

PENAPISAN DAN KARAKTERISASI PARSIAL SENYAWA ANTIMIKROBA DARI SIPUT BAKAU DAN PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI AKTIF

Alimuddin Ali, Yusminah Hala, dan Darminto
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Makassar

ABSTRACT

*Mangrove snail is one of the animal medicines used against bacterial infection, however, the scientific basic of the activity still void. The aim of this research were to investigate the antimicrobial effect of mangrove snail as the primary step to identify an antimicrobial activity and find out substances responsible to this activity. The study was conducted by collecting 4 snail samples. Extract were made by maceration of methanol and followed by chloroform and n-butanol partition, respectively. Antimicrobial activity has been done using *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and fungi *Candida albicans*. The result showed that these mangrove snail capable inhibit bacterial growth either Gram positive or negative, but can not inhibition fungi. Methanol extract of *Terebralia sulcata* showed inhibition zone has the R_f 0.27, whereas chloroform fractions of *Charonia* sp. has 6 spots by bioautographic. Two out of six spots showed inhibition zone with R_f 0.16 and R_f 0.4. Methanol extract of *N. birmanica* has inhibit with R_f 0.56. One spots with R_f 0.42 unclear as inhibition zone suggested negative. Then the methanol extract of *Telescopium telescopium* with R_f 0.34 showing inhibition zone.*

Key words: mangrove snail, antimicrobial activity, bioautographic

PENGANTAR

Meningkatnya resistensi mikroba akibat penggunaan antibiotik telah mengilhami pencarian produk alternatif pengganti antibiotik dari mikroba. Keadaan ini mendorong semakin pentingnya usaha untuk mendapatkan bahan antibiotik yang murah tersedia secara kontinu dalam jumlah besar dan memiliki semua unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pembuatan antimikroba tersebut.

Di Sulawesi-Selatan khususnya di Kabupaten Polewali, siput bakau (mangrove) telah digunakan sebagai obat antiinfeksi secara turun-temurun oleh masyarakat terutama yang tinggal di daerah pesisir. Masyarakat setempat menggunakan siput tersebut untuk mengobati berbagai penyakit infeksi, seperti luka bakar, sakit gigi, dan bahkan digunakan sebagai obat penyakit TBC dan infeksi usus buntu (Komunikasi Pribadi, 2002).

Tradisi pengobatan dengan memanfaatkan berbagai jenis organisme (hewan maupun tumbuhan) oleh suatu masyarakat merupakan potensi yang harus tetap dijaga kelestariannya. Selain faktor murah, pengaruh sampingan yang rendah, juga sesuai dengan kondisi sosial ekonomi dan budaya masyarakat setempat.

Studi tentang nilai ekonomi pada organisme utamanya hewan laut dari segi kimiawi dan farmasi dalam 3 dekade ini memperlihatkan adanya kandungan substrat bioaktif yang dapat dikembangkan untuk pembuatan obat-obatan baru. Tidak kurang dari 25% kandungan senyawa bioaktif

tersebut telah dihasilkan struktur senyawa bioaktif dari 675 spesies melalui berbagai penelitian. Senyawa bahan alam ini harganya cukup mahal dalam katalog hasil laboratorium (Prozanto *et al.*, 1999; Crew dan Hunter, 1993).

Data dari National Cancer Institute (Washington), yang telah melakukan proses skrining menunjukkan bahwa beberapa biota laut memiliki aktivitas biologis. Lebih dari 20 kategori senyawa bioaktif yang berbeda-beda telah ditemukan, seperti antivirus, antibiotik, antiinflamasi, antileukemia, insektisidal, sitotoksin, antihelmentik, dan antikanker (Burrens dan Clement, 1993; Crews dan Hunter, 1993). Senyawa bioaktif tersebut umumnya ditemukan pada kelompok spons laut. Secara umum perhatian pencarian senyawa bioaktif umumnya dilakukan pada spons laut, namun beberapa biota laut seperti siput bakau yang kemungkinan memiliki potensi farmakologis yang sama sebagai antimikroba belum pernah dilakukan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa siput yang diambil di areal mangrove baik yang ada di sekitar rizosfer maupun yang menempel pada pohon bakau. Sebanyak 4 (empat) spesies siput yang digunakan dalam penelitian yaitu: *Telescopium telescopium*, *Charonia* sp., *Nerita birmanica*, dan *Terebralia sulcata*. Setiap spesies diambil sekitar 500 sampai 600

