertumbuhan dan digunakan dalam proses-proses metabolisme esensial bagi organisme. Produksi metabolit ini hampir serupa pada semua organisme, melibatkan proses anabolisme dan katabolisme, contohnya lintasan pembentukan glukosa. Sementara itu, metabolisme sekunder adalah komponen senyawa yang diproduksi pada saat kebutuhan metabolisme primer sudah terpenuhi dan digunakan dalam mekanisme evolusi spesies atau strategi adaptasi terhadap lingkungan (Ismet, 2007).

Metabolisme merupakan reaksi-reaksi kimia yang terjadi pada makhluk hidup. Proses metabolisme dibedakan menjadi dua jenis yaitu anabolisme dan katabolisme. Anabolisme (Biosintesis) yaitu reaksi biokimia yang merakit molekul-molekul sederhana menjadi molekul-molekul yang lebih kompleks. Misalnya pembentukan protein dari asam amino. Secara umum proses anabolik membutuhkan energi. Sedangkan katabolisme yaitu reaksi biokimia yang memecah atau menguraikan molekul-molekul kompleks menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Proses katabolik melepaskan energi yang dibutuhkan oleh sel (Waluyo, 2004).

Aktivitas metabolisme tidak terlepas dari adanya enzim. Berdasarkan tempat bekerjanya, bakteri memiliki juga jenis enzim yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim yaitu enzim yang berkerja dalam sel. Sistem endoenzim selain bersifat anabolik dapat juga bersifat katabolik. Sedangkan eksoenzim yaitu enzim yang disekresikan ke luar sel dan berdifusi ke dalam media. Sebagian besar eksoenzim bersifat hidrolitik, yang berarti bahwa eksoenzim menguraikan molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana. Molekul-molekul yang

lebih kecil ini kemudian dapat memasuki sel dan digunakan untuk kepentingan sel. Aktifitas metabolisme menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder (Waluyo, 2004).

Metabolit primer (DNA, lemak, protein, karbohidrat) digunakan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup. Simbion sponge juga mempengaruhi metabolisme nitrogen dan oksigen dalam hosting (sponge). Wilkinson dalam Osinga et al., (2001) menyatakan adanya kehadiran bakteri nitrogen dalam sponge *indo-pacific coral reef*. Pada saat lingkungan sekitar tempat sponge hidup kurang nitrogen, maka untuk memenuhi kebutuhan nitrogen tersebut dipenuhi melalui fiksasi nitrogen yang esensial agar sponge dapat aktif berfotosintesis untuk menghasilkan karbohidrat.

Metabolit sekunder (*natural product*) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri. Metabolit sekunder yang diproduksi adalah *alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenol*. Senyawa kimia yang dilepaskan ini bersifat toksik terhadap lingkungannya, namun metabolit sekunder ini berpotensi sebagai anti virus, anti bakteri, anti malaria, anti inflamasi, anti oksidan, dan antikanker (Sijabat, 2009).

Meskipun terdapat pada semua organisme, metabolit sekunder biasanya dibatasi sebagai senyawa yang dihasilkan oleh biota yang fungsinya bagi biota itu sendiri tidak jelas, kecuali sebagai *protective agent*. Senyawa ini umumnya diproduksi tidak dalam fasa pertumbuhan yang cepat (*tropofase*), akan tetapi dibentuk pada fasa perlambatan pertumbuhan (*iodofase*). Banyak senyawa kimia yang digunakan dalam industri farmasi, bahan makanan, penyedap makanan, wangi-wangian merupakan hasil metabolisme tanaman, hewan dan mikroorganisme. Termasuk didalamnya senyawa alkaloid, isoprenoid, steroid, minyak, fenol, terpenoid dan pigmen (Andayani et al., 2002)

Penelitian kimia sponge menunjukkan bahwa sponge menghasilkan banyak jenis metabolit sekunder dengan radiasi struktur senyawa yang unik dan secara biologi aktif. Sponge diketahui mengandung avarone, avarol, asam polyasetilenik bromida, poliketide quinone, asam okadaic, 3-alkypiridium dan senyawa lain yang bersifat antimikroba (Scheuer, 1978).

Senyawa sekunder biasanya bersifat bioaktif, karena dalam kadar kecil dapat mempengaruhi fungsi fisiologis sel hidup. Senyawa sekunder bioaktif yang didapat dari berbagai biota laut mampu mempengaruhi berbagai struktur dan fungsi organisme lain di lingkungan laut (Scheuer, 1978).

Produk alami laut sebagai metabolit sekunder kemungkinan dihasilkan oleh kehadiran mikroorganisme pada jaringan spons sebagai simbiosis, baik simbiosis intra seluler ataupun ekstra seluler. Senyawa-senyawa organik tersebut dapat ditransport karena adanya kerja sama antar simbiosis dan inangnya. Kehadiran kedua pasangan simbiosis juga menjadi syarat untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti senyawa bioaktif yang bersifat anti mikroba (Abubakar, 2009).

Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Selain itu dilihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi (Waluyo, 2004).

## **2.8 Kombinasi Antibakteri**

Kombinasi antimikroba yang digunakan menurut indikasi yang tepat dapat memberi manfaat klinik yang besar. Kombinasi yang dilakukan dalam penggunaan terhadap beberapa antimikroba diharapkan memberikan efek sinergi satu sama lain (Tim FKUI, 2008).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Towse (2005) menyebutkan bahwa *magnesium chloride* ( $MgCl_2$ ) dapat berpengaruh terhadap besarnya zona

hambat *vibrio sp.* symbion sponge dalam aktifitas antibakterinya. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi dengan suatu zat tertentu dapat berpengaruh terhadap metabolit yang dihasilkan dalam aktifitas bioaktifnya sebagai antibakteri.

Dalam Melviani (2010), dijelaskan bahwa tujuan pemakaian kombinasi antibiotika mencakup hal-hal sebagai berikut :

- a. Memperluas spektrum anti kuman pada pasien dengan kondisi kritis atau infeksi berat, tetapi jenis infeksi belum dapat dipastikan. Misalnya pada sepsikemia sering diberikan kombinasi antibiotika antistafilokokus (misalnya nafsilin) dan antibiotika terhadap basil Gram negatif aerob (misalnya gentamisin).
- b. Untuk mengatasi adanya kuman yang resisten. Misalnya kombinasi amoksisilin dengan asam klavulanat atau sulbaktam untuk mengatasi resistensi karena produksi enzim penisilinase.

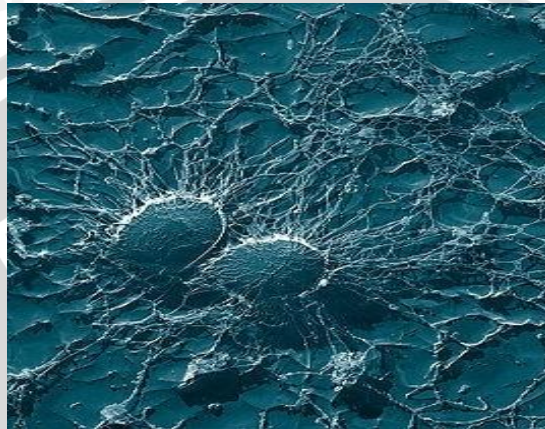
Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok :

- a. Antimikroba yang mengganggu metabolisme sel mikroba
- b. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba
- c. Antimikroba yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba
- d. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba
- e. Antimikroba yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel

## 2.9 Biologi *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen utama pada manusia yang menyebabkan berbagai penyakit secara luas yang berhubungan dengan *toxic shock syndrome* sebagai akibat dari keracunan pangan. Disamping itu *S. aureus* bertanggung jawab atas 80% penyakit supuratif, dengan permukaan kulit

sebagai habitat alaminya. Manifestasi klinis *Staphylococcus aureus* pada manusia antara lain adalah impetigo, *scalde skin syndrome*, pneumonia, osteomielitis, pioartrosis, endokarditis, *metastasis staphylococcal*, keracunan makanan, *toxic shock syndrome* (TSS), meningitis dan sepsis (Salasia et al., 2005).



**Gambar 4. *Staphylococcus aureus***  
([www.google.com](http://www.google.com))

Klasifikasi *S. aureus* menurut Yuari (2009), adalah sebagai berikut:

- Divisi : Protozoa
- Class : Schizomycetes
- Ordo : Eubacteriales
- Family : Micrococcaceae
- Genus : Staphylococcus
- Spesies : *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* dapat menimbulkan infeksi pada setiap jaringan atau alat tubuh manusia dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit bisul, postula, pemfigus neonatorum, hordeolum, mastitis, pneumonia, karbunkel, infeksi luka dan luka bakar, osteomielitis akut, abses perinefrik, keracunan makanan, dan enteritis. *S. aureus* berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur, mungkin sisinya agak rata

karena tertekan. Diameter *S. aureus* antara 0,8 - 1,0 mikro. Bakteri ini tidak bergerak, tidak berspora dan Gram positif. Diantara semua bakteri yang tidak membentuk spora, *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang paling kuat daya tahannya. Pada MH agar miring dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain dan dalam nanah dapat tetap selama 6-14 minggu.

### 2.10 Biologi *Shigella dysentriae*

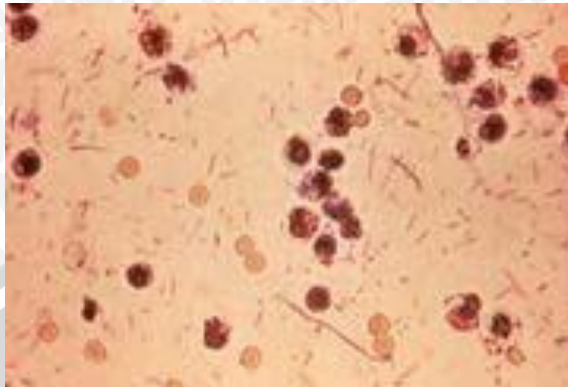
*Shigella* adalah binatang tidak bergerak, gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik yang dengan beberapa kekecualian tidak meragikan laktosa tetapi meragikan karbohidrat yang lainnya, menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas. Habitat alamiah *Shigella* terbatas pada saluran pencernaan manusia dan primata lainnya dimana sejumlah spesies menimbulkan disentri basiler (Jawetz. 2008).

Bentuk morfologi *Shigella* adalah batang ramping, tidak berkapsul, tidak bergerak, tidak membentuk spora, gram negatif. Bentuk cocobasil dapat terjadi pada biakan muda. *Shigella* adalah fakultatif anaerob tetapi paling baik tumbuh secara aerobik. Koloninya konveks, bulat, transparan dengan pinggir-pinggir utuh mencapai diameter kira-kira 2 mm dalam 24 jam. Kuman ini sering ditemukan pada perbenihan diferensial karena ketidakmampuannya meragikan laktosa.

Klasifikasi *S. dysentriae* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria  
Phylum : [Proteobacteria](#)  
Class : [Gamma Proteobacteria](#)  
Ordo : [Enterobacteriales](#)  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : *Shigella*

Species : *Shigella dysenteriae*



**Gambar 5. *Shigella dysenteriae***

*Shigellosis* disebut juga Disentri basiler . Disentri sendiri artinya salah satu dari berbagai gangguan yang ditandai dengan peradangan usus , terutama kolon dan disertai nyeri perut , tenesmus dan buang air besar yang sering mengandung darah dan lendir. Habitat alamiah kuman disentri adalah usus besar manusia, dimana kuman tersebut dapat menyebabkan disentri basiler. Infeksi *Shigella* praktis selalu terbatas pada saluran pencernaan, invasi dalam darah sangat jarang. *Shigella* menimbulkan penyakit yang sangat menular. Dosis infeksi kurang dari  $10^3$  organisme.

Disentri basiler dapat ditemukan di seluruh dunia. Disentri ini dapat terjadi di daerah yang populasinya padat tetapi sanitasinya sangat buruk. Penyebarannya dapat terjadi melalui kontaminasi makanan atau minuman dengan kontak langsung atau melalui vector, misalnya lalat. Namun factor utama dari disentri basiler ini adalah melalui tangan yang tidak dicuci sehabis buang air besar.

### **2.11 Uji Aktivitas Antimikroba**

Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bahan antimikroba bersifat menghambat apabila digunakan dalam konsentrasi kecil, namun bila digunakan dalam konsentrasi



tinggi dapat mematikan mikroorganisme. Salah satu cara untuk menguji bahan antimikroba dapat dilakukan dengan uji cakram. Uji cakram diperkenalkan oleh Willian Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).

Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter (Bonang dan Koeswardono, 1982). Adapun cara peletakan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

Ada beberapa cara yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dalam produk fermentasi antara lain dengan metode sumur agar dan metode difusi agar. Prinsip dari kedua metode tersebut adalah sama yaitu dengan melihat adanya zona bening di sekitar sumur atau cakram. Semakin besar diameter zona bening di sekitar sumur atau cakram menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi (Iqbal, 2007).

