

SKRINING AWAL EKSTRAK ETIL ASETAT SPONS *DYSIDEA* SP. SEBAGAI ANTIBAKTERI

Ni Wayan Martiningsih

Jurusan Analis Kimia Fakultas MIPA Universitas Pendidikan Ganesha
email: marti_chem03@yahoo.co.id

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan kemampuan dari ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Isolasi dilakukan dengan ekstraksi menggunakan pelarut metanol:diklorometana (1:1). Campuran metanol:diklorometana disaring, diuapkan dengan rotary evaporator dan kemudian dipartisi dengan etil asetat:air (3:2). Ekstrak kasar etil asetat dianalisis kandungan metabolit sekundernya dengan cara skrining fitokimia. Uji bioaktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar pada konsentrasi 50; 25; 12,5; 6,25 dan 3,125%. Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid dan steroid. Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat *Dysidea* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* sampai konsentrasi uji 25% dan bakteri *S.aureus*. sampai konsentrasi uji 3,125%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. memiliki potensi antibakteri.

Kata-kata kunci: antibakteri, *Dysidea* sp., skrining fitokimia

Abstract: The purpose of this study was to determine the secondary metabolites and ability of ethyl acetate extract of sponge *Leucetta* sp. in inhibiting the growth of *Escherichia coli* (*E.coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). The isolation was performed by extraction using a mixture of methanol:dichloromethane (1:1). Methanol:dichloromethane extracts was filtered, evaporated with a rotary evaporator and than partitioned with ethyl acetate: water (3:2). Crude ethyl acetate extract was analyzed the secondary metabolites by phytochemical screening. Antibacterial testing with agar diffusion method at concentrations of 50; 25; 12,5; 6,25 dan 3,125%. Phytochemical screening results indicate the presence of alkaloid and steroid compounds. The result of antibacterial test showed that the crude ethyl acetate extract of *Dysidea* sp. able to inhibit the growth of *E.coli* until the concentration of the test 25% and *S.aureus* until the concentration of test 3,125%. It means that ethyl acetate extract of sponge *Dysidea* sp. had antibacterial potency.

Keywords: antibacterial, *Dysidea* sp., phytochemical screening

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu persoalan kesehatan global baik di negara maju maupun berkembang. Data WHO menunjukkan bahwa infeksi virus, bakteri, jamur, parasit merupakan penyebab kematian terbesar di dunia (Mathers dan Loncar, 2005). Demikian pula data Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2007 menunjukkan bahwa penyakit infeksi seperti infeksi pernapasan dan diare merupakan penyakit yang sering diderita oleh masyarakat Indonesia (Anonim, 2008). Salah satu pengobatan penderita penyakit infeksi adalah melalui pemberian antibiotik. Dengan semakin

luasnya penggunaan antibiotik ini, timbul masalah baru yaitu meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan obat penyakit infeksi khususnya antibakteri tetap merupakan hal yang sangat penting.

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan dua pertiga wilayahnya adalah lautan yang merupakan bagian dari perairan Indopasifik. Wilayah Indopasifik yang sebagian berpusat di Indonesia Timur dan Filipina merupakan pusat keanekaragaman biota laut terbesar di dunia. Sumber daya biota laut tersebut merupakan aset potensial yang dapat

didayagunakan menjadi aneka produk, mulai dari produk makanan sampai produk farmasi (obat-obatan) (Suparno, 2005).

Dewasa ini, mulai banyak dikembangkan penelitian dengan objek biota laut dan telah menghasilkan penemuan berbagai senyawa yang menarik secara biologis dan kimiawi yang berguna untuk keperluan farmakologi. Spons merupakan sumber bahan baku yang potensial untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai antibiotik, antijamur, antikanker, antiinflamasi dan antioksidan yang selama ini terus dieksplorasi. Senyawa bioaktif tersebut jika terbukti bermanfaat, kemudian dikembangkan guna memperoleh *lead compound*, kemudian disintesis sebagai obat-obatan bagi kesehatan manusia dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Oleh karena itu dalam rangka memperoleh obat baru, spons menjadi filum yang paling banyak dieksplorasi karena memiliki banyak senyawa bioaktif dari berbagai tipe (Prosch *et al.* 2004; Munro 1989).

