ISOLASI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI 'SOFT CORAL' LAUT *Dendronephthya* sp.

Dian Handayani, Cut Masyithah dan Deddi Prima Putra
Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang

ABSTRACT

The isolation of antimicrobial compound from non polar fraction of the soft coral *Dendronephthya* sp. has been carried out and yielded a white amorphous compound 1. The compound showed antibacterial activity against bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and pathogenic fungus *Candida albicans* ATCC 10231 and *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 5431 by diffusion agar and dilution method. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of this compound was 25 ppm against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* respectively. Based on spectral data (infrared and ultraviolet) and chemical reaction, the compound 1 was identified as terpenoid.

PENDAHULUAN

Pada masa sekarang penelitian tentang biota laut bukan saja ditujukan untuk memenuhi kebutuhan bahan makanan ataupun sebagai bahan kosmetik, tetapi telah meluas ke bidang penemuan senyawa-senyawa kimia baru. Senyawa kimia baru tersebut diharapkan dapat memenuhi kebutuhan akan bahan obat baru terutama obat untuk penyakit-penyakit seperti AIDS dan kanker [1].

Dalam beberapa literatur dilaporkan bahwa organisme laut yang paling besar memiliki kandungan kimia umumnya berasal dari invertebrata laut diikuti dengan tumbuhan laut. Dalam hal ini yang termasuk ke dalam kelompok invertebrata laut antara lain: spon (filum Porifera), hewan lumut (filum Bryozoa), bunga karang/soft coral (filum Cnidaria) dan hewan bermantel (filum Tunicata)[2,3].

Dalam rangka menggali potensi jenis biota laut khususnya di Sumatera Barat telah dilakukan survei di Perairan Painan, Kabupaten Pesisir Selatan dan ditemukan beberapa jenis invertebrata laut. Berdasarkan *screening* aktivitas terhadap biota laut hasil survei tersebut, ditemukan satu sampel yang menunjukkan akitivitas yang cukup nyata. Sampel ini termasuk dalam kelompok 'soft coral' dengan genus *Dendronephthya* (Famili Neptheidae, Ordo Alcynarida, Sub Kelas Octocoralia, Kelas Anthozoa). Dari penelusuran *Data Base Natural Product* (2000) dan Marinlit (2003)[4], diketahui bahwa belum ada penelitian terhadap genus ini.

Hasil *screening* bioaktifitas ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan butanol spon laut *Dendronephthya*, memperlihatkan aktivitas antimikroba terhadap mikroba uji, dimana fraksi non polar dan semi polar menunjukkan aktivitas yang lebih besar dari fraksi polar. Berdasarkan hasil *screening* tersebut maka dilakukan isolasi senyawa antimikroba dari fraksi non polar 'soft coral' laut *Dendronephthya* sp.

METODOLOGI

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari Pulau Babi pada kedalaman 4-6 m, Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat.

Identifikasi Sampel

Sampel soft coral laut *Dendronephthya* sp. (DH-17) diidentifikasi di Fakultas perikanan Universitas Bung Hatta, Padang. Voucher spesimen disimpan di laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.

Teknik Analisis

Titik leleh ditentukan dengan alat Fisher, spektrum UV/Vis dicatat dengan alat spektrofotometer Shimadzu, spektrum infra merah dicatat dalam lempengan KBr menggunakan spektrometer infra merah Perkin Elmer 735 B.

Ekstraksi

Sampel 'soft coral' *Dendronephthya* sp. 1 kg dirajang halus kemudian dimaserasi dengan 2 liter metanol masing-masing selama 5 hari dan disaring dengan kapas. Gabungan maserat diuapkan *in vacuo* sampai kental. Ekstrak kental difraksinasi dalam corong pisah, dengan menambahkan air dan *n*-heksana, sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi *n*-heksana diuapkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan fraksi

kental *n*-heksana sebanyak 2,95 gram. Fraksi air selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat, sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan fraksi kental etil asetat sebanyak 1,42 gram. Fraksi air selanjutnya difraksinasi dengan butanol, sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi butanol dan fraksi air. Fraksi butanol diuapkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan fraksi kental butanol sebanyak 0,4 gram.

Uji Aktivitas Antimikroba [5]

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan bakteri uji: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherachia coli*, ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 5431 (Biofarma, Bandung).

