

Aktivitas Antibakteri dan Antimitotik dari Fungi yang Bersimbiosis dengan Spons

Wilmar Maarisit^{1,2*}, Marstella Minelko², Tan Tjie Jan²

ABSTRACT: *Sponge-derived fungi are source of natural bioactive compounds. The aim of this research is to test the anti-bacterial and anti-mitotic activities from marine sponge-derived fungus. The sponge-derived fungus (strain TID.24041021-2) has been successfully isolated from sponge (strain TID.24041021-2) collected from the sea around Tidung Island. The morphology of this fungus has been identified and classified in the genus Wangiella sp. This fungus was cultivated in PDA with salinity 25 ppm for 21 days at room temperature, extracted with acetone, partitioned with ethyl acetate, and tested the anti-bacterial activity against Bacillus subtilis, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus, and also tested the anti-mitotic activity using root tip cells of Allium cepa. The results showed that crude extract of ethyl acetate could inhibit the growth of B. subtilis (1.30-2.30 mm), E. coli (1.50-3.03 mm) dan S. aureus (2.80-5.0 mm) bacteria. Also, anti-mitotic activity from crude extract of ethyl acetate showed that there is chromosome abnormalities of 0.79 and 1.38 in extract concentration of 20 % and 25%, respectively.*

Keywords: *Sponge-derived fungi, anti-bacterial, anti-mitotic, chromosome abnormalities.*

ABSTRAK: Fungi laut merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif alami. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dan antimitotik dari fungi yang bersimbiosis dengan spons. Fungi simbiosis spons (strain TID.24041021-2) telah berhasil diisolasi dari spons (strain TID.24041021) yang berasal dari perairan pulau Tidung. Identifikasi morfologi fungi menunjukkan kemiripan dengan genus *Wangiella* sp. Fungi dikultivasi pada medium PDA dengan salinitas 25 ppm selama 21 hari pada suhu ruang, diekstrak dengan aseton, dipartisi dengan etil asetat dan diuji aktivitas antibakteri dan antimitotik. Uji aktivitas antibakteri menggunakan *disc diffusion method* terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, sedangkan sel-sel akar *Allium cepa* digunakan untuk uji aktivitas antimitotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* (1.30-2.30 mm), *E. coli* (1.50-3.03 mm) dan *S. aureus* (2.80-5.0 mm), sedangkan aktivitas antimitotik dari ekstrak kasar etil asetat menunjukkan adanya abnormalitas kromosom sebesar 0.79 % dan 1.38 % pada konsentrasi ekstrak 20% dan 25 %.

Kata kunci: Fungi simbiosis spons, antibakteri, antimitotik, abnormalitas kromosom.

¹ Program Studi Ilmu Kelautan,
Fakultas Perikanan dan
Ilmu Kelautan-Universitas
Sam Ratulangi-Manado

² Program Studi Biologi,
Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Pelita Harapan-
Tangerang

Korespondensi:

Wilmar Maarisit

Email : wmaarisit@yahoo.com

PENDAHULUAN

Mikroorganisme laut khususnya fungi telah menjadi sumber penting dari senyawa metabolit farmakologis. Fungi laut dapat ditemukan pada beberapa sumber salah satunya adalah spons. Fungi dan spons membentuk suatu hubungan simbiosis baik di dalam inti sel spons (simbiosis intranukleus), di dalam sitoplasma sel tubuh spons (simbiosis intraseluler), di dalam tubuh spons (endosimbiosis ekstraseluler), dan di bagian luar tubuh spons (eksosimbiosis ekstraseluler). Hubungan simbiotik ini terjadi karena spons merupakan hewan yang bersifat *filter feeder* (1). Metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis dari mikroba simbiotiknya termasuk diantaranya adalah fungi (1). Senyawa-senyawa dari hasil biosintesis tersebut memiliki banyak fungsi biologis, salah satunya adalah anti-bakteri dan anti-mitotik.

Antibakteri adalah senyawa alami atau sintetik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen (2), sedangkan antimitotik adalah senyawa yang dapat menghambat pembelahan sel (3). Senyawa antimitotik dapat digunakan untuk pengobatan penyakit kanker karena sifatnya yang dapat menghambat mitosis dengan mengganggu pembentukan α dan β -tubulin pada mikrotubul (4). Mikrotubul memegang peranan penting saat proses mitosis, yaitu berfungsi untuk mengatur dan memisahkan kromosom (5). Senyawa antimitotik juga sering disebut sebagai senyawa antimikrotubul.

