

**DISERTASI**

**PENELUSURAN METABOLIT SEKUNDER SPONS SEBAGAI  
AGEN ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN  
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabr.)**

INVESTIGATION OF SECONDARY METABOLITES OF  
SPONGES AS ANTIBACTERIAL AGENT AGAINST  
PATHOGENIC BACTERIA OF BLACK TIGER SHRIMP  
(*Penaeus monodon* Fabr.)

**LULU ADILLA LATIFAH**

**L013181010**



**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**PENELUSURAN METABOLIT SEKUNDER SPONS SEBAGAI AGEN  
ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN PADA UDANG WINDU  
(*Penaeus monodon* Fabr.)**

**INVESTIGATION OF SECONDARY METABOLITES OF SPONGES AS  
ANTIBACTERIAL AGENT AGAINST PATHOGENIC BACTERIA OF  
BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon* Fabr.)**

Disertasi  
Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor

Program Studi  
Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

**LULU ADILLA LATIFAH  
L013181010**

Kepada

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI**

**Penelusuran Metabolit Sekunder Spons Sebagai Agen Antibakteri terhadap  
Bakteri Patogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)**

**Disusun dan Diajukan oleh:**

**LULU ADILLA LATIFAH  
L013181010**

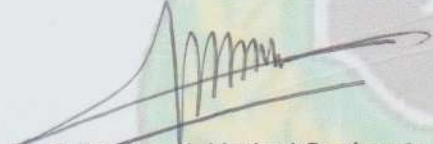
*Telah diperiksa dan disetujui oleh :*

**Komisi Penasehat,**



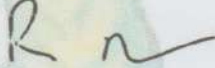
Prof. Dr. Akbar Tahir, M.Sc.

Promotor



Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekanto, MS

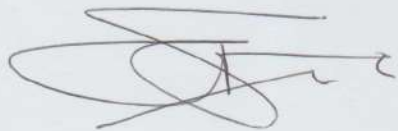
Ko-Promotor I



Prof. Raymond J. Andersen

Ko-Promotor II

Ketua Program Studi  
S3 Ilmu Perikanan,



Prof. Dr. Ir. Sharifuddin Bin Andy Omar, M.Sc.  
NIP. 19590223 198811 1 001

Dekan Fakultas Ilmu Kelautan  
dan Perikanan,



Dr. Ir. St. Aisjah Farhum, M. Si  
NIP. 19690605 199303 2 002

## PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Lulu Adilla Latifah

NIM : L013181010

Program Studi: Ilmu Perikanan

Fakultas : Ilmu Kelautan dan Perikanan

Menyatakan bahwa disertasi dengan judul : “Penelusuran Metabolit Sekunder Spons Sebagai Agen Antibakteri terhadap Bakteri Patogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)”

ini adalah karya penelitian saya sendiri dan bebas dari plagiasi. Di dalamnya tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali digunakan sebagai acuan dalam naskah ini, yang artinya sumber disebutkan sebagai referensi, dan dituliskan pula di daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti terdapat plagiasi dalam karya ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan terkait (Permendiknas No. 17, tahun 2007).

Makassar, Juni 2021



Lulu Adilla Latifah  
NIM. L013181010

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Lulu Adilla Latifah  
NIM : L013181010  
Program Studi : Ilmu Perikanan  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

"Penelusuran Metabolit Sekunder Spons Sebagai Agen Antibakteri terhadap Bakteri Patogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)"

adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Juni 2021

Yang menyatakan,



Lulu Adilla Latifah  
NIM. L013181010

## PERNYATAAN KEPEMILIKAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Lulu Adilla Latifah  
NIM : L013181010  
Program Studi: Ilmu Perikanan  
Fakultas : Ilmu Kelautan dan Perikanan

menyatakan bahwa publikasi sebagian atau keseluruhan isi disertasi pada jurnal atau forum ilmiah lain harus seizin, dan menyertakan tim pembimbing sebagai pemilik tulisan (*author*), dan Universitas Hasanuddin sebagai institusinya. Apabila dalam waktu sekurang-kurangnya dua semester (satu tahun sejak pengesahan disertasi), saya tidak melakukan publikasi dari sebagian atau keseluruhan disertasi ini, maka pembimbing sebagai salah seorang dari penulis berhak mempublikasikannya pada jurnal ilmiah yang ditentukan kemudian, sepanjang nama mahasiswa tetap diikutkan.

Makassar, Juni 2021  
Penulis,



Lulu Adilla Latifah  
NIM. L013181010

## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrahmanirrahim*

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya. Shalawat dan salam juga penulis panjatkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang selalu menjadi suri tauladan bagi kita semua. Syukur alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Penelusuran Metabolit Sekunder Spons Sebagai Agen Antibakteri terhadap Bakteri Patogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)” dengan baik. Disertasi ini ditulis berdasarkan data hasil penelitian yang dilakukan sebagai tugas akhir untuk memperoleh gelar Doktor dari Program Studi Ilmu Perikanan, Sekolah Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin.

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2018-2020 di beberapa tempat diantaranya Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia, dan *University of British Columbia*, Kanada. Keseluruhan penelitian didanai oleh Kementerian RistekDikti melalui Beasiswa PMDSU, dan PKPI. Hasil Penelitian telah dipublikasikan di 2 jurnal internasional terindeks SCOPUS, dan 2 prosiding internasional terindeks SCOPUS. Jurnal-jurnal yang telah terbit dilampirkan pada disertasi ini.

Disertasi disusun oleh penulis tidak terlepas dari berbagai kendala yang dihadapi, tetapi berkat bantuan berbagai pihak disertasi ini dapat selesai tepat pada waktunya. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Akbar Tahir, M.Sc, Ph.D selaku ketua komisi penasihat, serta Prof. Nunuk Hariani Soekamto, MS, Prof. Raymond J Andersen sebagai anggota komisi penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan, mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya penulisan disertasi ini;
2. Tim penilai / penguji Prof. Dr. Ir. Abdul Haris, M.Si, Dr. Nita Rukminasari, S.Pi, M.Si, Dr. rer. nat. Ir. Elmi Nurhaidah Zainuddin, DES, dan Dr. Hasnah Natsir, M.Si yang telah banyak memberikan saran dan perbaikan;
3. Prof. Yana Maolana Syah, M.S., Ph.D selaku penguji eksternal yang telah banyak memberikan saran dan perbaikan;
4. Dr. David William selaku *chief research assistant*, dan seluruh staff di Laboratorium Kimia Organik, *University of British Columbia*, Kanada, atas segala bantuan dan saran yang telah diberikan selama proses penelitian;

5. Prof. Dr. Ir. Sharifuddin Bin Andy Omar, M.Sc. selaku ketua program studi Doktor Ilmu Perikanan yang telah memberikan arahan dan dukungan;
6. Kementerian RistekDikti atas bantuan dana beasiswa PMDSU dan PKPI yang telah diberikan;
7. Orang tua dan keluarga penulis atas segala doa, dukungan, dan nasihat yang diberikan selama penelitian hingga akhir penyelesaian disertasi;
8. Rosmaniar S.Si, Huyyirnah, dan Indarwati sebagai laboran di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Mikrobiologi Laut, dan Teknologi Hasil Perikanan, yang telah membantu dan mengarahkan saat penulis melakukan penelitian;
9. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Kimia Organik, FMIPA, UNHAS atas segala bantuan, dukungan, masukan, saran, doa dan semangatnya;
10. Teman-teman Magister Program Studi Ilmu Perikanan angkatan 2017, Doktor Program Studi Ilmu Perikanan angkatan 2018, serta PMDSU Unhas Batch 3;
11. Para staf Jurusan Ilmu Perikanan, FIKP, yang telah membantu dan melayani penulis dengan baik dan tulus;
12. Seluruh pihak yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis, semoga Allah SWT membalas segala budi baiknya.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan disertasi ini masih jauh dari kategori sempurna. Oleh karena itu, penulis dengan hati dan tangan terbuka mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan tulisan yang akan datang. Semoga dalam tulisan ini bermanfaat bagi kita semua.

Makassar, Juni 2021  
Penulis,

Lulu Adilla Latifah



## RINGKASAN

**LULU ADILLA LATIFAH.** Penelusuran Metabolit Sekunder Spons Sebagai Agen Antibakteri terhadap Bakteri Patogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.). Dibimbing oleh Akbar Tahir, Nunuk Hariani Soekamto, dan Raymond J Andersen.

Spons, khususnya *Xestospongia* dari kelas *Desmospongia*, ordo *Haplosclerida*, famili *Petrosiidae*, menghasilkan beragam metabolit sekunder yang berpotensi sebagai sumber produk alam laut penting. Metabolit sekunder ini dapat dijadikan alternatif antibiotik dalam menghambat bakteri patogen *Vibrio* sp. pada udang windu. Tujuan penelitian yaitu untuk mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak spons dari Pulau Badi, Sulawesi Selatan, serta menganalisis potensi ekstrak dan senyawa isolat sebagai antibakteri. Metode yang digunakan diantaranya evaporasi, fraksinasi, pemurnian, identifikasi, dan karakterisasi senyawa menggunakan NMR 1D dan 2D. Ekstrak kasar dan senyawa isolat diuji aktivitas antibakterinya terhadap 3 jenis strain bakteri patogen pada udang (*Vibrio harveyi* M-120, *Vibrio parahaemolyticus* T-170, dan *Vibrio alginolyticus* B-425). Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar Kirby-Bauer, dan uji fitokimia menggunakan metode Harborne. Ekstrak etil asetat *Xestospongia testudinaria* menghasilkan nilai zona hambat lebih tinggi dibanding jenis spons *Haliclona fascigera* dan *Callyspongia aerizusa*, dengan kisaran nilai zona hambat 7,40-12,09 mm. Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak diperoleh golongan senyawa alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenol. Hasil fraksinasi dan elusidasi struktur diperoleh 4 senyawa asam lemak tak jenuh terbrominasi dengan beberapa ikatan rangkap. Keempat senyawa yang diperoleh antara lain: 2 senyawa diketahui (asam lemak metil ester), dan 2 senyawa baru (*xestospongienol*). Asam lemak diperoleh dari hasil metabolisme jalur asetat-malonat. Senyawa 3 dan 4 (*xestospongienol*) menghasilkan zona hambat lebih besar (6,33-7,97 mm), daripada senyawa diketahui 1 dan 2 terhadap bakteri *Vibrio* sp. yang diuji secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian pertama tentang uji antibakteri senyawa asam lemak terbrominasi terhadap *Vibrio* sp. Senyawa asam lemak tak jenuh rantai panjang terbrominasi dapat dipertimbangkan sebagai alternatif antibiotik yang dapat menjadi biokontrol bakteri patogen *Vibrio* sp. dalam budidaya udang.

Kata Kunci : Spons, Ekstrak etil asetat, *Xestospongia testudinaria*, Asam lemak terbrominasi, Agen antibakteri, *Vibrio* sp.

## SUMMARY

**LULU ADILLA LATIFAH.** Investigation of Secondary Metabolites of Sponges As Antibacterial Agent against Pathogenic Bacteria of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabr.). Guided by Akbar Tahir, Nunuk Hariani Soekamto, and Raymond J Andersen.

The marine sponges, especially *Xestospongia* belonging to the class Desmospongia, order Haplosclerida, family Petrosiidae, produce diverse bioactive secondary metabolites which can be the source of potentially valuable marine natural products. These bioactive secondary metabolites could be used as alternative antibiotics to inhibiting pathogenic bacteria *Vibrio* sp. of black tiger shrimp. The study aimed to isolate the active compound contained in sponge extracts from Badi Island, South Sulawesi, and to analyze the potential extracts and pure compounds as antibacterial agents. Research methods are evaporation, fractionation, purification, identification, and characterization of compounds using 1D and 2D NMR. Crude extracts and pure compounds were determined for their antibacterial activities against three shrimp pathogenic bacteria: *Vibrio harveyi* M-120, *Vibrio parahaemolyticus* T-170, and *Vibrio alginolyticus* B-425. Antibacterial activity assays used the agar diffusion method Kirby-Bauer, and phytochemical screening was carried out using the Harborne method. Ethyl acetate extract of *Xestospongia testudinaria* showed higher inhibition zones with inhibition zone diameter 7.40-12.09 mm than *Haliclona fascigera* and *Callyspongia aerizusa*. The phytochemical analysis exhibited alkaloid, steroid, terpenoid, and phenol compounds. The results of fractionation and elucidate structures presented four brominated polyunsaturated acetylenic fatty acids compounds (BPUFAs). There are two known compounds (fatty acids methyl ester), and two new compounds (*xestospongiol*). Fatty acids were obtained throughout the acetate-malonate biogenesis pathway. The inhibition zone value of new compounds 3 and 4 (6.33-7.97 mm) is higher than known compounds 1 and 2 which are determined in vitro. This study is the first study on the antibacterial test of BPUFAs against *Vibrio* sp. BPUFAs compounds can be considered as alternative antibiotics for controlling pathogenic bacteria *Vibrio* sp.

Keywords: Sponges, Ethyl acetate extract, *Xestospongia testudinaria*, Brominated fatty acids, Antibacterial agents, *Vibrio* sp.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
PERNYATAAN KEPEMILIKAN TULISAN.....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
DAFTAR ARTIKEL.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xviii
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pendahuluan .....	1
1.2. Kerangka Pikir, Hipotesis, dan Tujuan Penelitian .....	13
<b>II. PENELITIAN PENDAHULUAN : SKRINING UJI ANTIBAKTERI DAN UJI FITOKIMIA EKSTRAK KASAR (SPONS DAN MAKROALGAE) .....</b>	<b>15</b>
ABSTRAK.....	15
ABSTRACT .....	15
2.1. Pendahuluan .....	16
2.2. Bahan dan Metode .....	18
2.2.1. Jenis penelitian .....	18
2.2.2. Waktu dan lokasi penelitian.....	18
2.2.3. Alat dan bahan .....	19
2.2.4. Metode penelitian.....	20
2.3. Hasil dan Pembahasan Makroalgae .....	24
2.3.1. Identifikasi makroalgae.....	24
2.3.2. Ekstraksi sampel makroalgae.....	26
2.3.3. Aktivitas antibakteri dan uji fitokimia makroalgae.....	26
2.3.4. Pembahasan .....	30
2.4. Hasil dan Pembahasan Spons.....	32
2.4.1. Identifikasi spons.....	32
2.4.2. Ekstraksi sampel spons.....	37
2.4.3. Aktivitas antibakteri dan uji fitokimia spons.....	37
2.4.4. Pembahasan .....	41
2.5. Kesimpulan.....	44

<b>III. FRAKSINASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA ASAM LEMAK TAK JENUH RANTAI PANJANG TERBROMINASI DARI EKSTRAK ETIL ASETAT <i>Xestospongia testudinaria</i></b>	<b>45</b>
ABSTRAK.....	45
ABSTRACT .....	45
3.1. Pendahuluan .....	46
3.2. Bahan dan Metode .....	47
3.2.1. Waktu dan lokasi penelitian.....	47
3.2.2. Alat dan bahan .....	47
3.2.3. Metode penelitian.....	48
3.3. Hasil.....	49
3.3.1. Fraksinasi.....	49
3.3.2. Elusidasi struktur.....	52
3.3.3. Jalur biogenesis .....	76
3.4. Pembahasan .....	78
3.5. Kesimpulan.....	82
<b>IV. UJI ANTIBAKTERI SENYAWA ASAM LEMAK TAK JENUH RANTAI PANJANG TERBROMINASI TERHADAP <i>Vibrio sp.</i></b>	<b>83</b>
ABSTRAK.....	83
ABSTRACT .....	83
4.1. Pendahuluan .....	84
4.2. Bahan dan Metode .....	85
4.2.1. Waktu dan lokasi penelitian.....	85
4.2.2. Alat dan bahan .....	85
4.2.3. Metode penelitian.....	86
4.3. Hasil.....	87
4.4. Pembahasan .....	91
4.5. Kesimpulan.....	92
<b>V. PEMBAHASAN UMUM, KESIMPULAN UMUM, DAN SARAN</b>	<b>93</b>
5.1. Pembahasan .....	93
5.2. Kesimpulan.....	97
5.3. Saran.....	97
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>98</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>111</b>

## DAFTAR TABEL

1. Tingkatan Aktivitas Antibakteri Berdasarkan Diameter Zona Hambat .....	22
2. Berat Basah, Berat Kering, dan Berat Ekstrak Makroalgae .....	26
3. Diameter Zona Hambat Makroalgae ( <i>Mean ± SD</i> ) .....	26
4. Uji Fitokimia Makroalgae.....	30
5. Berat Basah, Berat Kering, dan Berat Ekstrak Spons .....	37
6. Diameter Zona Hambat Spons ( <i>Mean ± SD</i> ).....	37
7. Uji Fitokimia Spons .....	40
8. Data <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, HMBC, dan COSY Senyawa 1 .....	52
9. Data <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, HMBC, dan COSY Senyawa 2 .....	57
10. Data <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, HMBC, dan COSY Senyawa 3 .....	63
11. Data <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, HMBC, dan COSY Senyawa 4 .....	70
12. Diameter Zona Hambat Senyawa Murni ( <i>Mean ± SD</i> ).....	88

## DAFTAR GAMBAR

1. Struktur Kimia Haliclonadiamin (a) Halicrasterol (b) (Cheng et al., 2013). ....	5
2. Struktur Kimia 5-Bromo trisindolin (1) dan 6-Bromo trisindolin (2) (Pangal et al., 2013). ....	5
3. N-metilnifatin A.....	6
4. Senyawa dari Pulau Hachijo-jima, Jepang. ....	7
5. Manzamin C.....	7
6. Senyawa dari Perairan Jakarta, Indonesia. ....	8
7. Senyawa Sterol dari Laut China Selatan. ....	8
8. Senyawa Steroidal Keton dari Laut China Selatan. ....	9
9. Senyawa Steroid dari Laut Vietnam. ....	9
10. Senyawa Baru Sterol dari Laut Vietnam. ....	10
11. Senyawa Sterol dari Laut Merah, Arab Saudi. ....	11
12. Senyawa Poliasetilena Terbrominasi. ....	11
13. Senyawa Baru BPUFAs dari Laut China Selatan. ....	12
14. Senyawa Hidrokarbon Alifatik Terbrominasi dari Laut China Selatan. ....	12
15. Kerangka Pikir Penelitian. ....	13
16. Peta Lokasi Penelitian (Pulau Lae-Lae). ....	18
17. Peta Lokasi Penelitian (Pulau Badi). ....	19
18. Diagram Alir Proses Ekstrak Kasar. ....	21
19. Diagram Alir Proses Fitokimia. ....	23
20. <i>Padina australis</i> Hauck (Foto pribadi). ....	24
21. <i>Halimeda macroloba</i> Decaisne (Foto pribadi). ....	25
22. Grafik Diameter Zona Hambat ( <i>mean values</i> (mm +/- SE)) <i>Padina australis</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i> . ....	27
23. Aktivitas Antibakteri <i>Padina australis</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i> . ....	27
24. Grafik Diameter Zona Hambat ( <i>mean values</i> (mm +/- SE)) Ekstrak <i>Halimeda macroloba</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio alginolyticus</i> . ....	28
25. Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>Halimeda macroloba</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio alginolyticus</i> . ....	29
26. Sistem Saluran Air Leukonoid (Boury & Rutzler, 1997). ....	32
27. (A) <i>Xestospongia testudinaria</i> (Foto pribadi), (B) Bentuk Pertumbuhan <i>Massive</i> (Berman et al., 2013). ....	34

28. Kerangka <i>Xestospongia testudinaria</i> : A) Ectosomal, B) Choanosomal.....	34
29. Spikula <i>Xestospongia testudinaria</i> : (A) Foto Pribadi, (B) (Ackers et al., 2007).....	34
30. <i>Callyspongia aerizusa</i> : (A) Foto Bawah Laut, (B) Bentuk Pertumbuhan Tubular (Boury & Rutzler, 1997), (C) Spikula (Ackers et al., 2007), (D) Foto Pengamatan Spikula.....	35
31. (A) <i>Haliclona</i> ( <i>Reniera</i> ) <i>fascigera</i> (Foto pribadi), (B) Bentuk Pertumbuhan Tubular (Boury & Rutzler, 1997).....	36
32. Kerangka <i>Haliclona fascigera</i> : (A) Ectosomal dan (B) Choanosomal (Foto pribadi), (C) Ectosomal dan (D) Hoanosomal (Hooper & Van Soest, 2002).....	36
33. Spikula <i>Haliclona fascigera</i> : (A) Foto Pribadi, (B) (Ackers et al., 2007).....	36
34. Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>Xestospongia testudinaria</i> terhadap Bakteri Patogen a) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , b) <i>Vibrio alginolyticus</i> , dan c) <i>Vibrio harveyi</i> .....	38
35. Grafik Diameter Zona Hambat ( <i>mean values</i> (mm +/- SE)) Ekstrak <i>Xestospongia testudinaria</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i> .....	39
36. Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>Haliclona fascigera</i> : (A) N-heksan, (B) Kontrol negatif (pelarut), (C) Aseton, (D) Kontrol positif (ciprofloxacin), (E) Etil asetat terhadap <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	39
37. TLC Fraksi Etil Asetat <i>Xestospongia testudinaria</i> (A-F = Fraksi gabungan)..	49
38. TLC Fraksi D (a-e = Fraksi gabungan dari Fraksi D).....	50
39. Fraksi Gabungan a) FD-a, b) FD-b.....	50
40. Kromatogram RP- HPLC FD-a.....	51
41. Kromatogram RP- HPLC FD-b.....	51
42. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa 1.....	53
43. Spektrum <sup>13</sup> C-NMR Senyawa 1.....	54
44. Spektrum HMBC, dan COSY Senyawa 1.....	56
45. Struktur Molekul Senyawa (1) Metil 18-bromo-(13E,17E)-octadeca-13,17-diene-5,7,15-triynoate.....	56
46. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa 2.....	58
47. Spektrum <sup>13</sup> C-NMR Senyawa 2.....	59
48. Spektrum HMBC, dan COSY Senyawa 2.....	61
49. Struktur Molekul Senyawa (2) Metil 20-Bromoeicosa-11E,15E,19E-triene-7,9,17-triynoate.....	62
50. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa 3.....	63

