

Skrining aktivitas antimikobakteri ekstrak etanol spons dari Perairan Malalayang Sulawesi Utara

MAGIE M. KAPOJOS^{1,*}, DELFLY B. ABDJUL^{1,2}

¹Program Studi Farmasi, Universitas Prisma. Jl. Tikala Baru, Manado, Sulawesi Utara, Indonesia.

²Badan Penelitian dan Pengembangan Daerah Provinsi Sulawesi Utara. Jl. 17 Agustus, Manado, Sulawesi Utara, Indonesia

*email korespondensi: magiekapojos@prisma.ac.id

Abstrak. Kapojos MM dan Abdjul DB. 2024. Skrining aktivitas antimikobakteri ekstrak etanol spons dari Perairan Malalayang Sulawesi Utara. Penyakit tuberkulosis (TB) masih menjadi persoalan serius yang dihadapi oleh dunia termasuk Indonesia karena prevalensi yang banyak dengan angka kematian tinggi serta waktu pengobatan penyakit ini yang cukup lama. Permasalahan penyakit ini lebih diperkeruh dengan munculnya kasus resistensi terhadap obat TB konvensional. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan ini adalah dengan menemukan obat TB baru yang lebih efektif dan efisien. Spons adalah organisme laut yang sampai saat ini tetap menjadi sumber produktif dalam penemuan senyawa bioaktif baru karena keragaman struktural yang unik dengan aplikasi farmasetikal yang potensial. Mengingat Sulawesi Utara merupakan salah satu perairan di wilayah timur Indonesia yang memiliki keanekaragaman organisme laut yang tinggi maka spons dari perairan ini merupakan organisme target yang potensial untuk penemuan obat TB baru. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan skrining aktivitas antimikobakteri spons yang diperoleh dari Perairan Malalayang, Sulawesi Utara. Pengujian aktivitas antimikobakteri menggunakan strain *Mycobacterium smegmatis* dengan metode difusi cakram agar. Skrining aktivitas antimikobakteri dilakukan pada 10 jenis spons. Hasil skrining menunjukkan bahwa ekstrak etanol spons dengan kode sampel M10 memiliki aktivitas antimikobakteri kategori sedang dengan rerata diameter zona hambat 10 mm pada konsentrasi 50 µg/disk. Pemurnian dan identifikasi senyawa murni antimikobakteri pada spons M10 merupakan topik penelitian lanjutan yang sangat menarik.

Kata kunci: Spons, antimikobakteri, *Mycobacterium smegmatis*, tuberkulosis

Abstract. Kapojos MM and Abdjul DB. 2024. *Screening of antimycobacterial activity of ethanol extract from sponges collected at Malalayang Waters, North Sulawesi. Tuberculosis (TB) is still a serious problem faced by the world, including Indonesia, because of its high prevalence with a high mortality rate and a long treatment time for this disease. The emergence of cases of resistance to conventional TB drugs further complicates the problem of this disease. One of the efforts that can be made to overcome this problem is to find new TB drugs that are more effective and efficient. Sponges are marine organisms that to date remain a productive source in the discovery of new bioactive compounds due to their unique structural diversity with potential pharmaceutical applications. Considering that North Sulawesi is one of the waters in the eastern region of Indonesia that has a high diversity of marine organisms, sponges from this area are potential target organisms for the discovery of new TB drugs. The purpose of this study is to screen the antimycobacterial activity of marine sponges obtained from Malalayang Waters, North Sulawesi. The antimycobacterial activity was tested using the strain of *Mycobacterium smegmatis* by the agar diffusion method. Screening of antimycobacterial activity was carried out on 10 types of marine sponges. The screening results showed that the ethanol extract of marine sponge M10 had moderate antimycobacterial activity with an average inhibition zone diameter of 10 mm at a concentration of 50 µg/disk. The purification and identification of pure antimicrobacterial compounds in M10 sponges is a very interesting topic for further research.*

Keywords: Sponge, antimycobacterial, *Mycobacterium smegmatis*, Tuberculosis

PENDAHULUAN

Organisme laut menghasilkan berbagai macam substansi bioaktif yang menunjukkan beragam potensi aktivitas farmakologis dengan fitur struktural yang unik dan tidak ditemukan pada organisme darat (Haque *et al.*, 2022; Jiménez, 2018). Substansi tersebut diyakini memainkan peranan penting dalam mempertahankan diri dari predator dan persaingan mengingat organisme ini hidup pada lingkungan yang khusus seperti rentang termal

yang luas, tekanan tinggi, konsentrasi garam tinggi dan sebagainya (Cragg & Newman, 2013; Datta *et al.*, 2015). Berdasarkan kenyataan bahwa lautan menutupi lebih dari tujuh puluh persen permukaan bumi, maka lingkungan laut merupakan sumber yang menarik dan berpotensi untuk pencarian produk alam sebagai kandidat obat baru.

