Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fenol *Gracillaria verrucosa* terhadap Bakteri *Aeromonas salmonicida* secara in vitro

Mohammad A. Adam [1)*], Hardoko[2)], Maftcuh[2)]

[1)] Program Magister Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang
[2)] Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 31 Januari 2013, direvisi 14 April 2013

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh akivitas antibakteri ekstrak fenol *Gracillaria verrucosa* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida* serta berapa dosis dan lama ekstrak yang optimal. Metode yang digunakan adalah eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of Variance*) menunjukkan bahwa nilai rerata daya hambat pasca pemberian ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* adalah berbeda nyata (p < 0,05). Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan bahwa ektrak fenol *Gracilaria verrucosa* pada dosis 1,5 ppt mempunyai nilai rerata daya hambat tertinggi yaitu 15 mm, diikuti dosis 1 ppt dan 2 ppt dengan rerata masing-masing 10 mm dan 11 mm.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, *Gracilaria verrucosa*, *Aeromonas salmonicida*.

ABSTRACT

The aim of research were to investigeste the effect of antibacterial activity of phenolic extracts *Gracillaria verrucosa* on the growth of bacteria *Aeromonas salmonicida* and the number of doses and optimal time extract. The method used was an experiment with a completely randomized design (CRD). The concentration of the extract used were 1 ppt, 1.5 ppt and 2 ppt. Each treatment was done 3 replications. Based on the test results of ANOVA (*Analysis of Variance*) showed that the average value of the inhibition of post *Gracilaria verrucosa* phenol extract was significantly different (p <0.05). LSD (Least Significant Difference) showed that *Gracilaria verrucosa* phenol extract at a dose of 1.5 ppt has the highest average value of the inhibition by 15 mm, followed by a dose of 1 ppt and 2 ppt with a mean of respectively 10 mm and 11 mm.

Key word: antibacterial activity, *Gracilara verrucosa*, *Aeromonas salmonicida*.

PENDAHULUAN

Kasus terbesar gagalnya panen pada budidaya intensif ikan disebabkan adanya serangan penyakit infeksi. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, parasit, jamur dan virus yang secara normal hidup dan berada di perairan . Penyakit infeksi dapat dipicu melalui penyakit non-infeksi yaitu karena meningkatnya stres, intoksikasi dan menurunnya kualitas lingkungan [1]. *Aeromonas salmonicida* merupakan salah satu penyakit ikan golongan bakteri yang termasuk dalam kategori hama dan penyakit ikan karantina (HPIK) golongan II dan berdasarkan Undang–Undang RI No. 16 Tahun 1992 bahwa hama dan penyakit ikan karantina (HPIK) adalah semua hama dan penyakit ikan yang ditetapkan pemerintah untuk dicegah

---
*Coresponding author :
E-mail: ar.adam87@yahoo.com

masuknya ke dalam dan tersebarnya di dalam wilayah negara Republik Indonesia [2].

Aeromonas salmonicida merupakan penyebab penyakit furunculosis. Bakteri ini terutama menyerang pada ikan salmon, akan tetapi dapat juga menyerang ikan air tawar seperti ikan koki (*Carrasius auratus*), koi, mas (*Cyprinus carpio*) dan lele (*Clarias sp.*). Penyebarannya hampir di seluruh dunia seperti Amerika Serikat, Eropa, Jepang dan Australia, kecuali Amerika Selatan dan New Zealand. Berdasarkan Keputusan Menteri Nomor.17/MEN/2006 bahwa daerah– daerah di Indonesia yang pernah ditemukan bakteri ini yaitu pulau Jawa, Aceh Tengah dan Kalimantan Barat [3].