Senyawa antibakteri yang dihasilkan melalui proses fermentasi sebagai metabolit sekunder antara lain *bacteriocin*. Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tetapi bukan merupakan kebutuhan pokok fisiologis dari mikroorganisme tersebut (Kunaepah, 2008). Bacteriosin merupakan zat antimikroba berupa polipeptida, protein atau senyawa yang mirip protein (Kone dan Fung, 1992). Menurut Tagg *et al.*, (1976), kriteria yang merupakan ciri-ciri bacteriosin adalah sebagai berikut :

1. Memiliki spectra aktivitas yang lebih sempit
2. Senyawa aktif merupakan polipeptida atau protein
3. Bersifat bakterisida
4. Mempunyai reseptor spesifik pada sel sasaran
5. Gen deteminan terdapat pada plasmid, plasmid rekombinan atau episom dan kromosom atau transposom yang berperan pada produksi dan imunitas

### **2.12 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*)**

Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen akril amida dengan N.N` bisakrilamida. Kisi – kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul sehingga konsentrasi atau rasio akrilamid dengan bisakrilamid dapat diatur unuk mengoptimalkan kondisi migrasi komponen protein. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untk memonitor pemurnian protein (Wilson dan Walker, 2000). SDS-PAGE dilakukan terhadap protein tak larut dengan kekuatan ion rendah dan dapat menentukan apakah suatu protein termasuk monomerk atau oligomeric, menetapkan berat molekul dan jumlah rantai polipeptida sebagai subunit atau monomer.

Penggunaan SDS-PAGE bertujuan untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut (Dunn,1989). Denaturasi protein dilakukan dengan

merebus sampel dalam buffer yang mengandung  $\beta$ -merkaptotanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS (Wilson dan Walker, 2000). Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat sehingga kompleks protein - SDS memiliki rasio muatan per berat molekul yang konstan. (Hames, 1987 dalam Utami, 2007).

Sampel diinjeksikan ke dalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru yang dapat terionisasi. Fungsi pewarna adalah untuk membantu memonitor jalannya elektroforesis. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan Rf protein dengan protein standar yang berat molekulnya telah diketahui (Wilson dan Walker, 2000).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak sponge segar adalah sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* segar yang diperoleh dari perairan Pulau Gili, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji cakram adalah kertas cakram (*paper disc*), *cotton swap*, biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Media TSA (*tripton soy agar*) untuk menumbuhkan *Shigella dysenteriae* dan *Staphylococcus aureus*. sedangkan untuk uji SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui berat molekul dari sample metabolit primer dan sekunder.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar spoge adalah baskom, pisau, talenan, timbangan analitik, *beaker glass*, erlenmayer, corong glass, *rotary vacuum evaporator*, gelas ukur serta lemari es untuk menyimpan sampel. Adapun alat-alat yang digunakan untuk uji cakram adalah autoklaf untuk sterilisasi alat, *micro pipet*, cawan petri, bunsen, dan inkubator. SDS PAGE diperlukan untuk identifikasi senyawa protrin yang diduga bioaktif *Vibrio sp* yang berasosiasi dengan sponge.

#### 3.2 Metode Penelitian

##### 3.2.1 Metode Deskriptif

Tahapan dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Metode deskriptif yaitu metode yang menggambarkan suatu keadaan atau kejadian.

Penelitian deskriptif hanya akan melukiskan keadaan objek atau persoalannya dan tidak dimaksudkan untuk mengambil kesimpulan yang berlaku umum. Dalam hal ini penelitian deskriptif merupakan akumulasi data dasar, dan tidak perlu menerangkan mestest hipotesis, membuat ramalan atau mendapatkan makna dan implikasi (Suryabrata, 1983).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri *Vibrio sp* yang bersimbiosis dan komponen bioaktif yang terkandung dalam sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp*. segar dengan menggunakan metode SDS-PAGE serta mengetahui pengaruh kombinasi dari senyawa yang diduga bioaktif dari masing-masing sponge. Ditambahkan oleh Nasir (1989), tujuan dari penelitian deskriptif adalah untuk memberikan gambaran atau diskripsi yang sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta, sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki

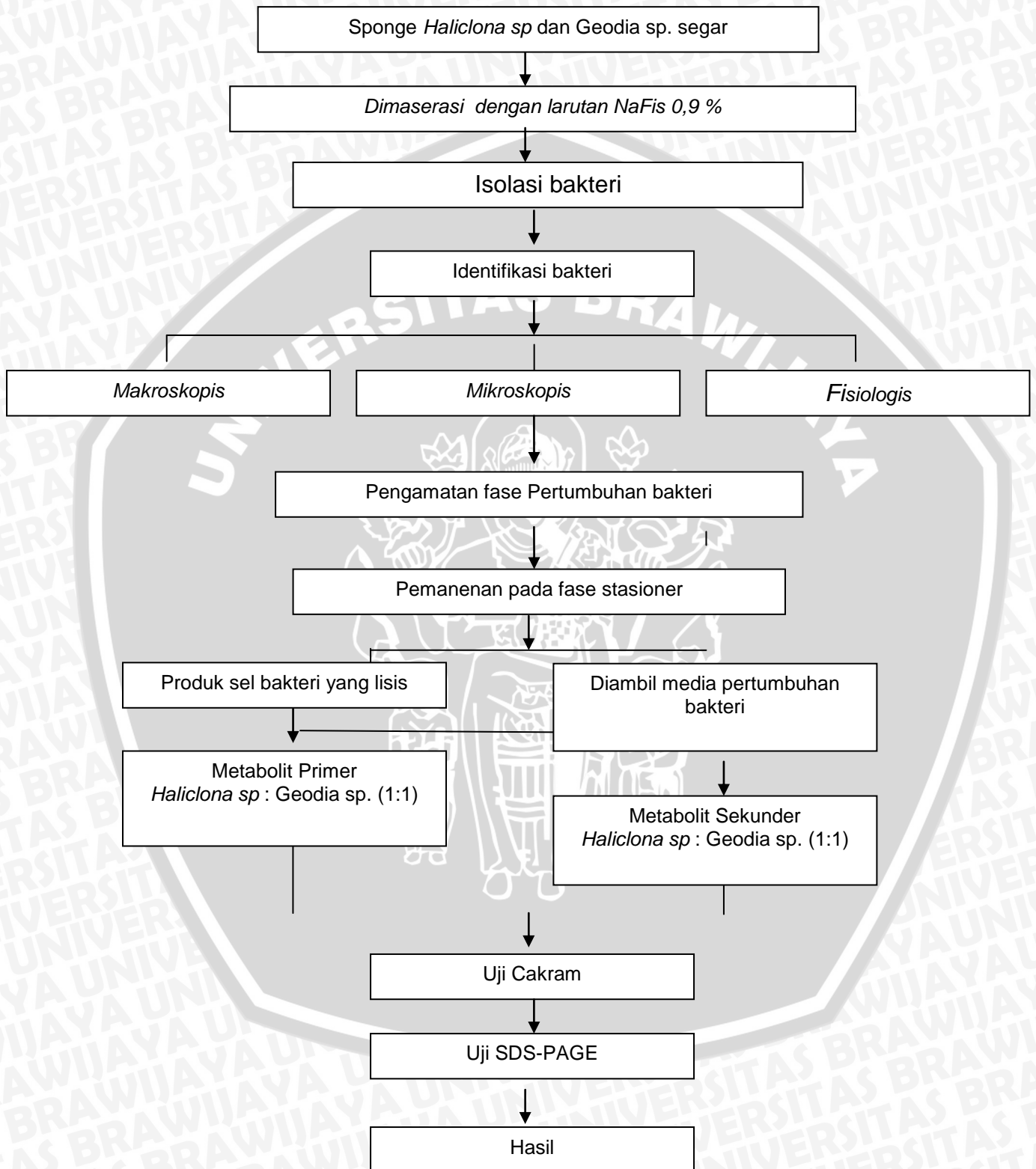
Metode diskriptif digunakan dalam penelitian ini karena dengan metode ini kita dapat memperoleh gambaran suatu keadaan atau kejadian, yang memusatkan perhatian pada pemecahan masalah yang ada sekarang tentang adanya kandungan bioaktif didalam sponge namun apabila dimanfaatkan secara berkelanjutan sangat merugikan karena membutuhkan sampel sponge dalam jumlah besar. Solusi pemecahan permasalahan tersebut adalah dengan jalan memanfaatkan bakteri yang bersimbiosis dengan sponge tersebut yang dilakukan secara kombinasi dari metabolit bakteri *Vibrio sp*. simbion *Haliclona sp*. dan *Geodia sp* sehingga linier dengan tujuan penelitian ini. Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah untuk memberikan gambaran atau diskripsi yang sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta adanya senyawa bioaktif dalam sponge, sifat serta hubungannya dengan bakteri yang bersimbiosis, serta kemampuannya dalam menghambat bakteri pathogen bila diaplikasikan secara kombinasi.

### 3.3. Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini, prosedur awal yang dilakukan adalah isolasi bakteri *Vibrio sp.* pada media TCBS. Melakukan identifikasi bakteri *Vibrio sp.* berdasarkan morfologi koloni, sifat gram dan motilitas serta uji biokimia untuk mengetahui karakteristiknya yang dilakukan pada media TCBS. Setelah itu dilakukan uji cakram untuk mengetahui daya hambat bakteri *Vibrio sp.* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentriae* pada media TSA dan yang terakhir melakukan uji elektroforesis SDS-Page untuk mengetahui berat molekul dari kombinasi metabolit primer dan metabolit sekunder bakteri *Vibrio sp.* *symbion masing-masing sponge* yang mengandung komponen bioaktif yang merupakan golongan protein. Adapun skema kerja yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :



- Skema kerja Penelitian



**Flowcahrt Skema Kerja Penelitian**

### 3.4 Pembuatan Sampel Dari Sponge Segar

Sponge (*Haliclona* sp. Dan *Geodia* sp.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perairan P.Gili Kabupaten Probolinggo. Sponge segar dicuci dan dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dipotong kecil kemudian dilakukan proses maserasi selama 24 jam dengan dimasukan dalam larutan NaFis yang telah disterilisasi dengan perbandingan 9:1. Dijelaskan oleh Iswani (2007), maserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut organik yang dilakukan pada temperatur ruang. Ditegaskan pula oleh Lenny (2006), bahwa proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga bakteri yang ada di dalam sponge akan berdifusi keluar dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi isolat terhadap bakteri. Penggunaan NaFis dimaksudkan untuk menjaga keisotonisan karena memiliki kandungan elektrolit sebagai bahan penunjang dalam pertumbuhan bakteri.

Sampel sponge yang telah direndam dalam NaFis 0,9% kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:9 (10 ml dalam 90 ml). Hal ini sesuai dalam statistik bahwa sampel yang ideal dan representatif adalah 10% dari jumlah bahan. Dilakukan proses pengenceran hingga  $10^{-5}$ . Tujuan dilakukan pengenceran yaitu untuk mendapatkan koloni bakteri yang ideal (30-300). Hasil pengenceran yang di dapat yaitu  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  selanjutnya ditanam dalam media selektif pertumbuhan *vibrio* sp yaitu TCBS agar.



### 3.5 Pembuatan Media

#### A. Media TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar)

Tabel 2. Komposisi TCBS per liter

Komposisi	Gram per liter
Ekstrak yeast	5
Proteose Peptone No. 3	10
Sodium Citrate	10
Sodium Thiosulfate	10
Oxgall	8
Saccharose	20
Sodium Chloride	10
Ferric Ammonium Citrate	1
Bromthymol Blue	0.04
Thymol Blue	0.04
Agar	14

Sumber: [www.neogen.com](http://www.neogen.com)

Adapun cara pembuatan media TCBS adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 88 gram bubuk/powder media TCBS
2. Masukkan erlenmeyer 2 liter
3. Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit
5. Selama pemanasan diwaterbath sesekali digoyang erlenmeyer untuk membantu pelarutan (supaya homogen)
6. Jika sudah larut sempurna ditandai dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer
7. Medium dituangkan pada cawan steril  $\pm$  20 ml , tutup cawan dibiarkan sedikit terbuka untuk mengeluarkan uap panas.
8. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi 37 °C selama 24 jam untuk uji sterilitas medium.
9. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan.

## B. Media TSB (Tryptone Soya Broth)

Tryptone Soya Broth merupakan media cair yang digunakan dalam penelitian ini pada tahap identifikasi dan pengamatan fase pertumbuhan bakteri simbion. Bakteri yang didapatkan dari hasil identifikasi dimasukkan kedalam media TSB kemudian dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri sehingga diketahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase stasioner yang nantinya digunakan sebagai waktu pemanenan metabolit primer dan sekunder.