Spons adalah organisme laut yang sampai saat ini tetap menjadi sumber produktif dalam penemuan baru senyawa bioaktif dengan keragaman struktural dan aplikasi farmasetikal yang potensial. Sejak diisolasinya senyawa

spongothymidine dan spongouridine dari spons Karibia *Tectitethya crypta* oleh kelompok riset Bergmann di tahun 1950 yang menjadi tahap awal dalam penemuan obat leukimia akut cytarabine (Cytosar-U[®]), penelitian untuk mencari senyawa bioaktif sebagai kandidat obat baru dari spons berkembang sangat pesat (Altmann, 2017). Perkembangan ini dipengaruhi oleh dua faktor penting yang saling berkaitan yaitu 1) asosiasi spons dengan banyak jenis mikroorganisme dan 2) spons kaya akan metabolit sekunder (Altmann, 2017; Hong *et al.*, 2022). Data terbaru terkait jumlah senyawa baru yang diisolasi dari spons dilaporkan oleh Hong *et al.*, 2022, dimana jumlah senyawa baru yang diisolasi dari organisme ini selang waktu antara tahun 2009-2018 berjumlah 2762 senyawa dan 1419 diantaranya menunjukkan aktivitas terhadap beberapa pengujian bioaktivitas dan sampai saat ini telah berkontribusi sebesar 23% dalam penemuan obat paten yang telah disetujui dari laut (Hong *et al.*, 2022). Namun demikian spons tetap memiliki potensi yang besar dalam upaya penemuan senyawa sebagai kandidat obat baru untuk mengatasi penyakit manusia mengingat pengujian senyawa bioaktif dari spons dalam suatu penelitian umumnya hanya dilakukan pada satu atau dua aktivitas saja (Hong *et al.*, 2022).

Penyakit tuberkulosis (TB) masih menjadi permasalahan kesehatan dunia dan Indonesia. Hal ini disebabkan oleh jumlah pasien cukup besar dengan angka kematian yang tinggi serta jangka waktu pengobatan yang lama. WHO melaporkan bahwa pada tahun 2021 sekitar 10,6 juta penduduk dunia menderita penyakit tuberkulosis dan jumlah total kematian akibat penyakit ini mencapai 1,6 juta jiwa sekaligus menjadi penyebab kematian karena infeksi tertinggi kedua di tahun tersebut setelah Covid-19 (Bagcchi, 2023). Sementara di tahun yang sama, jumlah penderita TB di Indonesia menempati peringkat ketiga setelah India dan Tiongkok dengan estimasi 824 ribu pasien dan menyebabkan 15 ribu kasus kematian (Kemenkes RI, 2022). Penyakit TB umumnya ditangani dengan pemberian obat antimikobakteri, namun pengobatan ini membutuhkan waktu yang cukup lama (6 bulan) dan harus disertai dengan pengawasan dan dukungan kepada pasien. Pengobatan dengan jangka waktu yang lama tersebut berpotensi untuk menimbulkan resistensi terhadap obat TB seperti MDR-TB (*Multi Drug Resistant Tuberculosis*) bahkan XDR-TB (*Extensively Drug Resistant Tuberculosis*) (Udwadia, 2012). Kondisi ini menyebabkan penelitian dalam rangka pencarian obat TB yang lebih efektif dan efisien masih menjadi daya tarik besar bagi para ilmuwan di dunia.

Perairan di Provinsi Sulawesi Utara merupakan salah satu perairan di wilayah timur Indonesia yang memiliki keanekaragaman organisme laut yang sangat tinggi. Kelimpahan keanekaragaman tersebut berkaitan dengan lokasi Sukawesi Utara yang termasuk dalam salah satu wilayah *World Coral Triangel* dan terkenal dengan keberlimpahan terumbu karang (Hanif *et al.*, 2019).

Merujuk pada penjelasan tersebut di atas, penelitian untuk mencari senyawa alam dari laut yang memiliki potensi anti TB sebagai kandidat obat baru yang efektif dan efisien masih sangat diperlukan. Mengacu pada keragaman

struktural senyawa bioaktif yang unik serta aplikasi farmasetikal, spons dari Perairan Malalayang Sulawesi Utara merupakan organisme target yang potensial untuk penemuan obat TB baru.