Faktor virulensi *Aeromonas sp.* ditentukan oleh *Extracellular Products Produced* (ECP) [4] yang ditunjukkan dengan memiliki lapisan tambahan (*A-layer*) pada permukaan luar membran sel [5]. *Aeromonas sp.* mempunyai pili tipe IV yang merupakan faktor virulensi pada rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [6]. Pili merupakan komponen bakteri yang mempunyai struktur berbentuk batang, merupakan tonjolan protein yang keluar dari permukaan bakteri dan berikatan dengan molekul permukaan hospes [7]. Pili terdapat pada elemen terluar bakteri yang berfungsi untuk melakukan perlekatan pada sel inang yang diperankan molekul adhesinya [8] dan ditambahkan juga [9] bahwa bagian pili yang terletak diujung telah diketahui berfungsi untuk perlekatan bakteri diperantarai oleh kesesuaian pili dan reseptor sel inang yang umumnya berupa karbohidrat.

Senyawa-senyawa yang diisolasi dari rumput laut diketahui memiliki fungsi sebagai antibakterial (bakterisidal). Senyawa-senyawa tersebut antara lain asam amino, terpenoids, phlorotanin, asam acrilic, senyawa fenol, steroid, hologenated keton dan alkanes, cyclic polysulphida dan asam lemak [10].

Alga merah juga mengandung senyawa fenol dari golongan florotannin yang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi [11]. *Gracilaria verrucosa* memiliki kemampuan antibakteri pada jenis *Bacillus subtilus* dan *Staphylococcus aureus* [12].

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan September s.d Desember 2012.

Bahan dan Alat. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rumput laut *Gracilaria verrucosa*, bakteri *Aeromonas salmonicida*, etanol 98%, etanol 60%, aquadest steril, media TSA, media NB, alkohol 70%, cotton swab, aluminium foil, kapas, tissue, kertas label dan kertas saring. Peralatan yang digunakan antara lain timbangan digital, spektrofotometer UV-Vis, waterbath, erlenmeyer, beaker glass, eppendorf, tabung reaksi, hot plate, corong, bunsen dan pipet volume 1 ml dan 5 ml.

Prosedur Penelitian. Ekstraksi Gracilaria verrucosa [13] yang dimodifikasi yaitu *Gracilaria verrucosa* kering sebanyak 200 gram dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dipotong kecil-kecil. Sampel *Gracilaria verrucosa* dimaserasi menggunakan pelarut ethanol 98 %,ethanol 60 % dan aquadest steril perbandingan 1:3 selama 1 hari, 2 hari dan 3 hari perendaman. Dalam proses ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dan disimpan di ruang penyimpanan pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sehingga didapat larutan. Larutan kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu titik didih pelarut yang digunakan, sampai tidak terjadi lagi pengembunan pelarut pada kondensor. Ekstrak difraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1 : 3 dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif dan identifikasi menggunakan spektrofometeri UV-Vis karena umumnya senyawa fenol yang merupakan senyawa aromatik, menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV-Vis [14]. Fraksi etil asetat dihitung dan disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Total fenol Gracilaria verrucosa dapat diketahui menggunakan metode [13] yang

dimodifikasi. Fraksi etil asetat sebanyak 100 µl dilarutkan dalam 1 ml aquades ditambah 0.5 ml folin denis reagen dan 0,6 ml natrium carbonate (Na2CO3), larutan dicampur selama 3 menit kemudian diinkubasi selama 90 menit pada suhu 30°C. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 760 nm. Nilai absorbansi tersebut dimasukkan kedalam persamaan garis linier dari kurva standar asam galat, sehingga kadar ekstrak *Gracilaria verrucosa* diketahui.

