

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia yang memiliki kekayaan dan keanekaragaman sumber daya alam yang melimpah khususnya keanekaragaman hayati laut. Keanekaragaman hayati laut memiliki ekosistem pesisir seperti mangrove, terumbu karang dan padang lamun yang sangat luas dan beragam. Keanekaragaman hayati tersebut memberikan peluang untuk memanfaatkan senyawa-senyawa aktif dari biota laut sebagai sumber pengobatan (Rompas dkk., 2022). Beberapa organisme laut yang diketahui dapat menghasilkan senyawa aktif antara lain ialah spons, moluska, bryozoa, dan tunikata. Organisme-organisme ini diketahui dapat menghasilkan sejumlah besar produk laut yang bersifat alami, juga mampu menunjukkan keragaman senyawa kimia yang sangat besar (Litaay dkk., 2017). Dalam mengeksplorasi sumber pengobatan baru melalui penemuan senyawa antibakteri untuk mengobati berbagai infeksi dan penyakit, produk alami laut telah menarik perhatian dunia melalui senyawa bioaktifnya yang luar biasa. Metabolit sekundernya menunjukkan potensi aktivitas biologis seperti antibakteri, antikanker, antitumor, antivirus, imunostimulan, dan lain-lain (Sibero dkk., 2023).

Tunikata merupakan kelompok hewan urochordata yang beragam dan merupakan anggota filum chordata dan subfilum tunicata (Malekhyati et al., 2024). Tunikata disebut juga urochordata yang merupakan kelompok hewan invertebrata dan memiliki pelindung yang bersifat keras pada bagian luar tubuhnya yang disebut tunik (Gao et al., 2023). Tunikata memiliki kurang lebih 3.000 spesies dari empat kelas Ascidiacea, Sorberacea, Thaliacea dan Appendicularia (Jabir dkk., 2022). Secara umum urochordata memiliki karakteristik antara lain, habitat utamanya di laut, hidup secara soliter atau berkoloni, memiliki tiga karakteristik chordata berupa ekor pasca anus yang berotot, notokord dan tali saraf dorsal berlubang hanya pada saat fase larva, faringnya berkembang dengan baik pada saat dewasa sehingga memenuhi sebagian besar volume tubuhnya (Hernawati, 2017). Cara hidup tunikata atau ascidian adalah dengan mucus *filter feeder* yang dapat mengekstrak partikel sekecil 0,5 μm seukuran kerongkongannya. Aliran makanan diciptakan oleh silia yang ada di saluran yang terletak di kedua sisi stigmata di dinding kantung brankial. Partikel makanan dikumpulkan pada lapisan mukus dan diarahkan ke lambung oleh silia. Jaring makan yang terbuat dari serat mukus ini mampu menjebak partikel berukuran 2–3 μm dengan efisiensi 100% (Ayuningrum dkk., 2020).

Tunikata memiliki sifat invasif dan kemampuannya tumbuh dengan cepat. Umumnya, senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh berbagai tunikata diyakini sebagai bagian dari pertahanan ekologi alam (Litaay dkk., 2023). Menurut Malekhyati et al (2024) beberapa jenis tunikata memiliki aktivitas antibiotik, antitumor, antivirus dan imunosupresif. Selain itu, khususnya ascidiacea telah menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai

antibakteri, antijamur, antivirus, dan antikanker namun hanya ada sedikit yang melakukan penelitian tersebut. Beberapa tunikata mengandung senyawa bioaktif seperti dehidrotirosil atau dopa dan top dehidrodopyl peptida dalam sel darah atau jaringannya (Litaay et al., 2019), termasuk namenamicin dari *Polysyncrator lithostrotum* (Casertano et al., 2020), halocyamines dari *Halocynthia roretzi* (Katoet al., 2021), lamellarins dari *Didemnum chartaceum* (Youssef et al., 2020) dan ferreascidin dari *Pyura* sp. (Strahsburger et al., 2020).

