

KARAKTERISASI DAN BIOAKTIF ANTIBAKTERI SENYAWA SPONS *Haliclona* sp. DARI TELUK MANADO

Defny S. Wewengkang¹, Deiske A. Sumilat² dan Henki Rotinsulu³

¹Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unsrat (E-mail: wdefny@yahoo.com);

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unsrat;

³ Universitas Pembangunan Indonesia, Manado.

ABSTRAK

Spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan daya hambat antibakteri ekstrak dan fraksi spons *Haliclona* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan menentukan karakteristik senyawa ekstrak dan fraksi spons *Haliclona* sp yang memiliki daya hambat paling besar. Sampel diekstraksi secara maserasi dan fraksinasi menggunakan pelarut etanol, fraksi heksan, fraksi kloroform dan fraksi metanol. Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar (Kirby and Bauer). Ekstrak atau fraksi terbaik dikarakterisasi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, FTIR dan pereaksi Mayer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar etanol, fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri *Escherichia coli*, ekstrak dan fraksi dikategorikan kuat berdasarkan kriteria Davis dan Stout. Fraksi metanol dengan daya hambat antibakteri paling besar dengan gugus utama N-H, C-H, C-O, C=O diduga mengandung alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri.

Kata kunci. Spons *Haliclona* sp., Aktivitas antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa biota laut memiliki potensi yang sangat besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai bahan baku obat. Sejak tahun 1980-an, perhatian dunia pengobatan mulai terarah ke berbagai macam biota laut sebagai sumber daya yang sangat potensial. Beberapa biota laut yang diketahui dapat menghasilkan senyawa aktif antara lain adalah spons, moluska, bryozoa, tunikata dan lain-lain (Ismet, 2007).

Indonesia merupakan Negara kepulauan terbesar di dunia yang mempunyai panjang pantai 81.000 Km yang kaya akan terumbu karang dan biota laut lainnya. Salah satu biota laut yang banyak diteliti ialah spons. Wilayah laut Indonesia merupakan salah satu pusat penyebaran terbesar spons di dunia dan diperkirakan terdapat sekitar 830 jenis yang hidup tersebar di wilayah ini (Van Soest, 1989).

Spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang presentase keaktifannya lebih besar dibandingkan

dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999). Untuk menjaga kelangsungan hidup dan pertahanan dirinya, spons menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder.

Spons laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40 persen dari biomassa spons. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dengan spons laut menyebabkan organisme ini sebagai invertebrata laut yang memiliki potensi antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya (Kanagasabhapathy *et al.*, 2005).

Komunitas mikroba yang beragam dan berjumlah besar pada spons diduga merupakan sumber dari berbagai senyawa bioaktif tersebut. Isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons, karakterisasi molekuler, dan karakterisasi senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri tersebut merupakan strategi yang dapat digunakan dalam memproduksi berbagai senyawa yang memiliki potensi terapi antibakteri dalam jumlah besar (Proksch *et al.*, 2003).

Penemuan beberapa senyawa bioaktif seperti alkaloid pada spons sendiri sangat berkembang, seperti pada penemuan Edrada *et al.* (1996) yang menemukan empat senyawa bioaktif baru alkaloid tipe manzamine dari spons *Xestospongia ashmorica* yang diperoleh dari Filipina, Alam *et al.* (2005) yang menemukan senyawa bioaktif alkaloid (Manzamine A dan 8-OH Manzamine A) dari spons *Petrosia sp* yang diperoleh dari teluk Bunaken Manado, Regalado *et al.* (2011) yang menemukan alkaloid bromopirrol dari spons *Agelas cerebrum* dari Karibia dan penemuan alkaloid Hainanrektamin A-C dari spons *Hyrtios erecta* yang diperoleh dari Hainan China oleh Wen *et al.* (2014).

Penelitian bertujuan untuk : Menentukan daya hambat antibakteri ekstrak dan fraksi spons *Haliclona sp.* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan menentukan karakteristik senyawa ekstrak atau fraksi spons *Haliclona sp.* yang memiliki daya hambat paling besar.