Penelitian tentang senyawa antibakteri dan antimitotik dari organisme laut khususnya fungi masih sangat terbatas. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antimitotik dari fungi yang bersimbiosis dengan spons yang dikoleksi dari perairan pulau Tidung Kepulauan Seribu.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Spons diambil dari perairan pulau Tidung pada

bulan April 2010, dengan kedalaman lima meter. Spons dipotong bagian pangkalnya menggunakan pisau dengan alat bantu *snorkel*, *goggle* dan *fins*, selanjutnya dimasukkan ke dalam kantung plastik steril dan disimpan dalam kotak pendingin (5-10°C). Sampel dibawa ke Laboratorium Biologi Universitas Pelita Harapan untuk diisolasi dan diidentifikasi fungi simbiotiknya.

Isolasi dan Kultivasi Fungi

Spons dibersihkan dengan air laut steril, dipotong kecil dan dimasukkan ke dalam medium PDB. Sampel diambil 1 mL dan disebarkan ke dalam medium PDA dengan salinitas 25 ppm. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Isolasi monospesies fungi simbion dilakukan dengan cara menggoresnya berulang kali pada medium PDA salinitas 25 ppm. Hasil isolat fungi simbion diberi kode TID.24041021-2 dan selanjutnya dikultur dalam medium PDA salinitas 25 ppm selama 21 hari pada suhu ruang.

Ekstraksi Fungi

Fungi (TID.24041021-2) sebanyak 100 petridis, dimaserasi dengan aseton selama 24 jam dengan dua kali ulangan. Perbandingan aseton yang digunakan adalah 1:2 (w:v). Larutan yang diperoleh disaring dengan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil ekstraksi kemudian dipartisi dengan menggunakan etil asetat. Ekstrak etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan difusi agar menggunakan metode *paper disk*. Bakteri patogen indikator yang digunakan adalah *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, dan *S. aureus* ATCC 25923. *E. coli* merupakan perwakilan dari bakteri Gram negatif, *S. aureus* merupakan perwakilan dari bakteri Gram positif, *B. subtilis* merupakan perwakilan dari bakteri Gram negatif yang membentuk endospora. Bakteri patogen indikator yang dikulturkan dalam medium NB diukur nilai absorbansinya hingga mencapai kisaran

0,08-0,13 pada panjang gelombang 625 nm yang merupakan *acceptable range* dari 0,5 McFarland Standards (6), selanjutnya dituang sebanyak 0,5 mL pada 20 mL medium NA dengan metode *pour plate*. Konsentrasi ekstrak kasar yang digunakan adalah 12,5; 25; 37,5; dan 50 mg/mL. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini adalah *Amoxicillin* dengan konsentrasi 50 g/mL, sedangkan etil asetat sebanyak 20 μ L digunakan sebagai kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona penghambatan yang terbentuk disekitar *paper disk* yang telah diberi sampel uji.