**Tabel 3. Komposisi TSB per liter**

Formula	Gram per Liter
Pandreatic Digest of Casein	17
Papaic Digest of Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dibasic Potassium phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Sumber: [www.neogen.com](http://www.neogen.com)

Prosedur pembuatan media TSB hampir sama dengan prosedur pembuatan media pada umumnya. Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media TSB adalah sebagai berikut :

- Ditimbang 30 gram bubuk/powder media TSB
- Masukkan erlenmeyer 1 liter
- Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter
- Dimasukkan dalam waterbath suhu 100 °C selama 15 menit
- Selama pemanasan diwaterbath sesekali digoyang erlenmeyer untuk membantu pelarutan (supaya homogen)
- Jika sudah larut sempurna ditandai dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer

- Media dalam erlenmeyer tersebut disterilisasi dalam autoklaf suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit
- Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan

### C. Media TSA (Tryptone Soya Agar)

Tabel 4. Komposisi TSA per liter

Formula	Gram per liter
Tryptone	15
Soya Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Sumber: [www.neogen.com](http://www.neogen.com)

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media TSA adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 40 gram bubuk/powder media TSA
2. Masukkan dalam erlenmeyer 2 liter
3. Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100 °C selama 15 menit
5. Selama pemanasan di waterbath sesekali erlenmeyer digoyang untuk membantu pelarutan (supaya homogen)
6. Tanda sudah larut sempurna adalah tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer
7. Media dalam erlenmeyer tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit
8. Setelah disterilisasi, media didinginkan sampai suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$
9. Media dituangkan pada cawan steril  $\pm 20$  ml per cawan petri
10. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media
11. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunaka

### 3.6 Pengenceran dan Penanaman

Sampel yang telah siap tersebut selanjutnya diencerkan. Tujuan pengenceran adalah untuk mendapatkan koloni yang ideal. Menurut Fardiaz (1993), bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba per ml, per gram atau per cm permukaan, memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada media agar didalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung. Pengenceran dilakukan sampai dengan  $10^{-5}$  dengan menggunakan 9 ml larutan Na-fis 0,9%. Selanjutnya dilakukan penanaman dari  $10^{-3}$  sampai  $10^{-5}$  sebanyak 1 ml pada medium TCBS. Setelah tahap penanaman selanjutnya diinkubasi pada inkubator pada suhu 30-35°C selama 48 jam untuk optimalisasi pertumbuhan bakteri *Vibrio sp.*

### 3.7 Isolasi Bakteri

Setelah bakteri ditumbuhkan pada medium TCBS agar, selanjutnya diambil bakteri yang berwarna kuning untuk disimpan pada medium TSA dan dilakukan tahap pemurnian. Pemilihan bakteri yang berwarna kuning karena bakteri *Vibrio sp.* identik dengan warna kuning yang menandakan adanya fermentasi sukrosa didalamnya. Menurut Afifah (2010), bakteri *Vibrio sp.* memiliki ciri-ciri gram negatif, motil, memfermentasi glukosa, sukrosa, laktosa dan maltose serta membentuk kolom berukuran 0,8-1,2 cm yang berwarna kuning pada medium TCBS agar. Dalam medium TCBS agar bakteri *Vibrio sp.* mensintesis sukrosa menjadi asam-asam organik, seperti asam asetat dan asam glukonat dan beberapa asam organik lainnya, sehingga dengan peningkatan asam-asam organik tersebut mengakibatkan penurunan pH pada medium.

Penyimpanan bakteri pada medium TSA digunakan sebagai bakteri stok. Tahap ini dilakukan karena bakteri yang disimpan dalam medium selektif terlalu lama tidak dapat bertahan hidup. Sementara untuk tahap pemurnian dilakukan pada media TCBS agar yang baru. Koloni yang diduga *Vibrio sp.* tersebut kemudian diambil dan ditanam kembali pada media TCBS agar yang baru karena kemungkinan pada media TCBS agar yang sebelumnya terdapat koloni lain. Hasil penanaman diinkubasi pada suhu 30 °C- 35°C selama 48 jam. Penanaman dilakukan dengan metode kuadran yaitu pada cawan dibagi menjadi 4 bagian yang bertujuan untuk melakukan penipisan dan mendapatkan koloni murni. Pemurnian itu sendiri dilakukan untuk mendapatkan koloni terpisah atau koloni murni yang menjadi syarat utama proses identifikasi bakteri.

### **3.8 Identifikasi Bakteri**

Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan morfologi koloni, sifat gram dan motilitas bakteri. Serta uji biokimia Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri *Vibrio* apakah yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp*, yang kemungkinan mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen. Identifikasi ini dilakukan melalui 3 tahap yaitu secara makroskopis, mikroskopis, serta uji fisiologis.

#### **3.8.1 Pengujian Secara Makroskopis**

Setelah didapatkan koloni murni, selanjutnya koloni tersebut ditanam dalam medium TCBS agar baru dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan secara makroskopis dengan cara diamati dengan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar. Menurut Takuechi *et al.* (1992), berdasarkan pengamatan visual terhadap bakteri patogen spesies *Vibrio*, maka bakteri ini dapat dibedakan berdasarkan warna, bentuk, dan ukuran

koloni yang tumbuh pada media TCBS Agar setelah masa inkubasi 24 - 48 jam pada suhu kamar (37°C).

### 3.8.2 Pengujian Secara Mikroskopis

Selanjutnya dilakukan pengujian secara mikroskopis dimana dilakukan tahap pewarnaan / pengecatan bakteri. Tahap ini dilakukan untuk mengetahui sel bakteri, apakah tergolong dalam bakteri gram positif atau gram negatif. Menurut Anne (2007), salah satu cara yang dapat dilakukan untuk identifikasi bakteri adalah dengan pewarnaan atau pengecatan. Bakteri gram positif berwarna ungu karena bakteri tersebut mengikat kompleks zat warna kristal ungu-iodium, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah karena mengikat zat warna sekunder yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan ini disebabkan perbedaan struktur dinding sel bakteri dan perbedaan kandungan asam ribonukleat antara bakteri gram positif dan gram negatif.

Prosedur pewarnaan diawali dari pengambilan koloni murni dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada bunsen. Selanjutnya satu ose bakteri diletakkan pada sebuah preparat dan dibuat semiran. Langkah ini dilakukan sebanyak 3x dengan membuat tiga semiran dalam satu preparat dimana masing-masing semiran ditandai dengan H1, H2 dan H3. Sebelumnya pada preparat diberi aquadest terlebih dahulu agar mempermudah saat melakukan semiran. Hasil semiran pada preparat kemudian di *blower* sampai kering sehingga dapat mempermudah untuk proses pewarnaan Gram.

Preparat yang telah kering lalu difiksasi agar bakteri yang ada menjadi mati namun tidak merusak struktur selnya. Selanjutnya pada preparat ditetesi kristal ungu (sebagai pewarna primer) kemudian ditunggu sekitar satu menit untuk optimalisasi kerja kristal ungu. Setelah didiamkan 1 menit, selanjutnya

dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa kristal ungu yang tidak melekat pada dinding bakteri. Selanjutnya diberi iodium untuk memperkuat warnanya dan didiamkan pula selama satu menit lalu dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa iodium. Setelah itu diberi alkohol 70% untuk melarutkan lemak dan dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa alkohol yang tidak terpakai. Tahap selanjutnya adalah pemberian safranin sebagai pewarna sekunder dan dibiarkan selama ½ menit lalu dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa safranin. Langkah terakhir yaitu preparat dikeringkan. Preparat yang telah diwarnai kemudian diamati pada mikroskop. Namun sebelumnya pada preparat ditetesi minyak imersi untuk memperjelas indeks bias pada mikroskop. Diamati bentuk bakterinya dan motilitasnya.

### 3.8.3 Pengujian Secara Fisiologis

Dalam uji fisiologis ini dilakukan pengujian dengan uji oksidase, katalase dan *microbact system*. Pengujian katalase dilakukan dengan cara mengambil koloni murni dari media isolasi dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya koloni dibuat suspensi bakteri dan diletakkan pada preparat. Kemudian ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 1-2 tetes. Untuk pengujian oksidase, koloni murni diambil dengan menggunakan kayu. Selanjutnya koloni dioleskan pada preparat dan ditutup dengan kertas oksidase.

Pengujian biokimia dalam tahap ini sangat tergantung dari hasil uji oksidase yang telah dilakukan sebelumnya. apabila oksidase positif maka diujikan menggunakan *microbact 24E*. Namun apabila oksidase negatif maka diujikan menggunakan *microbact 12E*. Tahapan pada uji fisiologis ini adalah diambil 5 koloni murni *Vibrio sp.* yang telah distok (bakteri stok pada medium TSA) dari penanaman sebelumnya lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Dari hasil sentrifuse akan diperoleh supernatan dan pelet namun yang digunakan hanya peletnya saja. Selanjutnya pelet ditambahkan dengan Na-fis

sebanyak 5 ml kemudian dimasukkan pada sumuran-sumuran di *microbact* 24E sebanyak 0,1 ml atau sebesar 100  $\mu$ L dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 30°C. Tahap terakhir diamati perubahan warna yang terjadi pada sumuran-sumuran di *microbact* 24E. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact system* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok. Dari angka oktal ini selanjutnya dapat diketahui spesies bakteri yang dimaksud dengan memasukkannya ke dalam software komputer.

### 3.9 Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri

Senyawa metabolit primer dan sekunder yang akan diuji daya anti bakterinya harus dipanen pada saat yang tepat, dimana kedua senyawa tersebut diproduksi secara maksimal. Alat yang digunakan berupa kamar penghitung khusus (*Petrof Hauser*) yang prinsip dasarnya seperti hemositometer dan sel dihitung dibawah mikroskop. Adapun prosedur Perhitungan Sel Bakteri :

1. Kamar hitung dan kaca penutupnya dibersihkan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% dan mengeringkan dengan tissue halus
2. Letakkan kamar hitung yang sudah bersih benar dengan kaca penutupnya terpasang mendatar diatas meja
3. Sampel diambil dengan mikro pipet dan tidak lupa mengocoknya terlebih dahulu
4. Masukkan sampel dengan cara menyentuhkan ujung tip mikropipet dengan sudut 30° pada permukaan kamar hitung yaitu pada bagian pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung itu terisi cairan sampel perlahan-lahan dengan daya kapiliritasnya sendiri
5. Pakailah lensa objektif kecil yaitu dengan perbesaran 40x Turunkan lensa kondensor atau kecilkan diafragma.



6. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah objektif dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis-garis bagi itu. Dengan sendirinya sel-sel bakteri akan terlihat
7. Hitunglah dengan counter semua sel yang terdapat pada 400 kotak kecil
8. mulailah menghitung dari sudut kiri atas, terus ke kanan ;kemudian turun kebawah dan kanan ke kiri ; lalu turun lagi kebawah dan mulai lagi dari kiri ke kanan.

Kadang-kadang ada sel-sel yang letaknya menyinggung garis batas sesuatu bidang. Sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas harus dihitung. Sebaliknya sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah tidak boleh dihitung.

Setelah diketahui fase pertumbuhannya, dilakukan pengamatan terhadap daya antibakterinya pada uji cakram dengan kombinasi metabolit primer pada *Haliclona sp* dan *Geodia sp.* dengan perbandingan 1:1, hal yang sama juga dilakukan pada metabolit sekunder dari kedua sponge dengan perbandingan yang sama. Selanjutnya dilakukan uji senyawa protein yang tekandung berdasarkan berat molekulnya dengan SDS-PAGE

### 3.10 Pemanenan Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder

Pemanenan sampel berupa metabolit primer dan sekunder bakteri *Vibrio* yang memiliki aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan metode Noviani *et al.* (2009), yang dimodifikasi. Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri *Vibrio*, dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial yang digunakan sebagai penanda waktu dalam proses pemanenan metabolit. Fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan

pertambahan lama waktu penyimpanan. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula bioaktif yang dapat dipanen dari bakteri tersebut (Nurwantoro, 2003).

Untuk mendapatkan bioaktif yang ada didalam sel bakteri, maka harus dilakukan pemecahan (lisis) sel tersebut dengan cara memanen metabolit primer bakteri *Vibrio* , kemudian disentrifuse dengan suhu rendah yaitu 4 °C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Sementara sampel metabolit sekunder yang berupa media dipanen pada fase yang sama yaitu fase eksponensial karena setelah bakteri mancapai pertumbuhan terbanyak pada fase stasioner karena nutrisi yang ada di dalam media telah habis. Untuk mempertahankan agar dirinya tetap hidup, maka metabolit primer yang tersisa dalam tubuh bakteri dikeluarkan sehingga terbentuklah metabolit sekunder.