METODE PENELITIAN

Sampel diperoleh dari perairan pantai Malalayang kota Manado, menggunakan alat bantu (masker, shorkel, fins dan tabung oksigen). Sampel dibersihkan dari pengotor, lalu dipotong kecil-kecil kemudian langsung direndam dengan cara maserasi dengan etanol dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi. Sampel difoto lalu diberi label serta nomor sampel.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

Spons *Haliclona* sp., bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, aquades, etanol, metanol, n-heksan, kloroform, *Nutrient agar*, pepton, ekstrak daging (*beef extract*), natrium klorida, cakram (*paper disc*) ukuran 6 mm, kertas label, tissue dan aluminium foil, merupakan bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini.

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Pembuatan Ekstrak

Ekstrak spons *Haliclona* sp. Sebanyak 40 g dibuat dengan cara maserasi. Sampel yang dipotong kecil-kecil dimasukkan kedalam Erlenmeyer, kemudian direndam dengan larutan etanol sebanyak 120 mL, ditutup dengan aluminium foil selama 1x24 jam. Sampel yang direndam disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 1 dan debris 1. Debris 1 kemudian ditambah dengan larutan etanol sebanyak 120 mL, ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 1x24 jam, sampel tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan debris 2. Debris 2 kemudian ditambah dengan larutan etanol sebanyak 120 mL, ditutup dengan aluminium foil selama 1x24 jam, sampel tersebut di lalu disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 3 dan debris 3. Filtrat 1, 2, dan 3 dicampur menjadi satu kemudian disaring, lalu dievaporasi menggunakan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak kasar etanol sampel sebanyak 0,6 g. Sebelum difraksinasi, diambil sebanyak 0,07 g ekstrak kasar etanol untuk uji aktivitas antibakteri.

Pembuatan Fraksinasi

Lima ratus tiga puluh miligram ekstrak kasar etanol spons *Haliclona* sp. dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian dilarutkan dengan metanol sebanyak 40 mL dan air sebanyak 10 mL lalu ditambahkan pelarut heksan sebanyak 50 mL setelah itu dikocok berulang kali sampai homogen. Dibiarkan sampai terbentuk lapisan MeOH dan heksan. Masing-masing lapisan di tampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan heksan selanjutnya dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga kering, lalu ditimbang dan ini dinamakan fraksi heksan.

Selanjutnya lapisan MeOH ditambahkan dengan air sebanyak 50 mL dipartisi dengan pelarut kloroform sebanyak 100 mL dalam corong pisah, setelah itu dikocok berulang kali hingga homogen. Dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan MeOH dan kloroform. Masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan kloroform dalam wadah selanjutnya dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga kering lalu ditimbang. Ini dinamakan fraksi kloroform. Lapisan MeOH yang ditampung pada wadah yang lain kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga kering lalu ditimbang berat sampel. Ini dinamakan fraksi MeOH. Ketiga fraksi tersebut digunakan dalam pengujian antibakteri. Rendemen-rendemen fraksi dihitung dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat hasil ekstrak}}{\text{Berat ekstrak awal}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Media dan Pengujian Antibakteri

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, pinset dibakar dengan pembakaran diatas api langsung dan media disterilkan diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit (Ortez, 2005).

Pembuatan media cair B1

Pepton 0,5 g, ekstrak daging (*meat extract*) 0,3 g, natrium klorida 0,3 g, dan aquades sebanyak 100 mL diaduk sampai rata kemudian dibuat homogen menggunakan *magnetic stirrer* lalu diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, ukur pH dengan menggunakan kertas pH. Dipipet 1 mL media cair B1, kemudian masukkan dalam tabung reaksi dan tutup dengan aluminium foil. Media cair B1 siap digunakan sebagai media kultur bakteri (Ortez, 2005).