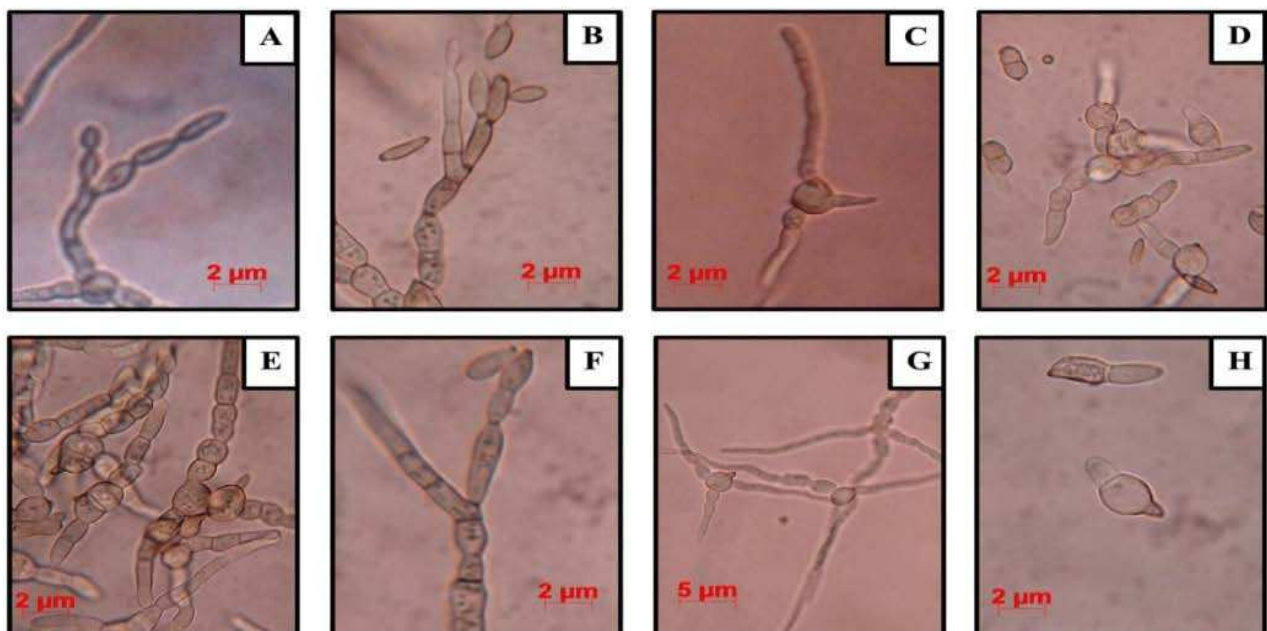
Uji Aktivitas Antimitotik

Bawang bombay (*Allium cepa*) direndam bagian pangkalnya dengan aquades selama 72 jam pada suhu 25°C, selanjutnya akar bawang bombay direndam dalam ekstrak dengan konsentrasi 20 dan 25% sebanyak 5 mL selama 24 jam. Aquades digunakan sebagai kontrol positif, sedang-

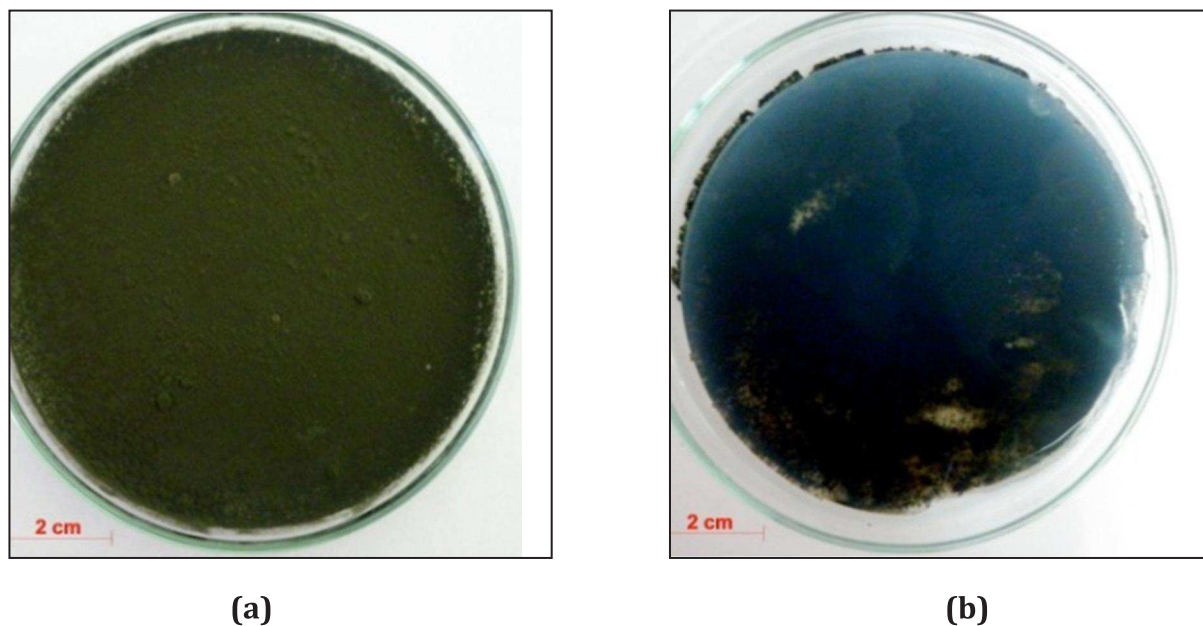
kan Tween 80, 0.05% digunakan sebagai kontrol negatif. Akar *A. cepa* dipotong sepanjang 1 mm, direndam dengan HCl 1M selama 2 menit, dibilas dengan aquades, diwarnai dengan asetokarmin selama 1 menit, difiksasi, dan diamati di bawah mikroskop. Uji aktivitas antimitotik dilakukan dengan dua kali pengulangan. Aktivitas antimitotik ditentukan berdasarkan nilai indeks mitosis yang dihitung dengan rumus: jumlah sel yang membelah/jumlah sel total.