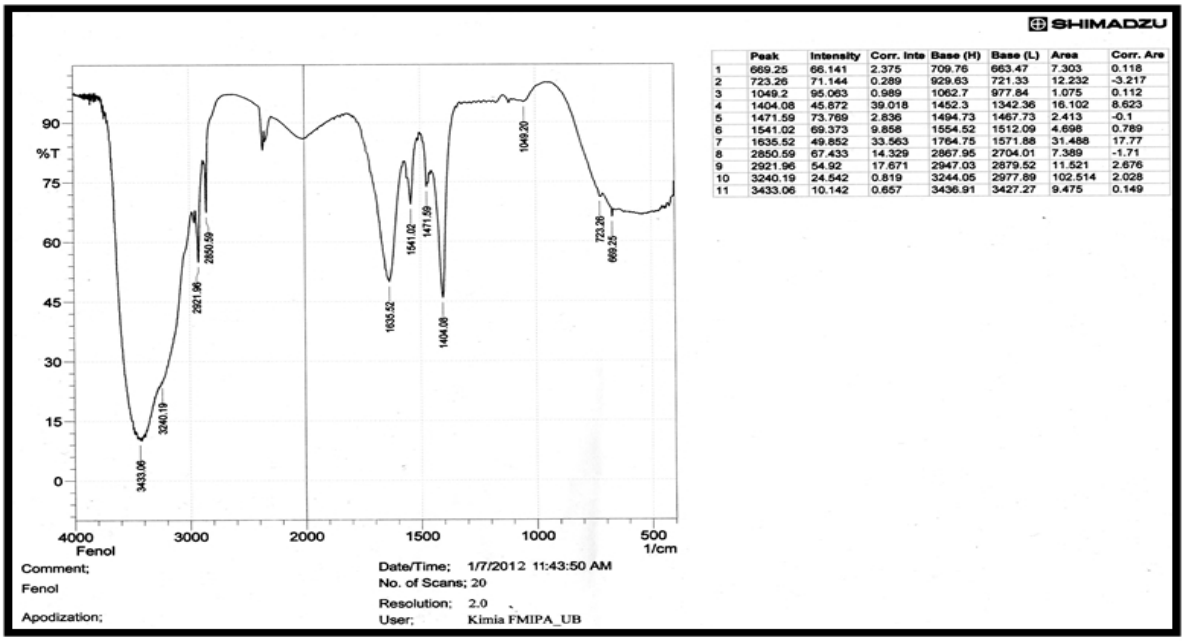
Selanjtunya dilakukan pengujian antibakteri pada media TSA yang sebelumnya sudah dibuat dengan bakteri uji yang sudah disuspensikan menggunakan media NB yang telah disterilkan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu kamar. Ekstrak yang sudah ditimbang selanjutnya dibuat larutan dengan konsentrasi berbeda yaitu 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt. Setelah diketahui bahwa ekstrak memiliki aktivitas antibakteri, dilakukan penetapan konsentrasi hambat minimum dari ekstrak tersebut untuk mengetahui kadar terendah dari sampel ekstrak yang masih memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Metode penetapan yang dilakukan adalah dengan metode agar padat. Sampel ekstrak dibuat dengan berbagai konsentrasi dan selanjutnya dihitung besar daya hambat masing-masing konsentrasi ekstrak.

Analisa Data. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, digunakan analisis keragaman satu arah (*One Way ANOVA*). Jika hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95 %).

Analisis Senyawa aktif. Analisis gugus fungsi senyawa dilakukan dengan spektrum spektrum IR dengan FTIR Shimadzu series 8400.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Ekstrak Fenol. Metode ekstraksi dengan alat Soxhlet dipilih selain berdasarkan pustaka juga karena ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan metode ini hasilnya lebih banyak dibandingkan dengan metode maserasi. Di samping itu, diperkirakan senyawa yang terdapat dalam rumput laut ini bersifat stabil terhadap pemanasan. Dengan cara perhitungan tersebut diperoleh nilai berat

