

**ISOCOPALANE DITERPENE DARI SPONGE LAUT
SEBAGAI ANTIBAKTERI RESISTEN *ESCHERICHIA COLI*
Isocopalane diterpene from Marine Sponge as Antibacterial Resisten
*Escherichia coli***

Viqqi Kurnianda¹⁾ dan Andi Setiawan²⁾

^{1,2)}Magister Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jl. Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1, Bandar Lampung 35145, HP/Telp.
082178742727; email: viqqi.kurnianda@yahoo.co.uk

Abstrak

Penelitian bioaktivitas sponge laut Indonesia 03K43 telah dilakukan. Fraksi V11B30 hasil kromatografi 03K43 mengandung senyawa isocopalane diterpene yang diisolasi dari sponge diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri resisten *Escherichia coli* dan menunjukkan aktivitas yang besar untuk MIC/MBC pada dosis 25 µg/mL. Pemberian dosis 25 µg/mL terhadap bakteri resisten *Escherichia coli* memberikan efek bioaktivitas yang besar dibandingkan dengan kontrol positif (Chloramphenicol). MIC/MBC yang dihasilkan oleh senyawa aktif sebesar 28 mm, sedangkan pada kontrol positif (Chloramphenicol) sebesar 9 mm.

Kata kunci: sponge, bioaktivitas, bakteri resisten, *Escherichia coli*, MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Abstract

A bioactivity research from Indonesian marine sponge 03K43 has been done. V11B30 fraction from chromatography 03K43 contain isocopalane diterpene compound isolated from sponge has activity as antibacterial resisten *Escherichia coli* and indicate big activity for MIC/MBC at dose of 25 mg/mL. Dose of 25 mg/mL give a big bioactivity effect compare with positive control (Chloramphenicol). Result MIC/MBC from active compound in the amount of 28 mm, whereas at positive control (Chloramphenicol) in the amount of 9 mm.

Keywords: sponge; bioactivity; antibacterial resisten; *Escherichia coli*; MIC (Minimum Inhibitory Concentration); MBC (Minimum Bactericidal Concentration).

PENDAHULUAN

Angka kematian akibat dari serangan berbagai penyakit semakin tahun semakin meningkat. Badan kesehatan PBB melaporkan bahwa penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dan angka kematian yang disebabkan oleh bakteri mencapai 8,6 juta jiwa^[1].

Dalam beberapa tahun terakhir ini penelitian kimia tertuju pada sponge, terutama yang berkaitan dengan metabolik sekunder pada sponge yang dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi^[2]. Telah banyak dilaporkan bahwa sponge sangat potensial sebagai penghasil produk alami laut dalam bidang farmasi. Senyawa yang terkandung di dalam sponge dapat digunakan sebagai anti tumor, anti virus, anti jamur, anti malaria dan lain-lain^[3-4]. Tetapi Penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri menjadi tidak efektif karena bakteri dapat memproduksi enzim yang membuat dirinya resisten terhadap antibiotic^[5].

Hasil terbaru melaporkan bahwa ekstrak alkaloid yang berasal dari sponge diketahui sebagai anti bakteri. Steroidal alkaloid yang berasal dari sponge telah diteliti sebagai anti angiogenik, golongan terpenoid yang berasal dari sponge juga dilaporkan sebagai penghambat sel kanker^[6-8].

A. Wyk, *et al* (2007) melaporkan bahwa ekstrak sponge mengandung senyawa diterpen isocopalane diacetate^[9]. Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi senyawa diterpen

isocopalane yang memiliki bioaktivitas terhadap bakteri resisten *Escherichia coli*, sehingga dapat memberikan informasi struktur dan peluang pengembangan kajian hubungan struktur dan aktivitas untuk pengembangan di bidang ilmu kimia dan kedokteran.

METODE PENELITIAN

2.1 Prosedur Umum Eksperimen

Data spektrum NMR diukur menggunakan Jeol 500 MHz (CD₃OD dan H₂O). Data MS-ESI diukur menggunakan LCMS-ESI.

2.2 Spesimen sponge

Sponge diambil di perairan kupang. Deposit sponge diambil, disimpan dan dianalisis di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (Indonesia).

2.3 Spesimen Bakteri

Bakteri resisten *Escherichia coli* diambil dari pasien RSUD Abdul Moeloek dan dibiakkan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (Indonesia).