Koloni murni yang telah di stok, ditumbuhkan kembali pada medium TCBS dan dipanen pada fase eksponensial berdasarkan data yang didapatkan pada pengamatan fase yang telah dilakukan sebelumnya. Pada jam yang menunjukkan fase eksponensial tersebut, media TCBS yang telah ditumbuhi bakteri diambil dari dalam inkubator. Selanjutnya bakteri yang tumbuh dipermukaan cawan diambil semua dengan cara pencongkelan menggunakan sendok tanduk. Bakteri yang didapatkan digunakan sebagai sampel metabolit primer. Sementara setelah semua bakteri diambil sebagai sampel metabolit primer, maka hanya media pertumbuhan yang tersisa. Media tersebut disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Setelah tahap sentrifuse selesai dilakukan, maka akan didapatkan supernatan, dan masing-masing supernatan inilah yang digunakan sebagai sampel metabolit primer dan sekunder untuk pengujian penghambatannya yang dilakukan secara kombinasi terhadap bakteri target.

Tahap pemanenan metabolit sekunder ini dilakukan karena bakteri memproduksi metabolit sekunder keluar dan dilepaskan pada media pertumbuhannya. Menurut Kunaepah (2008), apabila nutrisi pada substrat mulai habis (fase stasioner), mikroba menghasilkan senyawa yang kemungkinan memiliki aktivitas antibakteri, yang dikeluarkan pada substrat untuk mempertahankan kondisi fisiologis.

### 3.11 Uji Cakram

Untuk mengetahui konsentrasi yang memberikan diameter daerah hambatan terbesar dilakukan uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dengan demikian dapat diketahui efektifitas atau pengaruh perlakuan terhadap diameter daerah hambatan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Shigella disenteriae*. Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram metode *Kirby-Bauer* adalah sebagai berikut :

1. Lempeng agar *Muller Hinton Agar* (MHA) ditandai dengan nama , tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji.
2. Kapas Lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD : 0,1 CFU/ml, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.
3. Sebar mikroorganisme pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian diputar lempeng agar 90° dan dibuat olesan kedua , dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga.

4. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.
5. Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 macam dosis perlakuan, jarak antara kertas cakram harus cukup luas, sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat.
6. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar.
7. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
8. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata, dan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

### 3.12 Analisis SDS-PAGE

Untuk mengidentifikasi produk yang dihasilkan dari metabolit primer dan sekunder yang secara selektif dihasilkan secara kombinasi dari bakteri *Vibrio sp.* dari sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* dapat dilakukan dengan membandingkan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis. Metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya.

Hal ini didasari dari penelitian yang dilakukan oleh Chelossi *et al.* (2004) telah berhasil mengidentifikasi beberapa bakteri simbiosis spons *Petrosia ficiformis* merupakan bakteri dari genus *Vibrio sp.* Lebih lanjut dikatakan bahwa beberapa

galur bakteri genus ini, yang ditemukan berasosiasi dengan spons *Hyatella* sp., memproduksi antibiotik yang termasuk ke dalam kelompok peptida (Oclarit *et al.* 1994, diacu dalam Chelossi *et al.* 2004 dalam Ismet, 2007).

Prosedur dalam analisa elektroforesis SDS Page adalah sebagai berikut gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai media pemisah protein (*separating gel* 3%) dan gel pengumpul sampel (*stacking gel*) dengan prosentase bahan 12,5%. Dalam *separating gel* komposisi yang dipakai adalah acrylamida 30%, tris CL 1,5 M pH 8,8, dd H<sub>2</sub>O, SDS (Dodium Dodecil Sulfate) 10%, APS (Ammonium Persulfat) 10% dan TEMED (Tetra Ethylene Diamine). Sedangkan dalam *stacking gel* 3% komposisi yang dipakai adalah acrylamida 30%, tris CL 1 M pH 6,8, dd H<sub>2</sub>O, SDS (Dodium Dodecil Sulfate) 10%, APS (Ammonium Persulfat) 10% dan TEMED (Tetra Ethylene Diamine).

Larutan *separating gel* dituangkan ke dalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai tiga perempat tinggi *plate*. Perlahan dituangkan air di atas larutan gel agar permukaan gel tidak bergelombang. Dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit. Setelah itu air yang menutup *separating gel* dibuang, selama menunggu *separating gel* memadat, *stacking gel* disiapkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya segera dituangkan larutan kedalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet sampai *plate* penuh. Perlahan diselipkan sisir pembentuk sumur sampel kedalam *stacking gel* segera setelah dituang. Setelah gel memadat sekitar 30 menit, sisir diangkat.

Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit, sebagai bahan warna adalah RSB dengan perbandingan 1:1. *Marker* yang digunakan adalah *marker pro-stain*. Sampel dimasukkan sumuran gel menggunakan pipet per sumuran 18µL. Voltase yang digunakan 120 V, dengan waktu selama 90 menit. Gel

diangkat dari chamber, pewarnaan dilakukan dengan merendam dalam *staining solution* selama 30 menit sambil *dishaker*, setelah itu dihentikan pewarnaan dengan *staining solution*.

Gel hasil *silver stain* dianalisa dengan menghitung band yang muncul. Dari hasil pewarnaan gel akan diperoleh hasil berupa pita-pita protein. Pada pita-pita protein diukur jarak pergerakan masing-masing protein standar (*marker*) dan dicatat nilai Rf-nya dimana Rf merupakan perbandingan antara jarak pergerakan pita dari tempat awal dengan jarak pergerakan warna dari tempat warna. Selanjutnya membuat kurva kalibrasi berat molekul, nilai Rf ditempatkan sebagai sumbu Y dan berat molekul yang biasanya dinyatakan sebagai fungsi dari log berat molekul ditempatkan sebagai sumbu X. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis  $y=a+bx$ . Dari rumus di atas maka dapat dihitung berat molekul metaboli primer dan metabolit sekunder *Vibrio*.

### 3.13 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter daerah hambatan yang terlihat di sekitar kertas cakram (mm) yang menunjukkan daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentriae* serta komponen bioaktif yang dihasilkan berdasarkan uji SDS-PAGE dari berat molekul protein.

### 3.14 Analisa Data

Penelitian ini menggunakan analisis data dengan metode deskriptif. Dimana dibandingkan berat molekul golongan protein dari metabolit primer dan metabolit sekunder bakteri *Vibrio sp.* yang diuji dengan SDS-Page.

### 3.15 Jadwal Penelitian

Table 4. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Sept-Okt				Nov-Des				Februari			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Pengajuan Proposal		X										
2.	Revisi Proposal			X									
3.	Penelitian Utama				X	X	X	X					
4.	Pembuatan Laporan							X	X	X			
5.	Konsultasi Laporan								X	X			
6.	Seminar										X		
7.	Ujian Skripsi											X	
8.	Revisi Laporan												X

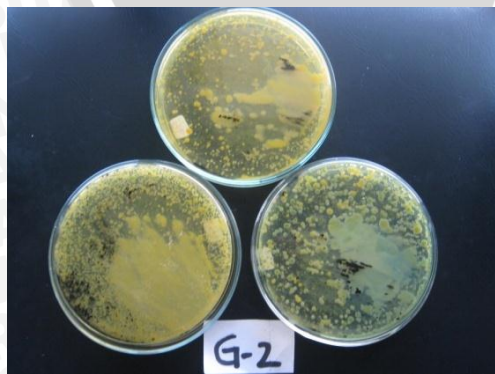


## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

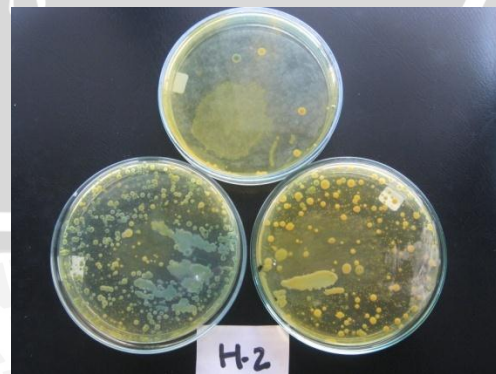
### 4.1 Isolasi Bakteri

Isolasi merupakan salah satu tahap dalam melakukan identifikasi terhadap suatu bakteri. Langkah awal untuk mendapatkan isolat bakteri adalah dengan ekstraksi. Ekstraksi bakteri *Vibrio sp* simbion sponge dilakukan dengan merendam dalam larutan NaFis yang dimaksudkan untuk menjaga keisotonisan karena memiliki kandungan elektrolit sebagai bahan penunjang dalam pertumbuhan sel bakteri. Larutan NaFis yang digunakan dalam proses maserasi akan berubah menjadi keruh kecoklatan karena senyawa yang terkandung dalam sponge ikut terlarut dalam larutan. Isolat bakteri *Vibrio sp* yang diinginkan didapat dari hasil maserasi dengan menggunakan pelarut NaFis 0,9 %. Menurut Iswani (2007), maserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut organik yang dilakukan pada temperatur ruang.

Hasil pengenceran ditanam pada media agar. Untuk mendapatkan koloni bakteri murni dilakukan penanaman pada media selektif untuk menumbuhkan *Vibrio sp*. yaitu TCBS agar. Berikut ini adalah hasil penanaman bakteri pada media selektif TCBS agar.



**Gambar 7. *Vibrio alainolyticus* simbion *Geodia***



**Gambar 8. *Vibrio alainolyticus* simbion**



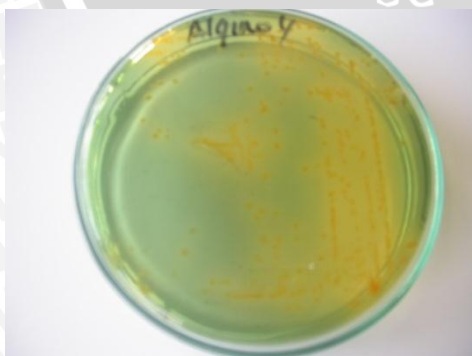
#### 4.2 Identifikasi Bakteri

Bakteri yang telah tumbuh dalam media selektif TCBS agar selanjutnya diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan fisiologis. Berikut ini adalah tabel hasil identifikasi bakteri *Vibrio sp.* yang dilakukan terhadap sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* :

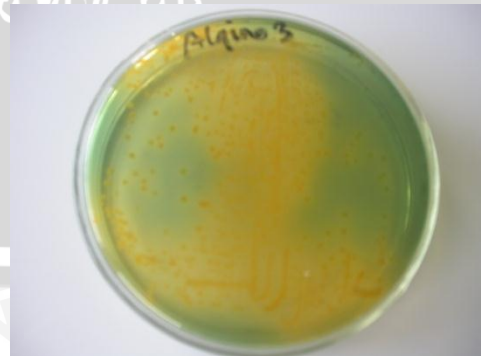
Tabel 5. Hasil Identifikasi Bakteri *Vibrio sp.*

Jenis Pengujian	Metode yang Digunakan	Hasil Pengujian	
		<i>Haliclona sp.</i>	<i>Geodia sp.</i>
Makroskopis	Secara kasat mata	+	+
Mikroskopis	Pewarnaan Gram	-	-
Fisiologis	<ul style="list-style-type: none"><li>• Katalase</li><li>• Oksidase</li><li>• <i>Microbact system</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>+</li><li>+</li><li>98 % <i>V.algynoliticus</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>+</li><li>+</li><li>94 % <i>V.algynoliticus</i></li></ul>

Proses awal dari identifikasi secara makroskopis yaitu dengan pengamatan secara kasat mata. Dari hasil pengamatan diketahui bakteri yang didapat adalah positif *Vibrio sp.* Hal ini terbukti bahwa bakteri *Vibrio sp.* akan berpendar / berwarna kuning bila ditanam dalam TCBS agar karena memfermentasikan sukrosa yang terkandung dalam media. Bakteri *Vibrio sp.* adalah jenis bakteri yang dapat hidup pada salinitas yang relatif tinggi. Sebagian besar bakteri berpendar bersifat halofil yang tumbuh optimal pada air laut bersalinitas 20-40 ‰.



Gambar 9.  
*Vibrio sp.* simbion *Haliclona*



Gambar 10.  
*Vibrio sp.* simbion *Geodia*

Identifikasi secara mikroskopis dilakukan pewarnaan Gram sehingga dapat diketahui struktur yang terdapat dalam sel bakteri. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri yang didapat adalah *Vibrio sp* yang merupakan bakteri Gram negative. Hal ini terlihat dari proses pewarnaan bakteri yang tidak dapat mempertahankan kristal ungu violet. Diamati bentuk bakterinya dan motilitasnya dibawah mikroskop menunjukkan bakteri ini memiliki flagella pada ujung sel.