Kultur Bakteri

Media cair B1 yang sudah disiapkan sebelumnya, ditambahkan dengan masing-masing bakteri yang sudah dikultur (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) sebanyak 100 µL ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Tutup dengan aluminium foil tiap tabung reaksi dan dimasukkan kedalam inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37 °C (Ortez, 2005).

Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan pelarut metanol untuk menguji apakah pelarut methanol memberikan pengaruh terhadap aktivitas daya hambat.

Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg. Satu kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya kemudian timbang serbuk dalam kapsul sebanyak 30 mg. Kemudian serbuk dilarutkan dalam metanol 5 mL untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 250 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode difusi agar (disc diffusion Kirby and Bauer). Pada pengujian aktivitas antibakteri ini, cakram (*paper disc*) yang digunakan berukuran 6 mm dengan daya serap 50 μL tiap cakram. Kosentrasi yang digunakan pada pengujian ini hanya satu kosentrasi yaitu 250 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ pada setiap sampel yang terdiri dari ekstrak kasar, fraksi heksan, fraksi kloroform, fraksi MeOH, kontrol positif dan kontrol negatif. Sampel yang telah ditentukan kosentrasinya (250 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$) ditotolkan pada masing-masing cakram dengan menggunakan mikropipet.

Untuk media agar B1 yang sudah diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 40 °C. Tuangkan media agar B1 ke cawan petri, Ambil sebanyak 100 μL bakteri yang telah di kultur dalam tabung reaksi, dipipet dan diinokulasi pada media agar B1 dan tunggu sampai media agar B1 mengeras. Masing-masing cawan petri diberi label dan nomor sampel yang sesuai. Letakkan kertas cakram yang telah ditotolkan sampel uji spons *Haliclona* sp. dengan pinset kedalam cawan petri lalu diinkubasi selama 1x24 jam (Ortez, 2005).

Pengamatan dan Pengukuran

Pengamatan dapat dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi. Daerah pada sekitaran cakram menunjukkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan mistar berskala dengan cara diukur diameter total zona bening cakram. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis dan Stoud (1971).

4. Penentuan Karakteristik senyawa menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, Spektrofotometri *Infra Red*, dan Pereaksi Mayer

Penentuan karakteristik senyawa menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, Spektrofotometri *Infra Red*, ini dibatasi hanya pada senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri paling besar. Ekstrak atau fraksi yang memiliki daya hambat paling besar kemudian dianalisis karakteristik senyawanya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer *Infra Red*, dan pereaksi Mayer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi spons *Haliclona* sp. dimaksudkan untuk memisahkan atau menyari senyawa aktif yang ada dalam bahan. Ekstraksi sendiri dimaksudkan untuk memisahkan dua atau lebih komponen yang diinginkan dengan menambahkan pelarut untuk melarutkan komponen tersebut (Suryanto, 2012). Pemilihan pelarut sendiri sangat penting untuk menentukan komponen yang ingin didapatkan. Suryanto (2012), menyatakan pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain selektivitas, kelarutan dan titik didih.

Untuk pelarut ekstraksi sendiri digunakan etanol, karena mempunyai sifat selektif, dapat bercampur dengan air dengan segala perbandingan, ekonomis, mampu mengekstrak sebagian besar senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia seperti alkaloida, minyak atsiri, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, damar dan klorofil. Sedangkan lemak, malam, tannin dan saponin, hanya sedikit larut (Depkes RI, 1986). Iswanti (2009) menjelaskan bahwa pelarut etanol menyari hampir keseluruhan kandungan simplisia, baik non polar, semi polar maupun non polar.

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi berbeda. Mula-mula simplisia disari berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut. Mula-mula disari dengan pelarut yang non polar, kemudian disari dengan pelarut yang kurang polar dan terakhir dengan pelarut polar (Harborne, 1987).

Tabel 1. Rendemen ekstrak dan fraksi *Haliclona* sp.