Spons dari famili Dysideidae seperti *Dysidea* sp. merupakan salah satu spons laut tropis yang paling banyak diteliti karena mengandung senyawa aktif dengan struktur kimia dan aktivitas biologi yang menarik. Senyawa aktif yang berhasil diisolasi diantaranya adalah golongan seskuiterpena, steroid, spiro-laktol/lakton, furan trisiklik, senyawa yang mengandung kerangka furodysin dan furodysin, alkaloid poliklorinasi, difenil eter terbrominasi dan senyawa lainnya dengan aktivitas antibakteri, antijamur, antiproliferasi (sel kanker payudara manusia), dan antioksidan (Cameron dkk., 2000; Handayani dkk., 1997; Zhang dkk., 2008; Utkina dkk., 2010).

Oleh karena itu maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan potensi antibakteri ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. Hasil penelitian ini

diharapkan dapat menambah khasanah pengembangan ilmu pengetahuan di Indonesia terutama di bidang farmakologi dan eksplorasi keanekaragaman hayati laut dari perairan Indonesia.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Dysidea* sp. yang diambil dari Perairan Pulau Menjangan Bali Barat, metanol, diklorometana, etil asetat, aquades, asam klorida, asam sulfat 50%, pereaksi besi (III) klorida, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, dan pereaksi Liebermann-Buchard, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, timbangan analitik, *rotary evaporator*, pipet mikro, *yellow tip*, *ependorf* kawat *ose*, lampu spiritus, cawan petri, autoklaf, *laminar airflow*, inkubator, *paper disk*, jangka sorong.

Identifikasi jenis spons

Pengamatan terhadap morfologi spons berupa warna, bentuk, konsistensi, spikuladan ukuran spons pada habitat aslinya (dalam laut) dilakukan untuk kepentingan identifikasi jenis spons. Gambar spons tersebut juga diambil baik di dalam air maupun setelah diambil di darat; disamping itu dilakukan pula pembuatan *voucher specimen* untuk melengkapi identifikasi sampel spons. Identifikasi jenis spons dilakukan di Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.

Ekstraksi spons

Spons seberat 307,71 gram dipotong kecil-kecil, dimaserasi dengan pelarut metanol:diklorometana 1:1 (v/v) kemudian disaring dan diuapkan dengan

rotary evaporator. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, dipartisi dengan etil asetat:air (3:2). Lapisan etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat. Terhadap ekstrak etil asetat ini kemudian dilakukan uji bioaktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawanya.

Uji Aktivitas Antibakteri

Sampel yang akan diuji bioaktivitas antibakterinya dikerjakan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut.

Penyiapan Sampel Uji

Pembuatan stok baku dengan melarutkan 50 mg sampel dalam 0,1 mL etil asetat sehingga didapatkan konsentrasi baku yaitu 50%. Sampel uji dibuat dengan variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 50; 25; 12,5; 6,25 dan 3,125%.

Penggunaan kontrol negatif

Kontrol negatif digunakan untuk menjamin bahwa pelarut yang digunakan dalam ekstrak sampel uji tidak memiliki aktivitas antibakteri, sehingga diharapkan memberikan hasil negatif. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak sampel uji yaitu etil asetat.

Penyiapan media

Media untuk uji antibakteri *E. coli* dan *S. aureus* digunakan NA yang dibuat dengan cara yaitu sebanyak 2 g NA ditimbang lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambah air suling sampai volumenya 100 mL lalu dipanaskan hingga homogen. Campuran disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Pembuatan suspensi bakteri

Satu ose biakan bakteri uji yang telah diremajakan pada media agar

miring disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Suspensi bakteri tersebut diencerkan menggunakan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan 0,5 Mc. Farland (populasi bakteri 1×10^7 CFU/mL – 1×10^8 CFU/mL). CFU singkatan dari *Colony Forming Unit*.

Pengujian antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar, yaitu dengan cara media NA cair (10 mL) dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Suspensi bakteri ditanamkan di atas permukaan agar yang telah memadat secara merata. Setelah permukaan agak kering sempurna, di atasnya diletakkan *paper disk* berdiameter 6 mm yang telah ditetesi 10 µL senyawa uji, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Wanger, 2009).

Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dilakukan dengan uji fitokimia dengan pereaksi pendeteksi senyawa. Pemeriksaan senyawa alkaloid dilakukan dengan pereaksi Dragendroff, Meyer dan Wagner. Reaksi positif jika terbentuk endapan jingga dengan pereaksi Dragendroff, endapan coklat dengan pereaksi Wagner dan endapan putih dengan pereaksi Meyer (Harborne (1987) dan Robinson (1991).

Pemeriksaan senyawa flavonoid dilakukan dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat dan 2-3 potong logam Mg. Reaksinya disebut positif jika memberikan warna orange-merah.