2.4 Ekstraksi dan Isolasi

Crude Sponge (15 gr basah) dipartisi menggunakan n-Heksana : H₂O (1:1 v/v). Hasil partisi yang didapat ekstrak n-Heksan (0,18 gr) dan ekstrak polar (14,82 gr). Ekstrak polar dipartisi kembali menggunakan DCM (1:1 v/v) dan dievaporasi menghasilkan ekstrak DCM (0,62 gr) dan ekstrak polar (14,2 gr). Crude ekstrak polar (14,2 gr) difraksinasi menggunakan kromatografi kolom RP-C18 dan dielusi menggunakan H₂O dan MeOH (H₂O dan MeOH 100%). Hasil fraksinasi ekstrak MeOH (2,85 gr) difraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom NP-SiO₂ dielusi menggunakan CHCl₃ : EtOH gradien dari 8:2, 7:3, 5:5, 3:7, dan EtOH 100%. Fraksi CHCl₃ : EtOH gradien (5:5) ditetapkan sebagai senyawa target dan diuji bioaktivitas terhadap bakteri resisten *Escherichia coli*.

2.5 Media Pertumbuhan Bakteri

Strain bakteri resisten *Escherichia coli* ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) pada suhu 37°C.

2.6 Screening sponge

Uji screening sponge menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 2,5 gram dilarutkan kedalam 100 mL aquadest. Kemudian dimasukkan kedalam autoclave bersamaan dengan petri dish, tabung reaksi, cakram (ring) selama 2 jam pada suhu 121°C. Setelah autoclave selesai, media NA dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan bakteri resisten *Escherichia coli* kemudian dituang di petri dish dan didiamkan beberapa saat hingga media NA membentuk jell. Kemudian ditambahkan cakram (ring) di media NA dan diberikan DMSO 2% sebagai kontrol negative, senyawa sponge dan chloramphenicol 30 µg/mL sebagai kontrol positif. Petri dish dimasukkan kedalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C dan zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk disekitar cakram (ring) diukur^[10].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak MeOH difraksinasi menggunakan kolom RP-18 dan SiO₂ dan dielusi dengan CHCl₃ : EtOH (1:1) menghasilkan fraksi V11B30 yang memiliki bioaktivitas terhadap bakteri resisten *Escherichia coli*.

3.1 Identifikasi struktur

Formula molekul fraksi V11B30 telah ditentukan sebagai $C_{24}H_{44}O_5$ oleh LCMS-ESI $[M+H]^+$ 415.576 m/z (Figure 1).

Figure 1. Isocopalane diterpene

Yellow oil: 1H NMR ($CD_3OD : H_2O$, 500 MHz) δ : 1.56; 1.30 (H-1), 1.29 (H-2), 1.06; 1.53 (H-3), 0.69 (H-5), 1.62; 1.64 (H-6), 1.33; 1.56 (H-7), 1.36 (H-9), 1.67; 1.82 (H-11), 3.05 (H-12), 1.46 (H-14), 4.16; 4.22 (H-15), 1.12 (H-16), 1.49 (H-17), 0.82 (H-18), 0.85 (H-19), 0.84 (H-20), 4.74 (H-1'), 4.81 (H-1''), 1.17 (H-2'), 1.15 (H-2''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 36.7 (C-1), 19.64 (C-2), 41.2 (C-3), 34.1 (C-4), 57.7 (C-5), 15.4 (C-6), 40.1 (C-7), 35.2 (C-8), 55.9 (C-9), 37.7 (C-10), 25.2 (C-11), 78.8 (C-12), 75.7 (C-13), 57.5 (C-14), 57.7 (C-15), 27.8 (C-16), 25.2 (C-17), 21.9 (C-18), 29.3 (C-19), 12.6 (C-20), 45.4 (C-1'), 43.9 (C-1''), 15.46 (C-2') 15.08 (C-2''); LCMS-ESI $[M+H]^+$ m/z 415.5764, $C_{24}H_{44}O_5$.

Berdasarkan hasil NMR sampel V11B30, menunjukkan kesamaan kerangka struktur seperti yang telah dilaporkan^[9].

Pada 1H NMR, nilai *chemical shift* pada δ 1.56 ppm (H-1), δ 1.29 ppm (H-2), δ 1.06; 1.53 ppm (H-3), δ 0.69 ppm (H-5), δ 1.62; 1.64 ppm (H-6), δ 1.33; 1.56 ppm (H-7), δ 1.36 ppm (H-9), δ 1.67; 1.82 ppm (H-11), δ 1.46 ppm (H-14), δ 1.16, 4.22 ppm (H-15), δ 1.12 ppm (H-16), δ 1.49 ppm (H-17), δ 0.82 ppm (H-18), δ 0.85 ppm (H-19) dan δ 0.84 ppm (H-20) (Tabel 1) memiliki kesamaan *chemical shift* seperti yang telah dilaporkan oleh Wyk *et al* (2007).