No	Sampel	Rendemen %	Warna Sampel
1	EKE	1,5%	Jingga
2	FH	20,7%	Hijau kekuningan
3	FK	35,8%	Jingga pekat
4	FM	43,3%	Kuning pekat

Keterangan :

- EKE : Ekstrak Kasar Etanol
- FH : Fraksi Heksan
- FK : Fraksi Kloroform
- FM : Fraksi MeOH

Pada pengujian antibakteri digunakan 3 fraksi yaitu fraksi heksan, fraksi kloroform, dan fraksi metanol-air (MeOH). Untuk pemilihan pelarut fraksi didasarkan pada bermacam-macam tingkat kepolaran, yaitu pelarut MeOH yang paling polar, pelarut kloroform untuk semi polar dan pelarut heksan untuk fraksi non polar. Penggunaan bermacam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda ini dimaksudkan agar senyawa aktif yang ada pada ekstrak etanol dapat dikelompokkan lagi menjadi lebih spesifik.

Hasil warna filtrat untuk ekstrak kasar etanol yaitu orange pekat dengan berat 0,6 g dengan rendemen 1,5% . Untuk pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kasar etanol diambil 0,07 g dari 0,6 g. Ekstrak kasar etanol 0,53 g kemudian di partisi dengan pelarut heksan dan Metanol-air (MeOH) menghasilkan 2 lapisan yaitu lapisan heksan dan lapisan MeOH. Partisi pelarut heksan menghasilkan filtrat berwarna hijau kecoklatan ekstrak kental yang didapat 0,11 g dan rendemen 20,7%. Lapisan MeOH kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan kloroform dan lapisan MeOH. Partisi pelarut kloroform menghasilkan filtrat berwarna jingga pekat yang didapat 0,19 g dan rendemen 35,8%. Partisi pelarut MeOH menghasilkan filtrat berwarna kuning pekat yang didapat 0,23 g dan rendemen 43,3% .

2. Aktivitas Antibakteri Spons *Haliclona* sp.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak Kasar, Fraksi MeOH, fraksi heksan dan fraksi kloroform Spons *Haliclona* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi agar (difusi Kirby dan Bauer yang dimodifikasi). Metode difusi agar (difusi Kirby-Bauer yang telah dimodifikasi) menjadi pilihan untuk tujuan klinis yang mempertimbangkan kesederhanaan teknik,

ketelitian, metode serbaguna bagi semua bakteri patogen yang tumbuh cepat dan sering digunakan dalam uji kepekaan antibiotik dalam program pengendalian mutu (Mpila, 2012).

Dalam uji aktivitas antibakteri, hasil diperoleh melalui pengamatan yang dilakukan selama 1x24 jam masa inkubasi dengan 3 kali pengulangan untuk masing-masing bakteri. Terbentuknya zona hambatan (daerah bening) disekeliling cakram menunjukkan kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri maupun antibiotik yang digunakan sebagai positif kontrol.

Hasil uji aktivitas antibakteri dan hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Kasar, Fraksi MeOH, fraksi heksan dan fraksi kloroform Spons *Haliclona* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Kasar, Fraksi MeOH, fraksi heksan dan fraksi kloroform Spons *Haliclona* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Ulangan	Diameter Zona Hambat (mm)					
	Ekstrak kasar	Fraksi Heksan	Fraksi kloroform	Fraksi MeOH	Kontrol (+)	Kontrol (-)
A1	8,60	0,00	9,60	19,00	27,00	0,00
A2	9,30	0,00	14,00	15,00	30,30	0,00
A3	12,60	0,00	12,60	19,00	25,66	0,00
Rata-rata	10,16	0,00	12,06	17,66	27,65	0,00

Tabel 3. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Kasar, Fraksi MeOH, fraksi heksan dan fraksi kloroform Spons *Haliclona* sp. terhadap bakteri *Escherichia coli*

Ulangan	Diameter Zona Hambat (mm)					
	Ekstrak kasar	Fraksi Heksan	Fraksi kloroform	Fraksi MeOH	Kontrol (+)	Kontrol (-)
B1	8,00	0,00	10,00	14,60	37,30	0,00
B2	9,60	0,00	13,30	12,60	37,00	0,00
B3	7,60	0,00	11,10	14,00	34,60	0,00
Rata-rata	8,40	0,00	11,46	13,73	36,30	0,00

Menurut Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan antibakteri sebagai berikut : diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10

dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Kriteria inilah yang digunakan dalam penelitian untuk menggolongkan daya hambat kontrol dan bahan uji sampel.

Kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kontrol positif, ekstrak maupun fraksi bahan uji. Kontrol negatif yang digunakan yaitu metanol, menunjukkan tidak adanya zona hambat pada pengujian terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* maupun gram negatif *Escherichia coli*. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut melainkan karena aktivitas senyawa yang ada pada spons *Haliclona sp.*

Kontrol positif menunjukkan perbedaan yang nyata, karena menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap bakteri uji dibanding kontrol negatif, ekstrak ataupun fraksi bahan uji. Untuk pengujian ini, antibiotik yang digunakan yaitu kloramfenikol. Menurut Katzung (2004), kloramfenikol merupakan antibiotik bakteriostatik berspektrum luas. Hasil penelitian menunjukkan diameter zona hambat kloramfenikol yang terbentuk, lebih besar pada bakteri gram negatif *Escherichia coli* (36,30 mm) dibandingkan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* (27,65). Hal ini sesuai dengan pernyataan Katzung (2004) yang menyatakan bahwa pada kebanyakan bakteri gram negatif, kloramfenikol hanya membutuhkan konsentrasi 0,2-5 µg/mL, sedangkan pada kebanyakan bakteri gram positif, bakteri dihambat pada konsentrasi 1-10 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri gram negatif lebih peka terhadap kloramfenikol dibandingkan bakteri gram positif. Kloramfenikol bekerja menghambat sintesis protein pada sel bakteri. Kloramfenikol akan berikatan secara reversibel dengan unit ribosom 50 S, sehingga mencegah ikatan antara asam amino dengan ribosom. Kloramfenikol berikatan secara spesifik dengan aseptor (tempat ikatan awal dari amino asil t-RNA) atau pada bagian peptidil yang merupakan tempat ikatan kritis untuk perpanjangan rantai peptide (Katzung, 2004).

Ekstrak kasar etanol menunjukkan perbedaan terhadap fraksi bahan uji maupun pada bakteri uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona daya hambat yang terbentuk oleh ekstrak kasar pada *Staphylococcus aureus* tergolong kuat yaitu 10,16 mm, sedangkan pada *Escherichia coli* tergolong sedang yaitu 8,40 mm. Ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki daya hambat yang lebih peka pada *Staphylococcus aureus* dibandingkan *Escherichia coli*.

Hasil penelitian untuk fraksi heksan menunjukkan bahwa tidak terbentuk zona bening pada *Staphylococcus aureus* dan pada *Escherichia coli*. Data tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi heksan tidak memiliki senyawa spesifik yang dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan pada *Escherichia coli*.

Untuk fraksi kloroform, hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona daya hambat yang terbentuk pada *Staphylococcus aureus* tergolong kuat yaitu 12,06 mm dan pada *Escherichia coli* juga tergolong kuat yaitu 11,46. Ini menunjukkan fraksi kloroform memiliki daya hambat yang peka pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Fraksi MeOH menunjukkan perbedaan terhadap ekstrak dan fraksi bahan uji maupun pada bakteri uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi MeOH memiliki nilai zona hambat terbesar untuk *Staphylococcus aureus* yaitu 17,66 mm dan tergolong kuat, juga yang terbesar untuk *Escherichia coli* yaitu 13,73 mm dan tergolong kuat. Ini menunjukkan fraksi MeOH memiliki daya hambat yang peka pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Berdasarkan kriteria Davis dan Stout (1971) maka ekstrak kasar, fraksi kloroform dan fraksi MeOH merupakan ekstrak yang efektif untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* karena ekstrak dan fraksi ini memiliki kategori yang kuat untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Umumnya kelompok bakteri gram positif lebih peka terhadap senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba dibanding dengan gram negatif. Perbedaan sensitifitas bakteri gram positif dan bakteri gram negatif dapat disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel yang dimiliki oleh masing-masing bakteri (Lathifah, 2008). Selanjutnya, bakteri *Escherichia coli* fraksi kloroform dan fraksi MeOH adalah yang paling efektif untuk bakteri *Escherichia coli*. Hal ini sesuai dengan penelitian Renhoran (2012) yang menyatakan bahwa gram negatif cenderung bersifat sensitif terhadap antimikroba yang bersifat polar. Sedangkan fraksi heksan adalah satu-satunya fraksi yang tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* ini menunjukkan bahwa fraksi heksan tidak memiliki senyawa yang dapat menghambat bakteri uji.