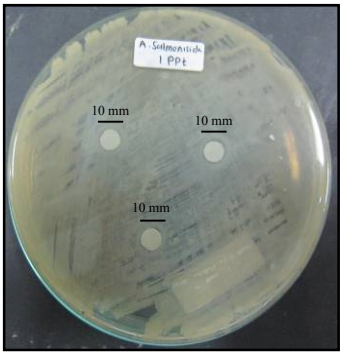


	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	669.25	66.141	2.375	709.76	663.47	7.303	0.118
2	723.26	71.144	0.289	929.63	721.33	12.232	-3.217
3	1049.2	95.063	0.989	1062.7	977.84	1.075	0.112
4	1404.08	45.872	39.018	1452.3	1342.36	16.102	8.623
5	1471.59	73.769	2.836	1494.73	1467.73	2.413	-0.1
6	1541.02	69.373	9.858	1554.52	1512.09	4.698	0.789
7	1635.52	49.852	33.563	1764.75	1571.88	31.488	17.77
8	2850.59	67.433	14.329	2867.95	2704.01	7.389	-1.71
9	2921.96	54.92	17.671	929.03	2879.52	11.521	2.676
10	3240.19	24.542	0.819	3244.05	2977.89	102.514	2.028
11	3433.06	10.142	0.657	3436.91	3427.27	9.475	0.149

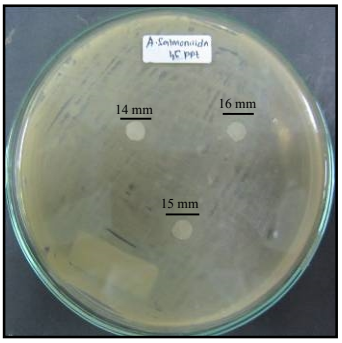
Gambar 1. Spektra Kandungan Fenol *Gracilaria verrucosa* dengan FT-IR.

kering ekstrak sebesar 29,31 gram dalam 1 kg sampel *Gracillaria verrucosa*. Hasil pengujian ekstraksi sampel *Gracillaria verrucosa* di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Brawijaya Malang ditunjukkan dalam Gambar 1.

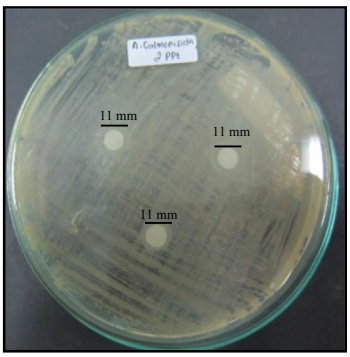
Uji Antibakteri. Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan berbagai konsentrasi larutan ekstrak. Berdasarkan hasil pengujian (Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4), ekstrak fenol dari rumput laut memiliki aktivitas antibakteri.



Gambar 2. Hasil Uji Antibakteri 1 ppt.

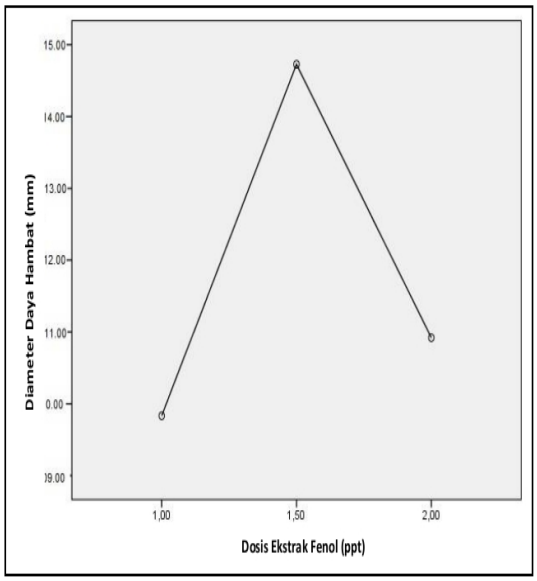


Gambar 3. Hasil Uji Antibakteri 1,5 ppt.



Gambar 4. Hasil Uji Antibakteri 2 ppt.

Berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of Variance*) menunjukkan bahwa nilai rerata daya hambat pasca pemberian ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* adalah berbeda nyata ($p < 0,05$). Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan bahwa ektrak fenol *Gracilaria verrucosa* pada dosis 1.5 ppt mempunyai nilai rerata daya hambat tertinggi yaitu 15 mm (Gambar 5) diikuti dosis 1 ppt dan 2 ppt dengan rerata masing-masing 10 mm dan 11 mm.



