

Bioaktivitas Antibakteri Lamun *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides*

Antibacterial Bioactivity Seagrass *Thalassia hemprichii* and *Enhalus acoroides*

Arief Anthonius Purnama^{*)} dan Eti Meirina Brahmana

Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Pasir Pengaraian, Kabupaten Rokan Hulu 28557, Riau

^{*)}Koresponden: ariefanthoniuspurnama@gmail.com

Abstract

The objective of present study was to identify bioactivity of antibacterial Indonesian Seagrass *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* from Karang Tirta Beach, Padang City, West Sumatera. This is a preliminary research for a new alternative antibiotic from Seagrass in Indonesia. In this study the seagrass was examined by a maceration process and using the rotary evaporator to obtain viscous extract. The material for the bioactivity testing was performed upon several intended bacteria such as *Escherichia coli*, *Stapillococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*. The bioactivity testing was performed by using the method of resazurin and MIC (Minimum Inhibitory Concentration), which is determined by looking at well blue-colored at the smallest concentration. The result revealed that the best antibacterial bioactivity of *Thalassia hemprichii* extract was a total of 62.50 µg/mL N-hexane solvent against *Escherichia coli* and *Stapillococcus aureus* bacteria. While the best antibacterial bioactivity of *Enhalus acoroides* extract is 15.62 µg/mL of N-hexane solvent against *Stapillococcus aureus*.

Keywords: Antibacterial, Bioactivity, *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*.

Pendahuluan

Lamun merupakan tumbuhan yang memiliki struktur pembuluh dan fungsi yang identik dengan tumbuhan di darat. Memiliki buah, bunga, daun dan akar yang tumbuh terendam di air laut pada substrat berlumpur, berbatu dan berpasir. Tumbuhan ini tumbuh di daerah pasang surut (intertidal dan subtidal) sampai kedalaman tertentu dimana sinar matahari masih dapat mencapai dasar laut (Bjork et al, 2008).

Di dunia, lamun ditemukan sebanyak 60 spesies, tersebar luas mencapai 177.000 km². Keberadaan lamun di sepanjang perairan pantai Indonesia diperkirakan luasnya 30.000 km² (Kuriandewa dan Supriyadi, 2006). Di Indonesia spesies lamun ditemukan sebanyak 13 spesies yang diklasifikasikan ke dalam 7 genus, spesiesnya antara lain: *Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule uninervis*, *Halodule pinifolia*, *Halophila decipiens*, *Halophila*

minor, *Halophila ovalis*, *Halophila spinulosa*, *Halophila sulawesii*, *Syringodium isoetifolium*, *Thalassia hemprichii* dan *Thalassodendron ciliatum* (Green dan Short, 2003; Kuo, 2007).

Beberapa penelitian telah mendokumentasikan kelimpahan metabolit alam (metabolit sekunder dan senyawa bioaktif) lamun dan beberapa telah difokuskan pada potensi bioaktif mereka (Subhashini et al, 2013) diantaranya yaitu pada ekstrak methanol lamun *Syringodium isoetifolium* oleh Mani et al (2012) ditemukan beragam senyawa metabolit sekunder seperti saponin, fenol dan alkaloid. Penelitian lain tentang senyawa kimia lamun yang terkandung di dalamnya antara lain: potensi Lamun sebagai sumber makanan kesehatan: Analisis proksimat (Stelle et al, 2005) dan Analisis Asam Lemak (Rompas et al, 2004), potensi antibakteri dari spesies Lamun di India terhadap patogen manusia (Kannan et al, 2010), aktivitas antibakteri dari ekstrak

Cymodocea serrulata akar terhadap patogen unggas (Ravikumar et al, 2010; Ravikumar et al, 2011), komposisi kimia dan aktivitas antibakteri dari Lamun di India terhadap patogen saluran kemih (Kannan et al, 2013), nilai gizi dari *Cymodocea nodosa* dan *Posidonia oceanica* di pantai Mediterania Mesir (El din et al, 2013).

Banyak metabolit dari lamun telah diketahui aktif secara biologis dan merupakan biomedis penting serta bisa dimanfaatkan sebagai obat yang potensial. Akar dari *Enhalus acoroides* sudah digunakan sebagai obat terhadap sengatan berbagai jenis pari dan kalajengking. *Halophila* sp. adalah obat yang ampuh terhadap penyakit malaria, penyakit kulit dan ditemukan sangat efektif dalam tahap awal kusta (Mani et al, 2012). Pada daerah-daerah maritim Asia, ekstrak lamun digunakan sebagai agen kuratif berbagai penyakit seperti antibiotik, antihelminik, batuk, anti piretik, anti tumor, anti diare, penyembuhan luka, pengobatan batu empedu dan gondok (Umamaheshwari et al, 2009).

