



**Uji Fitokimia dan Aktifitas Anti Bakteri Ekstrak Media Supernatan Bakteri Simbion
*Vibrio sp. Gastropoda Oliva vidua Terhadap Bakteri Multi Drug Resistant***

Adityo Harmawan, Ali Ridho, Delianis Pringgenies^{*)}

*Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698*

email: pringgenies@yahoo.com

Abstrak

Perkembangan resistensi antibiotik telah menjadi masalah penting dalam dunia kedokteran. Banyak jenis bakteri patogen terhadap manusia dilaporkan telah menjadi resisten terhadap satu atau lebih jenis antibiotik. Terdorong oleh permasalahan tersebut maka dilakukanlah pencarian sumber alternatif baru penghasil senyawa antibiotik. Salah satunya yang potensial adalah bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik bakteri simbion pada gastropoda *Oliva vidua* (isolat bakteri TOV 12.16), bioaktivitas ekstrak kasar bakteri TOV 12.16 terhadap bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) dan mengetahui kelompok senyawa darii ekstrak kasar bakteri TOV 12.16 yang berpotensi sebagai antibakteri MDR. Materi utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri TOV 12.16 yang di isolasi dari gastropoda (*Oliva vidua*) dari Perairan Ternate (Maluku Utara), sedangkan bakteri uji MDR adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP. Karakterisasi bakteri simbion TOV 12.16 menggunakan uji biokimia. Untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif memakai skrining fitokimia dan GC/MS. Hasil penelitian menunjukkan bakteri simbion *Oliva vidua* adalah *Vibrio ordalii*. Ekstrak kasar etil asetat dari bakteri simbion *Oliva vidua* menunjukkan aktivitas anti bakteri MDR terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil uji skrining fitokimia menunjukkan ekstrak kasar etil asetat mengandung 2 kelompok senyawa yaitu flavonoid dan triterpenoid, sedang pada analisis pada GC/MS diketahui mengandung asam isobutirad dan asam 2-metilbutanoad.

Kata Kunci : Bakteri simbion *Oliva vidua*, Antibakteri, Multi Drug Resistant

Abstract

The development of antibiotic resistance has become an important issue in medicine. Many types of bacteria are pathogenic to humans were reported to have become resistant to one or more types of antibiotics. It is pushing for a new search for alternative sources of antibiotic-producing compounds. One source of potential alternatives to be developed as a source of new antibiotic compounds are symbiotic bacterium with gastropods. The purpose of this study was to determine the characteristics of bacterial symbionts in gastropods (TOV 12.16 bacterial isolates), the bioactivity of crude bacterial extracts against bacterial MDR and find a group of compounds from TOV 12.16 crude bacterial extracts which most potentially. The main materials used in this study were samples of bacterial isolates TOV 12.16 in isolation from the gastropods (*Oliva vidua*) from Aquatic Ternate (North Maluku). While the bacterium MDR test are *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* obtained from the Laboratory of Microbiology Faculty of Medicine UNDIP. Biochemical tests used to determine the characteristics of bacterial isolates TOV 12.16. Meanwhile, to identify the bioactive compounds using phytochemicals screening and GC/MS. Bacterial symbionts *Oliva vidua* Gastropoda is *Vibrio ordalii*. Ethyl acetate crude extract of bacterial symbionts *Oliva vidua* Gastropoda species showed antibacterial activity of the most active against MDR bacteria test. Phytochemical screening test results showed the ethyl acetate crude extract showed two groups of compounds which contain flavonoids and triterpenoid compound that has both the antibacterial activity. Being on the analysis of the GC/MS are known isobutyric acid and 2-metilbutanoic acid.