51. Spektrum <sup>13</sup> C-NMR Senyawa 3.....	64
52. Spektrum HSQC Senyawa 3.....	65
53. Spektrum HMBC Senyawa 3.....	66
54. Spektrum COSY Senyawa 3.....	67
55. Spektrum HSQC, HMBC, dan COSY Senyawa 3.....	68
56. Spektrum TROESY Senyawa 3.....	68
57. Struktur Molekul Senyawa (3) (17E)-18-Bromo-3-hydroxyoctadeca -17-ene-5,7,15-triynoic acid.....	69
58. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa 4.....	71
59. Spektrum <sup>13</sup> C-NMR Senyawa 4.....	72
60. Spektrum HSQC Senyawa 4.....	73
61. Spektrum HMBC Senyawa 4.....	73
62. Spektrum COSY Senyawa 4.....	74
63. Spektrum HSQC, HMBC, dan COSY Senyawa 4.....	75
64. Spektrum TROESY Senyawa 4.....	75
65. Struktur Molekul Senyawa (4) (9Z,17E)-18-bromo-3-hydroxyoctadeca-9,17-dien-5,7,15-triynoic acid.....	76
66. Jalur Biogenesis Asam Lemak (Sahidin, 2018). ....	77
67. Jalur Biogenesis Asam Lemak Tak Jenuh (Dewick, 2002). ....	78
68. Grafik Diameter Zona Hambat ( <i>mean values</i> (mm +/- SE)) Ke-4 Senyawa terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio alginolyticus</i> . ....	88
69. Aktivitas Antibakteri Senyawa 3 dan 4 terhadap Bakteri Patogen a) <i>Vibrio harveyi</i> , b) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , dan c) <i>Vibrio alginolyticus</i> . ....	89
70. Aktivitas Antibakteri Senyawa 1 dan 2 terhadap Bakteri Patogen a) <i>Vibrio harveyi</i> , b) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , dan c) <i>Vibrio alginolyticus</i> . ....	90



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Dokumentasi Penelitian .....	112
2. Uji Statistik.....	117
3. Artikel.....	126
3. Surat Keterangan Determinasi Makroalgae .....	129
3. Daftar Riwayat Hidup .....	130

## DAFTAR ARTIKEL

### a) Publikasi dalam bentuk jurnal

#### ➤ Jurnal 1

Judul : Green Algae *Halimeda macroloba* in Spermonde Archipelago:  
Phytochemical and *In Vitro* Antibacterial Studies

Nama Jurnal : Pharmacognosy journal

Volume/Nomor: 12(5) : 1000-1004

Link jurnal : <https://www.phcogj.com/article/1227>

#### ➤ Jurnal 2

Judul : New Antibacterial Activities of Brominated C<sub>18</sub> and C<sub>20</sub> Fatty Acids  
Isolated from Marine Sponge *Xestospongia testudinaria* Against  
Shrimp Pathogenic Bacteria

Nama Jurnal : Rasayan Journal of Chemistry

Volume/Nomor: 14 (1) : 460-465

Link jurnal : <http://dx.doi.org/10.31788/RJC.2021.1415999>

### b) Publikasi dalam bentuk Prosiding

#### ➤ Prosiding 1

Judul : Preliminary Study: *Padina australis* Hauck's Antibacterial Activity  
and Phytochemical Test against Shrimp Pathogenic Bacteria

Publisher : IOP Conference Series : Journal of Physics

Link prosiding : <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1341/2/022005>

#### ➤ Prosiding 2

Judul : Antibacterial Assay of Crude Extracts from Marine Sponge  
*Haliclona fascigera* in Badi Island of Spermonde Archipelago  
against Shrimp Pathogenic Bacteria

Publisher : IOP Conference Series : Earth and Environmental Science

Link prosiding : <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/17551315/763/1/012029>

## DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

HPLC	= <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)
TLC/KLT	= <i>Analytical Thin-layer Chromatography</i> (Kromatografi Lapis Tipis)
MS	= <i>Mass Spectrometry</i> (Spektrometri Massa)
Lampu UV	= Lampu Ultraviolet
$\delta_H$	= Pergeseran Kimia Proton
$\delta_C$	= Pergeseran Kimia Karbon
<i>Cryoprobe</i>	= Tempat Sampel dan Eksperimen NMR
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	= <i>Deuterated</i> Dimetil Sulfoksida
R <sub>f</sub>	= <i>Retention Factor</i> (Faktor Retensi)
J	= Konstanta Kopling (Hertz)
ppm	= Parts per million (Satuan Pergeseran Kimia)
m/z	= <i>Mass-to-charge ratio</i> (Rasio Massa terhadap Muatan)
E / Z	= Entgegen (trans) / Zusammen (cis) (Sistem Isomer Geometrik)
Dd/dt/s/m	= Multiplisitas (doblet-doblet/ doblet-triplet/ singlet/multiplet)
TSA	= <i>Tryptic Soy Agar</i>
TCBS	= <i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i>
TSB	= <i>Trypticase Soy Broth</i>
PA	= Pro Analisis
<i>Peak</i>	= Puncak dari Suatu Senyawa
<sup>1</sup> H-NMR	= <i>Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance</i>
<sup>13</sup> C-NMR	= <i>Carbon Nuclear Magnetic Resonance</i>
HSQC	= <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	= <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
COSY	= <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
ROESY	= <i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ESIMS	= <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
TOFESIMS	= <i>Time of Flight Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
Metin/Metilen/Metil	= Atom Karbon CH/ CH <sub>2</sub> / CH <sub>3</sub>
C-Kuartener	= Atom Karbon yang terikat langsung pada 4 Atom Karbon lain
<i>Allylic methylene</i>	= Metilen yang Berikatan dengan Ikatan rangkap 2
Intramolekular	= Ikatan Kimia Permanen antar Atom Pembentuk Unsur atau Senyawa

*Marine Natural Products* (MNPs) = Bahan Alam Laut

*Conjugated enyne system* = Senyawa organik yang terdiri dari 1 buah ikatan rantai 2, dan 1 buah ikatan rantai 3 yang terkonjugasi/bersambung

*Conjugated enediyne system* = Senyawa organik yang terdiri dari 1 buah ikatan rantai 2, dan 2 buah ikatan rantai 3 yang terkonjugasi/bersambung

*Shielding/Deshielding* = Sinyal-sinyal yang lebih terlindungi/ kurang terlindungi

Olefin/Asetilen = Ikatan rangkap 2 / rangkap 3

*Subsequent heat application* = Penampakan noda KLT dengan *Heat Gun*

*Para-anisaldehyde stain* = Pewarna untuk KLT

*Polyacetylenes* = Ikatan rangkap 3 yang lebih dari 1

*Contiguous methylenes* = Beberapa Metilen (CH<sub>2</sub>) yang saling berikatan

*Trans (E)-disubstituted olefin (double bond)* = Ikatan rangkap 2 yang terikat dengan 2 atom karbon lain dalam posisi trans

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Pendahuluan

Udang windu merupakan salah satu komoditas unggulan budidaya di Sulawesi Selatan. Berdasarkan data produksi DKP Provinsi Sulawesi Selatan, produksi udang Sulawesi Selatan mengalami penurunan, dari tahun 2014 hingga 2016 sebesar 4,7%. Nilai ekspor udang juga mengalami penurunan sebesar 5,6%, dimana nilai ekspor pada tahun 2014 sebesar 71,3 juta US\$ menjadi 61,2 juta US\$ pada tahun 2016 (DKP Sulawesi Selatan, 2016). Produksi udang windu relatif lebih rendah dibanding produksi udang vanname. Jika dilihat perbandingan per triwulan, maka produksi udang windu mengalami penurunan hampir disetiap triwulan. Pada tahun 2017 produksi turun menjadi 12 ton, dan tahun 2018 kembali turun menjadi 10 ton. Peningkatan produksi terjadi pada tahun 2019, tetapi tahun 2020 turun lagi menjadi 435 ribu ton. Tidak hanya jumlah produksi yang menurun, tetapi volume ekspor udang juga mengalami penurunan pada tahun 2020 (DKP Sulawesi Selatan, 2018; 2019; 2020).

Peningkatan produksi dapat lebih tinggi, jika usaha pertambakan di Sulawesi Selatan tidak mengalami gagal panen akibat serangan penyakit bakterial. Jenis-jenis bakteri patogen pada udang pernah diteliti Rahman et al., (2012) dan Puspitasari et al., (2020), menyatakan bahwa pada udang yang berasal dari *hatchery*, kolam pemeliharaan, pasar, dan ekspor, ditemukan beberapa bakteri antara lain: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella* spp.

Bakteri *Vibrio* diketahui sebagai bakteri oportunistik dan berbahaya pada budidaya ikan, karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer bakteri masuk tubuh ikan melalui kontak langsung. Sebagai patogen sekunder bakteri menginfeksi ikan yang telah terserang agen penyakit lain, misalnya oleh parasit (Post, 1987).

Menurut Irianto (2005), menyatakan bahwa *Vibrio* digolongkan sebagai bakteri dengan sifat Gram negatif, berbentuk batang, dan sebagian besar hidup di perairan laut dan payau. Secara umum infeksi akibat *Vibrio* disebut sebagai vibriosis, atau dikenal pula sebagai *salt water furunculosis*, *red boil* atau *pike pest*. Beberapa jenis *Vibrio* bersifat patogen yang dapat mengeluarkan toksin ganas, dan menyebabkan kematian pada ikan dan invertebrata laut. Enam spesies antara lain: *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, dan *V. splendidus* merupakan bakteri yang paling sering menyerang udang. Jenis bakteri *V. harveyi* menjadi patogen utama dengan patogenitas tinggi pada kasus vibriosis, yang menyebabkan kegagalan panen di pertambakan udang windu sejak dua dekade terakhir

(Austin & Zhang, 2006; Atmomarsono & Rachmansyah, 2011). Oleh karena itu, penelitian ini berfokus pada pencarian antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* sp.

Antibiotik sintetik umumnya digunakan untuk mengatasi permasalahan penyakit bakterial. Pengobatan penyakit dengan antibiotik sintetik tidak disarankan lagi, karena dapat menimbulkan resistensi (Atmomarsono & Rachmansyah, 2011). Beberapa strain bakteri telah diketahui resisten terhadap hampir seluruh jenis antibiotik.

Beberapa jenis antibiotik yang umum digunakan pada *hatchery* untuk mengatasi bakteri *Vibrio* antara lain: oxytetracyclin, erytromicin dan elbasin. Bakteri *Vibrio* bersifat resisten hampir pada semua jenis antibiotik, tetapi bersifat sensitif hanya pada oxytetracycline, norfloxacin, dan ciprofloxacin (Jayasree et al., 2006; Hasniar et al., 2013). Penelitian Jayasree et al., (2006) dan Karunasagar et al., (2007), menyatakan bahwa kematian massal udang windu (*Penaeus monodon*) disebabkan oleh bakteri *Vibrio* yang resisten terhadap cotrimoxazole, chloramphenicol, erythromycin, dan streptomycin. Jenis *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. alginolyticus* menunjukkan sensitifitas terhadap antibiotik ciprofloxacin. Oleh karena itu, antibiotik ciprofloxacin merupakan pilihan yang tepat untuk dijadikan kontrol positif pada uji antibakteri, baik di penelitian utama maupun pendahuluan.

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk memperoleh informasi tentang potensi sampel penelitian yang digunakan. Uji pendahuluan pada penelitian ini telah mengubah sampel penelitian yang telah disusun. Sampel penelitian yang awalnya dipilih makroalgae diganti menjadi spons, karena didasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian pendahuluan (Bab 2). Hasil uji pendahuluan ini dapat menjadi acuan penelitian utama, sehingga dapat menunjang keberhasilan penelitian dengan sampel utama spons dari perairan Kepulauan Spermonde.

Kepulauan Spermonde terletak di sebelah Barat Sulawesi Selatan, dan terbentang mulai dari pulau-pulau di Kabupaten Kepulauan Selayar sebelah Selatan, hingga pulau-pulau di Kabupaten Pangkajene Kepulauan (Pangkep) sebelah Utara. Sebanyak 12 pulau berada di bagian Barat Daya Kota Makassar atau sebelah Selatan dari Selat Makassar (Rohana & Sri Wahyuni, 2019). Selain itu, kepulauan ini terdiri atas kurang lebih 121 pulau, dimulai dari bagian Selatan Kabupaten Takalar hingga Mamuju di Sulawesi Barat. Wilayah Kepulauan Spermonde dipetakan menjadi 4 jenis zona. Zona I adalah wilayah terdekat dari pantai dengan kedalaman laut rata-rata 10 m, dan didominasi oleh pasir berlumpur. Zona II berjarak  $\pm 5$  km dari daratan dengan kedalaman laut rata-rata 30 km. Zona III dengan jarak  $\pm 12,5$  km dari pantai dengan kedalaman laut sekitar 20-50 km. Zona IV merupakan wilayah terluar dengan jarak rata-rata 30 km dari daratan Sulawesi (Hutchinson, 1945).

Menurut Marzuki (2018), gugusan Kepulauan Spermonde dengan 293 pulau, mempunyai spons dengan berbagai jenis yang hampir terwakili dari 4 kelas spons. Kepulauan ini terdapat kurang dari 2.500 jenis spons yang tersebar di wilayah perairan Spermonde. Penelitian lain terkait penyebaran spons di Kepulauan Spermonde dilakukan oleh Haris et al., (2014), memperoleh 49 jenis spons, yang teridentifikasi berasal dari 16 famili dan 8 ordo, antara lain: Petrosidae, Microcionidae, Callyspongiidae, Chalinidae, Niphatidae, Dysdeaae, Agelasidae, Irciniidae, Spongidae, Thorectidae, Holicondriidae, Aplysinidae, Spirastellidae, dan Clionidae.

Spons menjadi sumber *marine natural products* (MNPs) yang paling banyak dibandingkan makroalgae dengan berbagai aktivitas biologis sejak tahun 1970an (Andersen, 2017). Biomassa spons dapat mereduksi sifat toksik beberapa jenis hidrokarbon, dan sebagai media tumbuhnya mikroorganisme tertentu yang memiliki aktivitas antibakteri (Marzuki, 2018). Biota ini juga menjadi sumber penting untuk memperoleh obat-obat baru yang berpotensi dalam aplikasi farmakologis, salah satunya sebagai antibakteri (Sipkema et al., 2005; Perdicaris et al., 2013).

Aktivitas antibakteri dari ekstrak spons pertama kali dilaporkan (Nigrelli & Stempien, 1963). Tinggi rendahnya aktivitas antibakteri yang terkandung dalam ekstrak spons, dapat dilihat menggunakan lebar diameter zona hambat sebagai parameternya. Semakin lebar diameter zona hambat yang terbentuk, menandakan semakin kuatnya senyawa bioaktif dari spons dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Ekstrak *Xestospongia testudinaria* mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap berbagai jenis bakteri, khususnya bakteri patogen manusia (Ankisetty & Slattery, 2012; Cita et al., 2017a; 2017b). Ekstrak *X. testudinaria* dari Sorong Papua, Indonesia mempunyai daya hambat yang luas terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Klebsiella pneumonia* ATCC, dan *Salmonella typhi* dibanding ekstrak spesies lainnya. Spesies ini juga yang diperoleh dari perairan Aramanyang, Indonesia, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* pada konsentrasi 70 ug/mL (Khairunnisa & Kurnianda, 2017).

Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa aaptamin, isoaptamin, dimetil (oksi) aaptamin, dan dimetil ketal yang disolasi dari spons *X. testudinaria* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* (Gram positif) dan *E. coli* (Gram negatif) dengan nilai MIC berturut-turut 25, 6, 25, dan <100 µg/mL (Calcul et al., 2003). Senyawa sestokuinol sulfat yang diisolasi dari genus *Xestospongia* juga memiliki aktivitas antibakteri pada IC<sub>50</sub> 125 µM terhadap bakteri *S. aureus* (He et al., 2015). Jenis *Xestospongia* terdapat senyawa alkaloid kelas aaptamin yang aktif sebagai antibakteri patogen manusia (Calcul et al., 2003; Ayyad et al., 2015).

Selain jenis *X. testudinaria*, spons *Callyspongia aerizusa* juga berpotensi aktif sebagai antibakteri. Beberapa ekstrak *Callyspongia* dapat menghambat terhadap beberapa strain bakteri patogen, khususnya *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Pejin et al., 2014). Penelitian yang dilakukan Warbung et al., (2014) dan Rumampuk et al., (2017), melaporkan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. (termasuk *C. aerizusa*) dapat menghambat bakteri *S. typhi*, *Streptococcus pyogenes*, dan *S. aureus*. Ekstrak spons laut *C. aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*, dan *S. pyogenes* dengan kategori menghambat lemah-sedang. Menurut Helber et al., (2018), menyatakan bahwa ekstrak *C. aerizusa* menunjukkan aktivitas antibakteri sebesar 31% aktif dibanding spesies lainnya.

Spesies spons lainnya *Haliclona fascigera* dari beberapa studi menunjukkan adanya potensi sebagai sumber senyawa antibakteri. Ekstrak etil asetat *Haliclona* diteliti mempunyai potensi sebagai agen antibakteri terhadap *S. aureus*, *E. coli*, dan mikroorganisme yang resisten terhadap berbagai obat. Sebanyak 8 ekstrak dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat antara 11-16,5 mm, tetapi semua ekstrak tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *E. coli*. Penelitian lainnya menguji bahwa 12 ekstrak dapat menghambat pertumbuhan MRSA dengan zona hambat antara 11,1 mm $\pm$ 0.17 dan 15,17 mm $\pm$ 0.76. Sembilan ekstrak etil asetat lainnya menunjukkan dapat menghambat pertumbuhan *Vancomycin-resistant Enterococcus* sp. (VRE), dan *extended-spectrum-beta* ( $\beta$ )-*lactamase Gram-negative organisms* (ESBL) (Handayani et al., 2015a; 2015b; 2016). Tidak hanya ekstrak polar, tetapi juga ekstrak non polar menunjukkan aktivitas antibakteri (Uli et al., 2017).

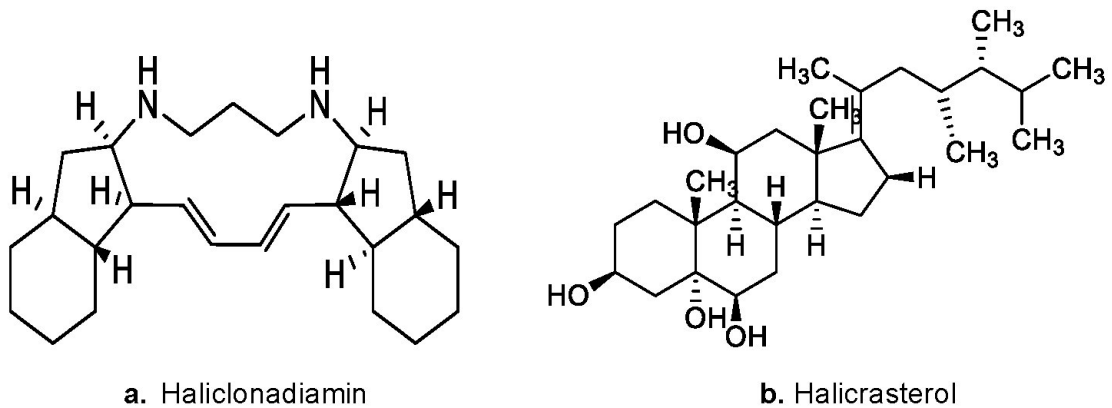
Spons diketahui sebagai salah satu komoditas Indonesia yang menarik dan cukup melimpah. Kajiannya diketahui masih sedikit sehingga belum banyak yang tercatat (Sahidin, 2018). Diperkirakan sebanyak 224 senyawa baru diisolasi dari spons tahun 2016, serta sebanyak 291 senyawa tahun 2015. Tahun 2018 diperoleh sebanyak 222 senyawa baru (Blunt et al., 2017; 2018; Carroll et al., 2020). Beberapa penelitian juga telah berhasil mengisolasi *Indonesian* MNPs beserta bioaktivitasnya yang diperoleh dari spons di Kepulauan Spermonde (Wagoner et al., 2001; 1999; Williams et al., 2004; Zhang et al., 2016; Putra & Murniasih, 2016; Uli et al., 2017).

Spons merupakan hewan unik yang dapat memproduksi senyawa bahan alam, antara lain: terpenoid, alkaloid dan steroid yang bersifat antibakteri (Marzuki, 2018). Spons *H. fascigera*, salah satu jenis spons dari genus *Haliclona*, famili Halicionidae, ordo Haplosclerida, mengandung alkaloid dan sterol (Campos et al., 2018; Gupta, 2019). Berdasarkan beberapa studi literatur, dikatakan bahwa haliclonadiamin (alkaloid), *polyhydroxylated sterols* (halicrasterol) (Gambar 1), dan cyclostelletamin (alkaloid) dapat digunakan sebagai agen antibakteri yang diperoleh dari spons *Haliclona* sp. (Fahy

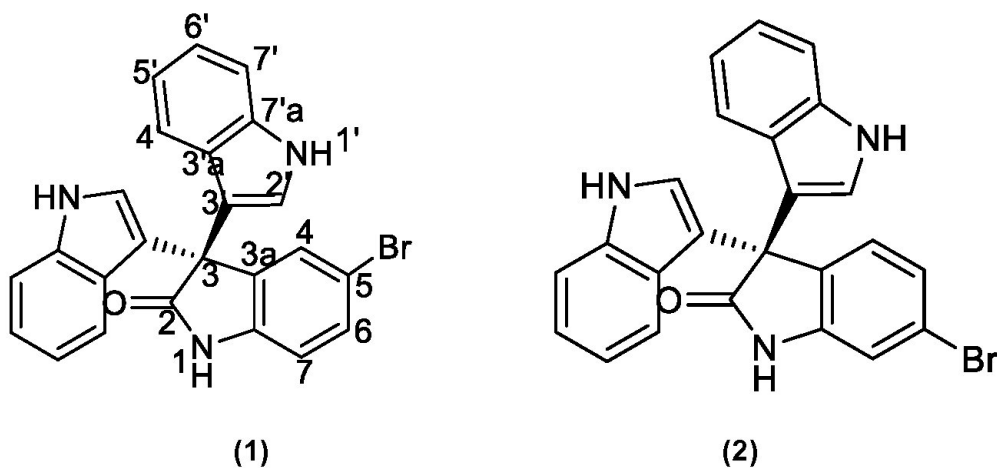


et al., 1988; Lee et al., 2012; Cheng et al., 2013). Beberapa senyawa bioaktif dari genus *Haliciona* diketahui mempunyai aktivitas antibakteri yang potensial dengan struktur senyawa unik.

