

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*

Roihanah S., Sukoso, Andayani S.

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Bakteri adalah salah satu penyebab penyakit pada makhluk hidup yang mematikan. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan Teripang (*Holothuria* sp.) yang memiliki kandungan bioaktif sebagai bahan antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang terhadap *Vibrio harveyi*, mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang dan mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam Teripang. Hasil uji cakram menunjukkan rerata zona hambat sebesar 8.502 mm sedangkan hasil uji MIC dan MBC menunjukkan bahwa pada dosis 0,55 mg.ml⁻¹ mampu menghambat (Bakteriostatik) dan dosis 0,60 mg.ml⁻¹ mampu membunuh (bakterisidal). Ekstrak kasar Teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *Vibrio harveyi* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri. Hasil analisis Spektrofometri Infra Merah dari ekstrak teripang dan Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Kata kunci: Aktivitas Antibakteri, Teripang, *Vibrio harveyi*

Abstract

*Bacteria are one potential deadly cause of disease in organism. One alternative to overcome these problems is to use sea cucumbers (*Holothuria* sp.) which contain bioactive as antibacteria. Aim of this study was to determine the antibacterial activity of sea cucumber's extracts against *Vibrio harveyi*, studying the character and bacterial structure which is inhibited by the bioactive extract of sea cucumbers and assess the bioactive components contained in the sea cucumber. The test results show mean zone of inhibition discs of 8,502 mm while the MIC and MBC test results show doses of 0,55 mg.ml⁻¹ is inhibit (bacteriostatic) and 0,60 mg.ml⁻¹ dose capable of killing (bactericidal). Crude extract of sea cucumbers effect on the character and structure of the bacterium *V. harveyi* – by destroying the cell walls and cell membranes of bacteria. Results of analysis of sea cucumbers' extract Spektrofometry on Infra Red and Ultra Violet with *n*-hexane uptake solvent is assumed to contain Triterpenoid compounds.*

Key words: Antibacterial Activity, Sea Cucumber, *Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Sumber daya alami lautan merupakan sumber daya yang belum dikembangkan secara maksimal, padahal berbagai bahan bioaktif yang terkandung dalam biota perairan laut seperti protein, omega-3, vitamin dan hormon sangat bermanfaat bagi kesehatan, terutama sangat berpotensi bagi penyediaan bahan baku untuk industri farmasi dan kosmetik [1]. Salah satu biota laut Indonesia yang berpotensi sebagai sumber daya alam penyedia bahan baku untuk industri farmasi adalah Teripang (*Holothuria* sp.).

Teripang digunakan sebagai sumber obat tradisional. Menurut kepercayaan masyarakat pesisir, cairan selom Teripang digunakan ketika

nelayan terluka agar lukanya cepat sembuh di daerah Langkawi. Obat ini disebut "*gamat*" yang berasal dari beberapa jenis mentimun laut yang digunakan, terutama *Holothuria scabra*, *Stichopus hermannii* dan *Stichopus horrens*.

Teripang mengandung bahan aktif antibakteri, antifungi (antijamur), antitumor dan antikoagulan (antipenggumpal) [2]. Penelitian Zancan dan Mourao [3] telah menunjukkan bahwa selain penyembuhan luka, ekstrak Teripang mengandung senyawa antikoagulan dan antithrombosis. Teripang juga mengandung senyawa yang dapat mereduksi kolesterol dan lipid, antikanker dan senyawa antitumor [4], serta senyawa antibakteri [5]. Seorang peneliti Rusia menunjukkan bahwa cucumarioside berasal dari spesies *Cucumaria japonica* memiliki sifat imunomodulator yang kuat, menunjukkan efektivitas yang tinggi terhadap *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis* BT-2, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*

* Alamat korespondensi: S. Roihanah

Email : Roihanah@ub.ac.id

Alamat : Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik
Universitas Brawijaya

dan *Pertusis meningoencephalitis* [6]. Menurut Han et al. [7] senyawa yang biasa terkandung dalam Teripang adalah *Triterpeneglycoside*. Senyawa *triterpeneglycoside* yang terdapat dalam Teripang ternyata bermanfaat sebagai anti tumor, anti jamur, anti bakteri dan anti virus.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang (*Holothuria* sp.) terhadap *Vibrio harveyi*
2. Mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang (*Holothuria* sp.)
3. Mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam Teripang