Metode Difusi

Sebanyak 0,1 ml suspensi mikroba dipipet dengan pipet mikro dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian masukkan media NA dalam kondisi cair (± 50 °C) sebanyak 12 ml untuk bakteri dan media SDA untuk jamur dan dihomogenkan dengan cara cawan petri digoyang hingga homogen kemudian biarkan memadat. Selanjutnya diletakkan kertas cakram steril di atas permukaan medium yang telah ditetesi 10 µl larutan uji. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam untuk bakteri dan suhu kamar (25-27 °C) selama 48-72 jam untuk jamur.

Diamati adanya pertumbuhan mikroba dan diukur diameter hambatan dengan jangka sorong. Sebagai kontrol negatif digunakan kertas cakram steril yang ditetesi DMSO sebanyak 10 µl. Sebagai pembanding untuk antimikroba digunakan larutan tetrasiklin 0,3% untuk bakteri dan untuk jamur digunakan larutan klotrimazol 0,1% masing-masing sebanyak 10 µl/cakram.

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dilakukan dengan metoda dilusi menggunakan plat titer mikro dengan 96 lubang yang telah disterilkan. Penentuan KHM dilakukan dengan cara lubang ke 1 diisi dengan 180 µl suspensi kultur bakteri, lubang ke 2-6 diisi dengan 100 µl suspensi kultur bakteri.

Sampel uji sebanyak 20 µl dimasukkan dalam lubang pertama yang telah berisi 180 µl suspensi kultur bakteri kemudian homogenkan dengan cara mengaduk suspensi dengan pipet mikro dalam plat titer mikro tersebut. Kemudian pipet 100 µl dari lubang pertama pindahkan ke lubang yang kedua, aduk homogen, kemudian pipet 100 µl dari lubang yang ke 2 pindahkan ke lubang yang ke 3, begitu seterusnya sampai lubang ke 6 dan 100 µl terakhir dibuang. Untuk kontrol negatif sebagai pembanding pada lubang ke 7 digunakan 10 µl DMSO ditambah 90 µl suspensi kultur bakteri, sedangkan kontrol positif sebagai pembanding digunakan 10 µl larutan tetrasiklin 160 ppm ditambah 90 µl suspensi kultur bakteri. Semua pengerjaan di atas dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) *Cabinet*. Plat titer mikro diinkubasi selama 24 jam. Daya hambat pertumbuhan mikroba ditunjukkan dengan perbedaan kekeruhan pada masing-masing lubang plat titer mikro yang dapat diamati secara visual. Konsentrasi terendah dari sampel uji pada lubang yang terlihat bening yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba merupakan angka Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksi yang paling aktif sebagai antimikroba yaitu fraksi heksan dan fraksi etil asetat (Tabel 1). Fraksi heksan dilanjutkan pemisahannya untuk mendapatkan senyawa aktif karena jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Isolasi dilakukan dengan cara kromatografi kolom menggunakan fasa diam silica gel 60 (40-63 µm) dan fasa gerak *n*-heksana, etil asetat dan metanol dengan system *SGP (Step Gradient Polarity)*. Dari fraksi heksan ini diperoleh fraksi A sampai fraksi G, selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antimikroba terhadap masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom dengan metoda difusi agar, untuk menentukan fraksi mana yang akan dilanjutkan pengerjaannya.

Hasil pengujian menunjukkan fraksi B memiliki aktifitas antimikroba terkuat (Tabel 2). Pemisahan fraksi B (1,15 *g*) dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam alumina dan fasa gerak heksan, diklorometan dan metanol yang ditingkatkan secara bertahap. Dari hasil kromatografi ini diperoleh beberapa fraksi yaitu Ba –Bg. Selanjutnya terhadap fraksi-fraksi ini dilakukan uji aktifitas antimikroba (Tabel 3).

Fraksi yang paling aktif adalah fraksi Bb, tapi masih belum murni sehingga harus dipisahkan dengan teknik kromatografi radial dengan fasa diam silika gel (< 45 µm) setebal 1 mm dengan fase gerak heksan, diklorometan dan metanol dengan sistim SGP, sehingga diperoleh fraksi Bb1–Bb5. Kemudian terhadap masing-masing fraksi kembali dilakukan pengujian aktifitas antimikroba dan diperoleh hasil fraksi Bb1 menunjukkan aktifitas terkuat (Tabel 4). Hasil monitoring KLT, diperoleh hasil, fraksi Bb1

ISSN: 0853-8018

menunjukkan satu noda pada plat KLT dengan penampak noda uap iodium dan pereaksi metanol-H_2SO_4 10%. Dari hasil rekristalisasi menggunakan campuran pelarut heksan dan metanol terhadap fraksi Bb1 diperoleh senyawa murni yaitu senyawa 1, berupa amorf putih seberat 30 mg. Karakterisasi struktur senyawa 1 meliputi pemeriksaan organoleptis, sifat fisika, sifat kimia, sifat fisikokimia dan pemeriksaan KLT.