Jenis spons lainnya yaitu *C. aerizusa*. Spons ini termasuk genus *Callyspongia*, ordo Haplosclerida, dan famili Callyspongiidae. Berdasarkan studi literatur, terdapat 24 senyawa telah diidentifikasi dari genus *Callyspongia*. Dua senyawa alkaloid *brominated oxindole* berperan sebagai antibakteri dari genus *Callyspongia*.



**Gambar 1.** Struktur Kimia Haliconadiamin (a) Halicrasterol (b) (Cheng et al., 2013).



**Gambar 2.** Struktur Kimia 5-Bromo trisindolin (1) dan 6-Bromo trisindolin (2) (Pangal et al., 2013).

Senyawa 1 diidentifikasi sebagai 5-bromo trisindolin, dan senyawa 2 sebagai 6-bromo trisindolin (Gambar 2). Senyawa 1 dan 2 diperoleh dari fraksi etil asetat, yang menunjukkan potensi antibakteri terhadap bakteri Gram positif *S. aureus* dan *B. subtilis* dengan zona hambat 17,5 mm, 18 mm, 15 mm, dan 16,4 mm (El-Hawary et al., 2019). Selain itu, senyawa 2H-1Benzopyran-2-one (*coumarine*) dari *Callyspongia diffusa* juga dapat berperan sebagai antibakteri (Pangal et al., 2013; Bindu et al., 2018).

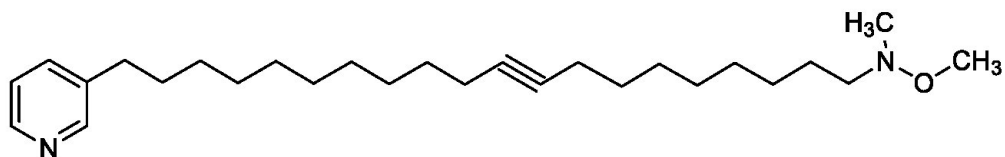
Spons ketiga yaitu dari genus *Xestospongia* yang diketahui sebagai salah satu spons dari kelas Demospongia. Sebanyak 34 spesies dari genus ini telah terdaftar dan teridentifikasi dalam *World Register of Marine Species (WoRMS)* (Sahidin, 2018). Jenis *Xestospongia* terdapat senyawa alkaloid kelas aaptamin yang aktif sebagai antibakteri patogen manusia (Calcul et al., 2003; Ayyad et al., 2015). Penelitian lain menyatakan bahwa senyawa 18-hydroxyrenierin-2 dan strongylodiol A dari *Xestospongia* sp. mempunyai aktivitas antibakteri (Ankisetty & Slattery, 2012). Metabolit sekunder lainnya yang telah ditemukan dari spons genus *Xestospongia* antara lain:

### 1. Alkaloid

Lebih dari 100 metabolit sekunder alkaloid telah diisolasi dari spons genus *Xestospongia*. Senyawa alkaloid yang ditemukan dari genus *Xestospongia* diantaranya:

#### a) 3-alkilpiridin alkaloid

N-metilnifatin A merupakan suatu metabolit sekunder baru dari golongan senyawa alkaloid 3-alkilpiridin yang berhasil diisolasi dari spons *Xestospongia* sp. Spons ini berasal dari Pulau Jawa Indonesia (Arai et al., 2016). Struktur senyawanya dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** N-metilnifatin A.

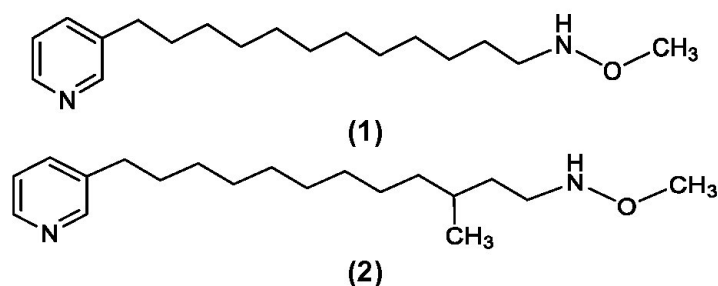
Penelitian yang dilakukan Tsukamoto et al., (2000), yaitu mengisolasi spons *Xestospongia* sp. yang berasal dari Pulau Hachijo-jima, Jepang, dan diperoleh beberapa senyawa baru. Senyawa yang diperoleh antara lain:

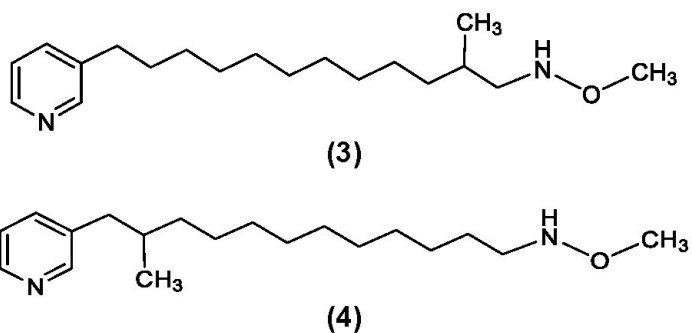
hachijodin A atau 3-[12-(N-metoksiamino)dodekanil]piridin **(1)**;

hachijodin B atau 3-[16-metil-12-(N-metoksiamino)dodekanil]piridin **(2)**;

hachijodin C atau 3-[17-metil-12-(N-metoksiamino)dodekanil]piridin **(3)**;

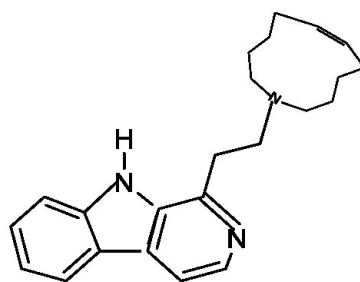
hachijodin D atau 3-[8-metil-12-(N metoksiamino)dodekanil]piridin **(4)** (Gambar 4).





**Gambar 4.** Senyawa dari Pulau Hachijo-jima, Jepang.

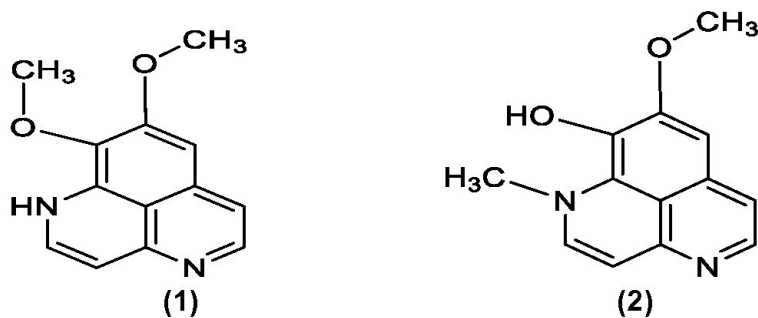
- b) Manzamin C (Gambar 5), berupa padatan tak berwarna, merupakan senyawa golongan indol alkaloid yang diisolasi dari *Xestospongia muta*, dan berasal dari laut Indonesia (Agustina et al., 2018).

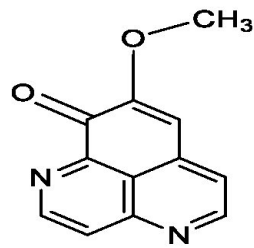


**Gambar 5.** Manzamin C.

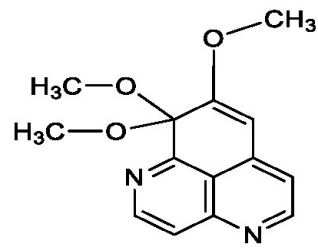
- c) Alkaloid aaptamin

Isolasi metabolit sekunder *Xestospongia* sp. dari Jakarta, Indonesia diperoleh 8 senyawa alkaloid aaptamin, dan 4 diantaranya merupakan senyawa baru. Senyawanya antara lain: Aaptamin, 8,9-dimetoksi-1H-benzo[de][1,6]naftiridin **(1)**; Isoaaptamin, 8-metoksi-1-metil-1H-benzo[de][1,6]naftiridin-9-ol **(2)**; Demetil(oksi)aaptamin, 8-metoksi-benzo[de][1,6]naftiridin-9-on **(3)**; 8,9,9-Trimetoksi-9H-benzo[de][1,6]-naftiridin **(4)** (Gambar 6) (Calcul et al., 2003).





(3)

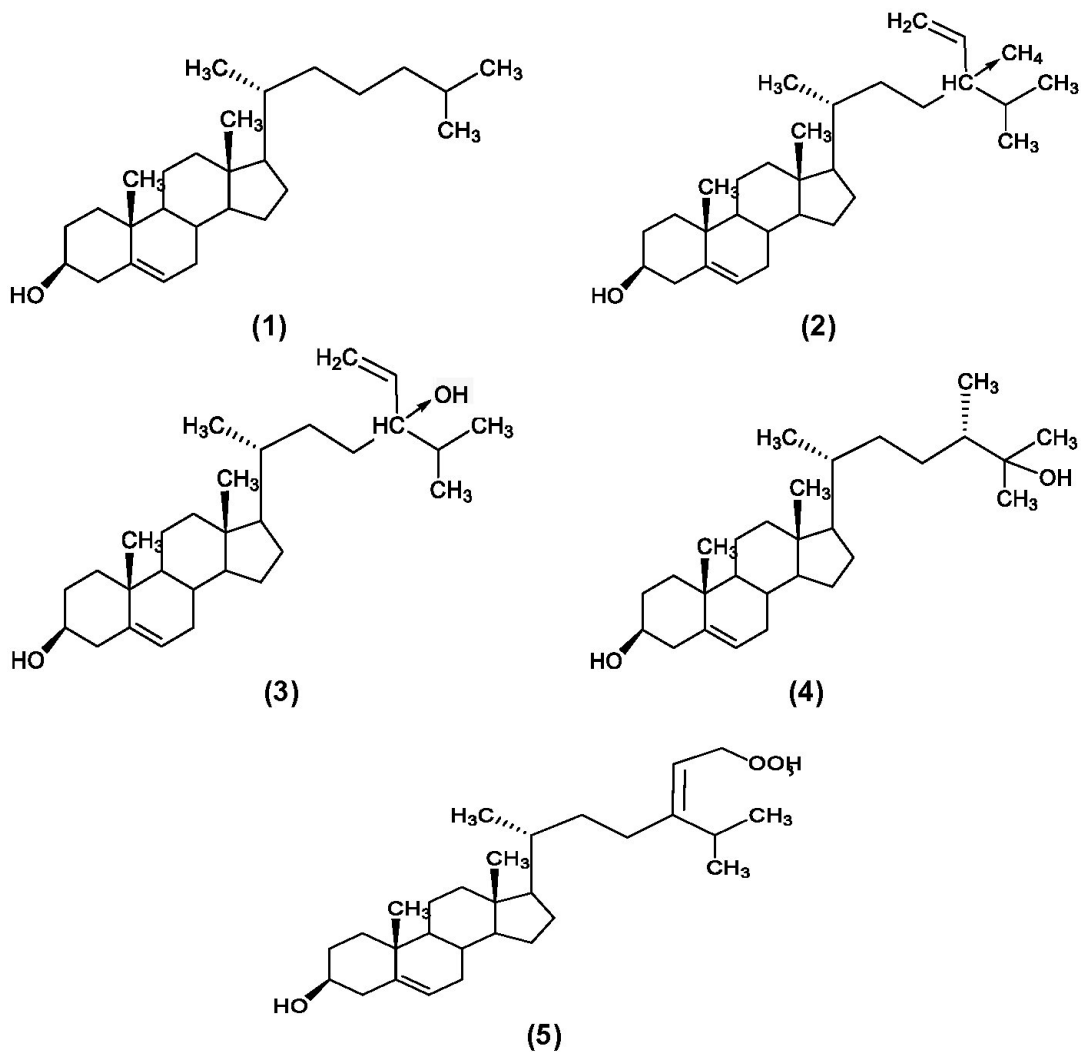


(4)

Gambar 6. Senyawa dari Perairan Jakarta, Indonesia.

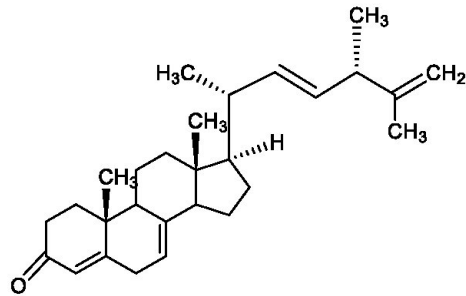
## 2. Steroid

Penelitian yang dilakukan Zhou et al., (2011), telah mengisolasi 5 senyawa golongan sterol dari ekstrak spons *X. testudinaria*, yang berasal dari Laut China Selatan. Senyawa yang diperoleh antara lain: kolesterol (1); 24-hidroperoksi-24-vinilcolesterol (2); saringosterol (3); 24-metilkolest-5-en-3 $\beta$ ,25-diol (4); 29-hidroperoksistigmasta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (5) (Gambar 7).



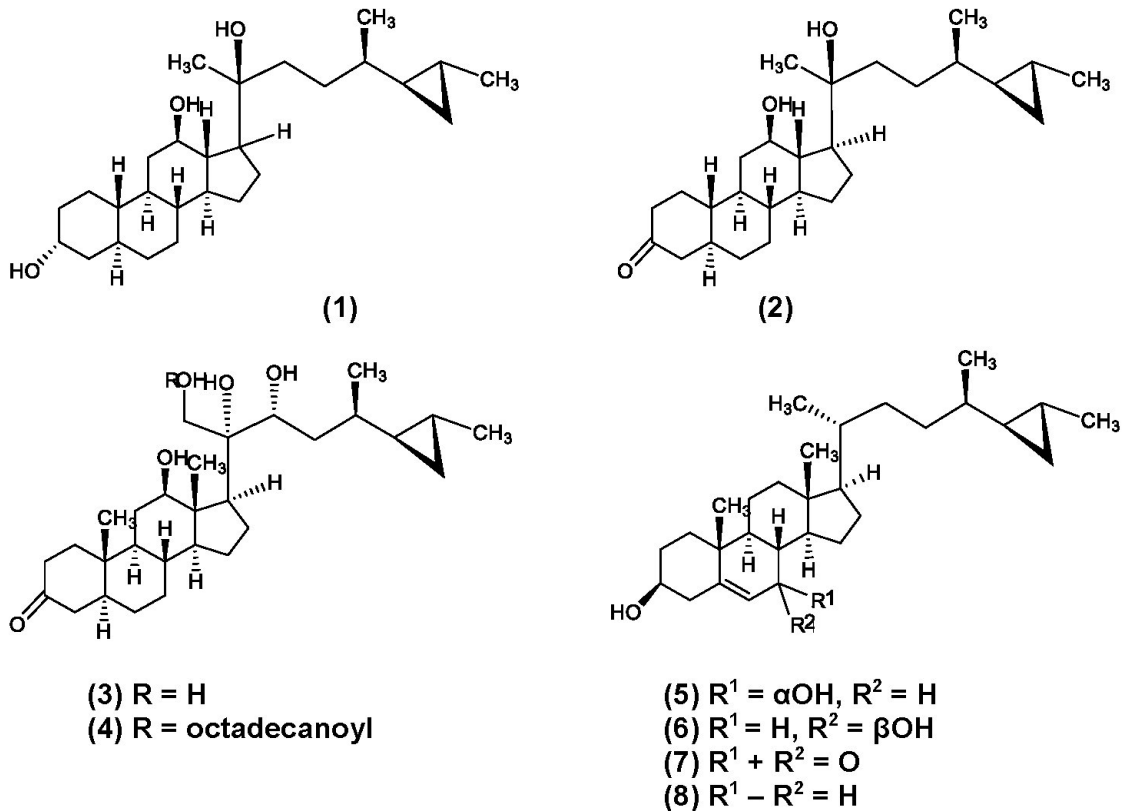
Gambar 7. Senyawa Sterol dari Laut China Selatan.

Senyawa baru steroidal keton telah diperoleh dari spons *X. testudinaria* yang berasal dari Laut China Selatan, Pulau Weichu. Senyawa yang diperoleh mempunyai rumus molekul  $C_{28}H_{40}O$ , dan berupa padatan coklat (He et al., 2016). Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 8.



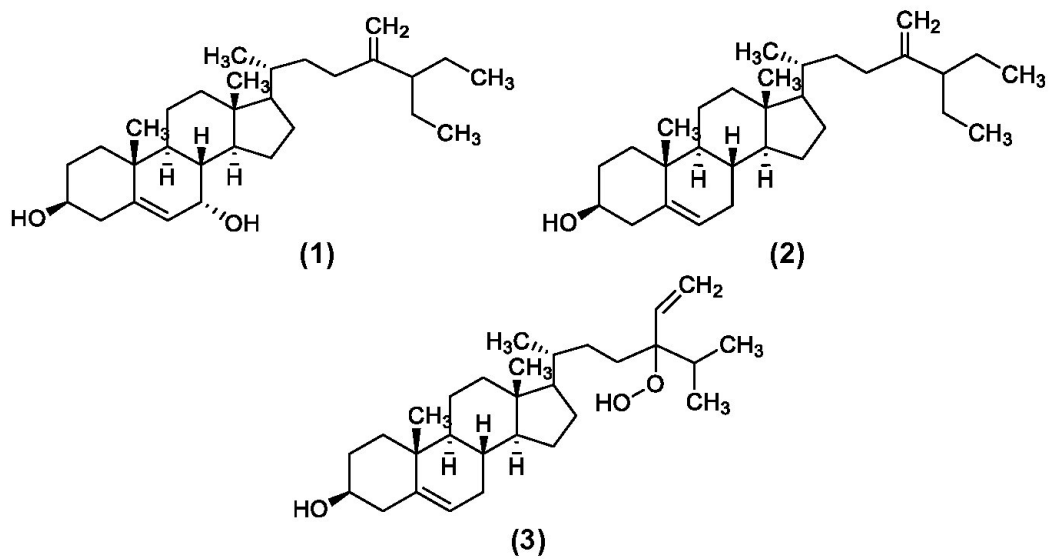
**Gambar 8.** Senyawa Steroidal Keton dari Laut China Selatan.

Isolasi spons *X. testudinaria* yang berasal dari Laut Vietnam diperoleh 8 senyawa golongan steroid, dan 3 diantaranya merupakan senyawa baru. Senyawanya antara lain: aragusterol I (**1**); 21-O-oktadekanoil-xestokerol A (**2**);  $7\beta$ -hidroksipetrosterol (**3**); aragusterol B (**4**); xestokerol A (**5**);  $7\alpha$ -hidroksipetrosterol (**6**); 7-oksopetrosterol (**7**); petrosterol (**8**) (Gambar 9) (Nguyen et al., 2013).



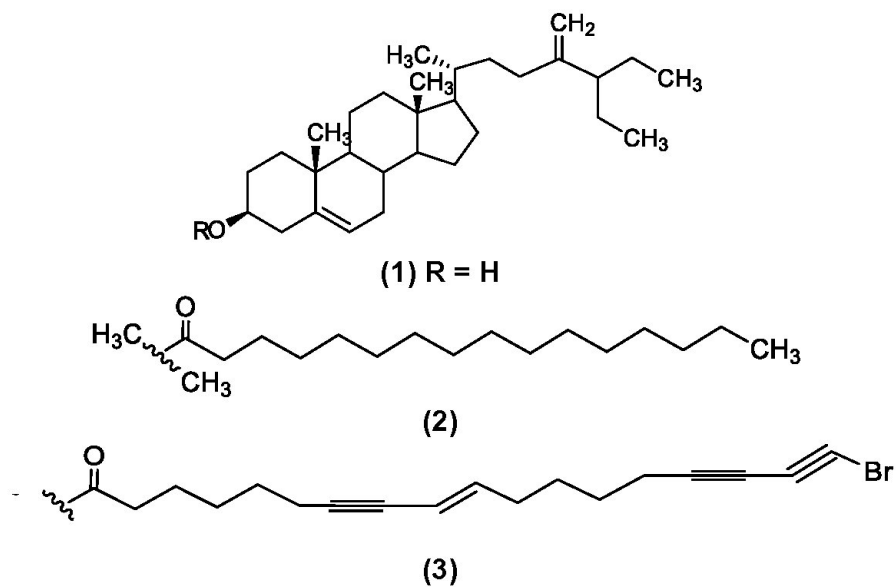
**Gambar 9.** Senyawa Steroid dari Laut Vietnam.