Key words: Screening, Bacterial symbionts, Antibacterial, Multi Drug Resistant

^{*)} Penulis penanggung jawab

Pendahuluan

Latar Belakang

Antibiotik adalah substansi kimia yang diproduksi oleh berbagai spesies mikroorganisme yang mampu menekan dan mematikan mikroorganisme lain (Suwandi, 1992). Penggunaan antibiotik yang tidak bijak menyebabkan timbulnya resistensi bakteri patogen, sehingga pencarian sumber antibiotik baru yang lebih efektif dalam mengatasi bakteri patogen yang telah resisten terhadap antibiotik harus dilakukan untuk mengatasi bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR). Menurut Suwandi (1993), untuk melawan bakteri patogen yang sudah bersifat resisten diperlukan antibiotik baru yang efektif.

Hingga kini telah dilakukan berbagai eksplorasi dalam pencarian senyawa bioaktif yang berasal dari darat dan laut sebagai alternatif antibiotik baru. Menurut Murniasih (2005) pengembangan obat baru yang berasal dari biota laut, saat ini menjadi perhatian para peneliti dikarenakan tingginya keanekaragaman hayati laut serta keunikan struktur metabolit sekunder yang dihasilkannya. Senyawa bioaktif yang berasal dari laut dapat menjadi alternatif dalam pengembangan obat antibakteri yang baru.

Senyawa bahan hayati laut sebagian besar terakumulasi pada kelompok invertebrata laut seperti sponge, tunikata, bryozoa, karang lunak dan moluska (Proksch *et al.*, 2002). Gastropoda adalah salah satu jenis moluska yang diketahui berpotensi sebagai penghasil senyawa antibakteri MDR. Menurut Cimino dan Gavagnin (2006), gastropoda merupakan salah satu jenis biota laut yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri karena dapat menghasilkan metabolit sekunder. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh gastropoda beberapa diantaranya diteliti aktivitasnya bukan hanya sebagai antibakteri, bahkan sebagai kandidat dari sumber obat-obatan baru. Sebagai contoh ialah *Dolastatin 10* dari kelinci laut jenis *Dolabella auricularia* yang mempunyai keaktifan sebagai antimitosis, dan saat ini

sedang dalam uji klinis tahap I sebagai obat kanker hati, kanker payudara, tumor dan leukemia (Murniasih, 2005).

Gastropoda mengembangkan sistem pertahanan diri dengan memproduksi senyawa kimia (*chemical defense*). Pemanfaatan Gastropoda secara langsung sebagai sumber senyawa bioaktif akan berpengaruh terhadap kelestarian dan kerusakan lingkungan. Oleh karena itu dikembangkan eksplorasi senyawa bioaktif dari bakteri simbiotiknya. Bakteri simbiotik cenderung menghasilkan metabolit sekunder yang hampir sama bahkan sama persis dengan inangnya. Menurut Kelecom (2001), gastropoda diketahui berasosiasi dengan *Bacillus* sp. yang menghasilkan metabolit sekunder *despsipeptide* dan juga berasosiasi dengan *Streptomyces* sp. dengan menghasilkan senyawa *macrolactam*.

Perumusan Masalah

Pada penelitian sebelumnya oleh Pringgenies (2009), telah dilakukan uji aktifitas anti bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) dari bakteri simbiotik gastropoda *Oliva vidua* terhadap bakteri MDR. Hasilnya diketahui bahwa 17 isolat bakteri memiliki kemampuan menghambat beberapa jenis bakteri MDR yakni *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Coagulata* *Negatif* *Staphylococcus*, *Enterobacteria Strain 5*, *Enterobacteria Strain 10* (Pringgenies, 2009). Berdasarkan besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan (uji kualitatif) dan jumlah jenis bakteri uji yang dapat dihambat (uji kuantitatif), isolat TOV 12.16 mempunyai kemampuan daya hambat yang paling kuat terhadap pertumbuhan beberapa bakteri. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan bahwa isolat bakteri tersebut mempunyai senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibakteri MDR. Menurut hasil *sequencing* dengan PCR diketahui bahwa isolat bakteri TOV 12.16 memiliki homologi sebesar 96 % yang memiliki kekerabatan dekat dengan *Vibrio* sp. (Pringgenies, 2009). Namun penelitian tersebut belum mengetahui tentang senyawa apa yang berpotensi sebagai