Analisa Statistik

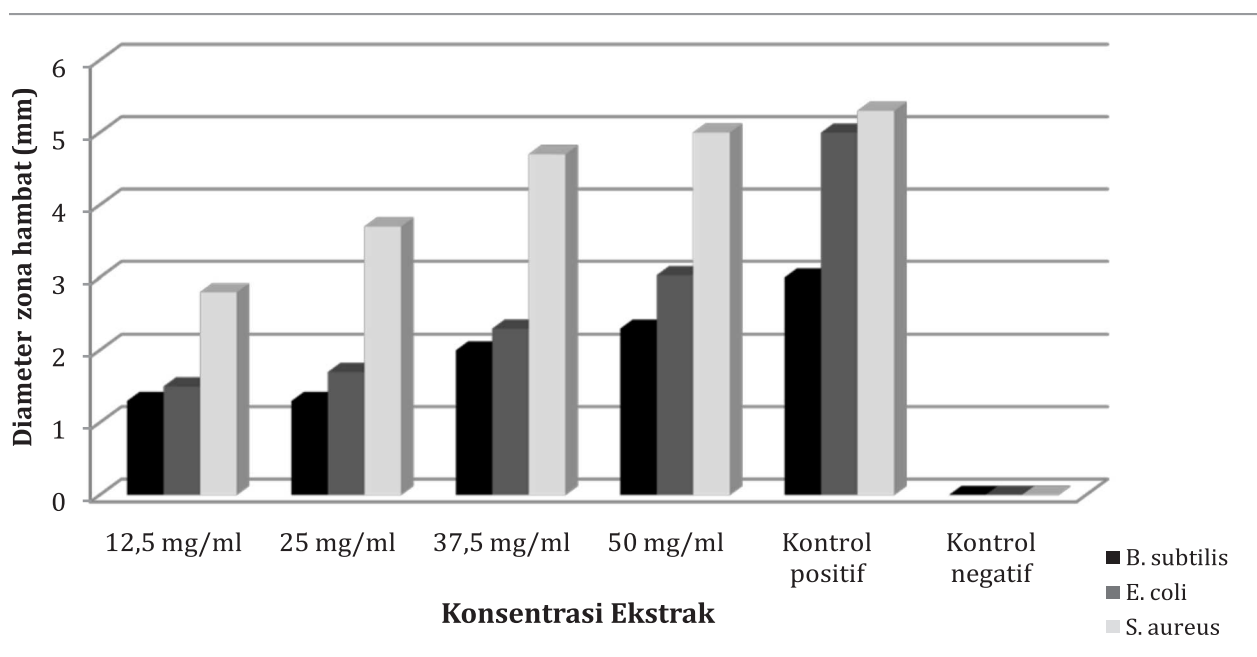
Analisa statistik yang digunakan adalah *Analysis of Variance* (ANOVA) *one way*. Uji ANOVA menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 16.0 untuk Mac. Selanjutnya data diolah dengan *Post Hoc test* Tukey's HSD (*Honestly Significant Difference*). Data yang dianalisa secara statistik adalah pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap aktivitas antibakteri dan antimitotik, dan pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap abnormalitas sel-sel akar *A. cepa*.



Gambar 1. Fungi TID.24041021-2 secara mikroskopik (A, B, F: percabangan pada fungi yang diawali dengan septa), (C dan G: *intercalary chlamydoconidium* yang sedang mengalami *budding* dan sel pada bagian ujung memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan sel lainnya), (D dan H: peristiwa *budding* pada spora), (E: *pseudohypha* yang membentuk rantai panjang dengan *intercalary chlamydoconidium* pada bagian tengah).



Gambar 2. Fungi TID.24041021-2 (a) Penampang bagian atas berwarna hijau (b) Penampang bagian bawah berwarna hitam.



Gambar 3. Grafik rerata diameter zona penghambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Fungi

Fungi (TID.24041021-2) diisolasi dari sponge (TID. 24041021). Secara makroskopis memiliki ciri berwarna hijau pada permukaan bagian atas

dan berwarna hitam pada bagian bawah (gambar 2). Fungi secara mikroskopis (gambar 1) terlihat memiliki *pseudohypha* dimana bentuknya seperti rantai yang memanjang dan tersusun dari sel-sel yang bertambah panjang karena proses pertunasan (*budding*), memiliki percabangan yang

diawali dengan adanya septa. Sel yang terdapat pada bagian ujung (terminal) memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan dengan sel lainnya. Fungi tersebut juga memiliki *intercalary chlamydoconidium* yang merupakan konidium berbentuk bulat