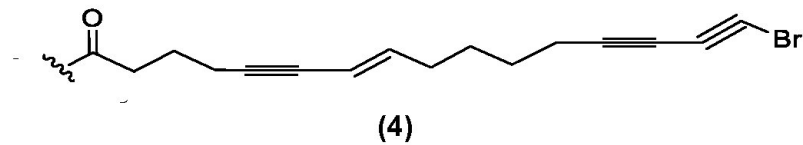
Senyawa baru golongan sterol juga diisolasi dari spons *X. testudinaria* yang berasal dari Laut Vietnam, antara lain: langkosterol A **(1)**; xestosterol **(2)**; 24-hidroperoksi-24-vinil kolesterol **(3)** (Gambar 10) (Nguyen et al., 2019). Struktur senyawanya sebagai berikut:



**Gambar 10.** Senyawa Baru Sterol dari Laut Vietnam.

Senyawa sterol lainnya diperoleh dari spons *X. testudinaria* yang berasal dari Laut Merah, Arab Saudi (Ayyad et al., 2015; El-Gamal et al., 2016). Senyawa yang diperoleh antara lain: xestosterol **(1)**; xestosterol palmitat **(2)**; asam 18'-bromooktadeka-7'E,9'E-dien-7',15'-dinoik **(3)**; asam 16'-bromo-(7'E,11'E,15'E)-heksadeka-7',11',15'-trien-5',13'-dinoik **(4)** (Gambar 11) (El-Gamal et al., 2016). Strukturnya sebagai berikut:

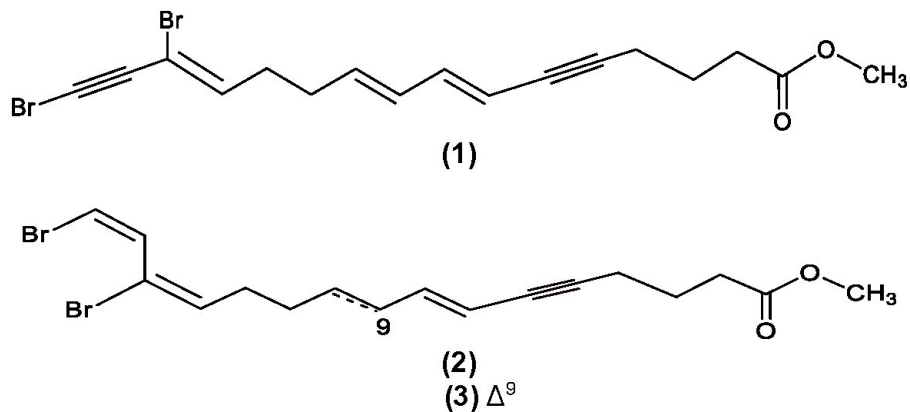




**Gambar 11.** Senyawa Sterol dari Laut Merah, Arab Saudi.

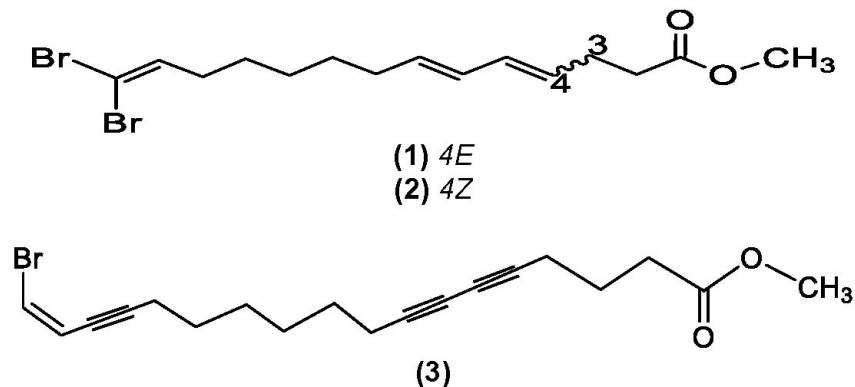
### 3. Hidrokarbon alifatik terbrominasi

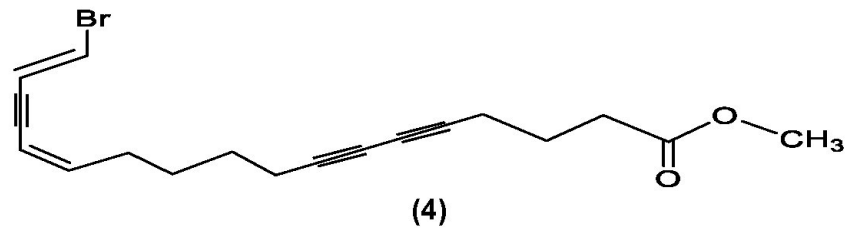
Penelitian yang dilakukan Yang et al., (2019), menghasilkan 3 senyawa poliasetilena terbrominasi dari spons *X. testudinaria*, Laut China Selatan. Senyawanya antara lain: xestonarien J **(1)**; metil (7E,13E,15Z)-14,16-dibromoheksadeka-7,13,15-trien-5-inoat **(2)**; metil (7E,9E,13E,15Z)-14,16-dibromoheksadeka-7,9,13,15-tetraen-5-trinoat **(3)** (Gambar 12).



**Gambar 12.** Senyawa Poliasetilena Terbrominasi.

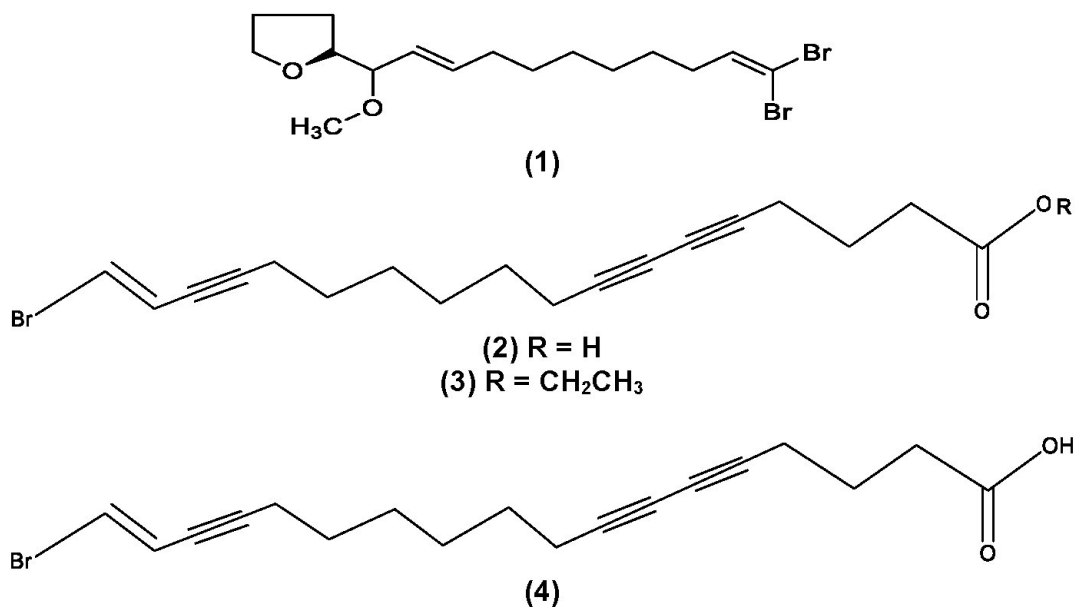
Penelitian lainnya He et al., (2015), telah mengisolasi senyawa baru asam lemak tak jenuh rantai panjang terbrominasi (BPUFAs) dari *X. testudinaria* yang berasal dari Laut China Selatan. Senyawanya antara lain: metil (E, E)-14,14-dibromo-4,6,13-tetradekatrienoat **(1)**; metil (Z, E)-14,14-dibromo-4,6,13-tetradekatrienoat **(2)**; metil 18-bromo-(17Z)-oktadeka-17-en-5,7,15-trinoat **(3)**; metil 18-bromo-(13Z,17E)-oktadeka-13,17-dien-5,7,15-trinoat **(4)** (Gambar 13).





**Gambar 13.** Senyawa Baru BPUFAs dari Laut China Selatan.

Senyawa golongan hidrokarbon lainnya diperoleh dari penelitian (Zhou et al., 2011). Senyawa alifatik terbrominasi diperoleh dari spons *X. testudinaria* yang berasal dari Laut China Selatan, antara lain: mutafuran H (1); asam xestospongik (2); asam xestospongik etil ester (3); asam 18-bromo-oktadeka-(9E,17E)-dien-5,7,15-trinoi (4) (Gambar 14).



**Gambar 14.** Senyawa Hidrokarbon Alifatik Terbrominasi dari Laut China Selatan.

Studi literatur yang telah diuraikan terkait keberagaman metabolit sekunder beserta potensi antibakteri yang dimiliki spons, dapat mendukung spons sebagai agen antibakteri baru dalam budidaya udang/ikan (Breijyeh et al., 2020). Selain itu, penelitian pendahuluan yang telah dilakukan pada penelitian ini, juga mendukung spons untuk dilakukan isolasi metabolit sekundernya dibanding makroalgae. Oleh karena itu, penelitian untuk menemukan sumber alternatif antibakteri alami dari spons penting untuk dilakukan. Pencarian sumber alternatif antibakteri alami dari metabolit sekunder spons ditujukan sebagai upaya dalam menangani bakteri patogen pada udang yang bersifat resisten, khususnya *Vibrio* sp.

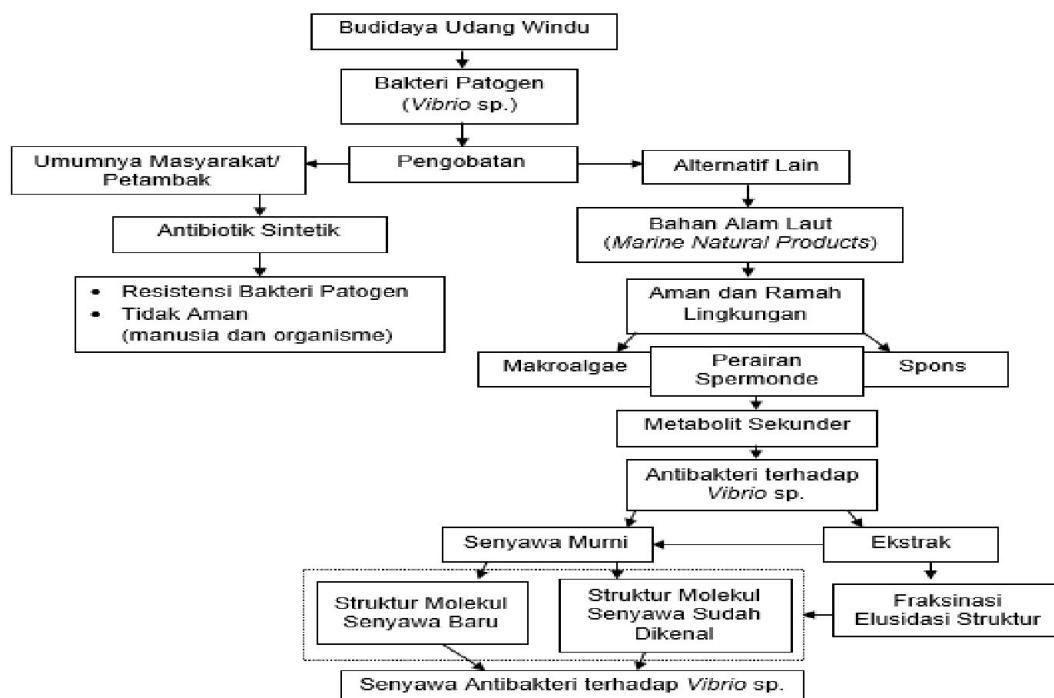


## 1.2. Kerangka Pikir, Hipotesis, dan Tujuan Penelitian

Bakteri patogen *Vibrio* sp. menjadi salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kesehatan udang windu bahkan kematian massal, sehingga produksi udang menurun. Pengobatan yang dilakukan oleh sebagian besar masyarakat/petambak biasanya menggunakan antibiotik sintetik. Pengobatan penyakit dengan antibiotik sintetik tidak disarankan lagi, karena dapat menimbulkan resistensi dan membahayakan kesehatan manusia (Atmomarsono & Rachmansyah, 2011). Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif pengobatan lain yang ramah lingkungan dan aman, yaitu bahan alam.

Bahan alam atau *natural products* berperan utama dalam perkembangan berbagai obat, khususnya dari *marine natural products* (MNP). Penelitian di bidang kimia bahan alam kini semakin menarik perhatian peneliti. Hal ini sejalan dengan menguatnya kecenderungan “kembali ke alam”, guna memenuhi berbagai keperluan, salah satunya pencarian sumber obat baru sebagai antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* sp. MNPs yang digunakan dalam penelitian ini antara lain makroalgae dan spons dari perairan Spermonde.

Makroalgae dan spons mempunyai metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp. Metabolit sekunder baik dari makroalgae maupun spons diperoleh melalui proses ekstraksi, fraksinasi, dan elusidasi struktur, hingga isolat tunggal/senyawa murni ditemukan. Senyawa murni baik senyawa dikenal maupun senyawa baru dapat berpotensi untuk dijadikan kandidat senyawa antibakteri terhadap *Vibrio* sp. Secara garis besar, kerangka pikir penelitian dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Kerangka Pikir Penelitian.

Hipotesis penelitian antara lain:

1. Beberapa senyawa hidrokarbon alifatik dari ekstrak spons dan/ makroalgae dapat diisolasi dan dimurnikan;
2. Ekstrak dan senyawa hasil isolasi berpotensi aktif sebagai antibakteri.

Tujuan penelitian antara lain:

1. Mengkaji ekstrak dari spons dan makroalgae yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi;
2. Mengkaji metabolit sekunder yang ditemukan secara spektroskopi;
3. Mengkaji aktivitas antibakteri dari senyawa murni hasil isolasi.

Kegiatan penelitian terbagi atas 3 kelompok penelitian. **Bab I** menjelaskan pendahuluan umum penelitian. **Bab II** (kelompok penelitian 1) menjelaskan tentang uji pendahuluan. Kegiatan ini bertujuan untuk mensortir jenis makroalgae dan spons yang akan digunakan pada lokasi yang dijadikan daerah pengambilan sampel. Kemudian proses ekstraksi dilakukan terhadap sampel yang diperoleh. Luaran yang dihasilkan berupa data sampel awal mengenai lokasi penelitian, sampel yang terdapat di lokasi sampling, serta uji pendahuluan fitokimia dan antibakteri semua ekstrak spons dan makroalgae terhadap bakteri patogen pada udang (*Vibrio sp.*).

**Bab III** (kelompok penelitian 2) dilakukan proses isolasi dan fraksinasi dari ekstrak kasar yang menghasilkan nilai zona hambat tertinggi terhadap bakteri *Vibrio sp.* Proses fraksinasi terbagi atas proses kromatografi dan HPLC. Selanjutnya uji NMR dan elusidasi struktur dilakukan terhadap senyawa murni yang telah diperoleh. Luaran yang diperoleh berupa data tentang deskripsi senyawa-senyawa yang telah diisolasi, baik senyawa diketahui maupun senyawa baru.

**Bab IV** (kelompok penelitian 3) mengkaji tentang hasil uji *in vitro* aktivitas antibakteri senyawa murni yang telah diperoleh terhadap bakteri patogen pada udang (*Vibrio sp.*). Luaran yang diperoleh dari penelitian ini yaitu adanya uji antibakteri terhadap bakteri *Vibrio sp.* dari senyawa diketahui maupun senyawa baru. **Bab V** - berupa pembahasan, kesimpulan umum dari ke-3 kelompok penelitian, serta saran.

Aspek kebaharuan dari penelitian ini berdasarkan penelusuran pustaka yang telah dilakukan, yaitu penemuan senyawa baru beserta bioaktivitasnya terhadap bakteri patogen pada udang. Senyawa yang diperoleh nantinya diharapkan memiliki aktivitas antibakteri yang bagus terhadap bakteri patogen *Vibrio sp.* secara *in vitro*. Informasi dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai data pendukung untuk penelitian selanjutnya, serta data pelengkap informasi senyawa. Penelitian lebih lanjut secara *in vivo* dibutuhkan untuk meneliti senyawa-senyawa yang diperoleh memungkinkan sebagai antibiotik alternatif terhadap bakteri patogen di bidang budidaya udang/ikan.

## II. PENELITIAN PENDAHULUAN : SKRINING UJI ANTIBAKTERI DAN UJI FITOKIMIA EKSTRAK KASAR (SPONS DAN MAKROALGAE)

### ABSTRAK

Udang windu merupakan biota budidaya potensial di Provinsi Sulawesi Selatan yang membutuhkan perhatian ekstra, untuk mencegahnya dari serangan infeksi bakteri. Penggunaan antibiotik sintesis pada udang dapat membuat bakteri patogen resisten dan mencemari lingkungan. Akhir-akhir ini, produk alami laut dapat digunakan sebagai cara lain untuk mengatasi masalah penyakit bakteri. Produk alami laut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2 jenis makroalga, dan 3 jenis spons. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak kasar n-heksan, etil asetat, dan aseton terhadap 3 jenis bakteri patogen pada udang windu (*Vibrio harveyi* M-120, *Vibrio parahaemolyticus* T-170, dan *Vibrio alginolyticus* B-425), serta skrining uji fitokimia. Uji antibakteri menggunakan metode difusi agar, dan uji fitokimia menggunakan metode Harborne. Hasil yang diperoleh menunjukkan ekstrak spons menghasilkan aktivitas antibakteri lebih tinggi dibanding ekstrak makroalga. Ekstrak spons *Xestospongia testudinaria* menghasilkan zona hambat paling tinggi dibanding ekstrak spons *Haliclona fascigera* dan *Callyspongia aerizusa* dengan aktivitas antibakteri sedang. Ekstrak n-heksan dan etil asetat *X. testudinaria* dapat menghambat *Vibrio* sp. dengan kisaran diameter zona hambat 7,40-12,09 mm. *V. harveyi* dapat dihambat dengan sedang oleh ekstrak etil asetat sebesar 12,09 mm. Semua ekstrak tidak ada yang dapat menghasilkan nilai zona hambat lebih tinggi dari kontrol positif ciprofloxacin. Uji fitokimia mengungkapkan bahwa sebagian besar ekstrak kasar sampel, baik pada makroalga maupun spons mengandung senyawa steroid, terpenoid, fenol, dan alkaloid.

**Kata kunci:** Makroalga, spons, Kepulauan Spermonde, antibakteri, *Vibrio* sp., uji fitokimia

### ABSTRACT

The potential of aquaculture organisms in South Sulawesi, black tiger shrimp, need extra watchfulness to prevent it against the pathogenic bacteria attack. The use of synthetic antibiotics in shrimp can make pathogenic bacteria resistant and pollute the environment. Lately, Marine Natural Products (MNPs) are other ways to overcome this problem. In this study, the MNPs were extracted from macroalgae (2 species) and sponges (3 species). The study aimed to examine the antibacterial activities of n-hexane, ethyl acetate, and acetone crude extracts against three black tiger shrimp pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi* M-120, *V. parahaemolyticus* T-170, dan *V. alginolyticus* B-425), and phytochemical screening, respectively. The antibacterial test used the agar diffusion method, and the phytochemical test used the Harborne method. The results showed that the sponge extracts produced higher antibacterial activities than the macroalgae extracts. *Xestospongia testudinaria* extract produced higher inhibition zone than *Haliclona fascigera* dan *Callyspongia aerizusa* extracts with moderate antibacterial activities. N-hexane and ethyl acetate crude extracts of *X. testudinaria* can inhibit *Vibrio* sp. with diameter of the inhibition zone 7.40 to 12.09 mm. *V. harveyi* was moderately inhibited by ethyl acetate extract of 12.09 mm. None of the extracts could produce an inhibition zone value higher than the positive control (ciprofloxacin). Phytochemical tests revealed that most of the extracts from both macroalgae and sponges contained steroid, terpenoids, phenol, and alkaloid compounds.

**Keywords:** Macroalgae, sponges, Spermonde Archipelago, antibacterial, *Vibrio* sp., phytochemical assay

## 2.1. Pendahuluan

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan di Provinsi Sulawesi Selatan, yang mengalami kasus infeksi bakteri di tambak. Kasus infeksi yang sampai saat ini belum dapat diselesaikan secara tuntas (Tangko & Pantjara, 2007; Atmomarsono & Rachmansyah, 2011). Jenis bakteri *Vibrio* sp. diketahui sebagai bakteri dengan patogenitas tinggi pada kasus vibriosis, yang memicu kematian cepat pada udang (Austin & Zhang, 2006). Pencegahan atau pengobatan diperlukan untuk mengatasi permasalahan penyakit bakterial pada udang. Pencegahan atau pengobatan penyakit udang biasanya menggunakan antibiotik sintetik. Menurut (Bansemir et al., 2006; Pérez et al., 2016), obat sintetik dianggap dapat membuat bakteri patogen menjadi resisten, meracuni spesies target, dan mencemari lingkungan. Oleh karena itu, pentingnya penelitian terhadap penemuan senyawa antibakteri baru, yang diharapkan berpotensi lebih baik dari antibiotik sintetik.

*Natural products* (NPs) diketahui menjadi sumber utama *lead compounds* untuk berbagai obat (Astuti et al., 2002). Awal tahun 1960 menjadi awal penelitian bidang kimia terkait MNPs. Sebanyak 47 NPs diperoleh dari laut untuk pertama kali. Beberapa senyawa yang diperoleh telah diuji bioaktivitasnya (Carroll et al., 2020; Andersen, 2017).

Berdasarkan studi literatur, di antara semua organisme laut, spons dianggap sebagai sumber MNPs baru paling banyak. Spons telah berkontribusi sekitar 30% dari seluruh penemuan MNPs. Spons mengandung metabolit sekunder yang unik dan beragam, serta mempunyai potensi sebagai senyawa antibakteri (Mehbub et al., 2014; Andersen, 2017). Selain spons, makroalgae juga dapat dipertimbangkan sebagai sumber senyawa bioaktif lainnya. Makroalgae lebih mudah diperoleh, karena tersedia melimpah di alam.

Makroalgae merupakan tumbuhan laut yang menghasilkan sejumlah metabolit sekunder dengan struktur bervariasi. Metabolit sekunder ini penting bagi tumbuhan itu sendiri, untuk berinteraksi dengan lingkungannya sebagai upaya adaptasi dan pertahanan diri. Organisme dapat menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan struktur yang unik dan bioaktivitas potensial, dikarenakan adanya pengaruh kimia dan fisik yang tinggi di lingkungan laut, sehingga dapat bermanfaat untuk berbagai keperluan farmakologis (Ravikumar et al., 2010; Ramakrishna & Ravishankar, 2011), salah satunya antibakteri. Aktivitas antibakteri makroalgae telah dilaporkan sejak tahun 1917 (Wei et al., 2015). Sebanyak 95% ekstrak dapat menunjukkan daya hambatnya termasuk terhadap bakteri patogen laut (Bansemir et al., 2006; Govindasamy et al., 2011; Mishra et al., 2016).