Pada ^{13}C NMR, nilai *chemical shift* pada δ 36.7 ppm (C-1), δ 19.64 (C-2), δ 41.2 ppm (C-3), δ 34.17 ppm (C-4), δ 57.75 ppm (C-5), δ 15.46 ppm (C-6), δ 40.17 ppm (C-7), δ 35.29 ppm (C-8), δ 45.58 ppm (C-9), δ 37.79 ppm (C-10), δ 25.22 ppm (C-11), δ 78.85 ppm (C-12), δ 75.75 ppm (C-13), δ 57.44 ppm (C-14), δ 57.75 ppm (C-15), δ 27.87 ppm (C-16), δ 25.27 ppm (C-17), δ 21.99 ppm (C-18), δ 25.6 ppm (C-19) dan δ 12.6 ppm (C-20) (Tabel 1) memiliki kesamaan *chemical shift* seperti yang telah dilaporkan oleh Wyk *et al* (2007).

Pada 1H NMR, δ 0.69, 0.82, 0.84, 0.85, 0.96, 0.99, 1.02 dan 1.04 ppm merupakan gugus metil terminal (CH_3)^[9]. Signal 1H NMR pada δ 3.05 ppm merupakan gugus metoksi, sekaligus mengindikasikan senyawa labdane. Pada δ 1.18 ppm menunjukkan proton CH pada H-14. Sedangkan *chemical shift* ^{13}C -NMR pada C-12 dan C-13 merupakan resonansi deshielded dari karbon CH ^[9-12].

Tabel 1. Data NMR (500MHz, $CD_3OD;H_2O$)

Referensi	V11B30	Referensi	V11B30	Referensi	V11B30	V11B30
Position		δC		δH		Mult. (J), int
1		40.5 (t)	36.7 (t)	1.57	1.56	m, 1H
				0.69	1.30	m, 1H

Referensi	V11B30	Referensi	V11B30	Referensi	V11B30	V11B30
Position		δC		δH		Mult. (J), int
2		18.9 (t)	19.64 (t)	1.32	1.29	m, 1H
3		42.3 (t)	41.2 (t)	1.09	1.06	m, 1H
				1.34	1.53	m, 1H
4		33.5 (s)	34.17 (s)			-
5		57.2 (d)	57.75 (d)	0.73	0.69	m, 1H
6		18.7 (t)	15.46 (t)	1.48	1.62	m, 1H
				1.50	1.64	m, 1H
7		39.1 (t)	40.17 (t)	1.30	1.33	m, 1H
				1.53	1.56	m, 1H
8		38.7 (s)	35.29 (s)			-
9		52.6 (d)	45.58 (d)	1.35	1.36	m, 1H
10		38.0 (s)	37.79 (s)			-
11		23.7 (t)	25.22 (t)	1.76	1.67	m, 1H
				1.80	1.82	m, 1H
12		78.3 (d)	78.85 (d)	5.01	3.05	m, 1H
13		74.6 (s)	75.75 (s)			-
14		58.0 (d)	57.44 (d)	1.44	1.46	m, 1H
15		62.8 (t)	57.75 (t)	4.15	4.16	m, 1H
				4.27	4.22	m, 1H
16		27.2 (q)	27.87 (q)	1.12	1.12	s, 3H
17		26.1 (q)	25.27 (q)	1.41	1.49	s, 3H
18		21.7 (q)	21.99 (q)	0.80	0.82	s, 3H
19		33.6 (q)	29.33 (q)	0.83	0.85	s, 3H
20		16.6 (q)	12.6 (q)	0.82	0.84	s, 3H
1'		169.7 (s)	45.4 (s)		4.74	m, 1H
2'		20.6 (q)	15.46 (q)	1.72	1.17	s, 3H
1''		169.3 (s)	43.9 (s)		4.81	m, 1H
2''		20.6(q)	15.08 (q)	1.65	1.15	s, 3H

3.2 Bioassay

Senyawa V11B30 mengandung bioaktivitas sebagai aktivitas sebagai anti bakteri resisten gram negatif (bakteri resisten *Escherichia coli*) (Figure 2). Senyawa memperlihatkan aktivitas biologi pada konsentrasi 25 µg/uL (Tabel 2).

