

## Skrining Senyawa Bioaktif pada Tumbuhan Mangrove yang Dapat Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penyebab Penyakit *Red Spot Disease*

### Screening Bioactive Compounds in Mangrove Plants that can Inhibit the Growth of Bacteria Caused *Red Spot Disease*

<sup>1)</sup> Darminto, <sup>2)</sup> Alimuddin Ali, dan <sup>3)</sup> Iwan Dini

<sup>1,3)</sup> Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Makassar

<sup>2)</sup> Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar

#### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai skrining senyawa bioaktif dari tumbuhan mangrove yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MAS. Penelitian dilakukan dengan metode skrining senyawa aktif dengan menggunakan kolom kromatografi dan pengujian antibakteri dengan metode difusi agar. Uji  $IC_{50}$  dilakukan dengan menggunakan sel vero yang dilanjutkan dengan uji mortalitas ikan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua komponen bioaktif dari *Avicennia* sp memiliki nilai  $IC_{50} > 200\mu\text{g/ml}$ , viabilitas ikan uji lebih tinggi dengan konsentrasi senyawa 15-25g/Kg pakan dan berbeda nyata dengan 1-10g/Kg pakan pada Uji BNT1%.

**Kata kunci:** Senyawa Bioaktif, Mangrove, *Red Spot Disease*

#### ABSTRACT

Screening of bioactive compounds from mangrove plants that can inhibit bacterial growth MAS used column chromatography and the antibacterial test by agar diffusion method.  $IC_{50}$  test by vero cells that continued by fish mortality test. The results showed that all the bioactive components of *Avicennia* sp have  $IC_{50}$  values  $> 200\mu\text{g/ml}$ , the viability of fish with higher concentrations of test compound 15-25g/Kg significantly different from the feed on the test 1-10g/Kg BNT1%.

**Key words:** Bioactive compounds, Mangrove, *Red Spot Disease*

#### A. PENDAHULUAN

Berbagai upaya yang telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit bakterial antara lain penggunaan antibiotik, vaksin, imunostimulan dan penggunaan biokontrol serta aplikasi ekstrak tumbuhan. Cara tersebut tidak lepas dari permasalahan yang justru berpotensi membawa dampak merugikan yang bisa ditimbulkan utamanya penggunaan antibiotik (Kamiso, 2004).

Bahan baku pembuatan antibiotik masih merupakan bahan impor hingga saat ini. Selain itu mahal harganya cukup mahal, sehingga pengobatan dengan

bahan lokal yang lebih murah, mudah didapat dan terutama ramah lingkungan perlu diusahakan (Bracket dan Little, 1994). Pengobatan tradisional dengan fitofarmaka mulai menjadi perhatian dunia sekarang ini. Di Thailand dan Filipina fitofarmaka telah dimanfaatkan sebagai bakterisida, fungisida, algasida, virusida, herbisida dan pestisida. Di Indonesia sebenarnya fitofarmaka telah dimanfaatkan untuk pengobatan manusia, tetapi belum digunakan dalam budidaya perikanan (Angka *et al*, 2002).

Eksplorasi sumberdaya hayati laut (flora dan fauna) seperti hewan misalnya

a23ikan, moluska, spons, karang lunak dan echinodermata serta tumbuhan (algae) masih sangat terbatas dilakukan. Beberapa jenis hewan tertentu hanya dimanfaatkan sebagai sumber vitamin, protein dan mineral. Namun kajian dalam bidang pengobatan masih kurang. Diketahui bahwa beberapa dari hewan laut tersebut mampu mensintesis dan menyimpan senyawa toksis yang biasa disebut *marine toxin* pada bagian tubuhnya yang dapat dikeluarkan ke lingkungan (Burrens dan Clement, 1993). Senyawa tersebut merupakan metabolit sekunder yang digunakan untuk mempertahankan hidup dan menghindari gangguan dari organisme lain di lingkungan hidupnya. Adanya aktivitas farmakologik yang ditimbulkan, maka senyawa tersebut memiliki prospek untuk dimanfaatkan dalam bidang pengobatan (Rahmaniar, 1996).

Berdasar uraian tersebut, maka upaya untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari sumber daya laut perlu terus digalakkan. Secara umum perhatian pencarian senyawa bioaktif antibakterial pada spons laut (Linnington *et al*, 2002) dari siput bakau (Alimuddin *et al*, 2006) telah dilakukan, namun potensi senyawa pada tumbuhan mangrove sebagai kandidat fitofarmaka budidaya perairan yang kemungkinan memiliki potensi farmakologik yang sama sebagai antimikrobia belum banyak dikaji.

Kajian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa pada tanaman mangrove memiliki potensi sebagai antibakteri *A.hydropila* penyebab kematian pada ikan budidaya.