Penelitian dalam rangka penemuan senyawa-senyawa yang potensial dimulai dengan uji bioaktivitas dari ekstrak kasar. Skrining ekstrak kasar dapat menggambarkan

jenis MNPs beserta potensinya yang dapat ditemukan (Andersen, 2017). Skrining juga menjadi metode yang telah lama diterapkan dalam studi penemuan obat baru, antibakteri, dan lainnya. Makroalgae (*Padina australis* Hauck dan *Halimeda macroloba*) maupun spons (*Xestospongia testudinaria*, *Callyspongia aerizusa*, dan *Haliclona fascigera*), telah diketahui dari berbagai penelitian mempunyai potensi antibakteri, dengan zona hambat dan target bakteri patogen berbeda-beda.

Berdasarkan beberapa penelitian, *Halimeda* mempunyai daya hambat terhadap berbagai jenis strain bakteri. Berbagai spesies dari genus *Halimeda*, *H. macroloba* (Fenical & Paul, 1984; Govindasamy et al., 2011), maupun lainnya (*H. opuntia*, *H. macrophysa*, *H. gracilis*, *H. tuna*, dan *H. renschi*) telah diuji potensinya sebagai antibakteri (Indira et al., 2013; Hendri et al., 2015; Mishra et al., 2016; WAR et al., 2018). Demikian juga algae coklat *P. australis* Hauck dari berbagai perairan Indonesia mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen pada manusia (*Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*) (Wei et al., 2015; Zailanie, 2016; Puasa et al., 2018), dan ikan (*V. harveyi*) (Gazali & Safutra, 2016). Aktivitas antibakteri dari kelas Chlorophyceae dilaporkan lebih tinggi daripada Phaeophyceae (Kolanjinathan et al., 2009).

Selain makroalgae, spons dari perairan Kepulauan Spermonde (Astuti et al., 2002; Yulianti et al., 2011), maupun perairan lainnya di Indonesia (Sahidin, 2018), telah banyak diteliti tentang uji daya hambat antibakterinya. Ekstrak kasar *X. testudinaria* mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap bakteri patogen manusia (Qaralleh et al., 2010; Ankisetty & Slattery, 2012; Cita et al., 2017a; 2017b; Khairunnisa & Kurnianda, 2017). Ekstrak jenis *C. aerizusa* (Pejin et al., 2014; Warbung et al., 2014; Rumampuk et al., 2017; Helber et al., 2018), serta *H. fascigera* (Handayani et al., 2015a; 2015b; 2016; Uli et al., 2017) juga berpotensi aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen manusia *S. typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, dan mikroorganisme yang resisten terhadap berbagai obat.

Penelitian terkait aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen pada udang atau ikan masih sedikit kajiannya, dibandingkan penelitian aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen lainnya. Dengan demikian, berdasarkan berbagai studi literatur yang telah banyak menguji ekstrak spons maupun makroalgae sebagai agen antibakteri, maka penelitian ini juga akan menguji aktivitas antibakteri ekstrak kasar. Ekstrak kasar dari sampel makroalgae dan spons yang telah dipilih diuji terhadap bakteri patogen udang *Vibrio* sp. Informasi penelitian dari bab ini dapat digunakan sebagai data acuan (referensi) dan pendukung, dalam menentukan sampel ekstrak kasar makroalgae atau spons yang dilakukan proses fraksinasi lebih lanjut di bab selanjutnya.

## 2.2. Bahan dan Metode

### 2.2.1. Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dalam rangka menemukan senyawa murni sebagai antibakteri. Penelitian terdiri atas sampling, preparasi sampel, ekstraksi, uji antibakteri, dan uji fitokimia semua ekstrak kasar sampel.

### 2.2.2. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 tahun yaitu mulai tahun 2019 hingga 2020, serta dilakukan pada beberapa tempat. Proses maserasi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, FMIPA UNHAS. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, dan Mikrobiologi Laut, FIKP, UNHAS.

Sampel ditentukan secara *random* di Kepulauan Spermonde, Sulawesi Selatan. Kepulauan Spermonde dikenal oleh masyarakat sebagai Pulau Sangkarang terdiri atas  $\pm$  121 pulau, mulai dari Kabupaten Takalar di Selatan hingga Mamuju di Sulawesi Barat. Sebanyak 12 pulau merupakan bagian wilayah Kota Makassar, antara lain : Pulau Lae-Lae, Lumulumu, Lanjukang, Langkai, Kolokoloang, Kodingarengkeke, Kodingareng, Bonetambung, Barrang Lompo, Barrang Caddi, Samalona, dan Kayangan (Marzuki, 2018; Rohana & Sri Wahyuni, 2019). Pulau lainnya berada di Kabupaten Pangkep yang memiliki 115 pulau kecil, dan tersebar di 4 kecamatan, salah satunya Pulau Badi (Nurjannah, 2020).

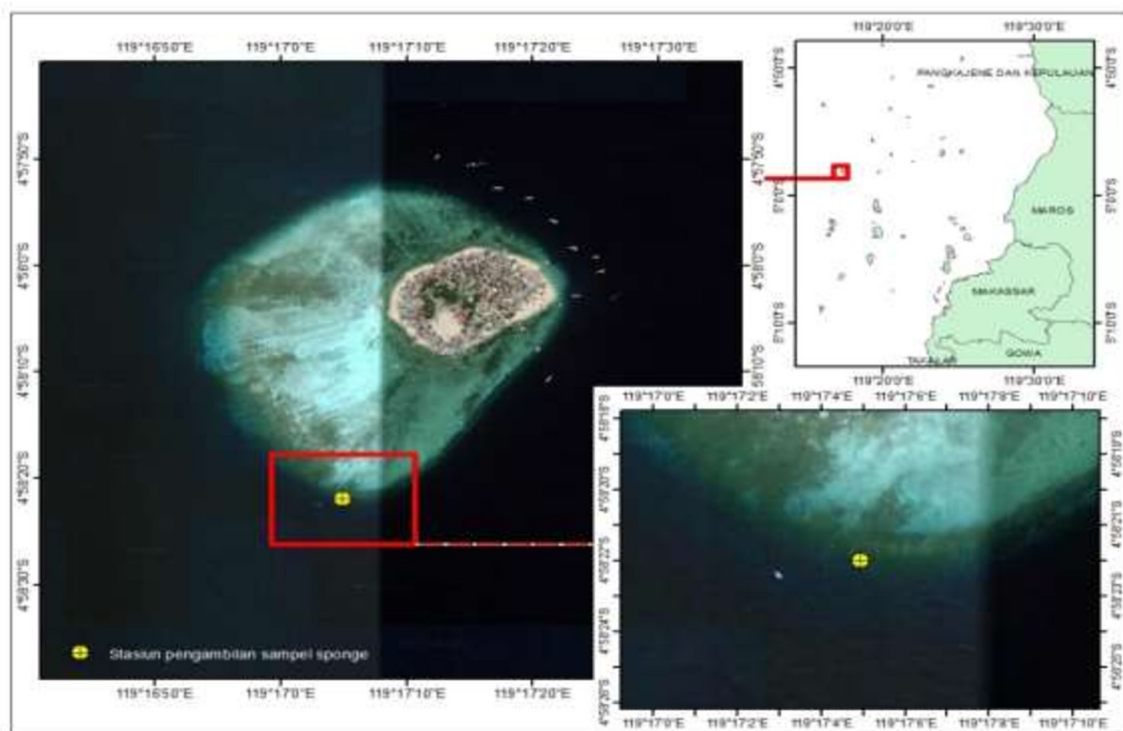


**Gambar 16.** Peta Lokasi Penelitian (Pulau Lae-Lae).

Makroalgae dikumpulkan dengan *snorkelling* di Pulau Lae-Lae. Pulau ini (Gambar 16) termasuk dalam wilayah administrasi Kelurahan Lae-Lae, Kecamatan

Ujung Pandang, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Secara geografis, Pulau Lae-Lae berada di perairan Selat Makassar pada posisi 119°23'33,1" BT dan 05°08'16,0" LS (Yusriana et al., 2019). Titik lokasi sampling di Pulau Lae-lae berada pada titik koordinat 119°23'41,5" BT 05°08'14,8" LS.

Spons dikumpulkan menggunakan tangan dengan *scuba diving* (kedalaman 10-18 m) dari Pulau Badi, Pangkep. Pulau Badi (Gambar 17) merupakan salah satu pulau dalam gugusan Kepulauan Spermonde, yang terbentang sepanjang Selat Makassar bagian Selatan. Secara administratif, pulau yang berbentuk bulat oval ini berada di Desa Mattiro Deceng, Kecamatan Liukang Tupabbiring, Kabupaten Pangkajene Kepulauan, Sulawesi Selatan. Titik lokasi sampling berada pada titik koordinat latitude 4°58'21.976224, dan longitude 119°17'4.923946.



**Gambar 17.** Peta Lokasi Penelitian (Pulau Badi).

## 2.2.3. Alat dan bahan

### 2.2.3.1. Alat

GPS (*Global Positioning System*), peralatan SCUBA, kamera *underwater*, *cool box*, timbangan digital, toples kaca, grinder/blender, pompa vacuum, corong Buchner, *suction*, rotary evaporator (Buchi), *round bottom flash*, lampu UV  $\lambda$  254 nm dan 365 nm, *tubes*, gelas kimia, pipet tetes, pipa kapiler, botol vial, batang pengaduk, cawan petri, *paper discs*, eppendorf, spuit suntik, jarum ose, autoclave, oven, Bunsen, Erlenmeyer, mikrotip, mikropipet, inkubator, *vortex*, kertas saring Whatman No.42, *hotplate with*

*magnetic stirrer, laminary air flow*, jangka sorong digital, plat KLT Si gel F<sub>254</sub>, *chamber* KLT.

### **2.2.3.2. Bahan**

*N*-heksan teknis (tk), etil asetat tk., aseton tk., DMSO (Dimetil Sulfoksida), ciprofloxacin, media TSA, media TCBS, media TSB, alkohol 70%, akuades, pereaksi Liebermann-Burchard, Wagner, Mayer, Dragendorf, dan besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>).

Bakteri *Vibrio* sp. (*Vibrio harveyi* M-120, *Vibrio parahaemolyticus* T-170, dan *Vibrio alginolyticus* B-425), spons, makroalgae, plastik *zip lock*, *gloves*, masker, aluminium foil, kertas label, spiritus, kapas, plastik *wrapping*.

### **2.2.4. Metode penelitian**

#### **2.2.4.1. Preparasi sampel**

Sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam *cool box*, dan diambil sebagian untuk diidentifikasi. Sampel dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan sisa kotoran yang melekat, kemudian ditiriskan dan ditimbang untuk mengetahui berat basah. Penghalusan dilakukan dengan blender atau grinder, dan hasil serbuk disimpan di plastik *zip lock* pada suhu kamar sampai akan digunakan.

#### **2.2.4.2. Identifikasi makroalgae**

Sampel makroalgae diidentifikasi di Laboratorium Produktivitas dan Kualitas Perairan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Identifikasi juga merujuk pada buku identifikasi *Philippine Seaweed* (Trono, 1988).

#### **2.2.4.3. Identifikasi spons**

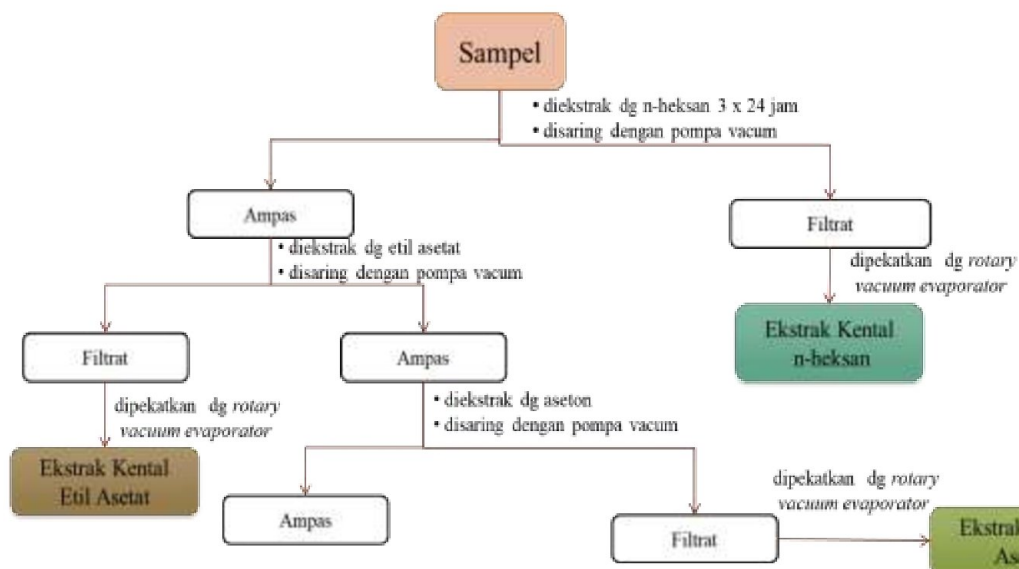
Identifikasi spons berdasarkan petunjuk buku identifikasi spons (Bergquist, 1968; 1970; Bergquist & Warne, 1980; Bergquist & Fromont, 1988; Levi et al., 1998; Dawson, 1993; Boury & Rutzler, 1997; Hooper, 2003; Kelly & Herr, 2015; Ackers et al., 2007), dan didukung dengan melihat bentuk skeleton dan spikula yang dianalisis di laboratorium Mikrobiologi Laut, FIKP, Unhas. Identifikasi bentuk pertumbuhan spons dilakukan dengan mengamati bentuk morfologi spons, kemudian dicocokkan dengan referensi (Berman et al., 2013; Boury & Rutzler, 1997). Proses identifikasi dilakukan dengan memotong sampel spons menjadi ukuran 3 cm, dan dilarutkan dalam natrium hipoklorit (NaClO) selama 2 jam, kemudian disentrifugasi untuk memisahkan supernatan dan presipitat. Presipitat dinetralkan dengan aquades dan ditambahkan alkohol 96%. Presipitat yang mengandung alkohol dan spikula diteteskan pada kaca preparat untuk diamati secara mikroskopis. Gambar spikula yang menyusun skeleton dibandingkan



dengan buku identifikasi. Sampel spons dikonfirmasi terlebih dahulu dengan foto kamera bawah air, kemudian dicocokkan dengan buku identifikasi spons yang merujuk pada pustaka. Klasifikasi spons merujuk pada buku *Systema Porifera* terbitan tahun 2002 dari berbagai penulis yang diedit oleh Hooper dan Van Soest. Buku ini merupakan bagian dari *World Register of Marine Species (WoRMS)* yang dapat diakses di *World Porifera Database* pada (<http://www.marinespecies.org/porifera/>).

#### 2.2.4.4. Ekstraksi sampel

Ekstraksi metabolit sekunder dilakukan dengan cara maserasi bertingkat, menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan aseton. Prosedur ekstraksi mengacu pada metode (Rosaline et al., 2017). Serbuk sampel direndam dalam pelarut *n*-heksan selama 3x24 jam. Filtrat dipisahkan dari ampasnya dengan cara penyaringan. Ampas hasil penyaringan dikeringkan dari pelarut dengan cara diangin-anginkan. Ampas yang telah bebas dari pelarut *n*-heksan dimaserasi kembali dalam pelarut etil asetat. Begitu selanjutnya sampai perendaman dengan pelarut aseton. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* Buchi pada suhu 50°C. Ekstrak yang telah dievaporasi, dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut menguap. Ekstrak ditimbang dan disimpan dalam lemari pendingin, sebelum digunakan sebagai sampel uji antibakteri.



**Gambar 18.** Diagram Alir Proses Ekstrak Kasar.

#### 2.2.4.5. Pembuatan suspensi bakteri uji

Turbiditas suspensi bakteri diukur berdasarkan metode (Wei et al., 2015). Turbiditas suspensi bakteri distandarkan terhadap 0,5 McFarland. Inokulum bakteri yang digunakan sebesar  $10^8$  cfu/ml.

McFarland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba menggunakan larutan barium klorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%. Standar kekeruhan McFarland ini untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu, dan memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada pengujian antimikroba.

Suspensi McFarland dibuat dengan mencampur larutan  $\text{BaCl}_2$  1% sebanyak 0,05ml dan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% sebanyak 9,95 ml. Standar kekeruhan yang digunakan yaitu 0,5 McFarland, dimana memiliki tingkat kekeruhan sebanding dengan  $1,5 \times 10^8$  colony forming unit (cfu)/ml. Medium TSB yang telah berisi bakteri dibandingkan dengan McFarland menggunakan Spectrophotometer pada panjang gelombang 600 nm. Hasil absorbansi dicatat dan disetarakan dengan nilai absorbansi pada konsentrasi McFarland.

#### 2.2.4.6. Uji aktivitas bakteri

Strain bakteri patogen yang digunakan sebagai bakteri uji adalah 3 strain dari koleksi kultur BPPBAP Maros dan Takalar (*Vibrio harveyi* M-120, *Vibrio parahaemolyticus* T-170, dan *Vibrio alginolyticus* B-425). Uji aktivitas antibakteri terdiri atas uji kontrol positif, negatif dan uji aktivitas antibakteri ekstrak. Uji kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin. Uji kontrol negatif menggunakan *n*-heksan, etil asetat, aseton, dan DMSO.

Metode yang digunakan pada uji ini adalah metode difusi agar (Bauer et al., 1966), dan *flying paper disc* (FPD) (Zainuddin et al., 2019; 2006). Suspensi bakteri uji diambil sebanyak 200  $\mu\text{l}$  (standar kekeruhan 0,5) menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam *tube* berisi 20 ml *Tryptic Soy Agar* (TSA). Suspensi dihomogenkan dengan vortex, dan dituang ke *petri discs* (diameter = 9 cm) secara perlahan. *Petri discs* didiamkan dalam *laminary air flow* hingga media TSA memadat.

*Sterile paper discs* berdiameter 6 mm direndam pada ekstrak dengan konsentrasi 2 mg dan 4 mg (25  $\mu\text{l}/\text{disc}$ ). *Paper discs* diuapkan hingga kering dari pelarutnya, kemudian *paper discs* diletakkan di permukaan agar yang mengandung bakteri. Cawan petri yang berisi ekstrak dan bakteri diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setiap uji dilakukan 3 replikasi. Aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper discs* yang diukur menggunakan jangka sorong. Penentuan tingkatan aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Tingkatan Aktivitas Antibakteri Berdasarkan Diameter Zona Hambat

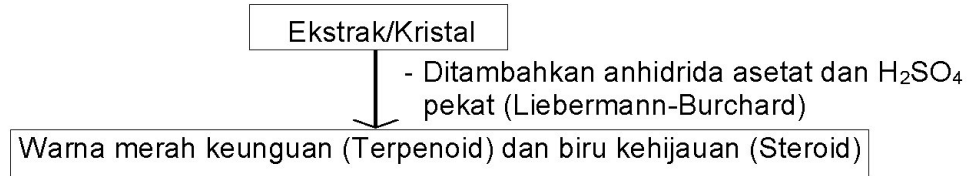
Diameter Zona Hambat	Aktivitas Antibakteri
15-20 mm	Tinggi
>11 - <15 mm	Sedang
$\leq 10$ mm	Lemah
6 mm	Inaktif

\*(Zainuddin, 2006)

### 2.2.4.7. Uji fitokimia

Uji identifikasi fitokimia digunakan untuk mengetahui kandungan kimia dalam suatu bahan secara kualitatif. Identifikasi yang dilakukan antara lain: uji alkaloid, uji flavonoid, uji steroid, uji terpenoid, dan uji fenol berdasarkan metode (Harborne, 1984) (Gambar 19).

#### 1) Uji Terpenoid dan Steroid



#### 2) Uji Alkaloid (Wagner)



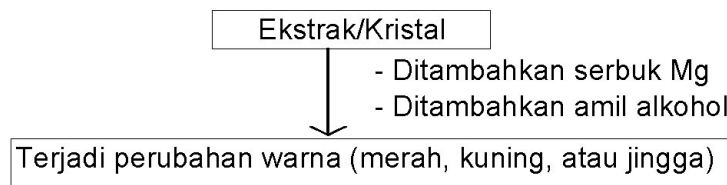
#### 3) Uji Alkaloid (Mayer)



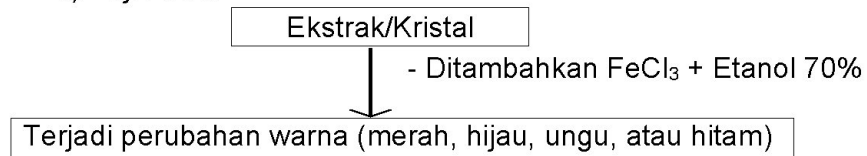
#### 4) Uji Alkaloid (Dragendorf)



#### 5) Uji Flavonoid



#### 6) Uji Fenol



**Gambar 19.** Diagram Alir Proses Fitokimia.

#### 2.2.4.8. Analisis data

Eksperimen dilakukan 3x ulangan ( $\bar{x}$ ). Data ditulis dalam bentuk *mean ± standard deviation* (SD). Pengujian hipotesis dengan analisis statistik *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* terhadap data diameter zona hambatan menggunakan SPSS 25.0 *software package*. Jika terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan ekstrak, maka dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat perbedaan antara rata-rata. *Significant differences* yang digunakan sebesar  $p < 0,05$ .