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah Teripang (*Holothuria* sp.) yang diperoleh dari perairan Socah, Kabupaten Bangkalan, Jawa Timur. Biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman) dengan lima pelarut yang berbeda dari yang bersifat polar hingga non polar, yaitu air, methanol, etanol, kloroform dan heksan. Ekstraksi dilakukan dengan merendam masing-masing 500 gr Teripang segar dengan 500 ml pelarut, selama 3 kali 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan pemekatan untuk tahap ekstraksi yang terakhir, yaitu dengan pelarut etanol dan methanol yang dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* vakum. Pelarut non polar heksana dan kloroform dipekatkan dengan cara ditiup dengan gas N_2 , sedangkan ekstrak air dipekatkan dengan cara stirer, karena air jika menggunakan *rotary evaporator* tidak dapat menguap.

Uji Cakram (Metode difusi)

Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Lempeng *Trypton Soya Agar* (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji. Kapas lidi (*cotton*

swab) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD: $0,1 \text{ CFU.ml}^{-1}$, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 90° dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.

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. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu tumbuh optimal dari bakteri patogen yang sedang diujikan. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih di permukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacterial Concentration* (MBC)

Tabung reaksi steril disiapkan sebanyak 24 buah dan telah diberi label konsentrasi. Dibuat konsentrasi bahan uji sesuai dengan tabel preparasi, masing-masing 1 ml. Dimasukkan 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU.ml^{-1} ke dalam masing-masing tabung reaksi dan vortex hingga homogen. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam, diamati dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung.

Selain itu dicatat nilai MIC yang merupakan konsentrasi terendah dari tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Untuk mengetahui nilai MBC, dilakukan *streak* pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MBC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut.

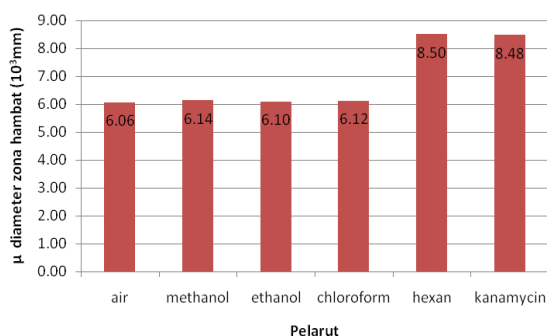
Pengamatan dengan Mikroskop Elektron (SEM)

Sebelum pengamatan mikroskopis SEM dilakukan pewarnaan gram. Sediaan dibuat di atas *cover glass* dan dikeringkan pada suhu kamar, jika

sudah kering difiksasi dengan cara dipanaskan diatas nyala api 3-4 kali lalu dibiarkan dingin. Setelah dingin diletakan di atas rak pewarnaan. Dituangkan larutan kristal violet di atas sediaan, diamkan selama 1 menit. Sediaan dibilas dengan air, kemudian dituangi larutan Lugol dan didiamkan 1 menit dan dibilas dengan air. Sediaan dilunturkan dengan Alkohol 96% hingga warna violet memudar dan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi larutan safranin, didiamkan 30 detik, dibilas dengan air, dikering anginkan. Setelah sediaan kering dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop SEM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter zona hambat dari ekstrak teripang dengan pelarut air dengan rerata sebesar 6.062 mm, methanol 6.142 mm, etanol 6.096 mm, cloroform 6.122 mm dan n-heksan 8.502 mm (Gambar 1). Pelarut n-heksan adalah yang paling efektif menghambat bakteri. Hal ini disebabkan bioaktif yang terdapat pada teripang berfungsi sebagai bahan antibakteri dan tidak bisa terlarut pada pelarut yang bersifat polar. Menurut Kimball [8], senyawa antibakteri (Triterpenoid) larut dalam pelarut non polar. Martoyo [9] juga menyatakan bahwa Teripang dari Famili Holothuriidae genus *Holothuria*, *Actinopyga* dan *Stichopus* banyak mengandung zat-zat ekstraktif seperti senyawa Terpenoid, yang hasil hidrolisisnya mudah larut dalam pelarut organik (seperti Cloroform, eter dan n-heksan) dan tidak larut dalam air [10].