ekor. Untuk keperluan dokumentasi dan identifikasi, maka sebanyak 2 dari masing-masing spesies siput diawetkan dalam etanol 70%. Siput yang diperoleh terlebih dahulu dibersihkan dengan cara dicuci dan disikat, selanjutnya dipecahkan cangkangnya dan diambil dagingnya.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi daging siput dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menurut petunjuk Rahmiani 1995 dan Rosyidi *et al.*, 2001. Daging siput diambil sebanyak 260 g, dipotong-potong kecil lalu diblender sampai halus. Kemudian dipindahkan ke dalam gelas piala 250 ml dan ditambahkan 25 ml air dan diaduk selama 2 jam pada kecepatan 150 rpm, selanjutnya disentrifugasi pada 3500 rpm selama 60 menit. Endapan dibuang, sedangkan pada supernatan ditambahkan metanol absolut sebanyak 3 kali volume dan disimpan di lemari es pada suhu 4 °C selama 30 menit. Suspensi yang diperoleh disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 60 menit. Supernatan ditampung dalam gelas piala dan ditutup rapat, selanjutnya dilakukan partisi dengan pelarut kloroform dan n-butanol. Ekstrak metanol dan hasil partisi diuji aktivitas antimikrobanya. Senyawa antimikroba dengan tingkat kepolaran tertentu pada masing-masing sampel dapat dijadikan sebagai acuan dalam penelusuran senyawa aktif dari siput bakau tersebut.

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan prosedur Iguchi *et al.*, 1982. Bakteri uji ditumbuhkan dalam medium *Heart Infusion Bouillon* (pH 7), sedangkan untuk fungi ditumbuhkan dalam media *Potato Dextrose Broth* (pH 5) pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur mikroba diencerkan 1000 kali dengan larutan NaCl fisiologis. Sebanyak 1 ml kultur (1×10^6 cfu/ml) diinokulasikan dengan metode agar tuang ke dalam media tumbuh. Pengujian dilakukan terhadap kedua kelompok bakteri Gram negatif, *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* dan bakteri Gram positif, *Staphylococcus aureus* serta fungi *Candida albicans* secara difusi agar. Sebagai pembanding digunakan khloramfenikol dan Ampicillin masing-masing (1000 µ/ml).

Karakterisasi Senyawa Antimikroba Ekstrak Daging Siput

Kromatografi lapis tipis analitik

Adsorben yang digunakan ialah silika, Kieselgel 60F254 (Merck). Kromatografi dilakukan menurut metode Sudirman, 2005 sebagai berikut: ekstrak/hasil fraksinasi,

diteteskan secukupnya pada titik awal di lempengan atau lapisan tipis silika gel berukuran 10×20 cm dan dibiarkan selama dua jam sampai lingkungan dalam bejana pengembang yang berisi pelarut menjadi jenuh. Lempengan dimasukkan ke dalam bejana dan dibiarkan selama kurang lebih tiga jam, sampai batas pelarut atau garis pelarut atau garis depan mencapai bagian ujung lempengan. Sisa pelarut pada lempengan diuapkan dengan membiarkannya dua atau tiga hari pada suhu kamar.