3. Karakterisasi Senyawa Ekstrak Fraksi Terbaik Spons *Haliclona* sp.

Untuk karakterisasi senyawa, hanya dibatasi pada ekstrak atau fraksi yang memiliki aktivitas paling besar. Hasil uji aktivitas antibakteri sendiri menunjukkan

bahwa fraksi MeOH memiliki daya hambat yang paling besar diantara ekstrak dan fraksi uji lainnya, sehingga penentuan karakteristik senyawa hanya dibatasi pada fraksi MeOH.

Identifikasi Senyawa Ekstrak Fraksi Terbaik Spektrofotometri UV-Vis

Analisis dengan spektrofotometer UV-VIS selain menunjukkan ada atau tidaknya ikatan rangkap terkonjugasi, dapat juga menentukan jenis inti yang terdapat dalam senyawa metabolit sekunder

Tabel 4. Spektrum UV-Vis fraksi metanol spons *Haliclona* sp.

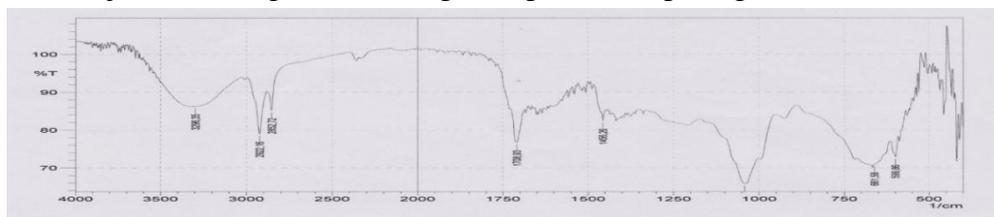
No	P/V	Wavelength	Abs
1	↑	358	0,015
2	↑	270	0,078
3	↑	233,50	0,403

Hasil analisis spektrofotometri menunjukkan bahwa fraksi metanol memberikan serapan pada panjang gelombang 358 nm, 270 nm dan 233,50 nm yang mengindikasikan senyawa tersebut termasuk dalam golongan alkaloid indol.

Identifikasi Senyawa Ekstrak Fraksi Terbaik FTIR

Pancaran Infra Merah pada umumnya mengacu pada bagian spektrum elektromagnetik yang terletak diantara daerah tertentu. Spektrum infra merah merupakan kekhasan sebuah molekul secara menyeluruh, gugus-gugus atom tertentu memberikan pita-pita pada serapan tertentu. Letak pita-pita di dalam spektrum infra merah ditampilkan sebagai bilangan gelombang atau panjang gelombang.

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, fraksi MeOH menunjukkan nilai zona hambat yang paling besar baik untuk *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli*, sehingga untuk mengetahui gugus senyawa pada fraksi MeOH dilakukan uji FTIR, dengan hasil serapan dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Spektrum IR fraksi MeOH spons *Haliclona* sp.

Tabel 5. Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa dalam Fraksi MeOH *Haliclona* sp.