METODE

Desain penelitian

Desain penelitian bersifat eksperimental laboratorium dengan melakukan skrining antimikobakteri terhadap ekstrak etanol spons dari Perairan Malalayang. Pengujian aktivitas antimikobakteri menggunakan strain *Mycobacterium smegmatis* dengan metode difusi agar.

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari: gelas ukur, pipet mikro, erlenmeyer, corong kaca, kertas saring, cawan petri, pengaduk, pinset, spatula, jarum ose, neraca analitik, inkubator, kertas cakram (6 mm), jangka sorong, autoklaf, *rotary evaporator*, kertas label, spidol, gunting, pisau, talenan, plastik *zipper* dan *cool box*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari: spons dari Perairan Malalayang, mikobakteri strain *M. smegmatis*, etanol 96%, metanol, akuades, media *Middlebook 7H9*, poliasorbat 80, gliserol, dan *middlebook AADC*.

Prosedur penelitian

Pengambilan sampel

Spons diperoleh dari Perairan Malalayang, Kota Manado, Sulawesi Utara dengan menggunakan peralatan snorkel. Sampel spons yang diperoleh dimasukkan ke dalam plastik *zipper* yang telah diberikan label nomor sampel dan ditempatkan dalam *cool box*. Sampel tersebut selanjutnya dibawa ke Laboratorium Farmasi Universitas Prisma untuk penanganan selanjutnya.

Ekstraksi spons

Ekstraksi spons dilakukan dengan metode maserasi. Sampel spons dipotong kecil seukuran dadu dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan direndam dengan pelarut etanol 96% sampai seluruh sampel terendam dengan sempurna. Proses perendaman dilakukan selama 1x24 jam dengan sesekali pengadukan. Setelah maserasi selesai, maserat yang diperoleh disaring dengan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Selanjutnya, dilakukan remaserasi lagi dengan proses yang sama sebanyak dua kali. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi digabungkan dan dikeringkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kasar atau etanol ekstrak.

Persiapan larutan uji

5 mg ekstrak kasar dari masing-masing spons dilarutkan dalam 1 mL metanol sehingga menghasilkan larutan induk untuk pengujian dengan konsentrasi 5 mg/mL.

Sterilisasi alat

Peralatan gelas dan media kultur yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit

pada suhu 121°C sementara pinset dan jarum ose disterilkan dengan pemijaran/pembakaran langsung.

Pengujian antimikobakteri

Pengujian aktivitas antimikobakteri menggunakan strain *M. smegmatis* dengan metode difusi agar (Abdul *et al.*, 2015). Organisme uji dikultur menggunakan media Middlebrook 7H9 dengan kandungan 0,05% polisorbat 80, 0,5% gliserol dan 10% middlebrook AADC pada suhu 37°C selama dua hari. Kemudian inokulum ditebarkan ke atas media kultur yang mengandung 1,5% agar pada wadah pengujian. 10 µL sampel uji dari larutan induk pengujian (konsentrasi 5 mg/mL) ditotolkan pada masing-masing cakram (6 mm) dengan mikropipet sehingga menghasilkan konsentrasi uji 50 µg/disk. Setelah metanol pada cakram kering, selanjutnya ditempatkan pada wadah pengujian (cawan petri) yang telah berisi media kultur dengan agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada pengujian ini menggunakan streptomycin sulfat (5 µg/disk) sebagai kontrol positif dan metanol (5 µL) sebagai kontrol negatif. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi dengan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram menggunakan jangka sorong. Pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 10 sampel spons yang berhasil dikoleksi dari Perairan Malalayang, Kota Manado, Sulawesi Utara dengan peralatan snorkel. Sebelum proses ekstraksi dengan etanol, masing-masing spons dipotong kecil seukuran dadu terlebih dahulu. Perlakuan tersebut dilakukan dengan tujuan untuk memaksimalkan interaksi antara sampel dan pelarut sehingga dapat mengoptimalkan jumlah senyawa aktif yang dapat ditarik oleh pelarut (Oeiyo *et al.*, 2019). Sementara pemilihan etanol sebagai pelarut untuk ekstraksi berkaitan erat dengan beberapa keuntungan yang dimiliki oleh pelarut ini seperti bersifat universal sehingga dapat melarutkan senyawa aktif polar serta non polar, ekonomis dan tidak bersifat toksik (Mubarak *et al.*, 2018; Tumundo *et al.*, 2024). Metode maserasi dipilih untuk ekstraksi dalam penelitian ini karena pengerjaan dengan metode tersebut sangat sederhana serta dapat menghindarkan dari terjadinya degradasi atau kerusakan senyawa aktif (Susanty & Bachmid, 2016).