Pyura sp. merupakan ascidian soliter yang tersebar luas pada substrat keras seperti rubel atau karang keras. Sebagai hewan penyaring makanan, kelompok ini rentan terhadap predator dan bergantung pada pertahanan kimia terhadap pemangsa (Litaay et al., 2019). *Pyura* sp. dewasa berbentuk bulat telur, ditutupi oleh tunik kasar tebal berwarna coklat karena adanya *epibionts*. Setelah dibersihkan tunikata *Pyura* sp. akan berwarna merah muda. Permukaan bagian dalam dari siphon *Pyura* sp. berwarna coklat gelap dengan garis-garis kuning pucat yang terdiri dari 4 (empat) lobus (Afzali et al., 2019).

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Siradjuddin dkk., 2023). *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* adalah dua jenis bakteri yang paling sering menyerang tubuh manusia (Nabilla dan Advinda, 2022). Bakteri *Staphylococcus aureus* termasuk golongan bakteri gram positif yang struktur dinding selnya terdiri atas sitoplasma, peptidoglikan yang mengandung lipid dan polisakarida, serta bagian terluar dari peptidoglikan terdapat asam teikoat (Wang et al., 2022). Adapun bakteri *Escherichia coli* termasuk golongan bakteri gram negatif yang struktur dinding selnya terdiri atas 3 lapisan, yaitu lapisan pertama lipoprotein, lapisan kedua lipopolisakarida dan fosfolipid, lapisan terluar yaitu peptidoglikan yang tipis (Li et al., 2022). Penggunaan antibiotik saat ini menimbulkan satu masalah besar yaitu banyaknya bakteri yang mengalami resistensi. Resistensi merupakan suatu keadaan dimana antibiotik tertentu sudah tidak mempan digunakan untuk pengobatan baik dalam dosis rendah maupun dalam dosis tinggi (Varela et al., 2021). Banyak usaha yang telah dilakukan untuk melawan bakteri patogen, antara lain dengan upaya penemuan senyawa yang mampu membunuh dan menghambat bakteri tersebut (Siradjuddin dkk., 2023).

Senyawa bioaktif hewan dapat diperoleh dengan proses ekstraksi. Salah satu metode ekstraksi yang umum digunakan yaitu metode maserasi. Metode maserasi dapat mencegah rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Selain itu, kelebihan dari metode maserasi yaitu prosedur dan peralatannya sederhana. Prinsip kerja maserasi didasarkan pada kemampuan larutan penyari untuk dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung berbagai komponen aktif. Zat aktif akan terdistribusi atau larut dalam larutan penyari atau pelarut (Asworo dan Widhiastuti., 2023).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk menganalisis potensi senyawa aktif tunikata *Pyura* sp. sebagai kandidat antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta menganalisis

dan mengidentifikasi jenis senyawa dari tunikata *Pyura* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Untuk menganalisis potensi senyawa aktif tunikata *Pyura* sp. sebagai kandidat antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
2. Untuk menganalisis dan mengidentifikasi jenis senyawa dari tunikata *Pyura* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri

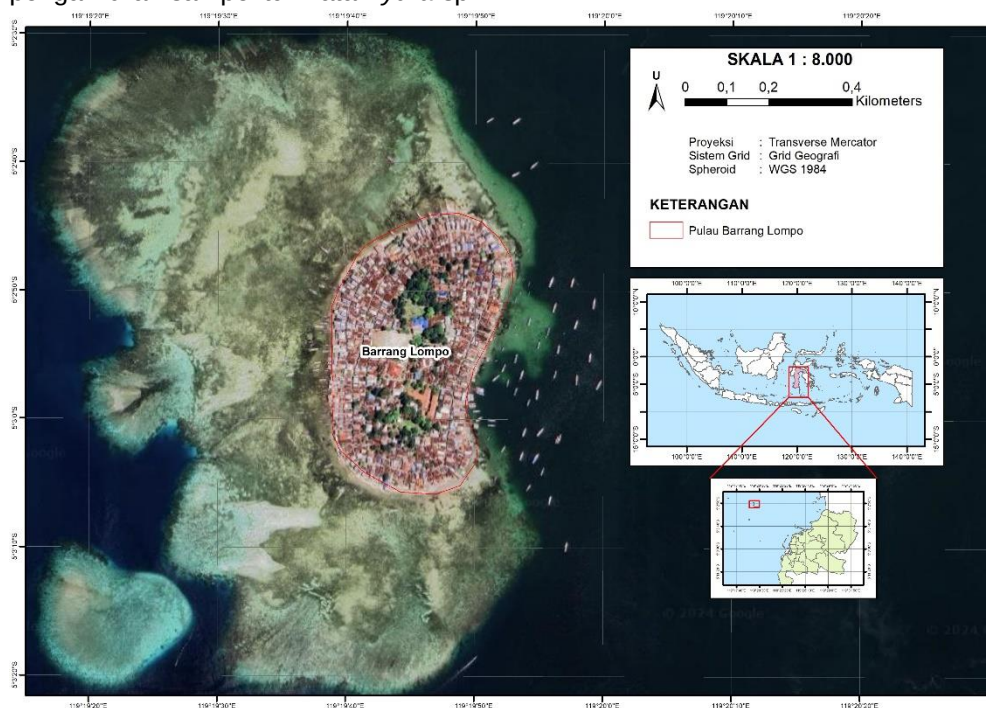
1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah terkait potensi senyawa aktif tunikata *Pyura* sp. sebagai kandidat antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta jenis senyawa dari tunikata *Pyura* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai Desember 2024. Pengambilan sampel tunikata *Pyura* sp. dilakukan di perairan Pulau Barrang Lompo, Makassar. Preparasi sampel *Pyura* sp. dilakukan di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan. Ekstraksi sampel *Pyura* sp. dilakukan di Laboratorium ILK dan Laboratorium Kimia Organik. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi. Analisis FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu. Semua laboratorium di atas berada di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang (PNUP). **Gambar 1** menunjukkan peta lokasi pengambilan sampel tunikata *Pyura* sp.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat selam, *coolbox*, wadah kaca, wadah plastik, botol reagen kaca coklat, mesh, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, corong kaca, jarum ose bulat, rak tabung reaksi, batang pengaduk, pipet tetes, spoit, sendok tanduk, bunsen, korek api, *grinder*

blending mill, *rotatory evaporator*, mikropipet, *microtube*, autoklaf, oven, *hot plate*, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), lemari pendingin, vortex, sentrifus dan timbangan digital.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel segar tunikata *Pyura* sp., isolat bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, metanol PA, n-heksana PA, *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), akuades, spiritus, *blankdisk*, kertas saring, *cling wrap*, *aluminium foil*, kasa, kapas, spoit, dan alkohol.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan pada penelitian ini disterilkan terlebih dahulu. Alat yang terbuat dari bahan kaca (alat-alat gelas) disterilkan dengan sterilisasi panas kering menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat yang terbuat dari logam disterilkan dengan cara dicuci menggunakan alkohol serta dipijarkan diatas api bunsen sampai merah membara. Media dan akuades disterilkan dengan sterilisasi panas basah yaitu menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

2.3.2 Pembuatan Media

Media *Nutrient Agar* (NA). Media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 0,28 gram dan dilarutkan ke dalam 10 mL akuades kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 3,4 gram dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

2.3.3 Pengambilan dan Preparasi Sampel Tunikata *Pyura* sp.

Pengambilan sampel tunikata *Pyura* sp. dilakukan di Pulau Barrang Lompo, Makassar, Sulawesi Selatan. Sampel *Pyura* sp. yang diambil kemudian disimpan di dalam *coolbox* dan dibawa ke Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan (ILK) untuk dipreparasi. Dibersihkan sampel *Pyura* sp. dan dipotong-potong kecil. Sampel *Pyura* sp. dikeringkan selama beberapa hari pada suhu ruang kemudian dikeringkan menggunakan oven selama 1×24 jam. Setelah kering, dihaluskan *Pyura* sp. menggunakan *grinder blending mill* hingga diperoleh bubuk *Pyura* sp. sebanyak 200 gram.

2.3.4 Ekstraksi Tunikata *Pyura* sp.

Ekstraksi tunikata *Pyura* sp. dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (Selviati dkk., 2024) menggunakan dua jenis pelarut yaitu metanol dan n-heksana. Serbuk simplisia tunikata *Pyura* sp. masing-masing direndam dalam pelarut metanol dan n-heksana dengan komposisi perbandingan 1:3 yaitu 200 gram serbuk simplisia dan 600 mL pelarut. Rendaman ini dibiarkan selama 1×24 jam (Mintadoa dkk., 2024). Setelah 1×24 jam, bahan disaring menggunakan kertas saring sehingga menghasilkan filtrat 1 dan debris 1. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh filtrat 1, 2, dan 3. Ketiga filtrat tersebut digabungkan dan dilakukan evaporasi (diuapkan) menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental.