### 2.3. Hasil dan Pembahasan Makroalgae

#### 2.3.1. Identifikasi makroalgae

Makroalgae merupakan komponen sistem karang tropis. Berdasarkan penelitian Verheij & Reine (1993), yang mengumpulkan berbagai jenis algae (chlorophyta, phaeophyta, dan *non-coraline* rhodophyta) pada bulan November 1988-1990 di Kepulauan Spermonde, menyatakan terdapat 199 taxa algae. Taxa ini terbagi atas 80 Chlorophyta mempunyai 21 genera (termasuk genus *Padina*), 36 Phaeophyta mempunyai 11 genera (termasuk genus *Halimeda*), 83 *non-coraline* Rhodophyta mempunyai 40 genera, dan 35 taxa dari *corraline* algae.

*Padina australis* Hauck mempunyai warna *light brown* atau *yellowish-brown*, dengan *whitish* di beberapa bagian dikarenakan kalsifikasi cahaya. Alga ini dapat tumbuh hingga 15 cm, hidup soliter dan/atau dalam kluster, serta mempunyai lobus yang terpisah dengan diameter 2-8 cm. Spesies ini dapat ditemukan di zona pasang surut dan zona terumbu karang, dengan menempel pada substrat yang padat menggunakan holdfast discoid (Trono, 1988).



**Gambar 20.** *Padina australis* Hauck (Foto pribadi).

Alga *P. australis* Hauck pertama kali ditemukan di perairan Indonesia oleh (Verheij & Reine, 1993; Silva et al., 1996; Atmadja & Reine, 2014). Menurut Hauck (1887), klasifikasi *P. australis* sebagai berikut:

Phylum : Ochrophyta  
Class : Phaeophyceae  
Subclass : Dictyotophycidae  
Ordo : Dictyotales  
Famili : Dictyotaceae  
Genus : *Padina*  
Spesies : *Padina australis* Hauck (Guiry & Guiry, 2020)

Jenis makroalga lainnya yaitu *H. macroloba* Decaisne dari genus *Halimeda*. Genus ini dikenal sebagai *Calcareous algae*, dikarenakan tingginya kandungan kalsium karbonat di dalamnya (50-90%, *dry weight*). Spesies ini juga menjadi penyumbang utama terhadap struktur *coral reef* (Paul & Fenical, 1983). *H. macroloba* Decaisne dari genus *Halimeda*, mempunyai warna *bright green* serta *cream* atau *greenish*. Tumbuhan ini dapat tumbuh hingga 12 cm, dan mempunyai *holdfast* berbentuk bulat yang dapat memanjang sekitar 4,5 cm. Umumnya spesies ini dapat ditemukan di perairan dangkal dengan menempel pada hamparan pasir, dan dekat dengan habitat padang lamun (Trono, 1988).

*Halimeda macroloba* Decaisne pertama kali ditemukan di perairan Indonesia oleh (Verheij & Reine, 1993; Silva et al., 1996; Atmadja & Reine, 2014). Menurut Decaisne (1841), klasifikasi *H. macroloba* sebagai berikut:

Phylum : Chlorophyta  
Subphylum : Chlorophytina  
Class : Ulvophyceae  
Ordo : Bryopsidales  
Famili : Halimedaceae  
Genus : *Halimeda*  
Spesies : *Halimeda macroloba* Decaisne (Guiry & Guiry, 2020)



**Gambar 21.** *Halimeda macroloba* Decaisne (Foto pribadi).

### 2.3.2. Ekstraksi sampel makroalgae

Berdasarkan hasil ekstraksi sampel makroalgae, diperoleh berat basah, berat kering, dan berat ekstrak dari masing-masing sampel (Tabel 2). Nilai rendemen terendah diperlihatkan oleh makroalga *P. australis* dari ekstrak *n*-heksan dengan presentase 0,05%. Rendemen ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan pelarut polar memperlihatkan presentase yang lebih tinggi dibanding pelarut non polar.

**Tabel 2.** Berat Basah, Berat Kering, dan Berat Ekstrak Makroalgae

Spesies	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Pelarut	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
<i>Padina australis</i>	3000	810	<i>N</i> -heksan	0,47	0,05
			Etil asetat	0,75	0,09
			Aseton	5,04	0,62
<i>Halimeda macroloba</i>	1285	100	<i>N</i> -heksan	0,36	0,36
			Etil asetat	2,79	2,79
			Aseton	1,51	1,51

### 2.3.3. Aktivitas antibakteri dan uji fitokimia makroalgae

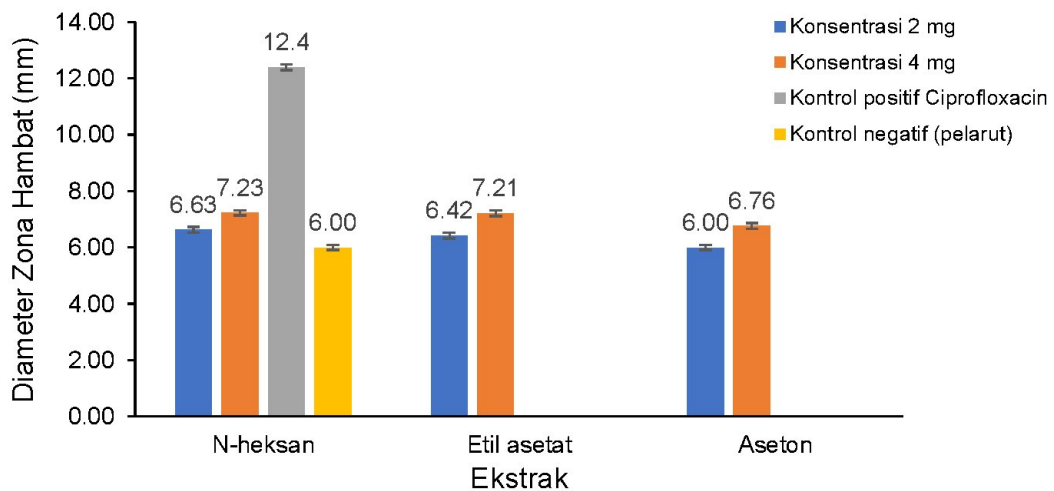
Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar dilakukan terhadap 3 jenis bakteri yaitu *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. alginolyticus*. Aktivitas antibakteri masing-masing ekstrak dinyatakan dalam millimeter yang diukur berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling *paper discs*. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar makroalgae terhadap 3 jenis bakteri patogen dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Diameter Zona Hambat Makroalgae (*Mean* ± *SD*)

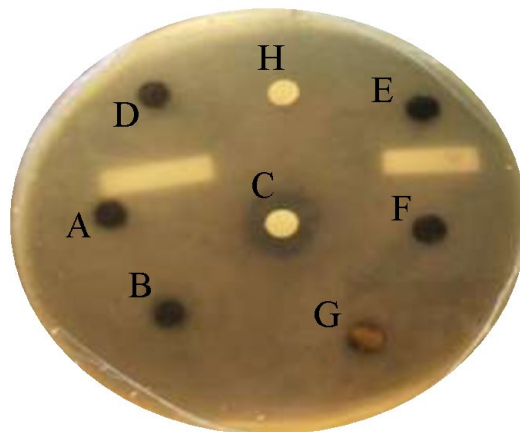
Ekstrak	Bakteri		
	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<b><i>Halimeda macroloba</i></b>			
<b>Konsentrasi 2 mg</b>			
<i>N</i> -heksan	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0
Etil asetat	6,22 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,44 ± 0,13 <sup>b</sup>	6,00 ± 0
Aseton	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0
<b>Konsentrasi 4 mg</b>			
<i>N</i> -heksan	6,19 ± 0,06 <sup>b</sup>	6,66 ± 0,16 <sup>a</sup>	6,00 ± 0
Etil asetat	6,90 ± 0,36 <sup>c</sup>	7,20 ± 0,53 <sup>b</sup>	6,00 ± 0
Aseton	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	6,00 ± 0
<b>Ciprofloxacin</b>	15,46 ± 0,42	8,47 ± 1,10	10,53 ± 0,74
<b><i>Padina australis</i></b>			
<b>Konsentrasi 2 mg</b>			
<i>N</i> -heksan	6,63 ± 0,32 <sup>c</sup>	6,00 ± 0	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
Etil asetat	6,42 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,00 ± 0	6,17 ± 0,13 <sup>b</sup>
Aseton	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
<b>Konsentrasi 4 mg</b>			
<i>N</i> -heksan	7,23 ± 0,13 <sup>b</sup>	6,00 ± 0	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
Etil asetat	7,21 ± 0,30 <sup>c</sup>	6,00 ± 0	6,96 ± 0,15 <sup>c</sup>
Aseton	6,76 ± 0,20 <sup>a</sup>	6,00 ± 0	6,52 ± 0,34 <sup>b</sup>
<b>Ciprofloxacin</b>	12,40 ± 0,95	14,98 ± 1,61	11,08 ± 1,81

\*Significant differences  $p < 0,05$ ; Nilai termasuk *paper disc* 6 mm

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak etil asetat *P. australis* Hauck dapat menghambat bakteri *V. harveyi*, dan *V. parahaemolyticus* (Tabel 3). Ekstrak *n*-heksan tidak memperlihatkan aktivitas (6,00 mm ± 0), baik pada konsentrasi 2 mg maupun 4 mg terhadap *V. parahaemolyticus*. Konsentrasi 4 mg dari ke-3 ekstrak (*n*-heksan, etil asetat, dan aseton) menghasilkan daya hambat lebih tinggi daripada konsentrasi 2 mg (Gambar 22). Nilai hambat dengan aktivitas antibakteri lemah diperlihatkan oleh ekstrak *n*-heksan, pada konsentrasi 4 mg terhadap *V. harveyi* sebesar 7,23 mm ± 0,13, diikuti etil asetat (7,21 mm ± 0,30), dan aseton (6,76 mm ± 0,20) (Gambar 23).



**Gambar 22.** Grafik Diameter Zona Hambat (*mean values* (mm +/- SE)) *Padina australis* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio harveyi*.



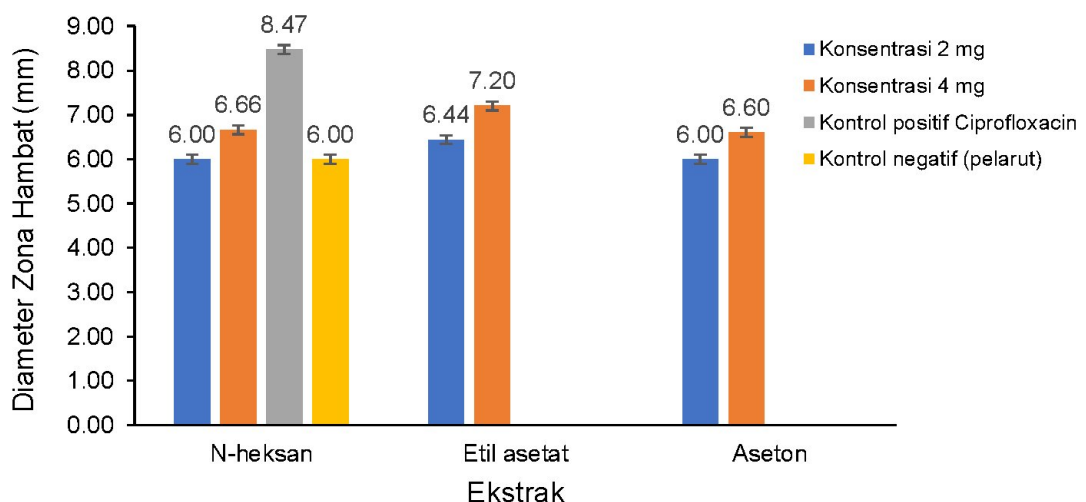
Keterangan :  
 A = Ekstrak etil asetat 2 mg  
 B = Ekstrak etil asetat 4 mg  
 C = Kontrol positif (ciprofloxacin)  
 D = Ekstrak aseton 2 mg  
 E = Ekstrak aseton 4 mg  
 F = Ekstrak *n*-heksan 2 mg  
 G = Ekstrak *n*-heksan 4 mg  
 H = Kontrol negatif (pelarut)

**Gambar 23.** Aktivitas Antibakteri *Padina australis* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio harveyi*.

Ekstrak kasar aseton tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap 3 jenis bakteri patogen *Vibrio* sp. (6,0 mm). Bakteri *V. alginolyticus* dihambat oleh ke-3 ekstrak dengan aktivitas antibakteri lemah. Pertumbuhan ketiga bakteri patogen dapat dihambat dengan sedang oleh kontrol positif ciprofloxacin (11,08 - 14,98 mm). Menurut Zainuddin, (2006), nilai zona hambat  $\leq 10$  mm dikategorikan lemah,  $>11 - <15$  mm dikategorikan sedang, dan 15-20 mm dikategorikan tinggi aktivitas antibakteri. Jika disesuaikan dengan Zainuddin, (2006), maka nilai zona hambat pada *P. australis* yang diperoleh dalam penelitian ini termasuk kategori aktivitas antibakteri lemah (Tabel 1).

Berdasarkan hasil uji statistik *one-way* ANOVA, menunjukkan bahwa adanya perbedaan signifikan antar ekstrak ( $p < 0,05$ ). Uji lanjut Tukey dilakukan terhadap bakteri *V. harveyi*, nilai zona hambat tertinggi diperlihatkan oleh ekstrak *n*-heksan ( $7,23 \text{ mm} \pm 0,13$ ), yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan ekstrak lainnya (etil asetat dan aseton). Pengujian Tukey lainnya menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat ( $6,96 \text{ mm} \pm 0,15$ ) terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*, berbeda nyata dengan *n*-heksan dan aseton. Ekstrak *n*-heksan menunjukkan tidak aktif ( $6,00 \text{ mm} \pm 0$ ) terhadap 3 bakteri Gram negatif *Vibrio* sp.

Aktivitas antibakteri *H. macroloba* dari ke-3 ekstrak (*n*-heksan, etil asetat, dan aseton) terhadap 3 bakteri Gram negatif dapat dilihat pada Tabel 3. Ekstrak kasar etil asetat *H. macroloba* dapat menghambat bakteri *V. harveyi*, dan *V. alginolyticus* pada semua konsentrasi. Konsentrasi 4 mg menghasilkan nilai hambat lebih tinggi dari 2 mg, baik pada *P. australis* Hauck maupun *H. macroloba*.



**Gambar 24.** Grafik Diameter Zona Hambat (*mean values* (mm  $\pm$  SE)) Ekstrak *Halimeda macroloba* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio alginolyticus*.

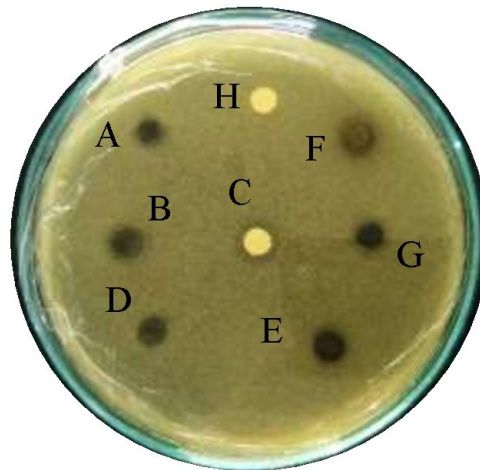
Diameter zona hambat tertinggi diperoleh dari ekstrak etil asetat pada konsentrasi 4 mg terhadap *V. alginolyticus* sebesar  $7,20 \text{ mm} \pm 0,53$ , diikuti *n*-heksan



(6,66 mm ± 0,16), dan aseton (6,60 ± 0,20) (Gambar 24 dan 25). Ekstrak *n*-heksan dan aseton menghambat *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dengan aktivitas lemah pada konsentrasi 2 mg.

Ketiga ekstrak tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (6,00 mm ± 0) terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Tidak hanya *P. australis* Hauck, ekstrak kasar aseton *H. macroloba* juga tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap 3 jenis bakteri patogen *Vibrio* sp. Ketiga ekstrak dari 2 jenis algae tidak ada yang dapat menghasilkan nilai zona hambat lebih tinggi dari kontrol positif ciprofloxacin. Nilai zona hambat yang diperoleh *H. macroloba* termasuk kategori dengan aktivitas lemah (6,2 -7,2 mm) (Tabel 1).

Uji Tukey menunjukkan bahwa terhadap bakteri *V. harveyi*, nilai zona hambat tertinggi diperlihatkan oleh ekstrak etil asetat (6,90 mm ± 0,36), yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan ekstrak lainnya (*n*-heksan dan aseton). Pengujian Tukey lainnya juga menunjukkan bahwa nilai zona hambat tertinggi terhadap bakteri *V. alginolyticus* yaitu ekstrak etil asetat, yang berbeda nyata dengan *n*-heksan dan aseton. Ekstrak *n*-heksan dan aseton menunjukkan tidak berbeda ( $p > 0,05$ ) terhadap *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*.



Keterangan : A = Ekstrak etil asetat 2 mg  
B = Ekstrak etil asetat 4 mg  
C = Kontrol positif (ciprofloxacin)  
D = Ekstrak aseton 2 mg  
E = Ekstrak aseton 4 mg  
F = Ekstrak *n*-heksan 2 mg  
G = Ekstrak *n*-heksan 4 mg  
H = Kontrol negatif (pelarut)

**Gambar 25.** Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Halimeda macroloba* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio alginolyticus*.

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam makroalgae yang berperan sebagai antibakteri, dapat diketahui dengan suatu metode pendekatan. Salah satu

metode yang dapat digunakan adalah metode uji fitokimia. Hasil fitokimia yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh jenis makroalgae itu sendiri. Kandungan fitokimia berbeda-beda pada tiap jenis makroalgae (Lantah et al., 2017).

Berdasarkan hasil uji fitokimia (Tabel 4), menunjukkan bahwa ekstrak kasar *P. australis* terdapat beberapa golongan senyawa. Alga ini didominasi oleh kelas steroid, terpenoid, dan fenol, tetapi kandungan alkaloid lemah. Beberapa studi mendukung bahwa *P. australis* mengandung steroid, terpenoid, fenol, dan tannin. Senyawa ini yang memungkinkannya dapat menghambat berbagai strain bakteri patogen (Maharany et al., 2017; Nursid & Noviendri, 2017).

Makroalga jenis lainnya, *H. macroloba*, juga didominasi kandungan steroid dan terpenoid, tetapi kandungan alkaloid lemah, ditandai dengan reagen Wagner saja yang memberikan hasil positif kandungan alkaloid. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini didukung oleh beberapa studi literatur, yang menyatakan adanya steroid dan terpenoid ditemukan dalam alga *Halimeda* sp. (Paul & Fenical, 1984; Hendri et al., 2015).

**Tabel 4.** Uji Fitokimia Makroalgae

No	Fitokimia	N-heksan	Etil asetat	Aseton
<b><i>Padina australis</i></b>				
1	Alkaloid	-	+	+
2	Flavonoid	-	-	-
3	Steroid	++	+	-
4	Terpenoid	++	+	-
5	Fenol	-	-	++
<b><i>Halimeda macroloba</i></b>				
1	Alkaloid	-	+	+
2	Flavonoid	-	-	-
3	Steroid	++	+	-
4	Terpenoid	++	+	-
5	Fenol	-	-	+

(-) Negatif; (+) Positif lemah; (++) Positif kuat

#### 2.3.4. Pembahasan

Ekstrak *P. australis* Hauck dapat menghambat bakteri *V. harveyi*, dan *V. parahaemolyticus*, yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar *paper discs*. Sampel makroalga lainnya, *H. macroloba*, dapat menghambat bakteri *V. harveyi*, dan *V. alginolyticus*. Kedua jenis algae menghasilkan nilai zona hambat (6,2 - 7,23 mm) dengan aktivitas antibakteri lemah terhadap *Vibrio* sp.

Ekstrak etil asetat menghasilkan aktivitas antibakteri lebih tinggi dari n-heksan dan aseton pada ke-2 jenis algae (*P. australis* dan *H. macroloba*) terhadap *Vibrio* sp. Hal ini didukung penelitian Pushparaj et al., (2014), menyatakan bahwa ekstrak etil asetat mempunyai aktivitas menghambat bakteri yang bagus terhadap bakteri Gram positif dan negatif. Ekstrak etil asetat juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

Penelitian lain tentang antibakteri *P. australis* menggunakan ekstrak etil asetat, menunjukkan nilai zona hambat lebih tinggi dibanding pelarut lain (Wei et al., 2015; Natrah et al., 2015).

Berdasarkan studi literatur, alga *P. australis* dari Aceh, Indonesia dapat menghambat optimum pada konsentrasi 80% terhadap *V. harveyi* (Gazali & Safutra, 2016). Demikian juga alga *P. australis* dari perairan Teluk Totok, Manado, dan Padike, Madura, Indonesia, mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* (Zailanie, 2016; Puasa et al., 2018). Spesies algae lainnya yaitu *H. macroloba*, juga menunjukkan aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambat bervariasi terhadap beberapa bakteri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, dan *Pseudomonas aeruginosa*). Ekstrak metanol dari *H. macroloba* mengandung aktivitas antibakteri lebih tinggi dibanding ekstrak aseton. Ekstrak metanol menunjukkan aktivitas tertinggi terhadap bakteri *S. aureus* (18 mm), *P. mirabilis* (16 mm), *E. coli* (16 mm), dan *P. aeruginosa* (11 mm) (Fenical & Paul, 1984; Govindasamy et al., 2011). Menurut Kolanjinathan et al., (2009), menyatakan bahwa aktivitas antibakteri dari kelas Chlorophyceae (62,5%) lebih tinggi daripada Phaeophyceae (61,9%). Berbeda dengan penelitian Rozirwan yang menghasilkan penelitian ekstrak *Halimeda* sp. tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio* sp. (Rozirwan et al., 2018).

Secara umum komponen fitokimia yang terdapat dalam ekstrak *P. australis* dan *H. macroloba* adalah steroid, terpenoid, fenol, dan alkaloid. Kandungan fenol dari alga coklat *P. australis* Hauck menunjukkan positif kuat. Alga coklat *P. australis* Hauck diketahui aktif sebagai antibakteri, dikarenakan adanya senyawa fenol. Senyawa fenol menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak fungsi membran sitoplasma bakteri (Zailanie, 2016). Polifenol atau senyawa fenol dapat menghambat bakteri Gram positif dan negatif. Polifenol terbagi atas phloroglucinol dan phlorotannin. Phlorotannin merupakan *oligomeric polyphenol* dari kelas phloroglucinol yang dilengkapi halogen atau hidroksil (Pérez et al., 2016).