Deteksi senyawa antimikroba dengan bioautografi

Lempengan kromatogram diletakkan di atas penyangga di dalam kotak inkubasi yang dilapisi kertas lembap steril. Untuk mengurangi kontaminan, lempengan disinari dengan sinar UV sekitar satu jam. Kemudian kromatogram dilapisi dengan sekitar 15 ml media TGY (Trypton 5 g, ekstrak khamir 5 g, glukosa 1 g, KH_2PO_4 1 g, agar-agar 7,5 g, aquades 1 l) yang telah mengandung bakteri uji sekitar $1-3 \times 10^5$ per ml. Sebelum di inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam kromatogram terlebih dahulu diinkubasi pada suhu sekitar 10 °C selama 3–4 jam agar senyawa aktif dapat berdifusi ke dalam media. Apabila terjadi hambatan pertumbuhan (*growth inhibition*) terhadap mikroba uji, maka akan terlihat zona bening pada tempat-tempat tertentu sepanjang ekstrak bermigrasi pada lempengan kromatogram yang menandakan adanya aktivitas dari senyawa-senyawa yang telah terpisah. Nilai Rf dari tiap zona hambatan pertumbuhan diukur dengan membagi antara jarak zona dengan jarak batas pelarut, yang diukur dari tempat ekstrak ditetaskan atau titik awal.

Deteksi senyawa aktif dengan pereaksi pembentuk warna dan sinar UV

Hasil bioautografi di atas kemudian dicocokkan dengan hasil pereaksi pembentuk warna dan dengan hasil penyinaran dengan sinar UV pada lempengan kromatogram yang lain. Untuk itu lempengan tersebut disemprot merata pada permukaannya dengan pereaksi di antaranya pereaksi vanillin-asam sulfat. Lempengan dipanaskan pada oven bersuhu 120 °C hingga timbul warna yang jelas pada bercak yang mempunyai Rf yang sama dengan Rf zona bening dari hasil bioautografi.

HASIL

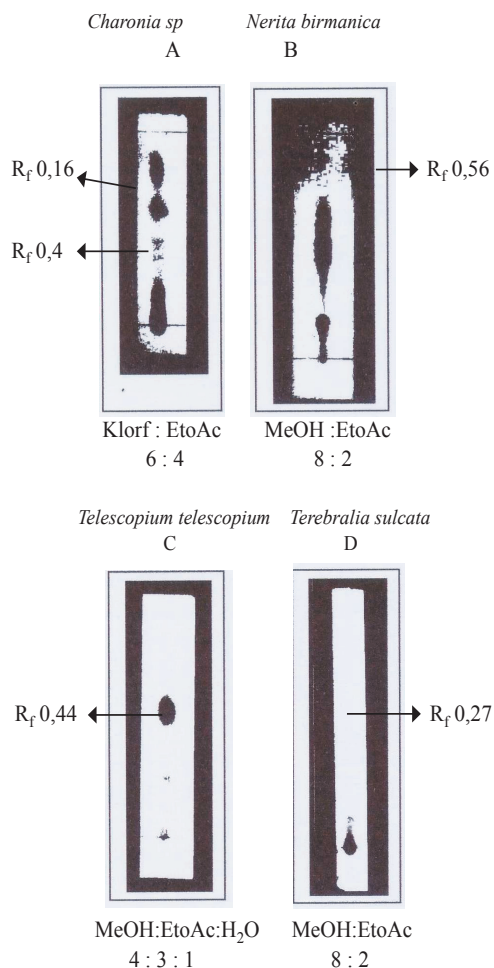
Sebanyak 4 jenis siput bakau yang dijadikan sebagai bahan penelitian menunjukkan adanya aktivitas antimikroba seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter zona hambatan berdasarkan konsentrasi ekstrak metanol daging siput bakau