Sel bakteri Gram negatif yang diwarnai dengan kristal violet dan iodine tidak dapat mempertahankan warna ungu violet pada saat dibilas dengan alkohol atau aseton. Namun pada bakteri gram positif warnanya akan tetap bertahan. Hal ini terjadi karena perbedaan dinding sel pada bakteri gram positif yang tersusun atas peptidoglikan dan asam teikoat. Sedangkan pada bakteri gram negatif dinding selnya hanya tersusun dari peptidoglikan dan membran luar (Jawetz, 2008).

Uji fisiologis dilakukan dengan uji katalase, oksidase dan *microbact system*. Uji katalase adalah suatu pengujian untuk mengetahui apakah suatu bakteri menghasilkan enzim katalase atau tidak. Dari hasil identifikasi diketahui bakteri *Vibrio sp* yang diidentifikasi bersifat positif menghasilkan enzim katalase. Dapat dilihat pada saat penambahan *hydrogen peroksida* ( $H_2O_2$ ) terdapat gelembung udara yang membuktikan bahwa bakteri merubah *hydrogen peroksida* ( $H_2O_2$ ) menjadi oksigen dan air.

Uji oksidase adalah suatu pengujian untuk mengetahui respon bakteri terhadap oksigen, metode yang digunakan adalah oksidase strip. Alat yang digunakan untuk mengambil bakteri uji terbuat dari kayu karena kayu bersifat trans negative. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa bakteri uji bersifat oksidase positif karena dalam waktu 5 detik tidak berubah warna menjadi ungu.

*Microbact system* yang terdiri dari 2 bagian yaitu tipe 24 E dan tipe 12 A/E. Dalam analisa yang digunakan adalah 24 E didalamnya mengandung 24 macam substrat biokimia yang berbeda yang nantinya dapat dilihat bagaimana respon bakteri target terhadap substrat tersebut. Penggunaan tipe 24 E didasarkan pada hasil uji oksidase dan katalase bakteri yang bersifat positif.

Prinsip kerja dari *microbact system* adalah dengan melihat kecocokan yang terlihat dari hasil uji diantaranya asam amino, gula, nitrat, indole dan citrate yang masing-masing memiliki nilai octal yang berbeda. Hasil yang menunjukkan nilai positif yang digunakan untuk menentukan nilai octal yang nantinya akan diolah dengan software dalam computer.

Uji biokimia sebagai metode dalam uji fisiologis didapat hasil bahwa bakteri *Vibrio sp* simbion pada sponge *Geodia sp* dan *Haliclona sp* menunjukkan spesies *Vibrio alginolyticus* dengan tingkat persentase masing-masing 94 % dan 98 %. Perbedaan presentase terhadap hasil uji secara fisiologis dimungkinkan karena perbedaan strain dari masing-masing *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp. Geodia sp.*

Pengamatan dilakukan selama proses inkubasi yaitu 12-18 jam. Sifat biokimiawi mulai galur, spesies, maupun genus tiap bakteri tidak sama. Hal itu terlihat dalam penggunaan bahan makanan, pembentukan bahan-bahan metabolik dan peragian terhadap gula-gula (Tim Mikrobiologi FK UB, 2010). Dalam Jawetz (2008) dijelaskan bahwa uji biokimia sederhana dapat memastikan adanya fungsi metabolic yang khas.

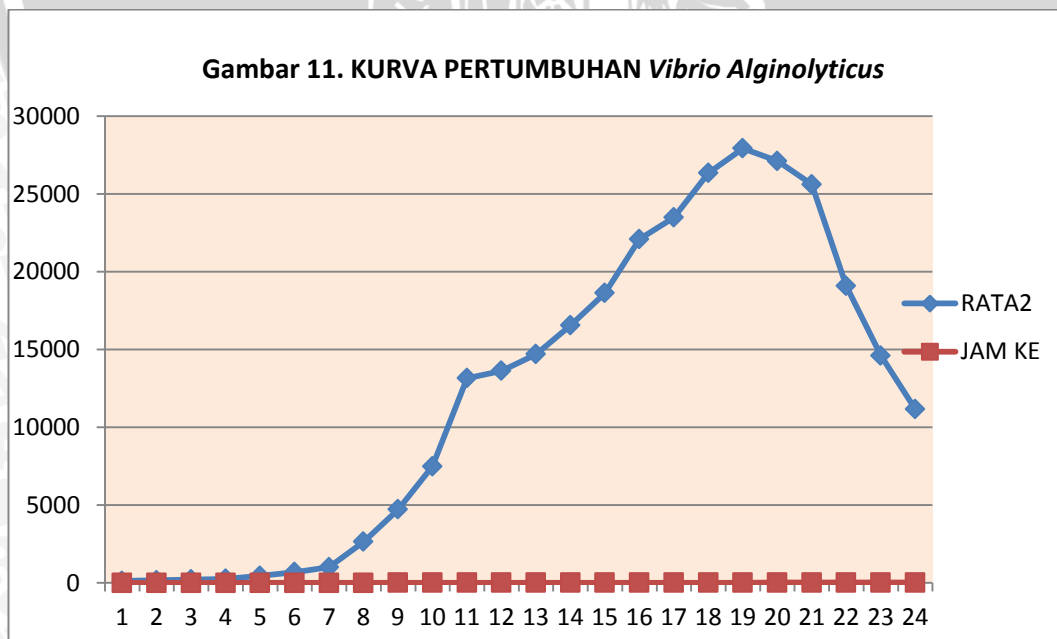
Bakteri *Vibrio Alginolyticus* yang telah diidentifikasi mempunyai ciri-ciri berwarna kuning, diameter 3-5 mm. Karakteristik fisika-biokimia adalah pewarnaan gram negatif, dan mempunyai sifat fermentatif, katalase, oksidase, serta H<sub>2</sub>S glukosa dan laktosa positif. Bakteri *Vibrio sp* akan berwarna kuning /

berpendar pada media TCBS karena memfermentasikan sukrosa yang ada pada medium (Feliatra,1999).

Bakteri ini sering ditemukan pada perairan laut, baik sebagai bakteri asosiatif maupun pelagis. Bakteri ini memiliki bentuk batang lurus atau lengkung, dengan pewarnaan Gram (-). Bakteri yang bersifat anaerob fakultatif ini memiliki flagella sebagai alat geraknya. Tipe metabolisme bakteri ini adalah respiratif dan fermentatif, dengan sifat kemoorganotrof. Katabolisme karbohidrat menghasilkan asam tanpa memproduksi gas. Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa bakteri ini umum ditemukan pada lingkungan akuatik pada permukaan serta di dalam saluran intestinal hewan laut (Ismet, 2007).

#### 4.3 Fase Pertumbuhan Bakteri

Pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, dilakukan untuk mengetahui pada jam berapa terjadi fase eksponensial yang akan digunakan sebagai penanda waktu dalam panen metabolit primer dan metabolit sekunder.



Kurva diatas menunjukkan fase pertumbuhan *Vibrio alginolyticus* yang diamati selama 24 jam. Untuk mendapatkan metabolit primer dan metabolit sekunder bakteri dipanen pada fase eksponensial. Pada fase ini diketahui bakteri dalam jumlah maksimal yaitu pada jam ke 19 rata-rata sebanyak  $28 \times 10^8$  cfu/ml. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangbiakan mencapai titik tertinggi dimana substrat digunakan dalam proses pertumbuhan secara optimal. Selain itu bakteri juga mengeluarkan senyawa sekunder untuk mempertahankan diri dari lingkungan (Timotius, 1982).

#### **4.4 Aktifitas Antibakteri Metabolit *Vibrio alginolyticus* Secara Kombinasi dari Sponge *Haliclona* sp. dan *Geodia* sp.**

Pengamatan aktivitas antimikroba dilakukan dengan uji cakram untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang diduga terdapat pada bakteri *V. alginolyticus* sebagai simbiosis sponge. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* karena kedua bakteri ini sama-sama bersifat patogen. *Shigella dysenteriae* merupakan penyebab penyakit diare pada manusia sedangkan *S. aureus* merupakan penyebab keracunan makanan pada manusia.

Menurut Zweig dan Whitaker (1971), zona bening pada lapisan agar yang terbentuk dikarenakan senyawa antibakteri berdifusi ke dalam lapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme (bakteri) sedangkan lapisan agar yang dilapisi mikroba akan tampak keruh.

#### 4.4.1 Kombinasi Metabolit Primer dari *Vibrio alginolyticus* simbion *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*

Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya. Metabolit primer antara lain asam laktat dan alcohol. Metabolit primer (DNA, lemak, protein, karbohidrat) digunakan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup (Kunaepah, 2008). Metabolit primer yang berupa *whole cell* (pellet) dari *Vibrio alginolyticus* simbion *Haliclona sp* dan *Geodia sp* secara kombinasi diujikan aktifitas antibakterinya terhadap bakteri target

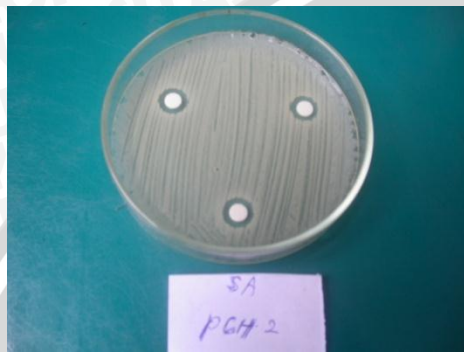
**Tabel 6. Uji Antibakteri pada Metabolit Primer *V. alginolyticus* dengan Metode Difusi Cakram Terhadap Bakteri *S.aureus* dan *S.dysenteriae***

Efektifitas yang didapat dari kombinasi metabolit primer *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp* relative lebih kecil bila dibandingkan dengan tanpa kombinasi. Berikut ini adalah table hasil uji cakram dari metabolit primer *Vibrio alginolyticus* dari kedua sponge yang dilakukan tanpa kombinasi terhadap bakteri *S.aureus*.

Metabolit	Bakteri	Rerata Zona Hambat (mm)
Primer	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.2
	<i>Shigella dysenteriae</i>	7.5

Tabel di atas menunjukkan kombinasi metabolit primer dari bakteri *V. alginolyticus* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* dan *S.dysenteriae*. Hal ini dapat diamati dari timbulnya zona bening disekitar kertas cakram. Adanya zona bening disekitar kertas cakram menandakan bahwa tidak adanya bakteri yang mampu tumbuh setelah diinkubasi dikarenakan adanya senyawa antibakteri pada daerah

tersebut. Zona hambat yang terjadi pada bakteri *S.aureus* sebesar 9.2 mm yang berarti bahwa metabolit primer dari *V. alginolyticus* memiliki aktivitas kurang efektif dan masuk kategori intermediet untuk menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Zona hambat pada bakteri *S.dysentriae* sebesar 7.5 mm dimana angka ini juga menunjukkan bahwa metabolit primer dari *V. alginolyticus* memiliki aktivitas kurang efektif untuk menghambat pertumbuhan *S.dysentriae*.



**Gambar 12. Uji Cakram terhadap *S.aureus* dengan metabolit primer**



**Gambar 13. Uji Cakram terhadap *S.dysentriae* dengan metabolit primer**

Dalam Wibowo *et al.* (2008) lebar daerah hambatan tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S), resisten (R) dan Intermediate (I). Standart parameter potensi antibiotik dengan pengujian cakram adalah jika diameter (D) zona hambat lebih dari atau sama dengan 11 mm berarti efektif ( $D \geq 11$  mm), jika diameter antara 9-11 mm berarti intermediate ( $9\text{mm} < D < 11\text{mm}$ ) dan jika diameter kurang dari atau sama dengan 9 berarti tidak efektif ( $D \leq 9\text{mm}$ ).

Zona hambat dari kombinasi metabolit primer yang berasal dari simbiosis bakteri *V. alginolyticus* pada sponge *Geodia sp* dan *Haliclona sp* menunjukkan bahwa respon terhadap bakteri *S.aureus* lebih besar dari pada *S.dysentriae*. perbedaan ini disebabkan karena pengaruh dinding sel yang berbeda dari bakteri gram positif dan bakteri gram negative. *S. aureus* yang merupakan bakteri gram

positif memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan dan asam teikoat yang diduga dapat berfungsi sebagai pengikat ion atau pengatur aktifitas enzim, namun pada bakteri gram negative dinding selnya hanya terdiri dari peptidoglikan dan membran luar (Jawetz, 2008).

Bakteri gram negative relative lebih resisten terhadap zat antibakteri karena sifat alami lipid yang terletak pada membrane luar yang terdiri dari molekul protein (porin) yang memungkinkan difusi pasif komponen hidrofilik dengan berat molekul rendah. Molekul bahan antibakteri yang besar relative lebih lambat saat menembus membrane luar (Jawetz, 2008).