antibakteri. Oleh karena itu perlu dilakukan uji fitokimia dan GC/MS untuk mengetahui kelompok senyawa yang terkandung.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui karakteristik isolat TOV 12.16 bakteri simbion gastropoda *Oliva vidua* melalui uji biokimia,
2. Mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam supernatan ekstrak isolat TOV 12.16 bakteri simbion gastropoda *Oliva vidua* melalui uji fitokimia,
3. Mengetahui senyawa yang terdapat dalam supernatan ekstrak isolat TOV 12.16 bakteri simbion gastropoda *Oliva vidua* menggunakan GC/MS.

Materi dan Metode

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel isolat bakteri *Vibrio* sp. yang di isolasi dari gastropoda *Oliva vidua* dari Perairan Ternate (Maluku Utara), sedangkan sebagai bakteri uji adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* strain *Multi Drug Resistant* (10) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen laboratoris. Yaitu metode yang menggunakan suatu penyelidikan berencana dalam lingkup laboratorium yang bertujuan untuk memperoleh atau memperluas fakta yang sudah ada sebelumnya (Arikunto, 2002).

Penelitian yang dilakukan meliputi persiapan isolat dan media uji, uji pendahuluan, peremajaan dan pembanyakan bakteri, karakterisasi bakteri, ekstraksi media super natan bakteri isolat, uji antibakteri ekstrak super natan bakteri isolat, uji fitokimia dan GC/MS.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Bakteri

Bakteri hasil isolasi dari gastropoda *Oliva vidua* dapat tumbuh dalam media TCBS setelah 48 jam. Uji Biokimia dilakukan untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri, uji ini dilakukan dengan 19 (sembilan belas) perlakuan. Hasil uji biokimia dan uji morfologi ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik bakteri simbion gastropoda *Oliva vidua*

No.	Nama Uji	Hasil	Keterangan
1.	Pewarnaan Gram	+	Gram Negatif
2.	Bentuk Bakteri	+	Batang
3.	Media TCBS	+	-
4.	Motilitas	+	-
5.	Aerobik	+	-
6.	Anaerobik	+(^F)	Fakultatif anaerobik
7.	Oksidase	+	-
8.	Katalase	+	-
9.	Hugh leifson (O/F)	NR	-
10.	Penggunaan Gula	K/K	Gula terfermentasi
11.	ONPG	+	-
12.	Vp	+	-
13.	50 ⁰ C	+	-
14.	10% NaCl	+	-

Keterangan:

- + : reaksi positif
- NR : tidak ada reaksi
- K/K : glukosa dan laktosa (kuning) atau sukrosa terfermentasi(kuning)

Untuk uji indol, uji reduksi nitrat, uji citrat, uji urea, uji starch, dan uji casein dinyatakan negatif (-). Berdasarkan hasil pengamatan

morfologi bentuk dan pewarnaan gram diketahui bentuknya batang panjang dan gram negatif. Karakteristik spesies isolat TOV 12.16 bakteri simbiosis gastropoda *Oliva vidua* menyerupai *Vibrio ordalii*.

Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan menunjukkan bahwa isolat bakteri *Vibrio* sp. aktif serta memiliki potensi sebagai antibakteri. Hasil ini dibuktikan dengan adanya zona hambat yang terbentuk dari uji antagonis antara bakteri simbiosis (*Vibrio* sp.) dengan bakteri uji (*S. aureus* dan *E. coli*). Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Antagonis *Vibrio* sp. dengan Bakteri Uji

Bakteri Uji	Rata2 Diameter Zona Hambat (cm)
<i>S. aureus</i>	1,04 ± 0,07
<i>E. coli</i>	1,07 ± 0,03

Keterangan: Diameter zona hambat diatas sudah dikurangi dengan diameter paper disk