Dari uraian diatas dapat diketahui bahwa lamun telah diketahui banyak digunakan untuk berbagai tujuan medis. Oleh karena itu dengan adanya penelitian ini diharapkan mampu menguji bioaktivitas metabolit sekunder dari spesies lamun *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* sebagai antibakteri. Penelitian ini juga merupakan langkah awal dalam pencarian antibiotik alternatif baru.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-September 2017. Lokasi penelitian adalah di Perairan Pantai Karang Tirta, Padang, Sumatera Barat. Kemudian dilanjutkan di Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Pasir Pengaraian dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu *cool box*, penampakan, timbangan, wadah tertutup, scalpel, oven, pisau, blender, erlenmeyer,

Spektrofotometer UV-Vis, *vacuum rotary evaporator*, Mikroplat 96-well, Mikropipet, Erlenmeyer, cawan penguap, spatula, botol vial, pipet tetes, lempeng tetes, tabung reaksi, *Global Positioning System* (GPS), kamera digital. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Alkohol 70%, plastik sampel, kertas saring, kertas label, Etanol, Etil Asetat, n-Heksana, Media *Muller Hinton Broth*, Antibiotik Amoxan, Resazurin, Aquades, air salin 9% dan DMSO. Bakteri yang digunakan yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Bakteri yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

Inventarisasi lamun dilakukan di Perairan Sumatera Barat. Lamun yang ditemukan dikoleksi dengan mencuplik di alam dengan *hand shorting* menggunakan peralatan snorkeling dan pisau pemotong. Lamun yang telah dicuplik selanjutnya di simpan dalam plastik sampel yang berisi alkohol 70%. Titik koordinat lokasi ditemukannya lamun diambil menggunakan GPS. Lamun yang ditemukan diidentifikasi di Laboratorium pendidikan biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Pasir Pengaraian menggunakan buku identifikasi *Seagrass of The World*, karangan (Green dan Short, 2003).

Preparasi sampel sebagai bagian dari isolasi dilakukan dengan tahapan-tahapan seperti uraian sebagai berikut: lamun yang telah dikoleksi selanjutnya dibersihkan menggunakan air mengalir. Lalu Lamun direndam ke dalam larutan HCl 5% di dalam wadah tertutup sambil sesekali diaduk selama 1 jam. Lamun yang telah direndam lalu dicuci lagi menggunakan air mengalir dan komponen epifit yang ditemukan dikeruk secara hati-hati menggunakan *scalpel* (alat logam pembersih lamun). Lamun dipotong kecil-kecil menggunakan gunting, selanjutnya potongan tersebut dikeringkan menggunakan oven pada suhu 37°C - 40°C hingga didapatkan berat konstan. Sampel yang telah dikeringkan dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan cara digerus menggunakan blender. Serbuk yang didapatkan digunakan sebagai sampel

penelitian. Serbuk sampel kemudian disimpan dalam kulkas untuk tahapan selanjutnya (Kannan, 2010) dibawa ke Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau dengan menggunakan wadah *cool box*.

Tahapan selanjutnya: serbuk lamun direndam dalam pelarut organik dengan kenaikan polaritas dari heksana, etil asetat dan etanol (1:4 w/v), dan disimpan selama dua minggu pada suhu ruangan dan ekstrak yang dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Konsentrat dilarutkan dalam pelarut dengan konsentrasi 5 mg/mL. Tahapan ini bermanfaat untuk menghasilkan ekstrak kental dari tumbuhan lamun yang telah diinventaris.

Pada penelitian ini strain bakteri yang digunakan untuk pengujian yaitu *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* yang didapat di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Kultur bakteri yang telah diremajakan di dalam media *Muller Hinton Broth* diencerkan dengan air salin 9 %. Sehingga diperoleh *optical density* (OD) dengan pengukuran spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm sebesar 0,1 atau setara 10^6 CFU. Uji aktivitas dilakukan dengan metode resazurin (Sarker *et al.*, 2007). Sebanyak 80 μ L sampel dan kontrol positif (*Amoxan*) dengan konsentrasi 10.000 μ g/mL dan diencerkan secara bertingkat dari konsentrasi final 1000 μ g/mL sampai dengan 15,625 μ g/mL dengan media *Muller Hinton Broth* di dalam mikroplat 96-well. Selanjutnya ditambahkan 10 μ L resazurin dengan konsentrasi 6 mg/mL dan diikuti dengan penambahan 10 μ L bakteri 10^6 CFU kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 Jam. Warna biru menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri sedangkan warna merah muda menandakan adanya pertumbuhan bakteri. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) ditentukan dengan cara melihat sumur bewarna biru pada konsentrasi terkecil. Pekerjaan dilakukan secara aseptis.