Metabolit primer memberikan respon penghambatan yang lebih besar terhadap bakteri target. Hal ini disebabkan karena bakteri sendiri memiliki sejumlah autolysin, enzim hidrolitik yang menyerang peptidoglikan yaitu glikosidase, amidase dan peptidase. Enzim-enzim ini diduga memainkan peran yang esensial dalam pertumbuhan dan pembelahan sel. Proses ini berlangsung pada fase stasioner dimana pertumbuhan terjadi maksimal. Terjadi kehilangan sel yang lambat akibat kematian yang diseimbangkan dengan pertumbuhan sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan (Jawetz,2008).

#### **4.4.2 Kombinasi Metabolit Sekunder dari *Vibrio alginolyticus* simbion *Haliclona* sp. dan *Geodia* sp. terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentriae***

Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis oleh mikroba tetapi tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok. Salah satu metabolit sekunder yang dapat berfungsi sebagai antibakteri adalah *bacteriocin* yang dihasilkan pada fase *decay* yaitu fase pada saat substrat mulai habis pada lama fermentasi tertentu



(Kunaepah, 2008). Berikut ini adalah table rerata zona hambat terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.dysentriae*.

**Tabel 7. Uji Antibakteri pada Metabolit Sekunder *V. alginolyticus* dengan Metode Difussi Cakram Terhadap Bakteri *S.aureus* dan *S.dysentriae***

Metabolit	Bakteri	Rerata Zona Hambat (mm)
Sekunder	<i>S.aureus</i>	8.4
	<i>S.dysentriae</i>	6,3

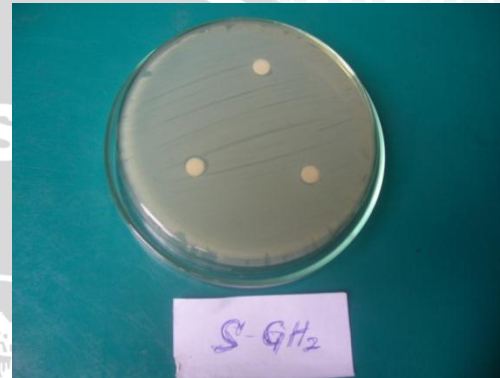
Tabel di atas menunjukkan bahwa kombinasi metabolit primer dari bakteri *V. alginolyticus* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* dan *S.dysentriae*. Hal ini dapat diamati dari timbulnya zona bening disekitar kertas cakram. Adanya zona bening disekitar kertas cakram menandakan bahwa tidak adanya bakteri yang mampu tumbuh setelah diinkubasi dikarenakan adanya senyawa antibakteri pada daerah tersebut. Zona hambat yang terjadi pada bakteri *S.aureus* sebesar 8.4 mm yang berarti bahwa metabolit primer dari *V. alginolyticus* memiliki aktivitas yang kurang efektif dan tergolong intermediet untuk menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Zona hambat pada bakteri *S.dysentriae* sebesar 6,3 mm dimana angka ini juga menunjukkan bahwa metabolit primer dari *V. alginolyticus* memiliki aktivitas kurang efektif untuk menghambat pertumbuhan *S.dysentriae*.

Aktivitas daya hambat bakteri dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram (*paperdisk*). Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm dan dijadikan ukuran kuantitatif untuk zona hambat. Menurut Wibowo *et al.* (2008) lebar daerah hambatan tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S), resisten (R) dan Intermediate (I). Standart parameter potensi

antibiotik dengan pengujian cakram adalah jika diameter (D) zona hambatan lebih dari atau sama dengan 11 mm berarti efektif ( $D \geq 11$  mm), jika diameter antara 9-11 mm berarti intermediate ( $9\text{mm} < D < 11\text{mm}$ ) dan jika diameter kurang dari atau sama dengan 9 berarti tidak efektif ( $D \leq 9\text{mm}$ ).



**Gambar 14. Uji Cakram terhadap *S.aureus* dengan metabolit sekunder**



**Gambar 15. Uji Cakram terhadap *S.dysenteriae* dengan metabolit sekunder**

Dari hasil uji cakram diketahui bahwa daya hambat terhadap bakteri *S.aureus* dan *S.dysenteriae* lebih besar didapatkan dari metabolit primer yaitu masing-masing sebesar 9,2 mm dan 7,5 mm, sedangkan dari metabolit sekunder zona bening yang didapat relative lebih kecil yaitu 8,4 mm dan 6,3 mm. Dari studi literatur dapat diduga bahwa metabolit primer (intraseluler) dari bakteri *Vibrio alginolyticus* yang bersimbiosis dengan sponge *Geodia sp.* dan *Haliclona sp* memiliki zona hambat yang lebih besar terhadap bakteri target karena setelah fase stasioner percepatan pertumbuhan berangsur-angsur turun dan akhirnya mencapai nol. Oleh karena itu bakteri mengeluarkan senyawa metabolit sekunder untuk dapat bertahan hidup. Sebagian dari metabolit sekunder yang dihasilkan diluar sel bahkan dimakan oleh bakteri yang masih bertahan hidup yang pada akhirnya bakteri tersebut mati karena senyawa sekunder yang bersifat toksik (Timotius, 1982).

#### 4.5 Perbandingan Hasil Cakram Aktifitas Antibakteri Metabolit *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* Secara Kombinasi dan Tanpa Kombinasi Terhadap *Staphylococcus aureus*

Hasil uji cakram terhadap aktifitas antibakteri yang telah dilakukan menunjukkan hasil yang berbeda baik secara kombinasi maupun tanpa kombinasi terhadap metabolit primer dan sekunder dari *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* Hasil uji yang didapat tersaji dalam tabel dibawah ini :

**Tabel 8. Hasil Uji Cakram Aktifitas Antibakteri Metabolit *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus***

Sponge	Zona Hambat (mm)	
	Metabolit Primer	Metabolit Sekunder
H dan G	9,2	8,4
H	10,2	8,8
G	12,9	9,9

**Keterangan :**

H : Sponge *Haliclona sp.*

G : Sponge *Geodia sp.*

H dan G : Kombinasi sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.*

Hasil uji cakram menunjukkan bahwa aktifitas antibakteri dari kombinasi sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* relative lebih kecil dibandingkan tanpa kombinasi dari masing-masing sponge baik dari metabolit primer atau metabolit sekundernya. Hal ini diduga adanya sifat antagonis senyawa yang dihasilkan oleh metabolit *Vibrio alginolyticus* simbion masing-masing sponge.

Dugaan ini semakin beralasan karena dalam identifikasi bakteri secara fisiologis dengan uji biokimia menunjukkan hasil yang berbeda dari masing-masing bakteri *Vibrio alginolyticus* simbiosis sponge. Pada *Haliclona sp* menunjukkan presentase sebesar 98% *Vibrio alginolyticus* sedangkan pada *Geodia sp.* menunjukkan presentase 94% *Vibrio alginolyticus*.

Perbedaan ini disebabkan karena hasil nilai octal bakteri simbiosis dari masing-masing sponge berbeda. Dari hasil *microbact system* diketahui bahwa *Vibrio alginolyticus* simbiosis *Haliclona sp.* memiliki nilai octal sebesar 665440000 dan *Vibrio alginolyticus* simbiosis *Geodia sp* memiliki nilai octal sebesar 665340000. Berikut ini adalah hasil identifikasi Biokimia dengan *Microbact system*.



**Gambar 16. Hasil Uji Biokimia dengan *Microbact system***

**Keterangan**

- G** : *Vibrio alginolyticus* simbiosis Sponge *Geodia sp.*
- H** : *Vibrio alginolyticus* simbiosis Sponge *Haliclona sp.*

Perubahan warna yang terjadi dalam sumuran disesuaikan dengan acuan yang digunakan dalam *microbact system*. Nilai tetapan yang digunakan bersifat paten. Dari perhitungan nilai inilah kemudian didapat angka octal. Berikut adalah table hasil analisa biokimia dengan *microbact system*.

Tabel 9. Hasil Microbact System Bakteri *Vibrio sp.*

Kandungan Biokimia	Simbion <i>Haliclona sp.</i>	Simbion <i>Geodia sp.</i>
<i>Lysine</i>	+	+
<i>Ornithine</i>	+	+
<i>H<sub>2</sub>S</i>	-	-
<i>Glucose</i>	+	+
<i>Mannitol</i>	-	-
<i>Xylose</i>	+	+
<b>O.N.P.G</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<i>Indole</i>	-	+
<i>Urease</i>	-	+
<i>VP</i>	+	+
<i>Citrate</i>	-	-
<i>TDA</i>	-	-
<i>Gelatin</i>	-	-
<i>Mallonate</i>	-	-
<i>Inositol</i>	-	-
<i>Rhamnose</i>	-	-
<i>Sucrose</i>	-	-
<i>Lactose</i>	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-
<i>Adonitol</i>	-	-
<i>Rafinose</i>	-	-
<i>Salicin</i>	-	-
<i>Arginin 24 hours</i>	-	-
<i>Arginin 48 hours</i>	-	-

Dari table diatas dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan dalam sumuran *O.N.P.G*, *Indole* dan *Urease*. Dalam hal ini uji indole digunakan untuk mengetahui hasil sampingan dari triptofan sedangkan urease untuk melihat apakah bakteri menghasilkan enzim urease atau tidak. Perbedaan terhadap hasil uji biokimia yang dilakukan menunjukkan bahwa *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp.* berasal dari strain yang berbeda.

Perbedaan strain inilah yang diduga menjadi salah satu penyebab mengapa terdapat perbedaan dalam aktifitas antibakteri secara kombinasi dan tanpa kombinasi. Hal ini diduga menyebabkan perbedaan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh bakteri.

Sifat biokimiawi mulai galur, spesies, maupun genus tiap bakteri tidak sama. Hal itu terlihat dalam penggunaan bahan makanan, pembentukan bahan-bahan metabolik dan peragian terhadap gula-gula (Tim Mikrobiologi FK UB, 2010). Dalam Jawetz (2008) dijelaskan bahwa uji biokimia sederhana dapat memastikan adanya fungsi metabolic yang khas.

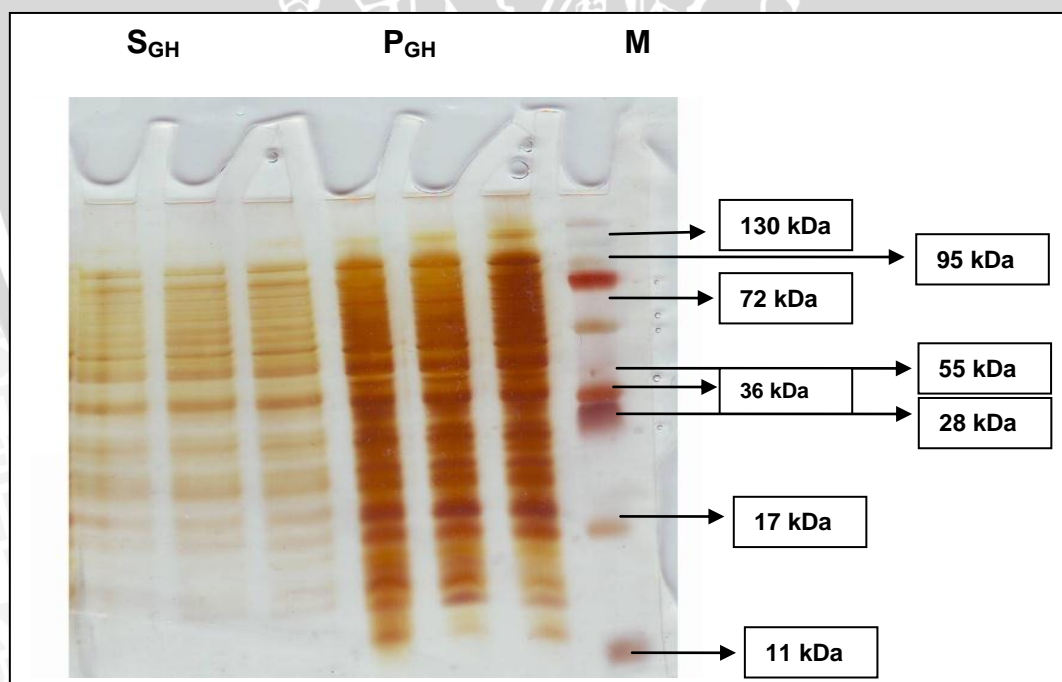
Pemakaian kombinasi antibiotika juga mengandung resiko misalnya adanya akumulasi toksisitas yang serupa, misalnya nefrotoksisitas aminoglikosida dan nefrotoksisitas dari beberapa jenis sefalosporin. Kemungkinan juga dapat terjadi antagonisme misalnya kombinasi penisilin dan tetrasiklin. Namun perlu tidaknya kombinasi tetap diragukan karena dapat menyebabkan efek yang merugikan. Sebagai contoh kombinasi tetap penisilin dan streptomisin justru akan menyebabkan inaktivasi dari masing-masing antibiotika oleh karena terjadinya kerusakan secara kimiawi (Melviani, 2010).