Jenis Siput Bakau	Mikroba Uji	Rata-rata diameter zona hambatan (mm) pada konsentrasi ekstrak metanol 1000 µg/mL
<i>Telescopium telescopium</i>	<i>Escherichia coli</i>	11,4 12,0 11,3
	Rata-rata zona hambatan	11,57
	<i>Salmonella typhii</i>	11,1 13,6 12,8
	Rata-rata zona hambatan	12,5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,1 10,7 9,4
	Rata-rata zona hambatan	9,42
	<i>Escherichia coli</i>	9,4 10,0 10,6
	Rata-rata zona hambatan	10,0
	<i>Salmonella typhii</i>	14,4 13,8 14,5
	Rata-rata zona hambatan	14,11
<i>Charonia</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,6 11,0 10,7
	Rata-rata zona hambatan	10,43
	<i>Escherichia coli</i>	10,25 10,2 10,3
	Rata-rata zona hambatan	10,25
	<i>Salmonella typhii</i>	- - -
	Rata-rata zona hambatan	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Escherichia coli</i>	10,25 10,65 11,0
	Rata-rata zona hambatan	10,63
	<i>Salmonella typhii</i>	11,2 11,8 11,2
<i>Terebralia sulcata</i>	Rata-rata zona hambatan	11,4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,9 10,25 10,65
	Rata-rata zona hambatan	10,62
	<i>Escherichia coli</i>	10,25 10,65 11,0
	Rata-rata zona hambatan	10,63
	<i>Salmonella typhii</i>	11,2 11,8 11,2
	Rata-rata zona hambatan	11,4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,9 10,25 10,65
	Rata-rata zona hambatan	10,62
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,9 10,25 10,65
Semua Jenis Siput Bakau	<i>Candida albicans</i>	-

Tabel 2. Rata-rata diameter zona hambatan berdasarkan konsentrasi fraksi kloroform dan n-butanol daging siput bakau

Jenis Siput Bakau	Mikroba Uji	Rata-rata diameter zona hambatan (mm) pada konsentrasi fraksi 1000 μ g/mL	
		Kloroform	n-butanol
<i>Telescopium telescopium</i>	<i>Escherichia coli</i>	9,1	9,2
		10,7	10,7
		9,4	10,8
	Rata-rata zona hambatan	9,73	10,23
	<i>Salmonella typhii</i>	10,3	13,4
		11,35	13,,2
		10,7	13,3
	Rata-rata zona hambatan	10,78	13,3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,0	12,4
		10,2	12,6
<i>Charonia sp.</i>		11,0	10,5
	Rata-rata zona hambatan	10,4	11,83
	<i>Escherichia coli</i>	—	11,3
		—	10,,5
		—	11,5
	Rata-rata zona hambatan	—	11,1
	<i>Salmonella typhii</i>	—	10,0
		—	8,05
		—	9,90
	Rata-rata zona hambatan	—	9,32
<i>Nerita birmanica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	10,40
		—	11,80
		—	10,50
	Rata-rata zona hambatan	—	10,9
	<i>Escherichia coli</i>	—	10,7
		—	11,35
		—	11,3
	Rata-rata zona hambatan	—	11,12
	<i>Salmonella typhii</i>	12,4	10,70
		12,4	11,35
<i>Terebralia sulcata</i>		14,6	11,30
	Rata-rata zona hambatan	13,3	11,12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
	<i>Escherichia coli</i>	—	—
	Rata-rata zona hambatan	—	—
	<i>Salmonella typhii</i>	—	—
	Rata-rata zona hambatan	—	—
	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
	Rata-rata zona hambatan	—	—
	<i>Candida albicans</i>	—	—



Gambar 1. Visualisasi kromatografi lapis tipis analitik

PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Antimikroba

Hasil pengujian aktivitas antimikroba dari ekstrak metanol menunjukkan bahwa seluruh jenis siput bakau yang diuji mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji, baik bakteri Gram positif maupun negatif. Sebaliknya tidak satu pun yang menunjukkan adanya zona penghambatan pada fungi. Meski demikian mekanisme penghambatan pertumbuhan senyawa antimikroba tersebut belum diketahui secara jelas.

Berdasar Tabel 1, terlihat bahwa rata-rata zona penghambatan cenderung lebih besar pada *Salmonella typhii*. Secara keseluruhan zona penghambatan paling besar ditunjukkan oleh ekstrak metanol *Charonis sp.* yaitu mencapai 14,11 mm. Sebaliknya penghambatan pertumbuhan tidak ditunjukkan pada bakteri *S. typhii* pada ekstrak *Nerita birmanica*. Senyawa aktif antimikroba diduga terkonsentrasi sebagian besar pada pelarut polar lainnya

(n-butanol). Hal ini terlihat dengan adanya zona penghambatan pertumbuhan pada fraksi n-butanol.