Hasil dan Pembahasan

Dari penelitian yang telah dilaksanakan lamun yang digunakan pada penelitian ini didapat dari perairan pantai Karang Tirta, Padang Sumatera Barat pada koordinat geografis $1^0 01.009$ LS dan $100^0 23.345$ BT sampai $1^0 01.841$ LS dan $100^0 22.952$ BT. Hasil ekstraksi serbuk lamun *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* (5,0 g) dengan variasi kepolaran pelarut yang berbeda yaitu etanol, etil asetat dan heksana diperoleh ekstrak pekat berupa gum berwarna coklat.

Resazurin memiliki warna biru yang tidak berfluorescent dan dapat tereduksi menjadi warna pink yang berfluorescent dalam bentuk resorufin. Perubahan warna dari biru (resazurin) menjadi warna pink (resorufin) merupakan indikator terjadinya reduksi oleh sel. Perubahan warna pada resazurin dilakukan oleh enzim-enzim dalam sel pada bagian mitokondria dan sitoplasma (Sarker *et al.*, 2007; Sani *et al.*, 2014; Pandey and Tripathi, 2014). Resazurin memiliki sensitivitas dan selektifitas yang baik dibanding metode lain (Bwanga *dkk.*, 2010). Metode resazurin memiliki beberapa kelebihan yaitu non-radioaktif, mudah digunakan, murah, tidak diperlukan keahlian khusus dalam penggunaan, pengujian dapat dilakukan cepat pada sampel yang banyak, tidak beracun, tidak mengganggu uji kimia, dan berguna untuk menentukan kecepatan tumbuh suatu sel (Rampersad, 2012; Martin *et al.*, 2003; Petrusa *et al.*, 2013).

Hasil uji bioaktivitas masing-masing sampel dengan metode resazurin dapat dijelaskan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Berdasarkan reaksi redok maka warna biru menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri sedangkan warna merah muda menandakan adanya pertumbuhan bakteri. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) ditentukan dengan cara melihat sumur bewarna biru pada konsentrasi terkecil.

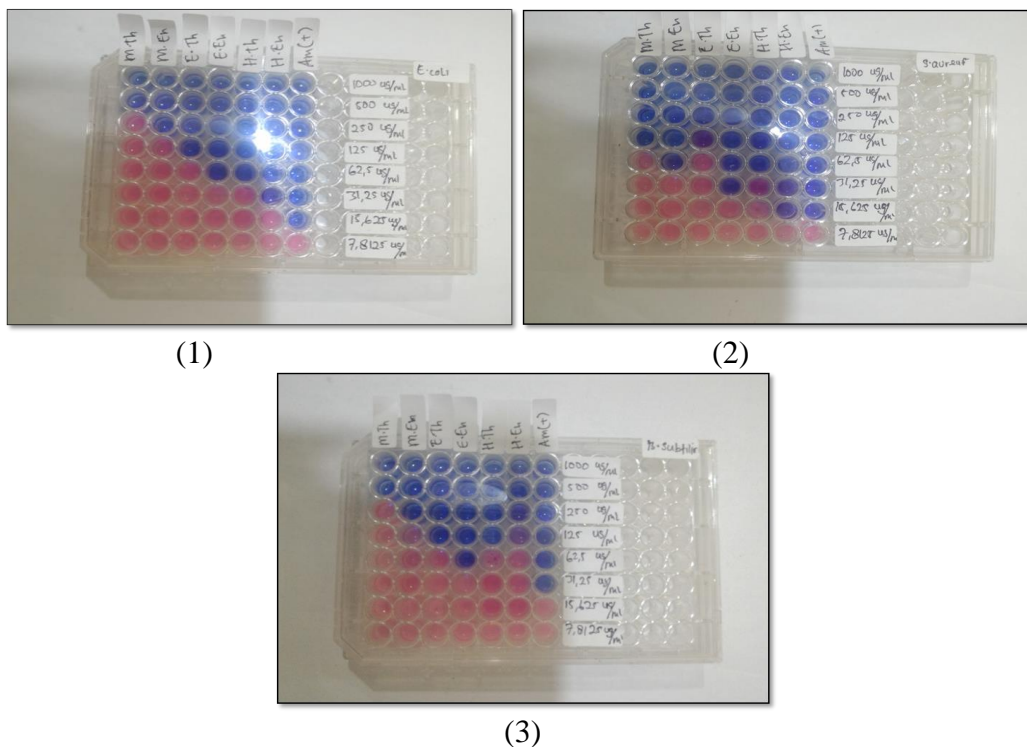
Berdasarkan data di atas (Tabel 1 dan Gambar 2), Ekstrak *Enhalus acoroides* dengan pelarut Etil Asetat terhadap *Escherichia coli* memiliki MIC sebesar 31,25 μ g/mL, tetapi nilai MIC Amoxan lebih kecil yaitu sebesar 15,625 μ g/mL. Uji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* Ekstrak *Enhalus acoroides* dengan pelarut