Menurut Peng et al., (2015), menyatakan phlorotannin mengandung polimer phloroglucinol yang hanya terdapat di algae coklat. Senyawa ini terbagi atas 6 subkelas utama, antara lain: *eckols*, *fuhals*, *fucophlorethols*, *fucols*, *phlorethols*, dan *isofuhals*, yang mempunyai aktivitas biologi sebagai bakterisidal. Senyawa phloroglucinol (1), eckol (2), fucofuroeckol-A (3), phlorofucufuroeckol-A (4), dioxinodehydroeckol (5), 8,80-bieckol (6), 7-phloroekol (7), and dieckol (8) berpotensi aktif sebagai antibakteri. Senyawa-senyawa ini yang mendukung algae coklat sebagai antibakteri terhadap sejumlah bakteri patogen (Nagayama et al., 2002; Choi et al., 2014; Eom et al., 2012).

Alga *Halimeda* terdapat senyawa terpenoid yang memungkinkannya sebagai antibakteri. Senyawa-senyawa halimedatrial, triacetate, halimedalactone, tetraacetate,

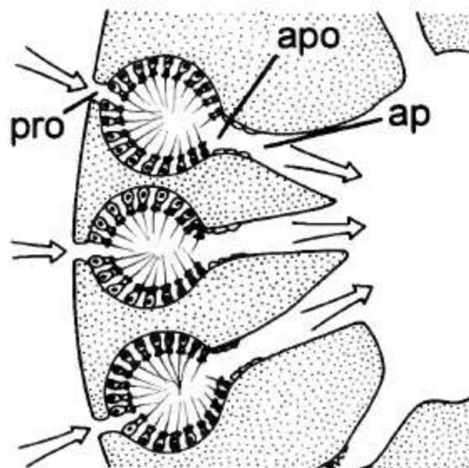
dan bis-nor diterpenoid yang telah diisolasi dari beberapa spesies *Halimeda* sp. mempunyai aktivitas terhadap bakteri *Vibrio* sp., *B. subtilis*, dan *S. aureus* (Paul & Fenical, 1984; Fenical & Paul, 1984). Diterpenoid yang diisolasi dari *H. macroloba* berbeda dengan spesies *Halimeda* lainnya, yaitu adanya *meta substituted benzaldehyde group*. Halimedatrial (turunan diterpenoid trialdehyde), dan halimedatetraacetate (turunan diterpenoid tetraacetate) merupakan metabolit sekunder paling banyak ditemukan pada algae *Halimeda*. Keduanya aktif sebagai antibakteri terhadap sejumlah mikroorganisme laut (*V. splendida*, *V. leiognathid*, *V. harveyi*) (Paul & Fenical, 1983; 1984; Fenical & Paul, 1984).

Data nilai zona hambat dan fitokimia pada *H. macroloba* dan *P. australis* yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi awal tentang potensi dan profil kandungan senyawa bioaktif yang ada pada ke-2 jenis algae. Data ini juga menjadi acuan (referensi) dan bahan pertimbangan untuk dilanjutkan fraksinasi dan elusidasi struktur.

## 2.4. Hasil dan Pembahasan Spons

### 2.4.1. Identifikasi spons

Sampel dalam penelitian ini terdiri atas 3 jenis spons (*X. testudinaria*, *C. aerizusa*, dan *H. fascigera*). Ketiga spons termasuk ke dalam kelas Demospongiae. Demospongiae merupakan kelas spons terbesar yang mencakup 90% dari seluruh jenis spons. Kelas ini terdiri atas spons dengan spikula silikon dioksida ( $\text{SiO}_2$ ), dan/atau pasir, dan/atau kolagen fibrillar, dan/atau kolagen berserat (spongin). Megasclere pada kelas ini biasanya monakson atau tetraxon (meskipun triakson hadir dalam Homoscleromorpha). Spongin ada melengkapi kerangka mineral, baik dengan mempererat spikula atau dengan membentuk serat. Spons dari kelas Demospongiae bertulang lunak karena tidak memiliki rangka.



**Gambar 26.** Sistem Saluran Air Leukonoid (Boury & Rutzler, 1997).

Seluruh spons dari kelas Demospongiae memiliki sistem saluran air tipe leukonoid (Gambar 26). Tipe ini adalah tipe sistem saluran air yang paling kompleks. Air masuk melalui ostium menuju ke rongga-rongga bulat yang saling berhubungan, kemudian mengalir menuju spongosol, dan keluar melalui osculum.

Klasifikasi Demospongiae didasarkan pada pola reproduksi, jenis larva, serta karakter spikula dan kerangka. Salah satu ordo dari klasifikasi kelas Demospongiae yaitu Haplosclerida. Ordo Haplosclerida sangat melimpah di terumbu karang, dimana hidup dalam cahaya penuh di antara karang keras atau di antara karang di padang lamun. Haplosclerida umumnya tidak mencapai bentuk ukuran massif, kecuali famili Petrosiidae. Spons dari famili Petrosiidae berukuran besar, berbentuk vas atau gunung berapi, bulat, berbentuk kepalan, kipas, tabung, cabang atau morfologi bercabang. Teksturnya bersifat berbatu dan rapuh, yang menandakan bahwa sebagian besar spikula mengandung silika dominan pada spongin. Reproduksi bersifat ovipar, dengan ciri tempat telur dan sperma dilepaskan ke dalam air dan larva berkembang secara eksternal ke induknya (Levi et al., 1998; Hooper, 2003; Kelly & Herr, 2015; Ackers et al., 2007).

Famili lainnya, Chalinidae, dan Callyspongiidae dari ordo Haplosclerida, mempunyai spikula yang tertanam dalam serat spongin di saluran uni atau multispikuler. Susunan kerangka rapi, teratur, dan tidak padat. Kerangka ini membentuk retikulasi segitiga isodictyal. Spikula dan serat juga membentuk jala segitiga, persegi panjang, atau poligonal. Spesies dari famili Chalinidae dan Callyspongiidae termasuk kelompok vivipar yang menginkubasi spons muda (Levi et al., 1998; Hooper, 2003; Kelly & Herr, 2015; Ackers et al., 2007).

*Xestospongia testudinaria* merupakan spons dari famili Petrosiidae. Spons ini berwarna merah muda dengan bentuk pertumbuhan *massive* (struktur besar dan kompak) (Gambar 27), memiliki konsistensi permukaan kasar, dan rapuh. Spikula berbentuk megasklera oxea dan strongyle (Gambar 29). Spesies ini mempunyai aroma bau menyengat. Sebaran spons jenis ini dapat dijumpai pada seluruh zona terumbu karang (*lower fore reef*, *upper fore reef* dan *reef crest*). Klasifikasi *X. testudinaria* menurut Lamarck (1815), antara lain:

Kingdom : Animalia

Filum : Porifera

Kelas : Demospongiae

Ordo : Haplosclerida

Famili : Petrosiidae

Genus : *Xestospongia*

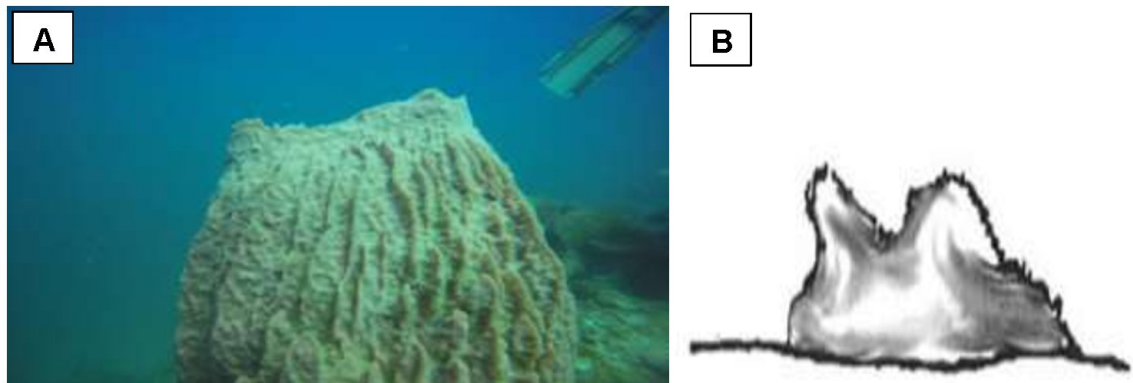
Spesies : *Xestospongia testudinaria*

Sinonim : *Alcyonium testudinarium* (Lamarck, 1815)

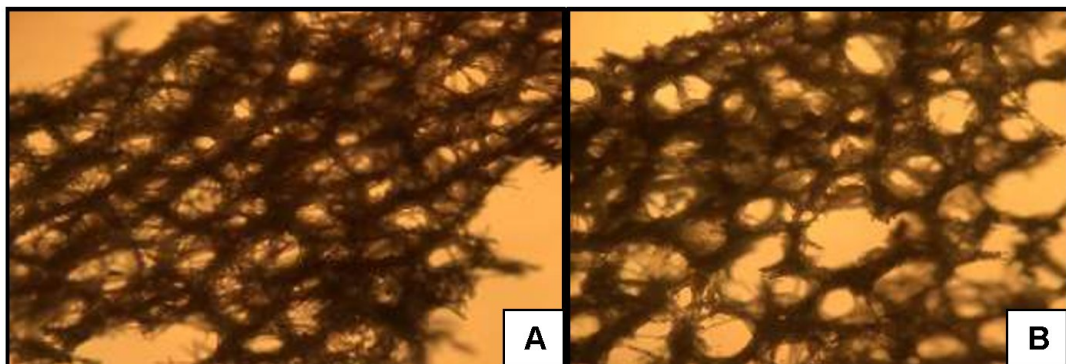
*Petrosia testudinaria* (Lamarck, 1815)

*Reniera crateriformis* (Carter, 1882)

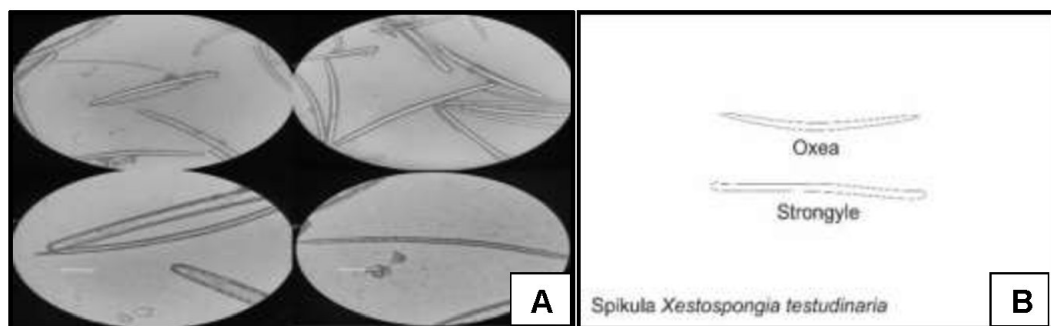
*Reniera testudinaria* (Lamarck, 1815)



**Gambar 27.** (A) *Xestospongia testudinaria* (Foto pribadi), (B) Bentuk Pertumbuhan Massive (Berman et al., 2013).



**Gambar 28.** Kerangka *Xestospongia testudinaria*: A) Ectosomal, B) Choanosomal.

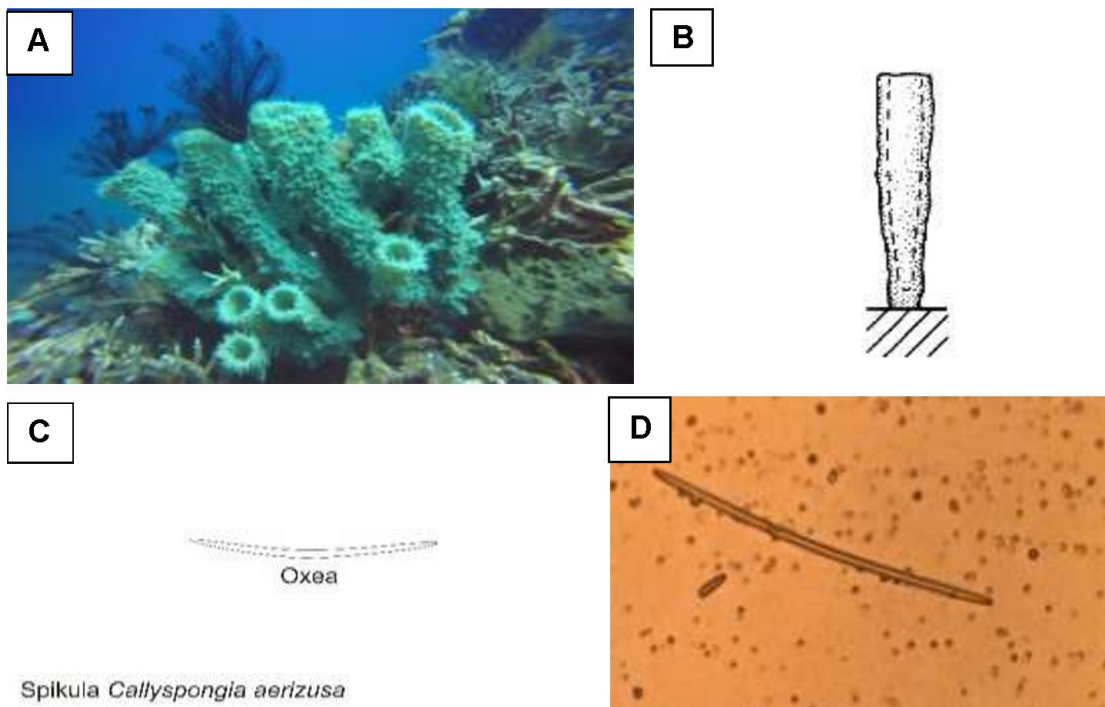


**Gambar 29.** Spikula *Xestospongia testudinaria*: (A) Foto Pribadi, (B) (Ackers et al., 2007).

*Callyspongia aerizusa* merupakan spesies spons yang tergolong dalam kelas Demospongiae, genus *Callyspongia*, dan famili Callyspongiidae. Spons *C. aerizusa* berwarna hijau kebiruan dengan bentuk pertumbuhan *tubular* (berongga dan tegak silinder). Spons ini memiliki permukaan yang kasar dan berduri, serta memiliki spikula

megasklera *oxea* (Gambar 30). Sebaran spons *C. aerizusa* dapat dijumpai pada zona *lower fore reef* dan *upper fore reef*. Klasifikasi *C. aerizusa* menurut Desqueyroux-Faúndez (1984), antara lain:

Kingdom : Animalia  
Filum : Porifera  
Kelas : Demospongiae  
Ordo : Haplosclerida  
Famili : Callyspongiidae  
Genus : *Callyspongia*  
Spesies : *Callyspongia aerizusa*



**Gambar 30.** *Callyspongia aerizusa* : (A) Foto Bawah Laut, (B) Bentuk Pertumbuhan Tubular (Boury & Rutzler, 1997), (C) Spikula (Ackers et al., 2007), (D) Foto Pengamatan Spikula.

*Haliclona fascigera* merupakan spons berwarna biru dengan bentuk pertumbuhan *tubular* (berongga dan tegak silinder) (Gambar 31). Spons ini memiliki konsistensi permukaan yang halus, dan bentuk spikula megasklera *oxea* (Gambar 33). *H. fascigera* dapat dijumpai pada zona *lower fore reef* dan *upper fore reef*. Klasifikasi *H. fascigera* menurut Hentschel (1912), sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Filum : Porifera  
Kelas : Demospongiae  
Ordo : Haplosclerida

Famili : Chalinidae

Genus : *Haliclona*

Spesies : *Haliclona (Reniera) fascigera*

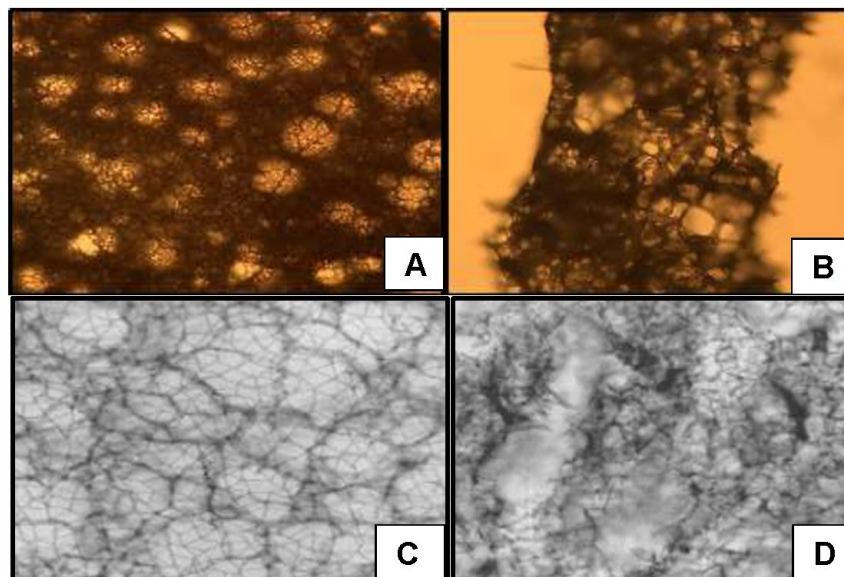
Sinonim : *Kallypilidion fascigera* (Hentschel, 1912)

*Kallypilidion poseidon* de Laubenfels, 1954

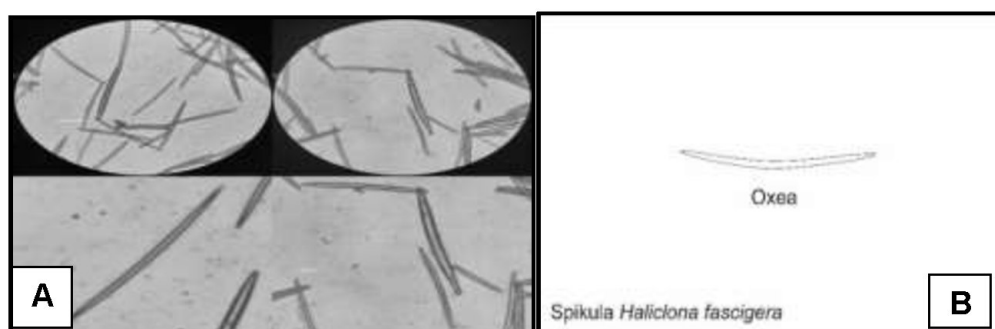
*Siphonochalina fascigera* (Hentschel, 1912)



**Gambar 31.** (A) *Haliclona (Reniera) fascigera* (Foto pribadi), (B) Bentuk Pertumbuhan Tubular (Boury & Rutzler, 1997).



**Gambar 32.** Kerangka *Haliclona fascigera* : (A) Ectosomal dan (B) Choanosomal (Foto pribadi), (C) Ectosomal dan (D) Hoanosomal (Hooper & Van Soest, 2002).



**Gambar 33.** Spikula *Haliclona fascigera* : (A) Foto Pribadi, (B) (Ackers et al., 2007).



#### 2.4.2. Ekstraksi sampel spons

Berdasarkan hasil ekstraksi sampel spons, diperoleh berat basah, berat kering, dan berat ekstrak dari masing-masing sampel (Tabel 5). Nilai rendemen tertinggi diperlihatkan oleh spesies spons *C. aerizusa* dari ekstrak aseton dengan persentase rendemen 5,06%. Rendemen ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan pelarut polar memperlihatkan presentase yang lebih tinggi dibanding pelarut non polar.