Pengujian aktivitas antimikobakteri menggunakan strain *M. smegmatis*. Strain mikobakteri dapat diklasifikasikan dalam dua kelompok berdasarkan pertumbuhan *in-vitro* yakni strain non patogen yang tumbuh cepat serta strain patogen yang tumbuh lambat (Nguta *et al.*, 2015). Penggunaan strain uji patogen dengan pertumbuhan lambat merupakan pilihan yang tidak efisien karena tidak dapat menyaring senyawa bioaktif anti mikobakteri dengan jumlah besar dalam waktu yang cepat serta strain tersebut memiliki resiko terhadap kesehatan dalam proses pengujian. Bertitik tolak dari hal tersebut, *M. smegmatis* merupakan pilihan strain terbaik yang dapat digunakan dalam pengujian untuk menemukan senyawa

bioaktif kandidat obat TB karena beberapa alasan yaitu: 1) Tidak bersifat patogen, 2) Penanganan pengujian yang mudah, dan 3) Laju pertumbuhan strain *M. smegmatis* lebih cepat dari *M. tuberculosis* (Nguta *et al.*, 2015). Selain itu diinformasikan juga bahwa pola kerentanan strain *M. smegmatis* terhadap dua obat TB lini depan (isoniazid dan rifampisin) identik dengan isolat klinis MDR-TB strain *M. tuberculosis* (Pauli *et al.*, 2005).

Skrining aktivitas antimikobakteri dilakukan pada 10 jenis spons yang diperoleh dari Perairan Malalayang dengan konsentrasi pengujian 50 µg/disk. Hasil pengujian berupa diameter zona hambat (mm) dari ekstrak etanol spons, kontrol positif (streptomycin sulfat) dan kontrol negatif (metanol) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas antimikobakteri ekstrak etanol spons terhadap pertumbuhan *M. smegmatis*

Kode Sampel Spons	Konsentrasi Pengujian (µg/disk)	Rerata Diameter Zona Hambat (mm)
M1	50	0
M2	50	0
M3	50	0
M4	50	0
M5	50	0
M6	50	0
M7	50	0
M8	50	0
M9	50	0
M10	50	10
streptomycin sulfat (Kontrol positif, 5 µg)		26
metanol (Kontrol negatif, 5 µL)		0

Hasil pengujian antimikobakteri menunjukkan bahwa etanol ekstrak spons dengan kode sampel M10 mampu menghambat pertumbuhan *M. smegmatis* dengan rerata diameter zona hambat 10 mm pada konsentrasi 50 µg/disk sementara 9 ekstrak etanol spons lainnya tidak aktif pada konsentrasi yang sama. Aktivitas antimikobakteri spons M10 membuktikan bahwa dalam ekstrak etanol spons ini terkandung senyawa murni yang dapat menghambat pertumbuhan *M. smegmatis*.

Pada pengujian yang sama, streptomycin sulfat yang dijadikan sebagai kontrol positif menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi dengan rata-rata diameter zona hambat 26 mm (konsentrasi 5 µg/disk) sementara metanol (5 µL) kontrol negatif tidak memperlihatkan aktivitas. Aktivitas antimikobakteri streptomycin melalui penghambatan sintesis protein khususnya pada tahap inisiasi translasi (Wei *et al.*, 2022). Rata-rata zona hambat dari kontrol positif tiga kali lebih kuat dari ekstrak etanol spons M10. Hal ini disebabkan streptomycin sulfat (kontrol positif) merupakan senyawa murni antimikobakteri sementara ekstrak etanol M10 masih

berupa ekstrak kasar yang terdiri dari banyak senyawa dan senyawa spesifik antimikobakteri belum dimurnikan.

Menurut (Alves *et al.*, 2000), aktivitas anti bakteri berdasarkan diameter zona hambat dapat dibagi menjadi empat kelompok yakni: inaktif (<9 mm), sedang (9-12 mm), aktif (13-18 mm) serta sangat aktif (>18 mm). Berdasarkan hasil pengamatan, ekstrak etanol spons M10 menunjukkan aktivitas antimikobakteri kategori sedang terhadap *M. smegmatis*. Hasil ini juga membuktikan bahwa spons yang berasal dari Perairan Sulawesi Utara memiliki potensi yang sangat baik dalam upaya penemuan obat anti-TB baru.