N-Heksana memiliki nilai MIC yang sama dengan nilai MIC dari Amoxan yaitu

sebesar 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides*.

Sampel	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Stapillococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Ekstrak Etanol <i>Thalassia hemprichii</i>	500	125	500
Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	250	62,5	250
Ekstrak Etil asetat <i>Thalassia hemprichii</i>	125	250	125
Ekstrak Etil asetat <i>Enhalus acoroides</i>	31,25	31,25	62,5
Ekstrak N-heksana <i>Thalassia hemprichii</i>	62,5	62,5	125
Ekstrak N-heksana <i>Enhalus acoroides</i>	31,25	15,625	250
Amoxan (+)	15,625	15,625	31,25



Gambar 1. Hasil Uji Antibakterial *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* terhadap *Escherichia coli* (1), *Stapillococcus aureus* (2), *Bacillus subtilis* (3)

Sedangkan, ekstrak *Enhalus acoroides* dengan pelarut Etil Asetat terhadap *Bacillus subtilis* memiliki nilai MIC yang cukup baik dari yang lain sebesar 62,5 $\mu\text{g/mL}$ dan MIC Amoxan sebesar 31,25 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan hasil tersebut kontrol positif Amoxan memiliki MIC yang terbaik dibandingkan keenam sampel yang diujikan. Semakin kecil nilai MIC, maka semakin tinggi aktivitas antibakterinya. Nilai MIC menunjukkan konsentrasi ekstrak terkecil yang masih menghambat mikroba uji. Jika nilai MIC makin kecil maka aktivitas antimikroba ekstrak bakteri

tersebut makin besar. Warna biru menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri sedangkan warna merah muda menandakan adanya pertumbuhan bakteri.

Hal ini menunjukkan besar kemungkinan ekstrak sampel tersebut mempunyai aktivitas anti mikroba pada bakteri uji bersifat bakteriosid (membunuh bakteri). Dinding sel bakteri gram negatif mempunyai susunan kimiawi yang lebih rumit atau kompleks jika dibandingkan dengan dinding sel bakteri gram positif. Hal ini menimbulkan rintangan yang besar bagi bahan antimikroba untuk dapat

menembusnya. Walaupun mengandung lebih sedikit peptidoglikan, tetapi di luar lapisan tersebut masih ada tiga polimer yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida. Selaput luar berfungsi mencegah kebocoran dari protein periplasma dan melindungi sel dari garam empedu dan enzim-enzim hidrolisa lingkungan sel. Pori protein di selaput luar menyebabkan selaput tersebut permeabel bagi zat terlarut dengan berat molekul rendah, tapi bagi zat yang mempunyai berat molekul besar seperti antibiotik relatif lambat untuk menembusnya (Jawetz et al, 2005).

Kesimpulan

Bioaktivitas antibakteri terbaik ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah dengan pelarut N-heksan 62,5 µg / mL dengan bakteri *Escherichia coli* dan *Stapillococcus aureus*. Sedangkan bioaktivitas antibakteri ekstrak *Enhalus acoroides* terbaik adalah dengan pelarut N-heksana 15,625 µg / mL dengan bakteri *Stapillococcus aureus*.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Ristekdikti) yang telah mendanai penelitian ini pada skema Penelitian Dosen Pemula tahun 2017.

Daftar Pustaka

Azwanida, N, N. 2015. A Review On The Extraction Methods Use In Medical Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromatic Plants* 4: 196-201.

Bwanga, F., Moses, J., Melles, H., Sven, H. 2010. Evaluation of seven tests for the rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Uganda. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 14: 890–895.