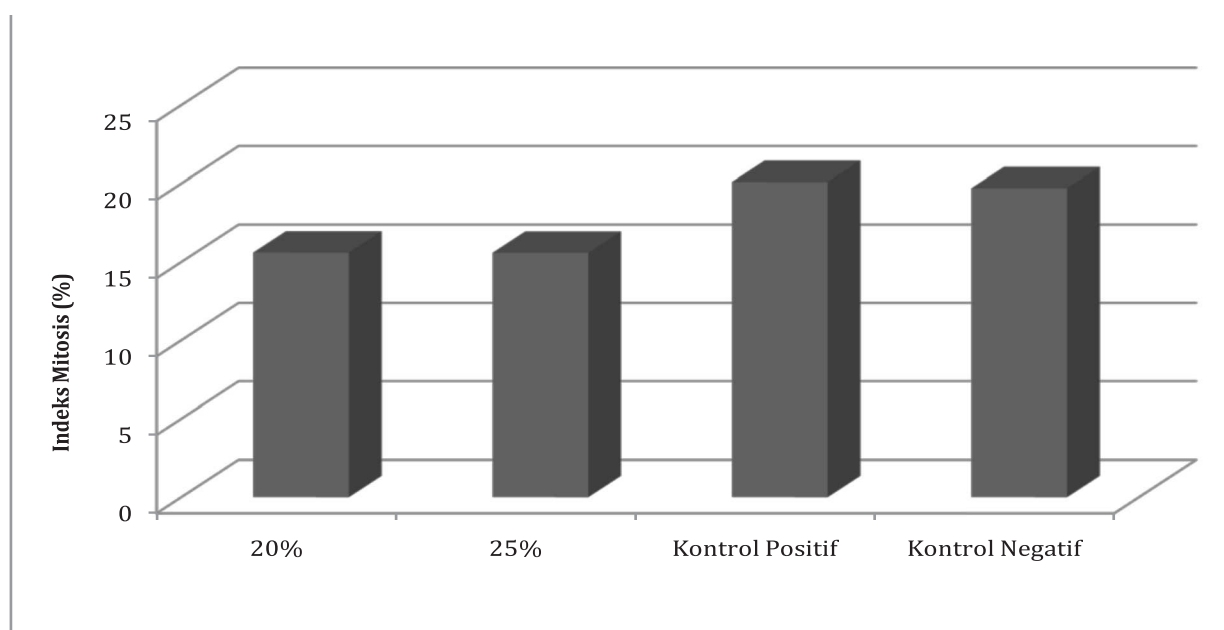
yang terletak di tengah-tengah hifa. Berdasarkan karakteristik tersebut, fungi (TID.24041021-2) memiliki kemiripan dengan *Wangiella* sp. (7) *Wangiella* sp. memiliki nama lain yaitu *Exophiala* (8).

Tabel 1. Rerata diameter zona penghambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Sampel	Rerata diameter penghambatan (mm)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
12,5 mg/mL	1,30±0,58 ^b	1,50±0,50 ^{ab}	2,80±0,29 ^b
25 mg/mL	1,30±0,58 ^b	1,70±0,58 ^{abc}	3,70±0,58 ^{bc}
37,5 mg/mL	2,00±0,50 ^{bc}	2,30±0,58 ^{bc}	4,70±0,58 ^{cd}
50 mg/mL	2,30±0,58 ^{bc}	3,03±0,58 ^{cd}	5,00±1,00 ^{cd}
Kontrol Positif (<i>Amoxicillin</i> 50 µg/mL)	3,00±0,00 ^c	5,00±1,00 ^d	5,30±0,58 ^d
Kontrol Negatif (20 µl etil asetat)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari tiga kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada p=0,05.



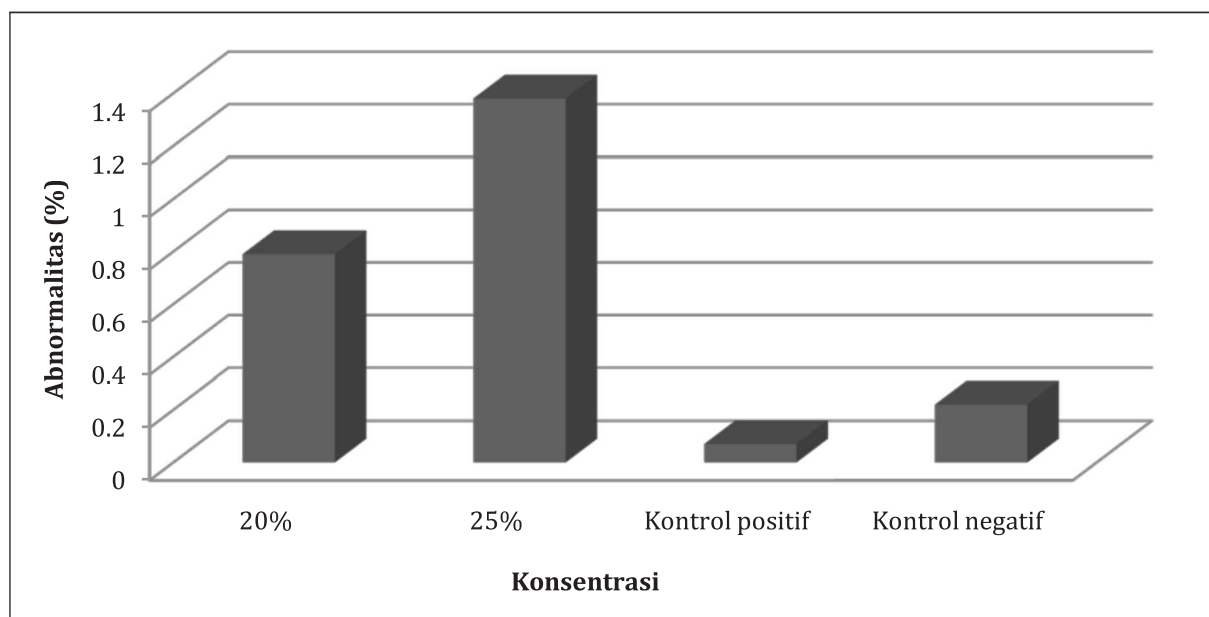
Gambar 4. Diagram batang rerata indeks mitosis ekstrak etil asetat fungi TID.24041021-2