Jika mengacu pada kriteria senyawa potensial sebagai antimikroba, maka jenis *Telescopium telescopium* dapat dikategorikan cukup berpotensi. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi ekstrak yang digunakan sebagai kategori patokan yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$. Kesimpulan ini didasarkan pada rerata dari interval konsentrasi perlakuan yang cenderung bertambah sekitar 0,8 mm pada tiap-tiap kenaikan konsentrasi ekstrak (Data tidak dipublikasi). Selain itu ekstrak dan hasil fraksinasi dari *Telescopium telescopium* menunjukkan ada dua senyawa antimikroba yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda, yaitu senyawa yang cenderung polar dan lainnya nonpolar.

Kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri uji oleh ekstrak daging *Charonia sp* hampir sama dengan fraksi kloroform dari *Terebralia sulcata*. Pada fraksi kloroform tidak ditemukan adanya zona penghambatan baik pada bakteri Gram positif maupun negatif. Ini menunjukkan bahwa senyawa aktif antimikroba tersebut cenderung bersifat polar.

Dari semua hasil fraksinasi, maka siput bakau jenis *Nerita birmanica* tidak mampu menghambat bakteri Gram positif dan fungi. Kemampuan melakukan penghambatan secara umum hanya ditunjukkan pada bakteri Gram negatif. Meski demikian zona hambat tertinggi ini ditunjukkan pada fraksi kloroform, yaitu pada bakteri *Salmonella typhii*. Zona hambatan ini tergolong cukup tinggi di antara ekstrak lainnya yang mencapai 13,3 mm. Tampak bahwa senyawa yang bersifat polar cenderung menghambat bakteri *E. coli* sedangkan senyawa nonpolar cenderung menghambat *S. typhii*. Ini menunjukkan bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan memiliki dua kelompok dengan sifat kepolaran yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif. Oleh karena itu, siput bakau jenis *N. birmanica* ini memiliki senyawa aktif antimikroba dalam menghambat bakteri Gram negatif utamanya fraksi kloroform dibanding fraksi n-butanol.

Tabel 1 dan 2, menunjukkan bahwa fraksi daging bakau siput jenis *Terebralia sulcata* yang memiliki senyawa antimikroba cenderung bersifat polar. Hal ini ditunjukkan oleh tidak adanya satupun mikroba uji yang menunjukkan zona penghambatan oleh fraksi kloroform baik pada bakteri maupun fungi. Zona penghambatan justru ditunjukkan oleh ekstrak metanol, baik bakteri Gram positif maupun negatif. Secara keseluruhan zona hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak tersebut tergolong sedang yaitu 11,3 mm dibanding ekstrak jenis siput lainnya. Ini menunjukkan bahwa siput *Terebralia sulcata* kurang potensial sebagai penghasil senyawa antimikroba. Namun demikian jika

dilihat dari spektrum penghambatan, maka jenis siput ini tergolong sebagai senyawa antimikroba yang berspektrum luas (*broad spectrum*).

Secara keseluruhan diameter zona penghambatan dari semua ekstrak yang diuji, masih lebih rendah dibandingkan dengan antimikroba komersil dalam konsentrasi yang sama. Hasil uji daya hambatan pada bakteri uji yang sama, terlihat besarnya diameter zona hambatan yang masih lebih tinggi 2–3 kali dari diameter zona hambatan dari ekstrak/fraksi siput bakau yang diuji (data tidak dipublikasi). Rendahnya kemampuan menghambat bakteri uji pada ekstrak siput jika dibanding dengan sediaan antibiotik komersil diduga terkait dengan tingkat purifikasi yang masih rendah pada ekstrak siput. Hal ini mengakibatkan senyawa aktif memiliki konsentrasi yang lebih kecil dari sediaan komersil untuk kadar yang sama.