#### **4.6 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrilamide Gel Electrophoresis)**

Penelitian yang dilakukan oleh Chelossi *et al.* (2004) telah berhasil mengidentifikasi beberapa bakteri simbiosis spons *Petrosia ficiformis* merupakan bakteri dari genus *Vibrio sp.* Lebih lanjut dikatakan bahwa beberapa galur bakteri genus ini, yang ditemukan berasosiasi dengan spons *Hyatella sp.*, memproduksi antibiotik yang termasuk ke dalam kelompok peptida (Oclarit *et al.* 1994, diacu dalam Chelossi *et al.* 2004 dalam Ismet, 2007).

Ditegaskan dalam Shafie (2008), *Bacteriocin* merupakan produk yang dihasilkan oleh bakteri yang merupakan substansi protein yang mempunyai peranan untuk menghambat atau meniadakan pertumbuhan mikroorganisme lain. Bacteriocin diketahui disusun oleh jenis-jenis asam amino Asparagin 7.5%, Histidine 3.8%, glycin 0.3%, alanine 2.3%, Valine 2.8%, leucine 6.1%, isoleucine 33.0%, Serin 4.3%, methionine 16.0%, lysine 11.0%, proline 6.6%.

Hasil kombinasi metabolit dari *Vibrio alginolyticus* simbiosis sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* diduga mengandung senyawa protein. Pada fase stasioner pertumbuhan bakteri dimana metabolit primer dipanen, dihasilkan enzim autolysin yang merupakan enzim hidrolitik yang menyerang peptidoglikan yaitu glikosidase, amidase dan peptidase. Di bawah ini merupakan hasil analisa kandungan protein pada masing-masing metabolit dengan menggunakan SDS-PAGE.



**Gambar 17. Analisa SDS PAGE**

Setelah dilakukan *running* terhadap sampel yang diuji didapat hasil berupa pita-pita yang menunjukkan senyawa protein yang diukur berdasarkan

berat molekulnya. Tabel dibawah ini adalah hasil *running* dari analisa SDS-PAGE dari senyawa metablit sekunder dan primer pada kombinasi *Vibrio alginolyticus* simbion *Geodia sp* dan *Haliclona sp*.

**Tabel 10. Senyawa yang Ada Pada metabolit Primer dan Sekunder**

Metabolit Primer (KDa)	Metabolit Sekunder (KDa)	Ada pada Keduanya
107.6754		
91.49033	91.49033	✓
82.63459	84.33435	
79.33714	80.96908	
76.17127	77.73809	
71.65775	73.13173	
68.79832	68.79832	
66.05299		
63.41721	63.41721	✓
60.88661	59.65943	
58.45699	54.99313	
56.12432		
49.6701		
47.68807	47.68807	✓
45.78512	39.70322	
42.20401		
40.5199		
38.1189		
35.86017		
34.42921		
32.38911	32.38911	✓
29.85577	30.4699	
26.9659	26.4224	
24.85674	22.91256	✓
23.86486		
21.55488		
19.86895	19.86895	✓
17.22964		
15.24826		
14.0556		
12.6951		

**Keterangan :**

XXXXXX : ada pada metabolit primer *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp*

XXXXXX : ada pada metabolit sekunder *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp*



Dari table diatas dapat terlihat bahwa terdapat senyawa dengan berat molekul yang sama pada metabolit primer dan sekunder bakteri *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* Senyawa dengan berat molekul sama pada metabolit primer dalam satuan KDa yaitu : 107,6754 ; 71,65775 ; 68,79632 ; 66,05299 ; 60,99661 ; 56,12432 ; 49,6701 ; 47,68807 ; 45,78512 ; 42,20401 ; 40,5199 ; 34,42921 ; 26,9659 ; 24,85674 ; 23,86486 ; 21,55488. Sedangkan pada metabolit sekunder dengan berat molekul yang sama dari *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* dalam satuan KDa yaitu : 80,96908 ; 77,73809 ; 47,68807 . Senyawa dengan berat molekul antara 28-37 diketahui sebagai rentang enzim *endoglucanase* (Rosmini dkk, 2007). Diduga senyawa dengan berat molekul yang sama memiliki kemampuan yang saling bersinergi satu sama lain dan senyawa dengan berat molekul yang berbeda dari metabolit primer atau sekunder tidak dapat bersinergi sehingga terdapat senyawa baru dengan berat molekul yang tidak sama dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* Hasil analisa SDS PAGE terhadap metabolit *Vibrio alginolyticus* simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* tanpa kombinasi dapat dilihat pada **Lampiran 7.**

Terdapat protein dengan berat molekul yang sama pada keduanya yaitu 91.49033 KDa, 68.79832 KDa, 63.41721 KDa, 47.68807 KDa, 32.38911 KDa, 19.86895 KDa . Hal ini diduga merupakan senyawa protein yang diduga lebih dominan dan memiliki daya tahan yang lebih kuat baik secara biologi maupun kimiawi. Hal ini dimungkinkan berpengaruh terhadap besarnya zona hambat terhadap aktifitas antibakteri pada bakteri target

Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Selain itu dilihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon

dan sumber energi akan berpengaruh terhadap metabolit yang dihasilkan (Waluyo, 2004).

Pemakaian kombinasi antibiotika juga mengandung resiko misalnya adanya akumulasi toksisitas yang serupa, misalnya nefrotoksitas aminoglikosida dan nefrotoksitas dari beberapa jenis sefalosporin. Kemungkinan juga dapat terjadi antagonisme misalnya kombinasi penisilin dan tetrasiklin. Namun perlu tidaknya kombinasi tetap diragukan karena dapat menyebabkan efek yang merugikan. Sebagai contoh kombinasi tetap penisilin dan streptomisin justru akan menyebabkan inaktivasi dari masing-masing antibiotika oleh karena terjadinya kerusakan secara kimiawi maupun biologi (Melviani, 2010).

Hasil uji cakram yang telah dilakukan diketahui bahwa hasil kombinasi metabolit primer dan sekunder dari bakteri *Vibrio alginolyticus* yang diisolasi dari sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* memberikan respon zona hambat yang relative lebih kecil dibandingkan dengan tanpa kombinasi. Diduga terdapat senyawa yang tidak dapat saling bersinergi satu sama lain. Untuk dapat mengetahuinya diperlukan analisa lebih lanjut .

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, kesimpulan yang dapat diambil adalah :

- Pada fase eksponensial diketahui bakteri dalam jumlah maksimal yaitu pada jam ke 19 rata-rata sebanyak  $28 \times 10^8$  cfu/ml dan dipanen metabolit primer bakteri
- Diduga perbedaan strain bakteri *Vibrio alginolyticus* dari simbiosis sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* menyebabkan perbedaan aktifitas antibakteri antara penggunaan metabolit secara kombinasi atau tanpa kombinasi.
- Terdapat protein dengan berat molekul yang sama pada keduanya yaitu 91.49033 KDa, 68.79832 KDa, 63.41721 KDa, 47.68807 KDa, 32.38911 KDa, 19.86895 KDa . Hal ini diduga berpengaruh terhadap besarnya zona hambat terhadap aktifitas antibakteri pada bakteri target
- Kombinasi metabolit dari bakteri *Vibrio alginolyticus* yang berasosiasi dengan sponge *Haliclona sp* dan *Geodia sp* diketahui memberikan zona hambat lebih besar pada metabolit primer dengan bakteri target *Staphylococcus aureus*
- Kombinasi metabolit *Vibrio alginolyticus* simbiosis sponge *Haliclona sp*. dan *Geodia sp*. menunjukkan aktifitas antibakteri yang kurang efektif terhadap bakteri *S.aureus* dan *S. dysenteriae*

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan adalah agar ada penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis senyawa antibakteri dari simbiosis bakteri *Vibrio alginolyticus* pada kombinasi metabolit dari sponge *Geodia sp* dan *Haliclona sp* serta

kombinasinya dengan bahan dan pelarut yang dapat saling bersinergi sehingga dapat meningkatkan efektifitas antibakteri yang dihasilkan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Assadatun. 2008. *Penapisan Inhibitor  $\beta$ -laktamase Dari Bakteri Symbion Sponge Axinella sp.* Buletin Teknologi Hasil Perikanan. Vol XI no II tahun 2008.
- Abubakar, Hermawaty. 2009. *Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis Sp.: Analisis Penghasil Senyawa Milroba dan Keragaman Genetiknya.* Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Amir, Ichsan dan Agus Budiyanto. 1996. *Mengenal Spons laut (Demospongiae) Secara Umum.* Oseana, volume XXI, Nomor 2, 1996 : 15-31. Balai Penelitian dan Pengembangan Biologi laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi – LIPI. Jakarta
- Anam, Khairul. 2009. *SDS PAGE Dengan Silver Staining Dan Zimogram.* Bioteknologi. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Anne, L. 2007. *Identifikasi Bakteri E. coli dan Total Bakteri pada Tubuh Lalat Berdasarkan Lokasi Penangkapan di Pasar Rejomulyo Semarang.* Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Day, R.A and Underwood. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif.* Penerbit Erlangga. Jakarta. Diterjemahkan Pudjaatmaka.
- Faikoh, Elok Ning. 2010. *Studi Daya Antibakteri Ekstrak Karang Lunak (Geodia sp.) Segar Terhadap Bakteri Escherechia coli DAN Vibrio harveyi Serta Kandungan Senyawa Aktifnya.* Laporan Penelitian Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan 1.* Gramedia Pustaka Utama: Jakarta
- Feliatra. 1999. *Identifikasi Bakteri Patogen (Vibrio sp) Di Perairan Nongso Batam Riau.* Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Jurnal Natur Indonesia.(29-33).
- Gandjar, I.G dan A, Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis.* Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Guether, E. 1987. *Minyak Atsiri I.* Penerbit UI. Jakarta. Diterjemahkan S. Ketaren.
- Harborne, JB. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Diterjemahkan oleh: Padmawinata, K dan I, Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Ismet, Meutia Samira. 2007. *Penapisan Senyawa Bioaktif Spons Aaptos aaptos Dan Petrosia sp. Dari Lokasi Yang Berbeda.* Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Iswani, S. 2007. *Proses Preparasi Ekstrak Kasar (Crude Extact) Etanol dari Makroalga untuk Uji Farmakologi.* Balai Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Buletin Lit. Akuakultur Vol. 6 No 1.
- Jawetz. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran.* EGC.

- Karlina, Itjeu. 2009. *Identifikasi Mikroba Laut di Ujung Grenggengan Semenanjung Muria*. Jurnal Sigma Epsilon vol.13 No.2 Mei 2009.
- Komara, A. 1991. *Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit dalam Anam C*. 2000. *Ekstraksi Oleoresin Jahe Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu*. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kunaepah, Uun. 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang
- Lay,B.H.1994. *Anailisis Mikroba di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Terpenoid dan Steroid*. Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Melviani. 2010. *Efek Antibakteri Alfa Mangostin Dan Kombinasinya Dengan Beberapa Antibiotik Terhadap Staphylococcus aureus Multiresisten*. Skripsi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Murniasih, Tutik dan Abdullah Rasyid.2010. *Potensil Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons Asal Barrang Lom[fo (MAKASSAR) Sebagai Sumber Bahan Antibakteri*. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia* (2010) 36(3): 281-292.
- Nofiani, R., Siti, N. Ajuk, S. 2009. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Nursid, M. 2005. *Skrining Senyawa Bioaktif Ekstrak Metanol Dari Karang Lunak Alcyoniidae*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia Vol. 11 no. 4 tahun 2005.
- Nurwantoro, Prastiwi, WD., Achmadi, J. 2003. *Populasi Mikrobia Isa Susu pada Peralatan Unit Pendingin Susu Akibat Lama Penyimpanan dan Aras Penambahan Dedak Padi*. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang
- Pelezar, M. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pringgenies, Delianis. 2010. *Karakteristik Senyawa Bioaktif Bakteri Symbion Moluska Dengan GC MS*. Marine Science Departement, Faculty of Fisheries and Marine Faculty. Diponegoro University. Semarang
- Putra, I. N. K. 2007. *Studi Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira Serta Kandungan Senyawa Aktifnya*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Rosmini, Dwina dkk. 2007. *Penyisihan Senyawa Kloroligninoleh Phenerochaeta Chrysoporium dengan Penambahan Jerami sebagai Co-Substrat*. Berita Selulosa Vol.42 (1) hal 18-22 Majalah Ilmiah. <http://www.bbpbk.go.id>
- Satari, R dan A, Kadi,. 1994. *Aktivitas Antibakteri Sponge Asal Pulau Pari*. Laboratorium Produk Alam Laut Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor.