Uji senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru untuk steroid dan merah-ungu untuk triterpenoid. Selain itu, dapat juga digunakan pereaksi asam sulfat 50% yang akan membentuk bercak

ungu-merah-coklat pada plat KLT jika reaksi positif terpenoid dan warna biru-hijau pada plat KLT jika positif mengandung steroid (Harborne (1987) dan Robinson (1991).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan mengamati ada tidaknya busa pada larutan sampel uji yang stabil dalam waktu 10 menit dan tidak hilang pada penambahan asam klorida 2N.

Uji senyawa golongan tanin dilakukan dengan penambahan larutan FeCl_3 1%. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya endapan biru hingga hitam kehijauan (Feigl, 1960).

Analisis Data

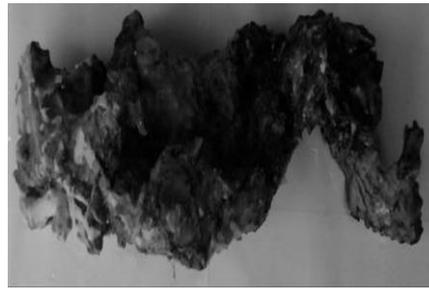
Zona jernih di sekitar *paper disk* (zona radikal) mengindikasikan adanya aktivitas mematikan dari senyawa uji dan zona pertumbuhan bakteri yang tidak rapat di sekitar *paper disk* (zona irradikal) mengindikasikan adanya aktivitas hambatan dari senyawa uji.

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etil asetat dinyatakan dengan nilai positif (terdapat senyawa) dan negatif (tidak terdapat senyawa). Hasil ini kemudian dianalisa secara deskriptif.

Pembahasan Hasil

Spons yang digunakan sebagai bahan penelitian ini Spons yang digunakan sebagai bahan penelitian ini berdinding tipis, permukaan tubuhnya sangat berkonulosa, berwarna kuning-abu-ungu dan semua serat/fibernya tersusun secara konsentris berlapis. Klasifikasi taksonominya dilakukan berdasarkan ciri-ciri fisiknya. Gambar spons yang dijadikan bahan penelitian ditunjukkan pada Gambar 1. Klasifikasi taksonomi spons tersebut adalah Kingdom: Animalia; Filum: Porifera; Kelas: Demospongia; Subkelas: Tetractinomorpha; Ordo: Dendroceratida; Familia: Dysideidae

Gray, 1867; Genus: *Dysidea Johnston, 1842.*



Gambar 1. Spons *Dysidea* sp. setelah diambil dari laut

Ekstrak etil asetat yang diperoleh dalam penelitian ini berwarna kuning kecoklatan seberat 0,45 gram kemudian diuji bioaktivitas antibakterinya dengan metode difusi agar dan uji fitokimia. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Spons *Dysidea* sp.

Konsentrasi sampel (%)	Diameter hambatan terhadap <i>E.coli</i> (mm)	Diameter hambatan terhadap <i>S.aureus</i> (mm)
50	15,50	17,50
25	10,13	10,25
12,5	-	8,75
6,25	-	8,38
3,125	-	6,88
Kontrol	-	-

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Ekstrak etil asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada semua konsentrasi uji, sedangkan untuk bakteri *E. coli* hanya dapat dihambat pertumbuhannya sampai konsentrasi ekstrak etil asetat 25%.

Suatu zat aktif dikatakan memiliki potensi yang tinggi sebagai antibakteri, jika pada konsentrasi rendah mempunyai daya hambat yang besar. Davis dan Stout (1971) menyatakan

bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar berukuran kurang dari 5 mm, maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah. Apabila zona hambat berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-19 mm dikategorikan kuat dan 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

Ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. pada konsentrasi 3,125; 6,25 dan 12,5% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan zona hambat masing-masing yaitu 6,88 mm; 8,38 mm dan 8,75 mm. Hasil ini menunjukkan bahwa pada ketiga konsentrasi tersebut, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas penghambatan yang sedang terhadap bakteri *S. aureus*. Ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *E.coli* pada konsentrasi 3,125; 6,25 dan 12,5% karena tidak terbentuknya zona bening pada ketiga konsentrasi uji tersebut.

Pada konsentrasi 50% dan 25% didapatkan hasil diameter zona hambat ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. terhadap bakteri *S. aureus* (masing-masing adalah 17,50 mm dan 10,25 mm) serta bakteri *E.coli* (masing-masing 15,50 mm dan 10,13 mm) menunjukkan aktivitas penghambatan yang tergolong kuat. Hasil uji secara keseluruhan menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dibandingkan dengan bakteri *E. coli*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan struktur membran bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif yang mempengaruhi penetrasi ekstrak uji ke dalam bakteri tersebut.

Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis dibanding bakteri Gram positif. Struktur bakteri Gram

negatif memiliki membran lapisan luar yang menyelimuti lapisan tipis peptidoglikan, struktur luar peptidoglikan ini adalah lapisan ganda yang mengandung fosfolipid, protein dan lipopolisakarida. Lipopolisakarida terletak pada lapisan luar dan merupakan karakteristik bakteri Gram negatif. Sementara sel bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal dan didalamnya mengandung senyawa teikoat dan lipoteikoat (Pelczar, 2010). Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antibakteri dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. disajikan pada Tabel 2. Uji fitokimia dengan pereaksi Dragendroff menghasilkan endapan berwarna jingga, dengan pereaksi Wagner menghasilkan endapan berwarna coklat dan dengan pereaksi Meyer menghasilkan endapan putih sehingga diduga ekstrak etil asetat mengandung alkaloid. Selain itu reaksi positif juga ditunjukkan saat uji menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* dan asam sulfat 50%, sehingga diduga ekstrak etil asetat juga mengandung steroid.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Spons *Dysidea* sp.

No	Uji Fitokimia	Pereaksi	Warna	Hasil
1	Flavonoid	HCl pekat + Mg	kuning muda	-
2	Alkaloid	Dragendroff Wagner Meyer	endapan jingga endapan coklat endapan putih	+ + +
3	Saponin	Air panas + HCl	tidak terbentuk busa	-
4	Tri-terpenoid / Steroid	Liebermann-Burchard H ₂ SO ₄ 50%	Biru kehijauan Biru	+ +
5	Tanin	FeCl ₃ 1%	tidak ada perubahan	-

SIMPULAN

Ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* sampai konsentrasi uji 25% dan bakteri *S.aureus*. sampai konsentrasi uji 3,125%. Berdasarkan uji fitokimia ekstrak etil asetat spons *Dysidea* sp. diduga mengandung alkaloid dan steroid.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif yang bersifat antibakteri dari spons *Dysidea* sp.

DAFTAR RUJUKAN

- Anonim. 2008. Indonesia Country Profile 2007. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Cameron, G.M., Stapleton, B.L., Simonsen, S.M., Brecknell, D.J. dan Garson, M.J., 2000, New Sesquiterpene and Brominated Metabolites from the Tropical

Marine Sponge *Dysidea* sp., *Tetrahedron*, 56, 5247-5262.

- Davis, W.W. dan Stout, T.R., 1971, Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Assay. *J. Microbiol.*, 22, 4.
- Feigl, F. 1960. Spot Test in Organic Analysis. Translate by Ralph E. Oesper. Sixth English Edition.
- Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Soest, R.W.M.V., Kunzmann, A. dan Soedarsono, 1997, Four New Bioactive Polybrominated Diphenyl Ethers of the Sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonesia, *J. Nat. Prod.*, 60, 1313-1316.
- Harbone, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Jilid II., Penerbit ITB, Bandung.
- Mathers, C.D. dan Loncar, D., 2005, *Updated Projections of Global Mortality and Burden of Disease, 2002-2030: Data Sources, Methods and Results, Evidence and Information for Policy*, World Health Organization.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 2010, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, jilid I, (diterjemahkan oleh: Hadioetomo, R. S, Imas, T., Tjitrosomo, S.S. dan Angka, S.L), Penerbit UI Press, Jakarta.
- Proksch P. 2004. Defensive Roles for Secondary Metabolites from Marine Invertebrates and Associated Microorganism. Di dalam: Soemodihardjo S, Rachmat R, Saono S, editor. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I; Jakarta 14 – 15 Oktober 1998*. Jakarta: LIPI. hlm 33-40.
- Robinson, T., 1991, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, terjemahan

- Padmawinata, K., Penerbit ITB, Bandung.
- Suparno, 2005. Kajian Bioaktif Spons (Porifera: Demospongiae) suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Bidang Farmasi. Publisher. Bogor.
- Utkina, N.K., Vladimir, A., Denisenko dan Krasokhin, V.B., 2010, Sesquiterpenoid Aminoquinones from the Marine Sponge *Dysidea* sp., *J. Nat. Prod.*, 73, 788-791.
- Wanger, A., 2009, *Antibiotic Susceptibility Test* dalam *Practical Handbook of Microbiology*, Goldman, E. dan Green, L.H.(eds.), 2nd edition, CRC Press, New York.
- Zhang, H., Skildum, A., Stromquist, E., Hellekant, T.R. dan Chang, L.C., 2008, Bioactive Polybrominated Diphenyl Ethers from the Marine Sponge *Dysidea* sp., *J. Nat. Prod.*, 71, 262-264