PENUTUP

Kesimpulan

Ekstrak etanol spons M10 memiliki aktivitas antimikobakteri kategori sedang terhadap *M. smegmatis* dengan rerata diameter zona hambat 10 mm pada konsentrasi 50 µg/disk.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk pemurnian dan identifikasi senyawa murni antimikobakteri Spons kode M10.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdjul, D. B., Yamazaki, H., Kanno, S.-I., Takahashi, O., Kirikoshi, R., Ukai, K., & Namikoshi, M. (2015). Structures and biological evaluations of agelasines isolated from the Okinawan marine sponge *Agelas nakamurai*. *Journal of Natural Products*, 78(6). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00375>.
- Altmann, K. H. (2017). Drugs from the oceans: Marine natural products as leads for drug discovery. *Chimia*, 71(10), 646–651. <https://doi.org/10.2533/chimia.2017.646>.
- Alves, T. M. D. A., Fonseca Silva, A., Brandão, M., Mesquita Grandi, T. S., Smânia, E. D. F. A., Smânia, A., & Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), 367–373. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000300012>.
- Bagcchi, S. (2023). WHO's global tuberculosis report 2022. *The Lancet Microbe*, 4(1), e20. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00359-7)
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.
- Datta, D., Nath Talapatra, S., & Swarnakar, S. (2015). Bioactive Compounds from marine invertebrates for potential medicines - An overview. *International Letters of Natural Sciences*, 34, 42–61. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.34.42>.
- Hanif, N., Murni, A., Tanaka, C., & Tanaka, J. (2019). Marine natural products from Indonesian waters. *Marine Drugs*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060364>.
- Haque, N., Parveen, S., Tang, T., Wei, J., & Huang, Z. (2022). Marine natural products in clinical use. *Marine Drugs*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/md20080528>
- Hong, L.-L., Ding, Y.-F., Zhang, W., & Lin, H.-W. (2022). Chemical and biological diversity of new natural products from marine sponges: a review (2009–2018). *Marine Life Science & Technology*, 4(3), 356–372. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00132-3>.
- Jiménez, C. (2018). Marine natural products in medicinal chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(10), 959–961. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00368>.
- Kemkes RI. 2022. Dashboard TB. <https://tbindonesia.or.id/pustaka-tbc/dashboard-tb/>.
- Mubarak, F., Sartini, S., & Purnawanti, D. (2018). Effect of ethanol concentration on antibacterial activity of bligo fruit Extract (*Benincasa hispida* Thunb) to *Salmonella typhi*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 5(3), 76. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v5i3.16444>.
- Nguta, J. M., Appiah-Opong, R., Nyarko, A. K., Yeboah-Manu, D., & Addo, P. G. A. (2015). Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(3), 165–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.004>.
- Oeiyo, W. E., Simbala, H. E., & Rotinsulu, H. (2019). Uji aktivitas antimikroba ekstrak dan fraksi spons *Liosina paradoxa* dari Perairan Desa Tumbak Minahasa Tenggara terhadap pertumbuhan mikroba *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*. *Jurnal PHARMACON*, 8, 629–638.
- Pauli, G. F., Case, R. J., Inui, T., Wang, Y., Cho, S., Fischer, N. H., & Franzblau, S. G. (2005). New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences*, 78(5), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.004>.
- Susanty, S., & Bachmid, F. (2016). Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap kadar fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*, 5(2), 87. <https://doi.org/10.24853/konversi.5.2.87-92>.
- Tumundo, S. C., Wewengkang, D. S., & Jumriadi. (2024). Uji potensi antibakteri ekstrak spons *Stylissa Carteri* dari Perairan Poopoh Minahasa terhadap bakteri *Staphylococcus Aureus* dan *Pseudomonas Aeruginosa*. 13(1), 529–539. <https://doi.org/10.35799/pha.13.2024.49697>.
- Udwadia, Z. F. (2012). MDR, XDR, TDR tuberculosis: ominous progression. *Thorax*, 67(4), 286–288. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201663>.
- Wei, W., Qiao, J., Jiang, X., Cai, L., Hu, X., He, J., Chen, M., Yang, M., & Cui, T. (2022). Dehydroquinase synthase directly binds to streptomycin and regulates susceptibility of *Mycobacterium bovis* to Streptomycin in a non-canonical mode. *Frontiers in Microbiology*, 13). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.818881>.