Gambar 1. Diameter daerah hambat ekstrak Teripang terhadap *Vibrio harveyi*

Zona jernih pada lapisan agar yang terbentuk karena senyawa antibakteri berdifusi ke dalam lapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan lapisan agar yang ditumbuhi mikroorganisme akan tampak keruh [11]. Kanamycin sebagai antibakteri kontrol dapat menghambat seluruh bakteri uji. Kanamycin dengan konsentrasi 0,2 mg.ml⁻¹ dengan daya

penghambatan rata-rata 8,482 mm (Gambar 1). Ekstrak Teripang menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi daripada Kanamycin. Hal ini dikarenakan *Vibrio harveyi* merupakan bakteri Gram Negatif yang memiliki *Bacteriocins-Like Inhibitor Substances* (BLIS), yaitu "harveyicin SY" dengan berat molekul 24 kDa yang berfungsi menghalangi substansi asing dari organisme lain dalam satu strain, antar spesies atau dari lingkungan masuk ke sel [12].

Uji MIC dan MBC

Pengujian MIC terhadap bakteri *Vibrio harveyi* pada konsentrasi 0,55 mg.ml⁻¹ sudah terlihat sedikit jernih, yang menandakan bahwa pertumbuhan bakteri dapat dihambat oleh ekstrak Teripang (bakteriostatik) dengan total bakteri sebesar 8,7.10¹ CFU.plate⁻¹ dan pada konsentrasi 0,60 mg.ml⁻¹ baru dapat terlihat jernih, menandakan bahwa pertumbuhan bakteri telah dapat dihentikan oleh ekstrak Teripang (bakterisidal). Menurut Pelczar dan Chan [13], antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisida bergantung dari konsentrasinya. Ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak mampu membunuh bakteri dan bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Edberg [14] menjelaskan bahwa senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) dan atau mati (bakteriosidal). Selain itu senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

Golongan bakteriostatik bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri melalui proses difusi pasif melalui kanal hidrofilik dan sistem transportasi aktif. Setelah antibakteri masuk ke dalam ribosom, maka akan berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino, sehingga bakteri tidak dapat berkembang biak [8].

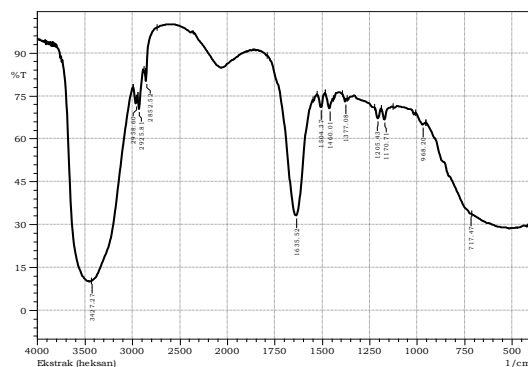
Karakter dan Struktur Bakteri yang Terhambat

Hasil penelitian ekstrak dari pelarut n-heksan diduga mengandung senyawa Triterpenoid. Efek penghambatan yang terjadi pada koloni bakteri *Vibrio harveyi* disebabkan oleh kandungan senyawa aktif Teripang, yang salah satunya adalah

Triterpenoid. Secara umum golongan Triterpenoid mampu merusak membran sel, mengnon-aktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan akibat penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan ion-ion organik yang penting masuk ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga mematikan sel.

Hasil Pengujian Spektrofotometri Inframerah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak Teripang (*Holothuria* sp.) dengan menggunakan alat FT-IR = 8400 S Shimadzu dapat terdeteksi sebanyak 12 peak dan hasil identifikasinya dapat dilihat pada Gambar 2 berikut :



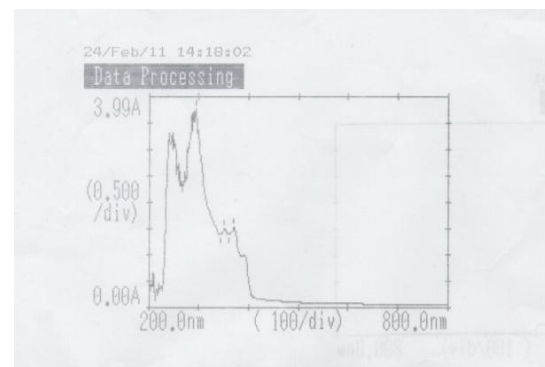
Gambar 2. Spektrofotometri Inframerah dari ekstrak n-heksan

Berdasarkan data yang muncul pada Gambar 2 menunjukkan adanya serapan pada daerah bilangan gelombang (cm^{-1}) 2958,60; 2925,81; 2852,52 yang diduga serapan dari gugus CH_2 . Pita serapan yang tajam pada daerah gelombang (cm^{-1}) 1635,52 dengan intensitas kuat mengidentifikasi gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) yang pita serapannya diperkuat oleh pita serapan pada bilangan gelombang (cm^{-1}) 1205,43 ; 1170,71. Pita serapan pada bilangan gelombang 1377,08 cm^{-1} menunjukkan serapan oleh gugus CH_3 . Pita serapan pada daerah gelombang 3427,27 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus Karboksilat. Pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah gelombang 1635 cm^{-1} dengan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$.