Bjork, M., Fred, S., Elizabeth, M., Sven, B. 2008. *Managing Seagrasses for Resilience to Climate Change*. IUCN. Gland. Switzerland.

El Din., Nihal G., Shams., Zeinab M., El-Sherif. 2013 "Nutritional value of *Cymodocea nodosa* and *Posidonia oceanica* along the western Egyptian Mediterranean coast." *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 39(3): 153-165.

Green, P. E dan F. T, Short. 2003. *World Atlas of Seagrasses*. Prepared by the UIMEP World Conservation Monitoring Centre. University of California Press, Berkeley. USA.

Jawetz., Melnick., Adelberg's., 2005 *Medical Microbiology*. Salemba Medika, Jakarta.

Kannan, R, R., Arumugam, R., Anantharaman, P. 2010. Antibacterial Potential Of Three Seagrasses Against Human Pathogens. *Asian Pasific Journal Of Tropical Medicine*: 890-893.

Kannan, R, R., Arumugam, R, Iyapparaj, P., Thangaradjou, T., Anantharaman, P. 2013. *In Vitro* Antibacterial, Cytotoxicity and Haemolytic Activities and Phytochemical Analysis Of Seagrasses From The Gulf Of Mannar, South India. *Food Chemistry* 136: 1484-1489.

Kuo, J. 2007. New Monoecious Seagrass of *Halophila sulawesii* (Hydrocharitaceae) from Indonesia. *Aquat Bot* 87: 171-175.

Kuriandewa, T. E., Supriyadi I. H. 2006. Seagrass Mapping in East Bintan Coastal Area, Riau Archipelago, Indonesia, Indonesia. *Coastal Marine Science* 30 (1): 154-161.

Mani, A. E. Velammal, A dan Jamila, P. 2012. Phytochemicals of The Seagrass *Syringodium Isoetifolium* and Its Antibacterial And Insecticidal Activities, *European Journal of Biological Sciences* 4 (3): 63-67.

Martin, A., Camacho, M., Portaels, F., Palomino, J. C. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (11): 3616-

- 3619.
- Pandey, A., Shalini, T. 2014. Concept Of Standardization, Extraction and Pre Phytochemical Screening Strategies For Herbal Drug. *Journal Of Pharmacognosy and Phytochemical* 2 (5): 115-119.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A. 2013. Plant Flavonoids Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* 14 14950-14973.
- Purnama, A. A., Zakaria, I. J., Nurdin, J. 2014. The Diversity And Distribution Of Seagrass In Karang Tirta Beach Padang City, West Sumatera. Prosiding International Conference Shiite 4th Annual Syiahkuala University (AIC - UNSYIAH) in conjunction With The 9th Annual International Workshop and Expo on Sumatra Tsunami Disaster and Recovery, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, 22 – 24 Desember 2014. Syiah Kuala University Press. pp: 172-176.
- Rampersad, S.N. 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *J. Sensors*: 12347-12360.
- Rompas, R. A., Hosea, J. E., Adithya, Y. 2012. Isolation and Identification Of Flavonoids In Seagrass Leaf (*Syringodium isoetifolium*). *PHARMACON* 1(2): 222 - 227
- Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob Inbaneson, S., and Vinodkumar, T. 2010. Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens. *Journal of Environmental Biology* 31(3): 387 - 392.
- Ravikumar, S., Ali, M. S., Anandh, P., Ajmalkhan, M., and Dhinakaraj, M. 2011. Antibacterial activity of *Cymodocea serrulata* root extract against chosen poultry pathogens. *Indian Journal of Science and Technology* 4(2): 98-100.
- Sani, R. N., Nisa, F. C., Andriani. R.D and Maligan, J. M. 2014. Yield Analysis and Phytochemical Screening Ethanol Extract of Marine Microalgae *Tetraselmis Chui*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2(2): 121-126.
- Sarker, S. D., Lutfun, N., Yashodharan, K. 2007. Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and Its Application in the in Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Methods* 42: 321 – 24.
- Subhashini, P., Elangovan, D., Thirunavukkarasu, T., Jutta, P. 2013, *Bioactive Natural Products From Marine Angiosperm: Abundance and Functions*, Natural Product Bioprospect: 129 - 136.
- Steele, L., Melanie, C., Anne, B., Tom, A. 2015. "Seagrass-pathogen interactions: 'pseudo induction' of turtlegrass phenolics near wasting disease lesions." *Marine Ecology Progress Series* 303: 123-131.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., Remyaraju, A, Subhadradevi, V., Ravi, T.K. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of ethnopharmacology* 124(3): 646-648.