Ekstraksi Media Super Natan Bakteri Isolat

Sampel bakteri *Vibrio* sp. diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak kasar dari bakteri tersebut. Sampel diekstraksi dengan 3 macam pelarut yaitu: n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan metanol (polar). Hasil ekstraksi dari masing-masing pelarut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Ekstraksi Media Supernatan Bakteri Isolat

Pelarut	Volume awal (ml)	Hasil Ekstraksi (ml)	Persentase (%)
n-heksan	500	8.1	1,62
etil asetat	500	11,9	2,38
Metanol	500	13,6	2,72

Hasil ekstrak terbanyak diperoleh dari pelarut metanol (polar) yaitu sebesar 2,72%, sedangkan ekstrak pelarut etil asetat (semi polar) sebesar 2,38% dan ekstrak pelarut n-Heksan (non polar) sebesar 1,62%.

Uji Antibakteri Ekstrak Super Natan Bakteri Isolat

Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sedangkan ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol menghambat pertumbuhan bakteri (*S. aureus* dan *E.coli*). Hasil uji bioaktivitas ekstrak kasar bakteri *Vibrio* sp. dari pelarut etil asetat (semi polar) dengan bakteri *E.coli*, memperlihatkan zona hambat sebesar 0,51 cm dan dengan bakteri *S.aureus* diameter zona hambatnya sebesar 0,43cm. Adapun ekstrak kasar pelarut metanol (polar) dengan bakteri *E.coli*, memperlihatkan diameter zona hambat sebesar 0,23 cm dan dengan bakteri *S.aureus* diameter zona hambatnya sebesar 0,22 cm. Uji bioaktivitas ekstrak kasar dengan bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji sensitivitas ekstrak kasar isolat bakteri *Vibrio* sp. terhadap bakteri uji

Ekstrak Kasar Pelarut	Bakteri Uji	Rata2 Diameter Zona Hambat (cm)
metanol	<i>S. aureus</i>	0,24 ± 0,02
	<i>E. coli</i>	0,23 ± 0,02
etil asetat	<i>S. aureus</i>	0,43 ± 0.01
	<i>E. coli</i>	0,52 ± 0,01
n-heksan	<i>S. aureus</i>	-
	<i>E. coli</i>	-

Keterangan : Diameter paper dish = 0,7 cm

Berdasarkan hasil uji diketahui bahwa zona hambat tertinggi dari sampel dengan bakteri uji (*S. Aureus* dan *E. Coli*) terjadi pada ekstrak kasar pelarut etil asetat (semi polar). Berdasarkan besarnya zona hambat yang ditunjukkan, maka isolat yang terpilih untuk diteliti lebih lanjut adalah ekstrak kasar dari pelarut etil asetat (semi polar).

Uji Fitokimia

Ekstrak kasar selanjutnya akan diuji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung didalam ekstrak kasar etil asetat isolat bakteri *Vibrio* sp., hasilnya disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat

Jenis Uji	Hasil	Keterangan
Flavonoid	+	timbul warna kuning
Triterpenoid	+	Berubah merah

Hasil dari uji menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat bakteri *Vibrio* sp. mengandung dua golongan senyawa, yaitu flavonoidanoid dan triterpenoid. Ekstrak kasar *Vibrio* sp. yang telah diuapkan ditambahkan dengan pereaksi Liberman-burchard dihomogenkan secara perlahan. Warna akan berangsur-angsur berubah kemerahan dengan dibandingkan dengan larutan blangko. Warna merah yang ditunjukkan pada gambar mengindikasikan ekstrak kasar tersebut positif (+) mengandung senyawa triterpenoid.

Ekstrak Kasar *Vibrio* sp. yang telah diuapkan dan ditambahkan aquades, digojog selama 30 detik dan ditambahkan Mg (magnesium). Setelah itu ditetesi HCL dan ditambahkan amilalkohol. Perubahan warna menjadi kuning yang mengindikasikan ekstrak kasar tersebut positif (+) mengandung senyawa flavonoid.