Hasil Pengujian Spektrofotometri Ultra Violet

Hasil analisis ekstrak teripang dengan pelarut *n*-heksan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan tiga puncak serapan. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak *n*-heksan ditunjukkan pada Gambar 3. Munculnya

serapan maksimum pada panjang gelombang 241,0 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi - \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya suatu kromofor $\text{C}=\text{O}$. Hal ini didukung dari hasil analisis spektrofotometri inframerah yang menunjukkan isolat mempunyai gugus pada panjang gelombang 1635,52 nm. Serapan Ultra Violet yang landai pada panjang gelombang 352 nm dan 371 nm kemungkinan diakibatkan oleh terjadinya transisi elektron dari $n - \pi^*$ dari ikatan rangkap $\text{C}=\text{O}$ [15]. Pengujian dengan Spektrofotometri Ultra Violet menunjukkan ekstrak *n*-heksan mengandung senyawa Triterpenoid.



Gambar 3. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak n-heksan

Kesimpulan

1. Ekstrak kasar Teripang (*Holothuria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio harveyi*
2. Ekstrak kasar teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *Vibrio harveyi* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri
3. Hasil analisis Spektrofotometri Infra Merah dan Spektrofotometri Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan dari ekstrak Teripang diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut secara *In-Vivo* dan melakukan purifikasi pada ekstrak kasar teripang.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rosmiati dan Suryati, 2001. Isolasi identifikasi dan pengaruh senyawa bioaktif spons *Callyspongia pseudoreticulata* terhadap bakteri patogen dari udang. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 6 (1).
- [2] Farrouk Abd Hamid Ghous and B.H. Ridzwan. 2007. New species isolated from Malaysian

- Sea Cucumber with optimized secreted antibacterial activity, *American J. of Biochem. and Biotech.*, 3(2): 60-65.
- [3] Zancan, P. and P.A. Mourao, 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 15: 45-54.
- [4] Hatakeyama, T., N. Matsuo, K. Shiba, S. Nishinohara, N. Yamasaki, H. Sugawara and H. Aoyagi. 2002. Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 157-163.
- [5] Afiyatullo, S. S., A. I. Kalinovsky, T. A. Kuznetsova, V. V. Isakov, M. V. Pivkin, P. S. Dmitrenok and G. B. Elyakov, 2002. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. *J Nat. Prod.*, 65: 641-4.
- [6] Sedov, A. M., I. B. Shepeleva, N. S. Zakharova, O. G. Sakandelidze and V. V. Sergeev. 1984. Effect of Cucumarioside (a triterpene glycoside from the Holothurian *Cucumaria japonica*) on the development of an immune response in mice to corpuscular pertussis vaccine. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 9: 100-104.
- [7] Han Hua, Yi Yang-hua, Li Ling, Liu Bao-shu, La Ming-ping, Zhang Hong-wei. 2009. Antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (6): 620-624.
- [8] Kimball, John W.. 2008. Bacteria, Kimball's Biology Pages. Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) and The Saylor Foundation. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Eubacteria.html>.
- [9] Martoyo, J., N. Aji, dan T. Winanto, 2006, Budidaya Teripang, Cet. 6, edisi revisi, Penebar Swadaya, Jakarta.
- [10] Trease, G. E., W. C. Evans. 1983. Drugs of Biological Origin. In: Pharmacognosy 12th Ed. United Kingdom: Balliere Tindall, 309-540.
- [11] Zweig, G. and J.R. Whitaker, 1971. Paper Chromatography and Electrophoresis. Academic Press. London, 397-400.
- [12] Prasad, S., P. C. Morris, R. Hansen, P. G. Meaden and B. Austin. 2005. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology*, 151 (9): 3051-3058.
- [13] Pelczar, M. J dan E.C.S. dan Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2. Alih Bahasa R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 88 hal.
- [14] Edberg, S. C. 1983. Tes kerentanan antimikroba. Dalam Antibiotika dan Infeksi. Alih bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hal.
- [15] Sastrohamidjojo, H. 1985, Spektroskopi, Liberty, Yogyakarta.