Tabel 2. Rerata indeks mitosis ekstrak etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Sampel	Indeks Mitosis
20%	15,60±1,24 ^a
25%	15,59±0,68 ^a
Kontrol Positif (Aquades, 100%)	20,10±2,07 ^a
Kontrol Negatif (Tween 80, 0.05%)	19,70±8,34 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari dua kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada p=0,05.



Gambar 5. Diagram batang rerata persentase abnormalitas ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Tabel 3. Rerata persentase abnormalitas ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Ekstrak	Abnormalitas (%)
Ekstrak 20%	0,79±0,25 ^{ab}
Ekstrak 25%	1,38±0,42 ^b
Kontrol positif (Aquades 100%)	0,07±0,01 ^a
Kontrol negatif (Tween 80,0.05%)	0,22±0,17 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari dua kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada $p=0,05$.

Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan empat konsentrasi yaitu 12.5; 25; 37.5; dan 50 mg/mL. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar etil asetat dapat dilihat pada gambar 3 dan tabel 1. Pada tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 12,5 mg/mL mulai menunjukkan adanya aktifitas terhadap ketiga bakteri pathogen. Ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 50 mg/mL menunjukkan aktifitas antibakteri tertinggi terhadap *S. aureus* dengan diameter daerah hambat (DDH) 5 mm. Kontrol positif (*Amoxicillin*) dengan konsentrasi 50 µg/mL menunjukkan adanya aktifitas antibakteri tertinggi, dengan DDH terhadap *B. subtilis* (3 mm), *E. coli* (5 mm), dan *S. aureus* (5.30 mm). Diameter zona hambat bakteri dari ekstrak kasar

tidak dipengaruhi oleh pelarut etil asetat karena etil asetat dengan volume 20 µl tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Adanya hambatan dari ekstrak kasar fungi terhadap pertumbuhan bakteri patogen karena adanya senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak kasar fungi yang mempunyai sifat antimikroba. Fungi laut *Exophiala pisciphilla* bersimbiosis dengan spons *Mycale adhaerensm* menghasilkan senyawa antibakteri *Exophilin A*. (8)