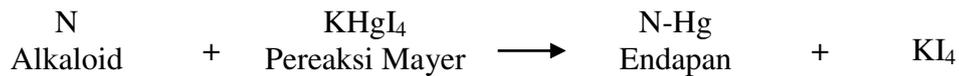
Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Literatur frekuensi (cm ⁻¹)	Gugus	Jenis Senyawa
3296 cm ⁻¹	3300-3500 cm ⁻¹	N-H	Amina, Amida
2922 cm ⁻¹	2850-2970 cm ⁻¹	C-H	Alkana
2852 cm ⁻¹	2850-2970 cm ⁻¹	C-H	Alkana
1708 cm ⁻¹	1690-1760 cm ⁻¹	C=O	Aldehid, Keton, Asam Karboksilat
1456 cm ⁻¹	1340-1470 cm ⁻¹	C-H	Alkana
1100 cm ⁻¹	1050-1300 cm ⁻¹	C-O	Eter
661 cm ⁻¹	(Settle, 1997)	C-H	Alkena
599 cm ⁻¹	(Settle, 1997)	C-H	Alkena

Berdasarkan Tabel 5, data spektro inframerah senyawa fraksi metanol-air mengandung gugus N-H dengan intensitas sedang pada serapan bilangan gelombang 3296 cm⁻¹, terdapat gugus C-H dengan intensitas kuat serapan bilangan gelombang 2922 cm⁻¹ dan didukung dengan pita serapan 2852 cm⁻¹, terdapat gugus C=O dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang 1708 cm⁻¹, terdapat gugus C-H dengan intensitas sedang pada serapan bilangan gelombang 1456 cm⁻¹, adanya gugus C-O dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang 1100 cm⁻¹, gugus C-H dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang 661 cm⁻¹ didukung pita serapan 599 cm⁻¹. Diduga fraksi metanol-air mengandung gugus utama N-H, C-H, C-O, C=O data ini sesuai dengan tabel identifikasi menurut Skoog *et al.* (1998).

Uji Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Mayer

Untuk memastikan ada atau tidaknya senyawa alkaloid, pada sampel uji, dilakukan uji dengan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan pada uji Mayer membuktikan adanya alkaloid pada fraksi MeOH.

Hasil penelitian menunjukkan terbentuknya endapan berwarna merah pekat pada fraksi metanol yang mengindikasikan sampel positif alkaloid. Ini disebabkan karena Hg pada pereaksi Mayer akan berikatan dengan gugus N-H pada alkaloid fraksi MeOH spons *Haliclona* sp. membentuk kompleks Hg-alkaloid yang mengendap. Dari hasil yang didapatkan dapat, diduga senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri paling besar mengandung senyawa alkaloid.



Gambar 2. Uji Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Mayer.

Berdasarkan uji karakterisasi senyawa dengan Spetrofotometer *Infra Red*. Spektrofotometer UV-Vis dan pereaksi Mayer, diduga fraksi metanol yang memiliki aktivitas antibakteri paling besar mengandung alkaloid. Ini kemungkinan disebabkan gugus amina pada alkaloid yang bermuatan positif pada fraksi metanol akan berikatan dengan asam teikoat yang memiliki gugus hidroksida yang relatif bermuatan negatif sehingga menyebabkan peptidoglikan pada dinding sel bakteri tertarik (Yusman, 2006). Hal inilah yang menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel bakteri, sehingga terjadi ketidakseimbangan tekanan internal sel dan menyebabkan kebocoran elektrolit intraseluler, seperti kalium dan protein dengan berat molekul rendah lainnya seperti asam nukleat dan glukosa. Inilah yang membuat metabolisme bakteri terhambat sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat (Herliana, 2010).

KESIMPULAN

Ekstrak kasar, fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* sedangkan fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri *Escherichia coli* dan dikategorikan kuat berdasarkan kriteria Davis dan Stoud. Karakteristik senyawa yang terlihat pada fraksi Metanol yang merupakan fraksi dengan aktivitas antibakteri paling besar mengandung gugus utama N-H, C-H, C-O, C=O dan diduga mengandung senyawa alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum maupun konsentrasi bunuh minimum pada fraksi metanol. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa apa yang efektif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* yang ada pada fraksi metanol.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G., Astuti, P., Sari, D., Wahyuono, S., Hamman, M.T. 2005. Structure Elucidation of Bioactive Alkaloid Compounds Isolated From Sponge *Petrosia* sp. Collected From Bunaken Bay Manado. *Indo. J. Chem.* 5 (2), 177 – 181.