Profil kandungan senyawa kimia masing-masing ekstrak yang memiliki diameter zona hambatan terbesar yang diuji secara autobiografi menunjukkan adanya berbagai bercak dengan nilai R_f yang berbeda. Bercak/noda yang menunjukkan zona penghambatan pertumbuhan bakteri uji merupakan senyawa antimikroba. Bercak yang tidak menunjukkan zona penghambatan bukan merupakan senyawa antimikroba atau senyawa aktif namun tidak terdeteksi dengan bakteri uji yang digunakan (Sudirman, 2005).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka ekstrak metanol dari daging siput bakau *T. sulcata* menunjukkan adanya zona penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada noda dengan nilai R_f 0,27. Hasil KLT ini hanya menunjukkan satu bercak yang berwarna ungu. Selanjutnya pada ekstrak kloroform dari *Charonia* sp. menunjukkan adanya 6 bercak/noda pada hasil KLT. Sebanyak dua dari keenam bercak menunjukkan zona penghambatan pertumbuhan pada bakteri uji yaitu dengan nilai R_f 0,16 dan R_f 0,4. Ini menunjukkan bahwa dua senyawa dalam ekstrak kloroform tersebut yang berpotensi sebagai antimikroba. Senyawa lainnya diketahui sebagai senyawa pengotor yaitu bercak dari senyawa yang tidak menunjukkan zona hambatan pertumbuhan.

Hasil lainnya menunjukkan bahwa untuk ekstrak metanol *N. biramnica* menunjukkan adanya 3 bercak pada KLT. Satu di antara 3 senyawa ini dinyatakan positif menghambat bakteri uji pada nilai R_f 0,56. Satu bercak lainnya yang memiliki R_f 0,42 menunjukkan hasil yang kurang jelas zona penghambatannya sehingga dinyatakan negatif. Demikian pula pada ekstrak metanol dari

Telescopium telescopium juga ditemukan adanya dua bercak yang menunjukkan zona penghambatan. Meski demikian zona dengan nilai R_f 0,34 menunjukkan zona yang kurang jelas, namun tetap dinyatakan sebagai positif menghambat. Satu bercak lainnya yang memiliki R_f 0,44 dinyatakan juga positif meskipun kesimpulan yang diambil masih ragu-ragu karena adanya pertumbuhan bakteri kontaminan (koloni yang berbeda dengan bakteri uji) yang ada di sekitar bercak.

Siput bakau merupakan salah satu organisme yang memiliki kandungan senyawa antimikroba khususnya senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri baik Gram positif maupun negatif, namun tidak menghambat pertumbuhan fungi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas bantuan dana penelitian dari Kantor Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia, melalui Proyek Penguatan Riset Dasar Sains bidang MIPA tahun anggaran 2005 dan Dinas Kesehatan Kabupaten SIDRAP Sulawesi Selatan.

KEPUSTAKAAN

- Burrens NS dan Clement JJ, 1993. Biomedical Potensial Marine Natural Product, Edited by Atawwa *et al.*, (I): Phamaceutical and Bioactive Natural Product Plenum Press, New York and London; 13–14.
- Crew P dan Hunter LM, 1993. The Search for Antimicrobia Parasitic Agent from Marine Animals, Marine Biotechnology, (I): Phamaceutical and Bioactive Natural Products, Edited by Davied *et al.*, New York: 352–382.
- Iguchi SM, Aikawa T, dan Matsumoto JJ, 1982. Antibacterial Activity of Snail Mucus Mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72A: 571–574.
- Prozanto P, Bavestrello R, dan Cerrano G, 1999. Pharmacologically Active Natural Product from Marine Invertebrates and Associated Microorganism. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I 1998, Jakarta 14–15 Oktober 1998. LIPI, Jakarta, 33–40.
- Rahmaniar R, 1997. Potensi Spons Asal Kepulauan Spermonde sebagai Antimikroba. Seminar Perikanan Indonesia II. Makassar, 2–3 Desember 1997.
- Rosyidi, Ali M, Sumarno, Roekistiningsih, dan Roosdiana A, 2001. Purifikasi dan Karakterisasi Faktor Antibakteri dari Siput. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 13(2): 171–174.
- Sudirman LI, 2005. Deteksi Senyawa Antimikrob yang Diisolasi dari Beberapa *Lentinus* sp Tropis dengan Metode Bioautografi. *Hayati, Jurnal Biosains* 12(2): 67–72.