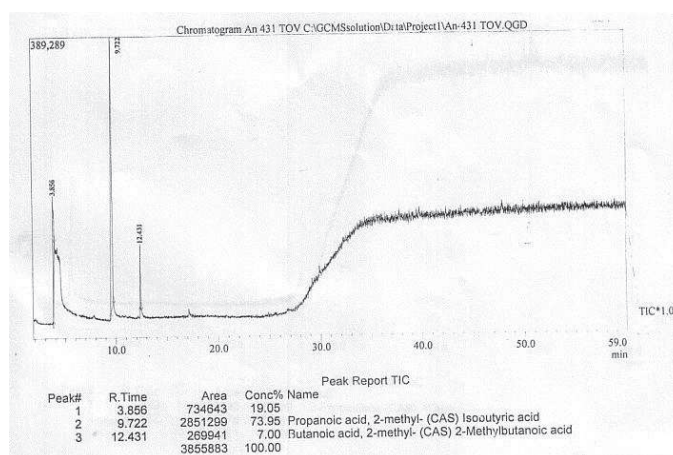
Hasil GC/MS

Analisa GC/MS, menggunakan kolom RTX-5MS. Kolom ini termasuk semipolar, kolom ini lebih baik untuk memisahkan komponen biomas. Hasil GC/MS dapat dilihat pada tabel di bawah.

Tabel 6. Hasil GC/MS

Puncak	Nama	Area	Konsentrasi (%)	Rt (menit)
1	Tidak diketahui	734643	19,05	3,856
2	Asam isobutirat	2851299	73,95	9,722
3	Asam 2-metilbutanoad	269941	7,00	12,431

Hasil GC/MS (Gambar 1.) memperlihatkan 3 puncak, dengan puncak pertama tidak diketahui strukturnya. Puncak ke-2 dengan Rt= 9,722 menit adalah asam isobutirat (73,95%). Puncak ke-3 Rt = 12.431 menit adalah asam 2-metilbutanoad (7%).



Gambar 1. Kromatogram Ekstrak

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat TOV 12.16 mempunyai karakteristik bakteri yang mengarah ke *Vibrio ordalii*.
2. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar etil asetat bakteri *Vibrio ordalii* mengandung flavonoid dan triterpenoid.
3. Hasil analisis GC/MS diketahui bahwa isolat ekstrak kasar etil asetat bakteri *Vibrio ordalii* mengandung asam isobutirat dan asam 2-metilbutanoat

Ucapan Terimakasih

Kepada reviewer Jurnal Penelitian Kelautan disampaikan penghargaan atas review yang sangat berharga pada artikel ini.

Daftar Pustaka

- Arikunto, S.M. 2002. Prosedur Praktikum Suatu Pendekatan Praktek, *Edisi Revisi*. Rineka Cipta, Jakarta, 378 hlm.
- Cimino, G. dan M. Gavagnin. 2006. Mollusc From Chemo-ecological Study to Biotechnology Application. Springer Berlin Heidelberg. Jerman. 187 pp.
- Kelecom, A. 2001. Secondary Metabolites From Marine Microorganism. *Ann. Braz. Acad. Sci. 74 :151-170*.
- Murniasih, T. 2005. Substansi Kimia Untuk Pertahanan Diri dari Hewan Laut Tak Bertulang Belakang. *J. Oseana, 30: 19-27*.
- Pringgenies, D. 2009. Bioprospeksi Bakteri Symbion Dari Gastropoda *Conus Miles* Terhadap Strain Bakteri MDR (*Multi Drug Resistance*). *Indonesia Journal of Marine Science.14:42-49*.
- Proksch, P., R.A. Edrada and R. Ebel. 2002. Drugs from the Seas – Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 : 124-125*.
- Suwandi, U. 1993. Skrining Mikroorganisme Penghasil Antibiotik. *J. Cermin Dunia Kedokteran, 89: 46 – 48*.