- Davis, W.W., Stout, T.R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Assay. *Journal of microbiology*. 22(4):659-665.
- Depkes RI. 1986. Sediaan Galenik. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Edrada, R.A., Proskch, P., Wray, V., Witte, L., Muller, W.E.G., Van Soest, R.M.W. 1996. Four New Bioactive Manzamine-Type Alkaloids from the Philippine Marine Sponge *Xestospongia ashmorica*. *Journal of Natural Products*. 59,1056-1060.
- Harborne, J. B. 1987. Metode fitokimia. Edisi ke-dua. ITB, Bandung.
- Herliana, P. 2010. Potensi Khitosan sebagai Antibakteri penyebab Periodontitis. *Jurnal UI Untuk Kesehatan, Sains dan Teknologi*. 1: 13-24.
- Ismet, M.S. 2007. Penapisan Senyawa Bioaktif Spons Spons Aaptops dan Petrosia sp. dari lokasi yang berbeda. [Skripsi] Bandung : Pasca sarjana ITB.
- Iswanti, D.A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat, Dan Fraksi Etanol 96% Daun Ekor Kucing (*Acalypha Hispida* Burm. F) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* atcc 25923 Secara Dilusi. [Skripsi] Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
- Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagatan, K., and Nagata, S. 2005. Inhibitory Activities Of Surface Associated Bacteria From The Marine Pseudocratina *Purpurea*. *Microbes and Environment*. 20: 178-185.
- Katzung, B.G. 2004. Farmakologi Dasar dan Klinik Buku 3 Edisi 8. Penerjemah dan editor: Bagian Farmakologi FK UNAIR. Penerbit Salemba Medika, Surabaya.
- Lathifah, Q. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dengan Variasi Pelarut. [Skripsi] Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
- Mpila, D.A. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus benth*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara invitro. [Skripsi] Program Studi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi Manado.
- Muniarsih T., Rachmaniar R. 1999. Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba Dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. Prosidings Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: *Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia*, Jakarta.
- Ortez, J.H. 2005. Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility testing. Marie B. Coyle (Coord. Ed). *American society for Microbiology*.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Schuup, P., Lin, W.H., Sudarsono, Wray, V., Steube, K. 2003. Detection of Pharmacologically Active Natural Products using Ecology selected Example from Indopacific. Marine Invertebrates and Sponge-derived Fungi. *Pure and Appl Chem*.
- Regalado, E.L., Laguna, A., Mendiola, J., Thomas, O.P., Nogueiras, C. 2011. Bromopyrrole Alkaloids from The Caribbean Sponge *Agelas cerebrum*. *Quim. Nova*. Vol. 34, No. 2, 289-291, 201.
- Renhoran, W. 2012. Aktivitas Antoksidan dan Mikrobiologi Ekstrak *Sargassum polycystum*. [Skripsi] Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Skoog, D.A., Holler, F. J., Nieman, T.J. 1998. Principles of International Analysis. 5th Edition. *Saunders College Publishing*. Philadelphia.

- Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Penerbit Putra Media Nusantara, Surabaya.
- Van Soest, R.W.M. 1989. The Indonesian Sponges Fauna : A Status Report. *Ne&J. Sea Res* 23: 223-30
- Wen, F.H., Duo, Q.X., Li, G.Y., Jing, Y.L., Jia, L., Yue, W.G. 2014. Hainan erectamines A–C, Alkaloids from the Hainan Sponge *Hyrtios erecta*. *Mar. Drugs*. 12, 3982-3993.
- Yusman, D.A. 2006. Hubungan Antara Aktivitas Bakteri Kitosan dan Ciri Permukaan Dinding Sel Bakteri. [Skripsi] *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor*.