Penentuan jarak leleh menggunakan alat *Fisher-Jhon Melting Point Apparatus*, diketahui senyawa 1 memiliki jarak leleh 142-144°C (Tabel 5). Pengujian aktifitas antimikroba senyawa 1 dilakukan dengan metoda dilusi. KHM senyawa 1 terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231 serta *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 4531 masing-masing sebesar 25 ppm (Tabel 6).

Tabel 1. Hasil uji pendahuluan aktifitas antimikroba dari ekstrak methanol dan fraksi-fraksi dari 'soft coral' *Dendronephthya* Sp.

No	Mikroba uji	Diameter Daerah Hambat (mm) * dari				
		Vol. sampel	Ekstrak MeOH	Fraksi Heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Butanol
1	*Staphylococcus aureus*	10 µl	15	12	13	8
2	*Staphylococcus epidermidis*	10 µl	14	13	10	7
3	*Micrococcus luteus*	10 µl	11	10	10	7
4	*Escherichia coli*	10 µl	8	7	7	6
5	*Pseudomonas aeruginosa*	10 µl	10	10	8	7
6	*Candida albicans*	10 µl	17	15	16	9
7	*Trichophyton mentagrophytes*	10 µl	17	12	13	8
8	*Kontrol negatif*	10 µl	-	-	-	-

Keterangan:
Konsentrasi sampel uji = 1%
Kontrol negatif = DMSO
*Hasil rata-rata pengukuran 2 kali perlakuan

Tabel 2. Hasil pengamatan pengujian aktivitas antimikroba dari hasil kolom fraksi heksan

Zat Uji (fraksi)	Diameter Daerah Hambatan (mm)*		
	Sa	Ca	Tm
A	11,5	16,5	16
B	12,5	24,5	25
C	11,5	25	24,5
D	11	18,5	23,5
E	11	18,5	22,5
F	10	17,5	20
G	6	15,5	17,5
Kontrol -	-	-	-
Kontrol +	24,5	25	25

Keterangan:
Konsentrasi sampel uji = 1 %
Kontrol negatif = DMSO
Kontrol Positif: Bakteri = Tetrasiklin 0,3% (30 µg/cakram)
Jamur = Klorimazol 0,1 % (10 µg/cakram)
Sa = *Staphylococcus aureus*
Ca = *Candida albicans*
Tm = *Trichophyton mentagrophytes*
*Hasil rata-rata pengukuran dua kali perlakuan

Tabel 3. Hasil pengamatan pengujian aktivitas antimikroba dari hasil kolom fraksi B

Zat Uji (fraksi)	Diameter Daerah Hambatan (mm)*		
	Sa	Ca	Tm
Ba	12,5	15,5	17
Bb	11,5	25	24,5
Bc	12	24,5	24,5
Bd	10,5	21,5	20,5
Be	11	15,5	19,5
Bf	8	18,5	19,5
Bg	6	11,5	11,5
Kontrol -	-	-	-
Kontrol +	25	25	25

Keterangan:
Konsentrasi sampel uji = 1 %
Kontrol negatif = DMSO
Kontrol Positif: Bakteri = Tetrasiklin 0,3 % (30 µg/cakram)
Jamur = Klotrimazol 0,1 % (10 µg/cakram)
Sa = *Staphylococcus aureus*
Ca = *Candida albicans*
Tm = *Trichophyton mentagrophytes*
*Hasil rata-rata pengukuran dua kali perlakuan

Tabel 4. Hasil pengamatan pengujian aktivitas antimikroba dari hasil kolom fraksi Bb

Zat Uji (fraksi)	Diameter Daerah Hambatan (mm)*		
	Sa	Ca	Tm
Bb1	15,5	19,5	18,5
Bb2	14,5	24,5	23,5
Bb3	11,5	12,5	15
Bb4	9,5	12,5	10
Bb5	7,5	8	7
Kontrol -	-	-	-
Kontrol +	25	25	25