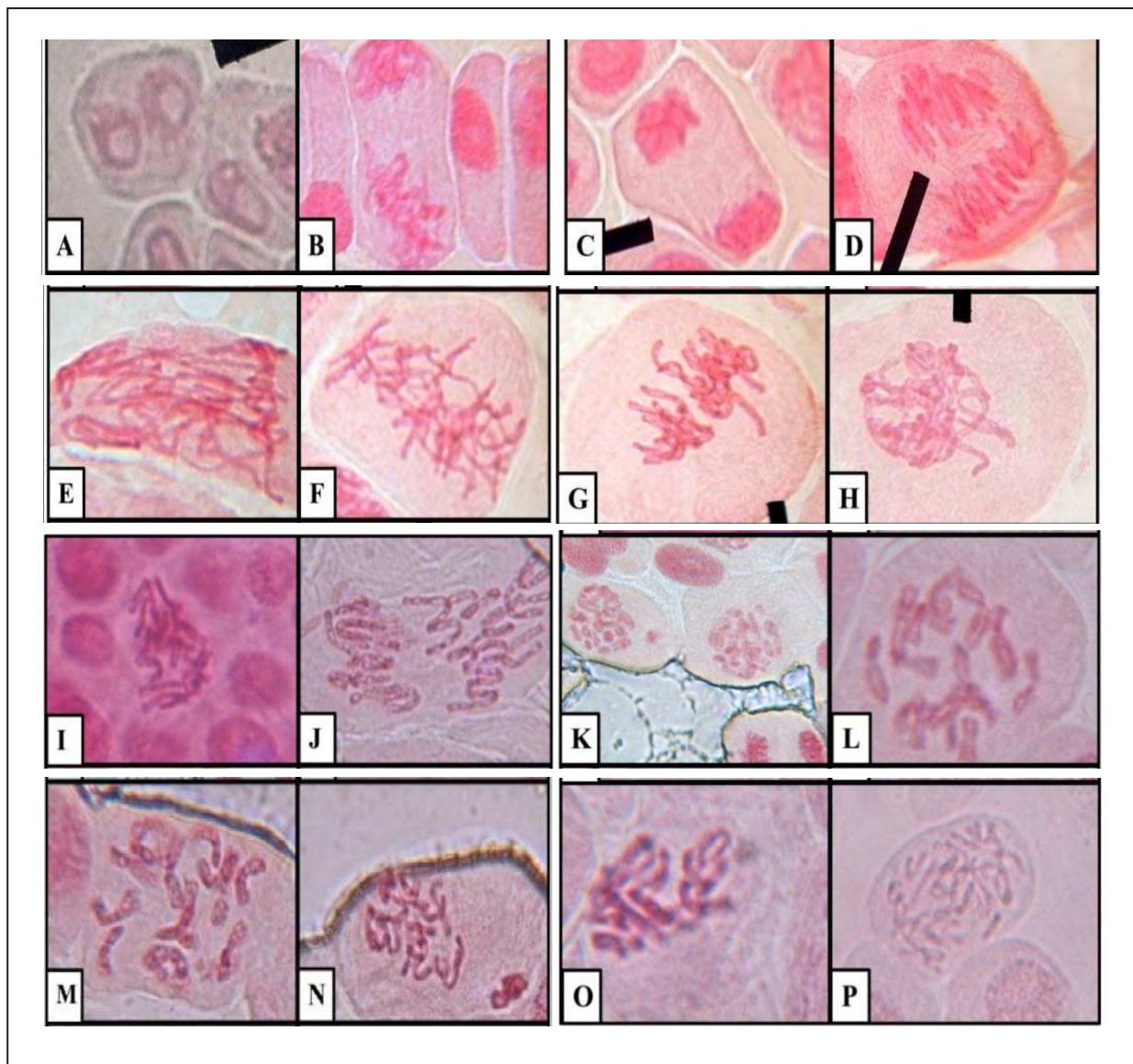
Uji Antimitotik

Uji aktivitas antimitotik dilakukan dengan melihat perbandingan sel-sel yang sedang bermitosis dengan jumlah sel secara keseluruhan (indeks mitosis). Sampel yang memiliki aktivitas

antimitotik menunjukkan hasil berupa nilai indeks mitosis yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan. Hasil uji aktivitas antimitotik ekstrak kasar etil dengan konsentrasi 20% dan 25%, serta kontrol positif (aquades 100%) dan Kontrol negatif (Tween 80 0,05%) dapat dilihat pada gambar 4 dan tabel 2. Pada tabel 2 menunjukkan bahwa indeks mitosis dari akar *A. cepa* dengan konsentasi 20 dan 25 %

masing-masing sebesar 15. 60 dan 15.59 %. sedangkan kontrol positif dan negatif masing-masing sebesar 20.10 dan 19.70 %. Indeks mitosis ekstrak kasar etil asetat lebih kecil dibandingkan dengan indeks mitosis kontrol positif dan kontrol negatif. Indeks mitosis ekstrak kasar etil asetat serta kontrol positif dan kontrol negatif tidak menunjukkan beda nyata ($p>0,05$).

Ekstrak kasar etil asetat dapat menyebabkan



Gambar 6. Abnormalitas kromosom pada sel-sel akar *A. cepa*. (A, B, C) *Binucleate cell*: suatu abnormalitas dimana dalam satu sel terdapat dua inti sel. (D) *Multipolar*: abnormalitas yang terjadi saat *sister chromatid* tidak memiliki satu kutub pembelahan sehingga mikrotubul kinetokor tidak terbentuk. (E, F, G) *Spindle abnormalities*: abnormalitas yang terjadi karena benang spindel mengalami gangguan sehingga kromosom menjadi tidak teratur (H) *Vagrant chromosome*: abnormalitas dimana ada bagian dari kromosom yang tersebar. (I, K, L) *Chromosome pairing*: *Sister chromatid* tersebar dalam sel. (J, M, N, O, P) *Chromosome spreading*: kromosom yang belum berpasangan tersebar di dalam sel (9).