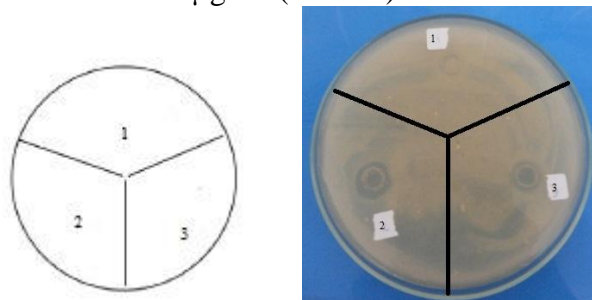


Figure 2. Bioaktivitas V11B30

Tabel 2. Bioassay

Nama Sampel	Zona Inhibition (mm)	MIC & MBC ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1. DMSO 2 %	0	-
2. V11B30	28	25
3. Chloramphenicol	9	30

PENUTUP

Kesimpulan

Kajian senyawa dari sponge laut Indonesia yang telah berhasil diisolasi bernama isocopalane diterpene memiliki bioaktivitas terhadap antibakteri resisten. Untuk pengetahuan kita, senyawa ini berasal dari golongan diterpene yang berasal dari sumber alami. Senyawa ini memiliki kerangka struktur yang sama dengan struktur senyawa yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Wyk, 2007).

Hasil dari uji bioaktivitas menunjukkan aktivitas yang besar pada dosis minimum 25 mg/mL dibandingkan dengan kontrol positif (Chloramphenicol) 30 mg/mL. Hasil ini menunjukkan aktivitas yang besar dibandingkan dengan obat generik (Chloramphenicol).

Saran

Kajian terhadap penelitian ini dapat membuka peluang untuk mempelajari mekanisme gugus fungsi senyawa yang berperan terhadap protein target bakteri resisten *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] WHO. 2014. *Global Health Observatory* (Online). (<http://www.who.int/gho>, diakses tanggal 27 agustus 2014).
- [2] Pronzato, R. Bavestrello, G. Cerrano, C. Magnino, G. Manconi, R. Pantelis, J. Sara, A. and Sidri, M. 1999. *Sponge Farming in the Mediterranean Sea: New Perspectives*. *Memoir of the Queensland Museum* 44: 485 - 491.
- [3] Soediro, I. S. 1999. Produk Alam Hayati Bahari dan Prospek Pemanfaatannya di Bidang Kesehatan dan Kosmetika. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: 41 – 52. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta, 1999.
- [4] Kobayashi, M dan Rachmaniar, R. 1999. Overview of Marine Natural Product Chemistry. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: 23 – 32. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta.
- [5] Krisnaningsih, M. M. Asmara, W. Wibowo, M. H. 2005. Uji Sensitivitas Isolat *Escherichia coli* Patogen Pada Ayam Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik. *Jurnal Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada*. Indonesia.
- [6] Arai, M. Yamano, Y. Kobayashi, M. 2014. Identification of the target protein of agelasine D, a marine sponge diterpene alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Journal ChemBioChem* 15(1): 177.
- [7] Arai, M. Kawachi, T. Setiawan, A. Kobayashi, M. 2010. Hypoxia-selective growth inhibition of cancer cells by furospinosulin - 1, a furanosesterterpene isolated from an Indonesian marine sponge. *ChemMedChem* 2010. 5(11): 1919-26.
- [8] Aoki, S. Watanabe, Y. Sanagawa, M. Setiawan, A. Kotoku, N. Kobayashi, M. 2006. Cortistatins A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex*. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128(10): 3148-9.

- [9] Wyk, A. W. W. Froneman, P. W. Bernard, K. S and Coleman, M. T. D. 2007. New isocopalane diterpene diester from a sub-Antarctic marine nudibranch. *Journal Arkivoc*. 2007(9): 121-128
- [10] Mbah, J. A. Ngemenya, M. N. Abawah, A. L. Babiaka, S. B. Nubed, L. N. Nyongbela, K. D. Lemuh, N. D and Efange, S. M. N. 2012. Bioassay-guided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. *Journal Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials 2012*, **11**:10.
- [11] Waridel, P. Wolfender, J. L. Lachavanne, J. B. and Hostettmann, K. 2004. *ent*-Labdane glycosides from the aquatic plant *Potamogeton lucens* and analytical evaluation of the lipophilic extract constituents of various *Potamogeton* species. *Journal Phytochemistry*. 2004(65): 945-954.
- [12] Munoz, M. A. Urzua, A. Echeverria, J. Bucio, M. A. Barragan, A. H and Nathan, P. J. 2012. Determination of absolute configuration of salvic acid, an *ent*-labdane from *Eupatorium salvia*, by vibrational circular dichroism. *Journal Phytochemistry*. 2012(80): 109-114.