2.3.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Tunikata *Pyura* sp.

Ekstrak kental tunikata *Pyura* sp. dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi yang terdiri dari konsentrasi 15%, 20%, dan 25%. Pada konsentrasi 15%, ditimbang sebanyak 0,30 gram ekstrak dan dilarutkan ke dalam 2 mL pelarut. Pada konsentrasi 20%, ditimbang sebanyak 0,40 gram ekstrak dan dilarutkan ke dalam 2 mL pelarut. Pada konsentrasi 25%, ditimbang sebanyak 0,50 gram ekstrak dan dilarutkan ke dalam 2 mL pelarut.

2.3.6 Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Bakteri uji diinokulasikan menggunakan ose bulat ke media agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam. Setelah 1×24 jam, bakteri uji disuspensikan ke akuades steril masing-masing sebanyak 5 mL.

2.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode *diffusion disk* (Mehmood et al., 2024). Metode *diffusion disk* dilakukan dengan merendam *blank disk* pada ekstrak sampel. Kemudian *blank disk* diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode tuang. Selanjutnya, diinkubasi selama 1×24 jam dan 2×24 jam di inkubator pada suhu 37°C. Senyawa tersebut diserap ke dalam media secara bertahap dan menghambat pertumbuhan bakteri. Setelah diinkubasi, dapat diketahui daya antibakteri yang dihitung berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar *blank disk* (Sahoo et al., 2024).

2.3.8 Identifikasi Senyawa Bioaktif

Analisis FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Identifikasi senyawa dapat diketahui melalui instrumen FTIR (Nurfirzatulloh dkk., 2023). Karakterisasi FTIR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak tunikata *Pyura* sp. Ekstrak tunikata *Pyura* sp. dimasukkan ke dalam cetakan pellet. Kemudian pellet dimasukkan pada FTIR dengan sinar IR dari spektrofotometer inframerah yang sudah dinyalakan pada kondisi yang stabil. Diukur serapan inframerah pada bilangan gelombang 4000-45 cm^{-1} . Selanjutnya dilakukan pendeteksian menggunakan tombol detektor dan akan menghasilkan rekorder histogram FTIR yang menampilkan puncak-puncak gugus fungsi yang terdapat pada sampel.

Analisis GC-MS (*Gas Chromatography and Mass Spectrometry*). Identifikasi senyawa bioaktif yang terdapat pada *Pyura* sp. diidentifikasi menggunakan analisis GCMS (*Gas Chromatography and Mass Spectrometry*). Analisis GCMS adalah metode yang digunakan untuk pemisahan dan digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen dalam suatu campuran sampel yang umumnya berupa senyawa-senyawa yang mudah menguap. GC-MS terdiri dari dua buah alat yaitu kromatografi gas dan spektrometri massa sebagai detektor (Margareta dan Wonorahardjo, 2023).

Hasil ekstrak tunikata dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 0,5 gr serbuk serta 1,5 ml pelarut, lalu di vortex selama 1 menit dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 9000 rpm. Supernatan yang terbentuk dilanjutkan untuk pengujian GC-MS. Waktu diatur selama 60 menit dengan suhu injektor 260°C, detektor 250°C, dan kolom 325°C. Gas pembawa yang digunakan yaitu gashelium sebagai pembawa laju aliran konstan 1 mL/menit. Proses identifikasi menggunakan alat GC-MS menghasilkan beberapa senyawa-senyawa bioaktif dapat dilihat dari puncak kromatogram sebagai identifikasi data hasil kromatografi dan spektrometri massa (MS) dilihat dari spektrum massa dengan masing-masing berat molekul senyawa bioaktif (Rosdiana dkk., 2023; Hotmian dkk., 2021).

2.3.9 Analisis Data

Berdasarkan Jonasson et al (2020), parameter pengamatan aktifitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling kertas cakram. Data hasil uji daya hambat dalam berbagai macam konsentrasi ekstrak dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.