abnormalitas pada sel-sel akar *A. cepa*. Ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2 konsentrasi 20% menunjukkan abnormalitas sebesar 0,79%, sedangkan konsentrasi 25% menunjukkan abnormalitas sebesar 1,38%. Peningkatan konsentrasi ekstrak dapat mengakibatkan peningkatan persentase abnormalitas pada sel-sel akar *A. cepa*. Kontrol positif ditemukan adanya abnormalitas sebesar 0,07 % sedangkan abnormalitas pada kontrol negatif sebesar 0,22% (gambar 5). Pada sel-sel akar *A. cepa* yang diberi perlakuan dengan ekstrak kasar etil asetat, abnormalitas yang ditemukan semakin banyak. Persentase abnormalitas yang ditunjukkan oleh ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 25% cukup tinggi dan memiliki beda nyata dengan kontrol negatif dan kontrol positif ($p < 0,05$). Kontrol positif dan kontrol negatif tidak memiliki beda nyata ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa Tween 80 0,05% tidak mempengaruhi persentase abnormalitas sel-sel akar *A. cepa* (tabel 3).

Jenis-jenis abnormalitas kromosom yang ditemukan cukup beragam, seperti *binucleate cell*, *spindle abnormalities*, *multipolar*, *vagrant chromosome*, *chromosome pairing*, dan *chromosome spreading* yang dapat dilihat pada gambar 6. Abnormalitas yang terjadi disebabkan karena adanya gangguan pada mikrotubul sehingga proses mitosis sel-sel *A. cepa* tidak berjalan dengan normal. *Binucleate cell* terjadi karena terhambat-

nya *cell plate formation* sehingga telofase tidak diikuti dengan sitokinesis yang mengakibatkan tidak terbentuknya dinding sel yang memisahkan dua sel yang sudah membelah. Abnormalitas lain yang terjadi merupakan hasil dari *colchicine mitosis* yang merupakan suatu proses inaktivasi dari spindle yang diikuti dengan tersebarnya kromosom secara acak di dalam sel (9).

KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Aktivitas antibakteri paling tinggi ditunjukkan terhadap *S. aureus*. Ekstrak kasar etil asetat mengakibatkan terjadinya penurunan indeks mitosis sel-sel akar *A. cepa* dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Fungi laut (strain TID.24041021-2) memiliki kemiripan dengan fungi genus *Wangiella* baik secara makroskopis maupun mikroskopis.

Perlu dilakukan fraksinasi dari ekstrak kasar etil asetat serta penentuan struktur dengan menggunakan 2D-NMR dari senyawa yang berperan sebagai anti bakteri dan antimitotik. Identifikasi isolat fungi TID.24041021-2 perlu dilakukan lebih lanjut sampai pada tahap spesies. Identifikasi ini dapat dilakukan secara molekuler dengan 18S rRNA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee YK, Lee JH, Lee, HK. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Journal of Microbiology*. 2001;39 (4) : 254-264.
2. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Biology of Microorganisms, Twelfth Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 2009.
3. Namikoshi M, Suzuki S, Meguro S, Kobayashi H, Mine Y, Kasuga I. Inhibitors of Microtubule Assembly Produced by the Marine Fungus Strain TUF 98F139 Collected in Palau. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 2002; 88:1-6
4. Roberge M, Cinel B, Anderson HJ, Lim L, Jiang X, Xu L, Bigg CM, Kelly MT, Andersen RJ.. Cell-based Screen for Antimitotic Agents and Identification of Analogues of Rhizoxin, Eleutherobin, and Paclitaxel in Natural Extracts. *American Association for Cancer Research*. 2000; 60: 5052-5058.
5. Leslie BJ, Holaday RH, Nguyen T, Hergenrother PJ. Phenylcinnamides as Novel Antimitotic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53: 3964-3972.
6. Andrews JM. BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64:454-489.

7. Larone DH. Medically Important Fungi: A Guide to Identification 4th Edition. Washington: ASM Press. 2002.
8. Doshida J, Hasegawa H, Onuki H, Shimidzu N. Exophilin A, A New Antibiotic From A Marine Micro-organism *Exophiala pisciphila*. *Journal of Antibiotics* 1996; 49(11):1105-1109.
9. Auti S, Pagare R, Ahire D, Sawale V. Cytogenetical Studies on The Effect of Omnacortil on Root Tip Cells of *Allium cepa* L. *Journal of Cell and Tissue Research*. 2010;10(03):2331-2335.