Keterangan
Konsentrasi sampel uji = 1 %
Kontrol negatif = DMSO
Kontrol Positif: Bakteri = Tetrasiklin 0,5 % (30 µg/cakram)
Jamur = Klotrimazol 0,1 % (10 µg/cakram)
Sa = *Staphylococcus aureus*
Ca = *Candida albicans*
Tm = *Trichophyton mentagrophytes*
*Hasil rata-rata pengukuran dua kali perlakuan

Pemeriksaan pendahuluan terhadap senyawa 1 menggunakan pereaksi Liebermann-Bouchard menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah terpenoid. Lebih lanjut noda senyawa 1 pada plat KLT disemprotkan pereaksi asam sulfat 10 % dalam metanol kemudian dipanaskan menghasilkan warna merah, reaksi ini spesifik untuk senyawa terpenoid (Tabel 5).

Pemeriksaan secara fisikokimia meliputi pemeriksaan spektroskopi *ultraviolet-visible* terhadap senyawa 1 dalam pelarut heksan, menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 226 nm (abs = 0,3636).

Pemeriksaan spektrum IR (Pellet KBr) menunjukkan adanya pita-pita serapan gugus C–H pada bilangan gelombang 2950 cm^{-1}, pada bilangan gelombang 1740 cm^{-1} memperlihatkan regang C=O, ada gugus C–H di panjang gelombang 1440 cm^{-1}, gugus C–H pada 1380 cm^{-1}, dan gugus C–O pada panjang gelombang 1040 cm^{-1} [5].

Tabel 5. Karakterisasi senyawa antimikroba hasil isolasi senyawa 1

No	Karakterisasi		
1	Organoleptis	Bentuk	Amorf
		Warna	Putih
		Bau	Tidak berwarna
2	Pemeriksaan fisika	Kelarutan	Larut dalam heksan, etil asetat, sukar larut dalam methanol
		Jarak leleh	142-144 °C
3	Pemeriksaan Kimia	Liebermann-Bouchard	Merah
		Vanilin-asam sulfat	Merah
4	Pemeriksaan KLT	Eluen	Heksan : diklormetan (3:2)
		Rf	0,63

Tabel 6. Hasil pengujian konsentrasi hambat minimum senyawa 1

Bakteri Uji	Senyawa uji	Konsentrasi Senyawa (ppm)						KHM (ppm)
		100	50	25	12,5	6,25	3,25	
Staphylococcus aureus	1	+	+	+	-	-	-	25
Candida albicans	1	+	+	+	-	-	-	25
Trichophyton mentagrophytes	1	+	+	+	-	-	-	25

Keterangan: + : Aktif antibakteri
- : Tidak aktif antibakteri

KESIMPULAN

Dari fraksi heksan 'soft coral' *Dendronephthya* sp. diperoleh senyawa 1 seberat 30 mg berupa amorf berwarna putih dengan jarak leleh 142-144°C. Senyawa 1 aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6583, jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 5431 dengan KHM masing-masing sebesar 25 ppm. Hasil analisis pemeriksaan fisika, kimia dan spektrum UV-Vis dan IR menunjukkan bahwa senyawa ini termasuk golongan terpenoid.

ISSN: 0853-8018

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek Riset Unggulan Terpadu Internasional (RUTI) II-Menristek RI tahun 2004.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. M. Suffnes, D. J. Newman, and K. Snader, Discovery and Development of Antineoplastic Agent from Natural Sources, *Bioorganic Marine Chemistry*, 3: 132-166 (1989).
2. K. Carte, Brad, Biomedical Potential of Marine Natural Products, *Bioscience*, 46(4): 276-278. (1996).
3. R. A. Edrada, V. Wray, D. Handayani, P. Schupp, M. Balbin-Oliveros, and P. Proksch, Struktur-Activity Relationship of Bioactive Metabolites from Some Indo-Pasific Marine Invertebrates, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman (Ed), Elsevier Science, 21: 251-25 (2000).
4. Marinlit, version September, *"A Marine Literature Database Produced and Maintained"*, by the Departement of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand (2001).
5. A. Balows, *Manual Clinical Microbiology*, 5th Edition, American Society For Microbiology (1980).
6. R. M. Silverstein, C. G. Bassler and C. Moril, *Spectronic Identification of Organic Compounds*, 4th ed., John Wiley and Sons, New York, (1981).