Gambar 5. Dosis Optimal Uji Antibakteri.

Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian [15] bahwa hasil uji antibakteri dengan penggunaan ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* pada bakteri *Vibrio harvey* adalah pada dosis 1,5 ppt.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian penggunaan ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* yang optimal untuk uji antibakteri pada penelitian ini adalah 1,5 ppt kemudian 2 ppt dan 1 ppt. Dari penelitian tersebut masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui peranan bioaktif fenol *Gracilaria verrucosa* dalam menanggulangi infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* secara in vivo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada *Titin Supriyanti dan Slamet* yang telah membantu dalam mendapatkan isolat *Aeromonas salmonicida*.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Zonneveld, N., Huisman, E.A., dan Boon, J.H. (1991), *Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan*, Alih bahasa, Penerbit PT. Gramedia Jakarta, Hal 159-160.

[2] Septiama (2008), *Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri Aeromonas Salmonicida*, Pusat Karantina Ikan departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

[3] Wirsan (2011), *Bakteri Aeromonas salmonicida Penyebab Penyakit Ikan*. Artikel.

[4] Ellis, A.E. (1998), *Fish Vaccination*, Academia Press, London,155 pp.

[5] Cipriano, R.C., B.M. Novak, D.E. Flint, and D.C. Cutting (2001), Reappraisal of the federal fish health recommendation for disinfection eggs of Atlantic Salmon in iodophor, *Journal of Aquatic Animal Health*, **13**,320-327.

[6] Masada, C. L., LaPatra, S. E., Morton, A. W. & Strom, M. S. (2002), An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout, *Dis Aquat Org.,* **51**, 13-25.

[7] Salyers A.A., Whitt D.D. (2002), *Bacterial Pathogenesis*, 2nd ed, Washington, ASM Press., p. 229 – 243.

[8] Wiseman, P. W. and Petersen, N. O. (1999), Image correlation spectroscopy. II. Optimization for ultrasensitive detection of preexisting platelet-derived growth factor-beta receptor oligomers on intact cells. *Biophys. J.*, **76**, 963-977.

[9] Maftuch, U. Yanuhar, Satuman, Sukoso, Sumarno (2004), Karakterisasi pili Vibrio alginolitycus dan Vibrio parahaemoliticus sebagai faktor virulensi bakteri patogen, *Prosiding Simposium Nasional Penyakit Ikan dan Udang*, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

[10] Mtolera, M.S.P and Semesi A.K. (1996), *Antimicrobial Activity of Extract From Six Green Algae From Tanzania, Current Trends in Marine Research in East African Region*,http://iodeweb1.vliz_be/odin/bitstream/1843/469/1/ CTMBREAR-211.pdf.

[11] Chkhikvishvili, I. D and Z. M. Ramazanov (2000), Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity, *Applied Biochemistry and Microbiology,* Vol. 36 No. 3, 289-291.

[12] Ballantine, D.L, William H.G, Sylvia M.V, Evelina. A, and Pablo G. ((1987), Anitibiotic activity of Lipid-Soluble Extracts from Caribbean Marine Algae, *Hydrobiologia* ,151/152, 463-469.

[13] Himaya, SWA, B.M Ryu, Z.J Qian, S. K. Kim (2010), *Sea cucumber, Stichopus japonicus ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 68–75.

[14] Harborne, J. B. (1987), *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Cetakan Keempat, ITB, Bandung.

[15] Toban, M.H. (2008), *Perubahan Jumlah Hemosit, Kandungan Anion Superoksida dan Aktivitas Enzim Protease Udang Windu (Penaeus monodon Fabricus) Pasca Pemberian Imunostimulan Gracilaria verrucosa*, Tesis, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Hal. 90.