**Tabel 5.** Berat Basah, Berat Kering, dan Berat Ekstrak Spons

Spesies	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Pelarut	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
<i>Callyspongia aerizusa</i>	1100	105	N-heksan	0,16	0,15
			Etil asetat	0,15	0,14
			Aseton	5,32	5,06
<i>Xestospongia testudinaria</i>	950	340	N-heksan	2,84	0,83
			Etil asetat	1,06	0,31
			Aseton	4,49	1,32
<i>Haliclona fascigera</i>	800	100	N-heksan	0,13	0,13
			Etil asetat	0,22	0,22
			Aseton	0,11	0,11

#### 2.4.3. Aktivitas antibakteri dan uji fitokimia spons

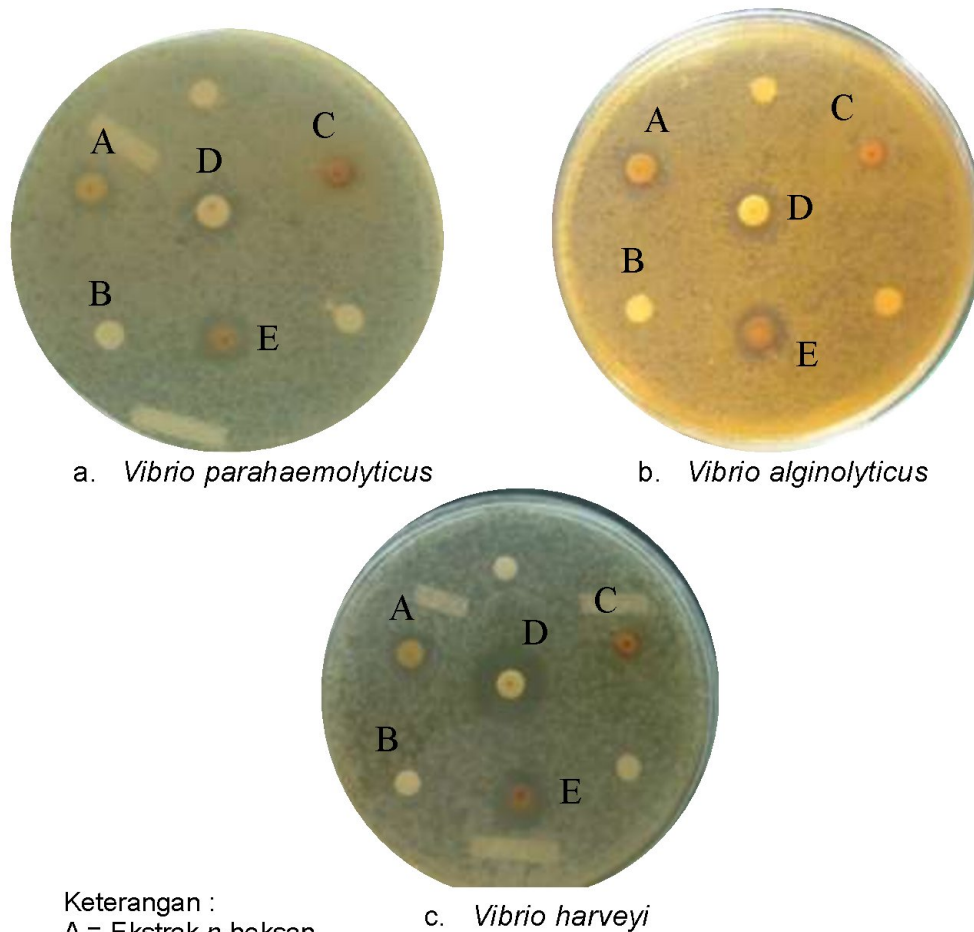
Jenis spons dari Pulau Badi telah diidentifikasi sebagai *X. testudinaria*, *C. aerizusa*, dan *H. fascigera* menggunakan *microscopic identification of long slender spicules*. Penelitian pada bab ini berfokus pada mengevaluasi kemampuan ekstrak dari ke-3 jenis spons, dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio* sp. Ketiga jenis spons telah diuji aktivitas antibakterinya yang dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Diameter Zona Hambat Spons (*Mean ± SD*)

Ekstrak	Bakteri		
	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<b><i>Callyspongia aerizusa</i></b>			
N-heksan	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
Etil asetat	6,66 ± 0,88 <sup>b</sup>	6,87 ± 0,36 <sup>b</sup>	6,84 ± 0,11 <sup>b</sup>
Aseton	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
<b>Ciprofloxacin</b>	8,59 ± 0,94	7,85 ± 0,48	9,34 ± 1,45
<b><i>Haliclona fascigera</i></b>			
N-heksan	6,00 ± 0	6,00 ± 0	8,07 ± 0,52 <sup>c</sup>
Etil asetat	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
Aseton	6,00 ± 0	6,00 ± 0	7,62 ± 1,51 <sup>b</sup>
<b>Ciprofloxacin</b>	16,24 ± 0,79	10,45 ± 0,69	8,90 ± 0,45
<b><i>Xestospongia testudinaria</i></b>			
N-heksan	8,24 ± 1,23 <sup>b</sup>	8,91 ± 0,7 <sup>b</sup>	7,40 ± 1,03 <sup>ab</sup>
Etil asetat	12,09 ± 0,55 <sup>c</sup>	9,77 ± 0,28 <sup>c</sup>	8,01 ± 0,14 <sup>b</sup>
Aseton	6,00 ± 0 <sup>a</sup>	6,0 ± 0 <sup>a</sup>	6,00 ± 0 <sup>a</sup>
<b>Ciprofloxacin</b>	16,95 ± 1,02	9,87 ± 1,88	8,10 ± 0,15

\*Konsentrasi 2 mg; p<0,05; Nilai termasuk *paper disc* 6 mm

Ekstrak spons tertinggi terhadap bakteri patogen *Vibrio* sp. ditunjukkan oleh ekstrak *X. testudinaria*. Spons *X. testudinaria* mempunyai aktivitas antibakteri lemah-sedang (8-12 mm) (Tabel 1). Zona bening yang diperlihatkan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat memiliki spektrum luas sebagai antibakteri, sehingga dapat menghambat 3 jenis bakteri (Gambar 34). Kedua ekstrak dapat menghambat *Vibrio* sp. dengan kisaran diameter zona hambat 7,40-12,09 mm. *V. harveyi* dapat dihambat dengan sedang oleh ekstrak etil asetat sebesar 12,09 mm (Gambar 35).

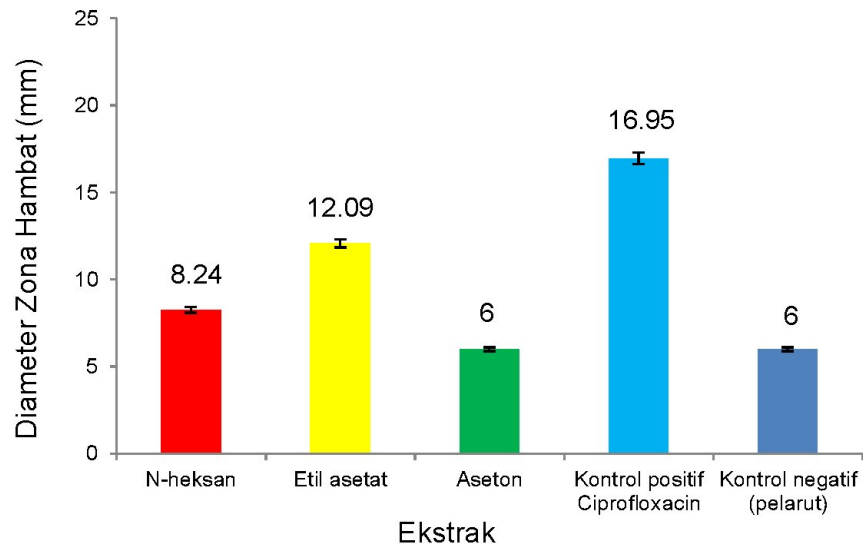


Keterangan :  
A = Ekstrak *n*-heksan  
B = Kontrol negatif (pelarut)  
C = Ekstrak aseton  
D = Kontrol positif (ciprofloxacin)  
E = Ekstrak etil asetat

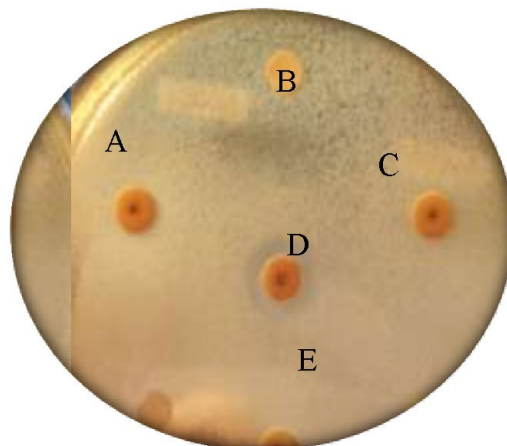
**Gambar 34.** Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Xestospongia testudinaria* terhadap Bakteri Patogen a) *Vibrio parahaemolyticus*, b) *Vibrio alginolyticus*, dan c) *Vibrio harveyi*.

Uji Tukey menunjukkan bahwa terhadap bakteri *V. harveyi*, nilai zona hambat tertinggi diperlihatkan oleh ekstrak etil asetat ( $12,09 \text{ mm} \pm 0,55$ ), yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan ekstrak lainnya (*n*-heksan dan aseton). Pengujian Tukey lainnya menunjukkan bahwa 2 ekstrak (*n*-heksan dan etil asetat) terhadap bakteri

*V. alginolyticus* termasuk kategori lemah dengan diameter zona hambat berkisar 8,9-9,7 mm. Ekstrak etil asetat (9,77 mm) berbeda nyata dengan *n*-heksan. Uji Tukey terhadap bakteri lainnya *V. parahaemolyticus*, juga menunjukkan bahwa diameter zona hambat ekstrak etil asetat menghasilkan aktivitas antibakteri lemah (8,01 mm), yang berbeda nyata dengan *n*-heksan. Ekstrak aseton tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (6,00 mm ± 0) terhadap 3 bakteri Gram negatif *Vibrio* sp.



**Gambar 35.** Grafik Diameter Zona Hambat (*mean values* (mm +/- SE)) Ekstrak *Xestospongia testudinaria* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio harveyi*.



**Gambar 36.** Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Haliclona fascigera* : (A) *N*-heksan, (B) Kontrol negatif (pelarut), (C) Aseton, (D) Kontrol positif (ciprofloxacin), (E) Etil asetat terhadap *Vibrio parahaemolyticus*.

Hasil pengujian ekstrak spons *H. fascigera* menunjukkan bahwa ke-3 ekstrak hanya efektif menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* dengan kategori lemah. Ekstrak *n*-heksan mempunyai nilai zona hambat lebih tinggi (8,07 mm) dibanding aseton

(7,62 mm) terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Ekstrak etil asetat tidak menghasilkan aktivitas antibakteri (6,00 mm) terhadap ke-3 *Vibrio* sp. (Gambar 36). Uji Tukey *H. fascigera* menunjukkan bahwa terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*, nilai zona hambat tertinggi diperlihatkan oleh ekstrak *n*-heksan, yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan ekstrak lainnya (etil asetat dan aseton). Pengujian Tukey lainnya tidak dilakukan terhadap bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*. Ketiga ekstrak tidak dapat menghambat pertumbuhan (6,00 mm) bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*.

Spons lainnya *C. aerizusa* memperlihatkan aktivitas antibakteri paling rendah dibanding *X. testudinaria*, dan *H. fascigera*. Ekstrak etil asetat saja dari *C. aerizusa* yang dapat menghambat aktivitas ke-3 bakteri patogen dengan kisaran diameter rata-rata 6,66 - 6,87 mm. Ekstrak etil asetat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan ekstrak lainnya (*n*-heksan dan aseton) terhadap ke-3 bakteri *Vibrio* sp. Pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp. dihambat lemah oleh ekstrak *n*-heksan dan aseton. Ekstrak yang diuji terhadap *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, dan *V. parahaemolyticus*, tidak ada yang dapat menghasilkan zona hambat melebihi zona hambat kontrol positif. Aktivitas antibakteri yang berbeda-beda dari masing-masing spons dapat dipengaruhi kandungan fitokimianya.

Analisis reaksi kimia dari ekstrak kasar yang diperoleh pada masing-masing jenis spons, bertujuan untuk menguji golongan senyawa dari metabolit sekunder. Golongan senyawa dari ekstrak kasar masing-masing jenis spons dapat diketahui menggunakan uji fitokimia. Hasil uji fitokimia pada masing-masing jenis spons dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan hasil uji fitokimia, sebagian besar ke-3 spons mengandung steroid, terpenoid, alkaloid, dan fenol.

**Tabel 7.** Uji Fitokimia Spons

No	Fitokimia	<i>N</i> -heksan	Etil asetat	Aseton
<b><i>Callyspongia aerizusa</i></b>				
1	Alkaloid	-	+	+
2	Flavonoid	-	-	-
3	Steroid	++	+	-
4	Terpenoid	++	+	-
5	Fenol	-	-	+
<b><i>Haliclona fascigera</i></b>				
1	Alkaloid	-	+	+
2	Flavonoid	-	-	-
3	Steroid	++	+	-
4	Terpenoid	++	+	-
5	Fenol	-	-	+
<b><i>Xestospongia testudinaria</i></b>				
1	Alkaloid	-	+	+
2	Flavonoid	-	-	-
3	Steroid	++	+	-
4	Terpenoid	++	+	-
5	Fenol	-	-	+

(-) Negatif; (+) Positif lemah; (++) Positif kuat

Kandungan fenol pada ekstrak spons cenderung larut pada pelarut polar. Kandungan steroid/terpenoid cenderung larut pada pelarut nonpolar-semipolar. Ekstrak *n*-heksan dan etil asetat yang diuji dengan pereaksi Liebermann-Burchard, menunjukkan positif kuat steroid dan terpenoid dengan terbentuknya warna ungu dan biru-kehijauan. Kandungan fenolik ditandai dengan terbentuknya endapan hijau kehitaman. Endapan kuning yang terbentuk setelah diuji dengan pereaksi Wagner pada ke-3 spons menunjukkan adanya alkaloid.

#### 2.4.4. Pembahasan

Pertumbuhan ke-3 bakteri *Vibrio* sp. dapat dihambat oleh spons (*X. testudinaria*, *H. fascigera* dan *C. aerizusa*) dengan kisaran diameter zona hambat yang berbeda-beda. Sebagian besar studi literatur yang telah meneliti uji antibakteri dari ekstrak spons, mengujinya terhadap bakteri patogen manusia. Pengujian antibakteri terhadap *Vibrio* sp. masih sedikit kajiannya. Penelitian ini memberikan informasi tambahan terkait aktivitas antibakteri dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan aseton pada ke-3 jenis spons.

Ekstrak *X. testudinaria* menghasilkan zona hambat lebih tinggi (7,4 -12,09 mm) dibanding spons *H. fascigera* dan *C. aerizusa*. Studi literatur yang pernah meneliti ekstrak genus *Xestospongia*, juga menyatakan sebagian besar ekstrak mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap berbagai jenis bakteri khususnya bakteri patogen manusia (Ankisetty & Slattery, 2012; Cita et al., 2017a; 2017b). Ekstrak *X. testudinaria* dari Sorong Papua, Indonesia mempunyai daya hambat yang luas terhadap bakteri patogen *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC, *Klebsiella pneumonia* ATCC, dan *S. typhi* dibanding ekstrak spesies lainnya. Spesies ini juga yang diperoleh dari Aramanyang, Indonesia aktif sebagai antibakteri terhadap *E. coli* pada konsentrasi 70 ug/mL (Khairunnisa & Kurnianda, 2017).

Ekstrak spons lainnya *H. fascigera* menunjukkan bahwa ke-3 ekstrak hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* dengan kategori lemah. Hal ini kemungkinan menurut Sugrani et al., (2019), menyatakan bahwa senyawa bioaktif dalam ekstrak *H. fascigera* bersifat bakteristatik, karena tidak dapat menghambat bakteri setelah 48 jam. Ekstrak etil asetat *H. fascigera* mempunyai sifat bakteristatik terhadap *S. aureus*, dan *E. coli*. Penelitian lainnya menguji 8 ekstrak kasar *H. fascigera* dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat berkisar 11-16,5 mm. Ekstrak *Haliclona* juga aktif menghambat bakteri MRSA (11,1 mm±0,17-15,17 mm±0,76), bakteri Vancomycin-resistant *Enterococcus* sp. (VRE), dan extended-spectrum-beta ( $\beta$ )-lactamase *Gram-negative organisms* (ESBL). Ekstrak tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *E. coli* (Handayani et al., 2015a; 2015b;

2016). Tidak hanya ekstrak polar, tapi juga nonpolar menunjukkan aktivitas antibakteri. Senyawa non polar dari ekstrak *n*-heksan *H. fascigera* yang diperoleh dari Pulau Samalona, Makassar, dapat menghambat *E. coli* dan *S. aureus* dengan zona hambat 6,70 mm, dan 11,60 mm (Uli et al., 2017).

Jenis spons lainnya *C. aerizusa* menunjukkan aktivitas antibakteri lemah (6,6-6,8 mm) terhadap *Vibrio* sp. Genus *Callyspongia* dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan beberapa strain bakteri patogen, diantaranya *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, dan *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Ekstrak metanol dan kloroform menghasilkan zona hambat maksimum terhadap *V. harveyi* (Pejin et al., 2014; Chandrakala & Priya, 2017). Penelitian yang dilakukan Warbung et al., (2014) dan Rumampuk et al., (2017), menyatakan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. (termasuk *C. aerizusa*) dapat menghambat bakteri *S. typhi*, *Streptococcus pyogenes*, dan *S. aureus*. Ekstrak spons laut *C. aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* dan *S. pyogenes* dengan kategori menghambat lemah-sedang. Menurut Helber et al., (2018), menyatakan bahwa ekstrak *C. aerizusa* menunjukkan aktivitas antibakteri sebesar 31% aktif dibanding spesies lainnya.

Kandungan fitokimia yang berbeda pada masing-masing ekstrak, dapat menentukan respon yang berbeda pula pada ke-3 jenis bakteri uji. Perbedaan respon dari ke-3 bakteri, disebabkan oleh adanya perbedaan struktur membran sel dari masing-masing bakteri uji (Yulneriwarni et al., 2016). Golongan terpenoid dan steroid merupakan jenis senyawa dominan pada sampel spons berdasarkan uji fitokimia. Terpenoid dan steroid dapat bersifat antibakteri dengan merusak membran sel bakteri. Kerusakan pada membran dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Gunawan et al., 2008).

Kandungan steroid dari ekstrak *X. testudinaria*, Pulau Badi, didukung oleh penelitian lain yang menyatakan *X. testudinaria* dari Laut Vietnam mengandung senyawa golongan steroid. Senyawa steroid yang diperoleh antara lain: langkosterol A (1), sterol: xestosterol (2); 24-hidroperoksi-24-vinil kolesterol (3). Senyawa-senyawa ini aktif sebagai antibakteri (Nguyen et al., 2019). Jenis sterol lainnya juga telah diisolasi dari genus *Xestospongia* sp. (Zhou et al., 2011; He et al., 2016; Nguyen et al., 2019).

Aktivitas antibakteri dari *Xestospongia* sp. juga didukung oleh adanya senyawa golongan alkaloid. Beberapa alkaloid telah diisolasi dari *Xestospongia*, antara lain: 3-Alkylpyridine alkaloid, aaptamin, dan manzamin C (Calcul et al., 2003; Arai et al., 2016; Agustina et al., 2018). Sebanyak 4 novel alkaloid dari golongan aaptamin juga diperoleh dari *Xestospongia*. Senyawa yang diperoleh diantaranya aaptamin, isoaptamin, demetil(oxy)aaptamin, dan dimetilketal. Senyawa-senyawa ini berpotensi sebagai antibakteri (Calcul et al., 2003).

Spons *H. fascigera* mengandung kaya akan sumber senyawa alkaloid (Campos et al., 2018; Gupta, 2019). Berdasarkan beberapa studi literatur, dikatakan bahwa haliclonadiamin (alkaloid), *polyhydroxylated sterols* (halicrasterol), dan cyclostelletamin (alkaloid) dapat digunakan sebagai agen antibakteri yang diperoleh dari spons *Haliclona* sp. (Fahy et al., 1988; Lee et al., 2012; Cheng et al., 2013).

Dua senyawa alkaloid *brominated oxindole* berperan sebagai antibakteri dari genus *Callyspongia*. Senyawa 5-bromo trisindolin, dan 6-bromo trisindolin yang diperoleh dari fraksi etil asetat, menunjukkan potensi antibakteri terhadap bakteri Gram positif *S. aureus* dan *B. subtilis* dengan zona hambat masing-masing 17,5 mm, 18 mm, 15 mm, dan 16,4 mm (El-Hawary et al., 2019). Selain itu, senyawa 2H-1Benzopyran-2-one (coumarin) dari *Callyspongia diffusa* juga dapat berperan sebagai antibakteri (Pangal et al., 2013; Bindu et al., 2018).

Kemampuan senyawa yang terkandung pada ekstrak *X. testudinaria*, *H. fascigera*, dan *C. aerizusa* dalam menghambat aktivitas bakteri patogen dapat dipengaruhi beberapa faktor, salah satunya karakteristik bakteri patogen. Bakteri *Vibrio* sp. diketahui merupakan Gram negatif yang sulit untuk dihambat pertumbuhannya. Hal ini dikarenakan Gram negatif mempunyai lapisan peptidoglycan yang tebal. Selain itu, senyawa dalam ekstrak juga sulit melarutkan lapisan lipopolysaccharide (LPS) pada dinding sel bakteri Gram negatif. LPS pada Gram negatif dapat menghalangi proses permeasi, dan mencegah terjadinya agregasi pada senyawa antibakteri dari ekstrak (Bezić et al., 2003; Bansemir et al., 2006; Christobel et al., 2011; Nuzul et al., 2018).

Selain karakteristik bakteri patogen, konsentrasi ekstrak yang digunakan juga dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri uji. Antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas tinggi, jika nilai konsentrasi penghambatan bakteri yang digunakan terendah, tapi menghasilkan zona hambat besar. Kandungan antibakteri dari suatu ekstrak dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), dan bakteriostatik terhadap bakteri patogen. Bakteriostatik terjadi jika ekstrak dapat menghambat pertumbuhan bakteri, tapi tidak membunuh bakteri dalam waktu 48 jam (Wattimena, 1991; Yulneriwarni et al., 2016; Zailanie, 2016; Sugrani et al., 2019).

Kadar garam dalam sampel diduga mempengaruhi hasil uji penelitian. Kandungan garam anorganik dalam jumlah besar dapat memberikan efek sehingga memberikan hasil uji bioaktivitas yang salah. Hal ini disebabkan oleh proses *desalting* yang tidak maksimal. Teknik *desalting* yang tidak maksimal dapat mempengaruhi hasil analisis, karena garam dapat bereaksi dengan senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel (Lantah et al., 2017).

Hasil uji antibakteri dan fitokimia dari ke-3 jenis spons, menandakan bahwa spons *X. testudinaria* mempunyai potensi mengandung senyawa-senyawa aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* sp. Senyawa-senyawa aktif yang dihasilkan spons, mempunyai perbedaan dengan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat, yang selama ini merupakan sumber utama bahan obat-obatan. Dengan demikian, untuk penelitian bab selanjutnya akan mengisolasi ekstrak etil asetat *X. testudinaria*, beserta uji antibakteri senyawa murni yang dihasilkan.

## **2.5. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian pada bab ini, dapat menjawab tujuan penelitian pertama dengan kesimpulan antara lain: Ekstrak spons menunjukkan aktivitas antibakteri lebih tinggi (6–12,09 mm) dibanding ekstrak makroalgae *Halimeda macroloba* dan *Padina australis* (6 – 7,23 mm). Ekstrak kasar etil asetat dari spons *Xestospongia testudinaria* menghasilkan zona hambat lebih tinggi dibanding ekstrak kasar spons *Haliclona fascigera* dan *Callyspongia aerizusa* dengan kategori sedang (12,09 mm). Komponen golongan senyawa antibakteri pada ekstrak kasar etil asetat dari *X. testudinaria* adalah steroid, terpenoid, dan alkaloid.