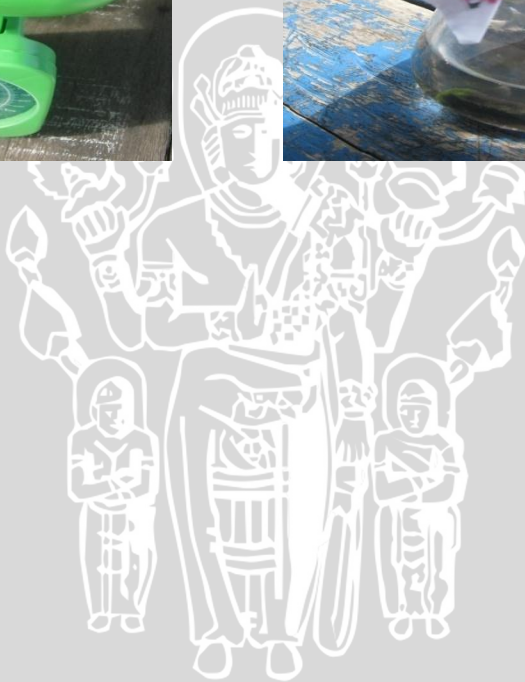
- Suharyanto. 2008. *Distribusi dan Persentase Tutupan Sponge (Porifera) pada Kondisi Terumbu Karang dan Kedalaman yang Berbeda di Perairan Pulau Barranglombo, Sulawesi Selatan*. Jurnal Biodiversitas Volume 9, Nomor 3, Halaman: 209-212. Surakarta.
- Suparno. 2005. *Kajian Demospongiae Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Dibidang Farmasi*. Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS 7002). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suryati. 2000. *Identifikasi Bakteri dan Kapang yang Bersimbiosis dengan Sponge di Perairan Spermonde, Sulawesi Selatan*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia VI (1) : 59-64
- Suwandi, Usman. 1999. *Penelitian dan Pengembangan, PT Kalbe Farma, Cermin Dunia Kedokteran No. 124*. Jakarta.
- Takuechi, C. dan P. Wentworth. 1992. *Immunology. In Meyers, R.A. (Ed.). Immunology From Cell Biology to Disease*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim p:3-26
- Timotius. 1982. *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga.
- Tim FKUI. 2008. *Farmakologi dan Terapi*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Tomascik, T., A, Janice., A, Nontji., dan M, Moosa. 1987. *The Ecology of Indonesian Seas*. Periplus edition Ltd. Hongkong.
- Towse, Stephen James. 2005. *Antimicrobial Activity Of Marine Vibrio sp., Isolate NI-22*. Department of Biology. The University of Winnipeg.
- Utami, Edi Setiti Wida dkk. 2007. *Sintesis Protein Selama Embriogenesis Somatik Angrek Bulan Phalaenopsis amabilis (L.)*. Biodiversitas vol 8 no 3 hal 188-191.
- Vogel, A.I 1987. *Textbook of Practical Organic Chemistry*. Revised by Furnies B.S. 4<sup>th</sup> Edition. New York.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Diterjemahkan Soendani. Dan Setiono
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah Malang: Malang
- Wasitaningrum, Ika Dyah Ayu.2009. *Uji Resistensi Bakteri Staphylococcus aureus dan e.Coli dari isolat susu Sapi Segar Terhadap Beberapa Antibiotik*. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Yanuhar, Uun dkk. 2010. *Peran Reseptor Cromileptes altivelis dalam Mekanisme Vibriosis (Studi Infeksi Bakteri Vibrio Pada Ikan Kerapu Tikus)*. [uunyanuhar@yahoo.com](mailto:uunyanuhar@yahoo.com) [ diakses pada 9 Maret 2011 ]
- Zhang D, and Son, B.W. 2007. *Chemical Studies on the Bioactive Metabolites from Marine Derived-Fungi MFB604 & MFC353*. Natural Products Chemistry Laboratory. Pukyong National University. Busan. Korea.
- Zweig, G. and J.R. Whitaker. 1971. *Paper Chromatography and Electroforesis*. Academic Press. London. P.397-400.

Lampiran 1. Pembuatan Media

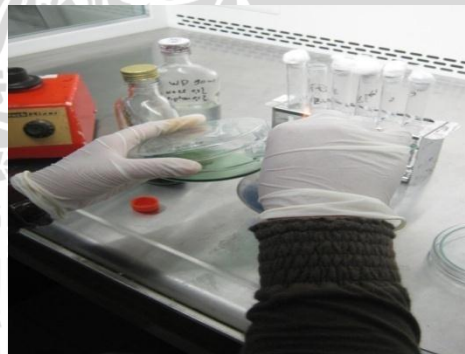
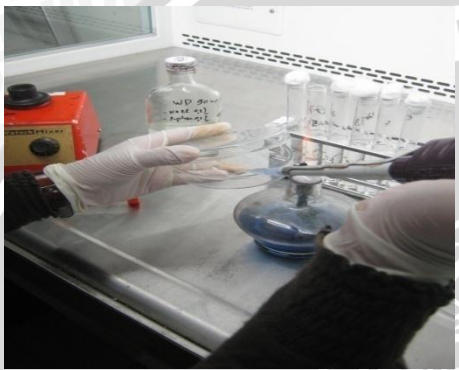
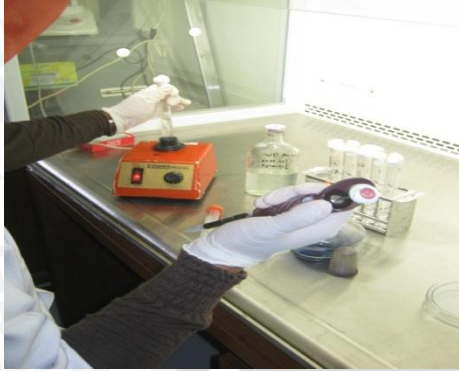




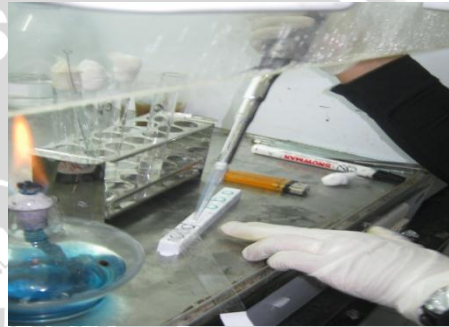
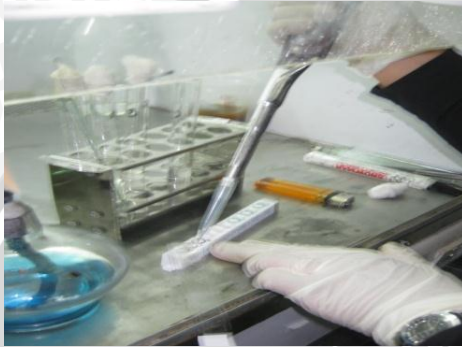
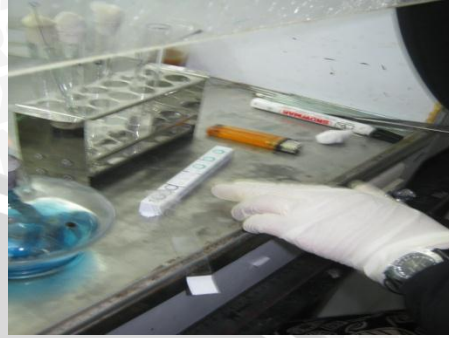
Lampiran 2. Pengambilan Sample Ke Pulau Gili Probolinggo



### Lampiran 3. Isolasi Bakteri



Lampiran 4. Microbact System



Colour chart/Farbstoff-/Tableau de couleurs.

Microbact	12E	12A	24E	Row / Reihe / Rangée	A.C.E.G.									
Reaction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Urease	Lipase	VP II	VP III	Casein	Mannitol	Hydrolase	ONPG	Indole B	Glucose	VP III	Casein	TSA B	Nitrate
Negative	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Positive	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

Microbact	12B	24E	Row / Reihe / Rangée	B.D.F.								
Reaction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Urease	Casein	Mannitol	Hydrolase	Sulfid	Phosphatase	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Sorbitol
Negative	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
Positive	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue



# Lampiran 5. Elektroforesis SDS-Page

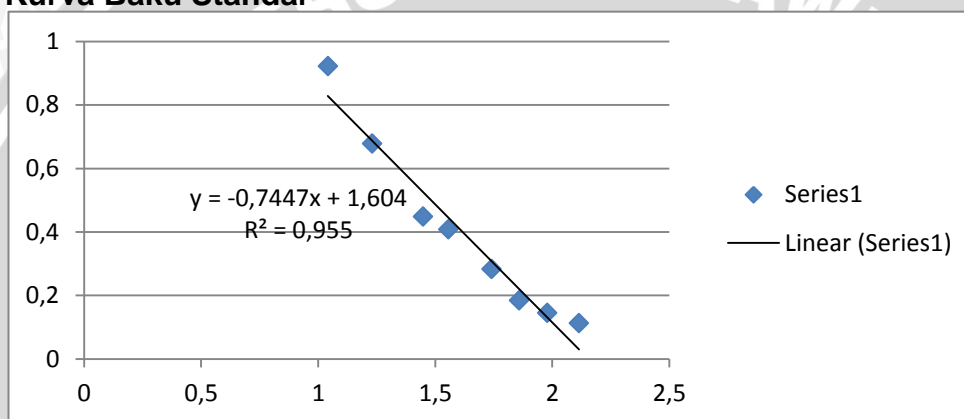




Lampiran 6. Hasil Elektroforesis SDS-Page  
Marker

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
130	8.5	2.113943	0.111842
95	11	1.977724	0.144737
72	14	1.857332	0.184211
55	21.5	1.740363	0.28285
36	31	1.556303	0.407895
28	34	1.447158	0.447368
17	51.5	1.230449	0.677632

Kurva Baku Standar



Lampiran 8. Hasil Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri

JAM KE	X1	X2	RERATA	$\Sigma$ Sel / ml
1	123	131	127	$1.2 \cdot 10^6$
2	147	182	164.5	$1.6 \cdot 10^6$
3	215	234	224.5	$2.2 \cdot 10^6$
4	247	282	264.5	$2.6 \cdot 10^6$
5	485	434	459.5	$4.6 \cdot 10^6$
6	668	716	692	$6.9 \cdot 10^6$
7	1038	980	1009	$1.0 \cdot 10^7$
8	2540	2750	2645	$2.6 \cdot 10^7$
9	4820	4620	4720	$4.7 \cdot 10^7$
10	7740	7230	7485	$7.5 \cdot 10^7$
11	12460	13850	13155	$1.3 \cdot 10^8$
12	13460	13800	13630	$1.4 \cdot 10^8$
13	14870	14530	14700	$1.5 \cdot 10^8$
14	16520	16580	16550	$1.7 \cdot 10^8$
15	18490	18760	18625	$1.9 \cdot 10^8$
16	21740	22450	22095	$2.2 \cdot 10^8$
17	23390	23560	23475	$2.3 \cdot 10^8$
18	25810	26870	26340	$2.6 \cdot 10^8$
19	28030	27820	27925	$2.8 \cdot 10^8$
20	27390	26820	27105	$2.7 \cdot 10^8$
21	25950	25270	25610	$2.6 \cdot 10^8$
22	19610	18550	19080	$1.9 \cdot 10^8$
23	15790	13410	14600	$1.5 \cdot 10^8$
24	11740	10610	11175	$1.1 \cdot 10^8$

Lampiran 7. Hasil analisa SDS PAGE terhadap metabolit *Vibrio alginolyticus* simbion simbion sponge *Haliclona sp.* dan *Geodia sp.* tanpa kombinasi

<i>Geodia sp.</i>	<i>Haliclona sp.</i>
BM (KDa)	BM (KDa)
107,6754	107.6754
103,3787	103.3787
93,37226	93.37226
89,64634	84.33435
86,06909	80.96908
84,33435	77.73809
82,63459	74.63602
80,96908	71.65775
79,33714	70.21348
77,73809	68.79832
74,63602	66.05299
73,13173	63.41721
71,65775	60.88661
68,79832	58.45699
66,05299	56.12432
64,72168	49.6701
62,13903	47.68807
60,88661	45.78512
59,65943	42.20401
56,12432	40.5199
49,6701	38.90299
47,68807	36.5978
45,78512	34.42921
42,20401	33.05534
40,5199	31.09665
38,90299	30.4699
36,5978	26.9659
34,42921	24.85674
33,05534	23.86486
31,09665	23.38386
30,4699	21.55488
26,9659	20.27765
26,4224	19.86895
24,85674	17.58405
23,86486	16.54211
23,38386	15.56191
21,55488	14.63979
17,22964	12.6951
16,54211	11.23518
15,24826	10.56944
12,43923	9.165441
11,23518	
11,00873	
9,165441	



**Keterangan :**



: ada pada metabolit primer *Vibrio alginolyticus*



: ada pada metabolit sekunder *Vibrio alginolyticus*