## B. METODE

### 1. Ekstraksi dan Fraksinasi

**Ekstraksi.** Sebanyak 100 Kg sampel bagian tumbuhan (kulit batang), dipotong-potong kecil lalu

dikeringanginkan tanpa kena sinar matahari langsung. Selanjutnya dimaserasi selama 1 x 24 jam sebanyak 4 kali dengan metanol. Keseluruhan maserat yang diperoleh dari hasil penyaringan menggunakan penyaring Buchner dengan kertas Whatman diuapkan pada tekanan rendah sampai diperoleh maserat metanol agak kental kemudian ditentukan beratnya. Ekstrak metanol diekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut pada kepolaran yang berbeda-beda dimulai dari pelarut yang paling nonpolar. Setiap fraksi yang diperoleh dan memiliki aktivitas antibakteril dievaporasi sampai kering dan kemudian ditentukan beratnya dengan mengacu pada penelitian pendahuluan.

**Fraksinasi.** Sebelum ekstrak difraksinasi terlebih dahulu dianalisis dengan KLT dan dideteksi dengan lampu UV dan penyemprotan larutan serum sulfat lalu dipanaskan untuk menentukan eluen dalam proses fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan KKV, fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan KLT. Fraksi yang memiliki profil nilai  $R_f$  yang sama digabung kemudian dievaporasi sampai kering, ditentukan beratnya dan dilakukan uji aktivitas. Fraksi-fraksi yang aktif menghambat bakteri uji kemudian difraksinasi lebih lanjut menggunakan KKT dan KKG yang dilakukan berulang kali sampai diperoleh senyawa murni.

### 2. Pengujian Aktivitas Antibakteri (uji *in vitro*)

Pengujian aktivitas antibakterial dari senyawa (**ekstrak kasar dan senyawa murni**) dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar dan inhibisi metabolit berdasarkan prosedur Iguchi *et al*, 1982. Bakteri uji ditumbuhkan dalam medium Heart Infusion Bouillon (pH 7) pada suhu 37°C

selama 24 jam. Kultur mikrobial diencerkan 1000 kali dengan larutan fisiologis. Sebanyak 1 mL kultur *A. hydrophila* ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) diinokulasikan secara pour plate ke dalam cawan petri. Kertas cakram yang telah dijenuhkan dengan fraksi diletakkan diatas media agar.

### 3. Penentuan IC<sub>50</sub> senyawa bioaktif

#### Pembuatan Larutan Uji

Senyawa hasil purifikasi dan fraksinasi dibuat dengan melarutkan masing-masing dalam DMSO sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1.000 µg/ml. Larutan stok diencerkan dengan media kultur hingga diperoleh seri konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 µg/ml untuk uji IC<sub>50</sub>.

#### Pengamatan Viabilitas Sel

Pengamatan viabilitas sel dilakukan dengan *MTT assay* (Mosmann, 1983). Kultur sel Vero yang telah konfluen dipanen dan didistribusikan ke dalam sumuran *96-well microplate* dengan jumlah 10.000 sel / sumuran. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> untuk adaptasi sehingga siap untuk perlakuan. Larutan uji dengan seri konsentrasi yang ditentukan dimasukkan ke dalam sumuran (triplo) setelah sel dicuci dengan PBS. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah inkubasi, larutan uji dibuang dan ditambahkan pereaksi MTT sejumlah 100 µl/sumuran. Pereaksi *stopper* ditambahkan setelah 3 jam inkubasi dengan MTT. Sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, *plate* digoyang dengan *horizontal shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya persen sel hidup dihitung dengan menggunakan persamaan regresi hubungan antara

viabilitas sel dengan konsentrasi senyawa bioaktif

### 4. Uji Efektifitas Kandidat Fitofarmaka secara *In Vivo*

Uji efektifitas dilakukan pada senyawa yang memiliki aktivitas menghambat tertinggi dari semua senyawa yang diuji. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kelangsungan hidup atau tingkat mortalitas ikan, cara yang dilakukan adalah sebagai berikut: Sebelum dilakukan uji tantang, maka ikan diaklimatisasi selama 5 hari dalam air tawar. Perlakuan uji tantang dilakukan, jika selama aklimatisasi, mortalitas ikan uji tidak melebihi 3%. Uji ini dirancang dengan menggunakan 5 ekor ikan uji sesuai metode Angka *et al*, 2002. Pakan yang diberikan untuk kontrol negatif ialah pelet saja tanpa bakteri uji, sedangkan untuk perlakuan ikan uji diberi *A. hydrophila* sebanyak  $10^6$  cfu/ml dalam wadah akuarium yang dilengkapi dengan aerator. Selanjutnya untuk ikan perlakuan diberi senyawa hasil fraksinasi yang aktif menghambat bakteri uji dan pakan dengan perlakuan dan 3 kali ulangan. Pemeliharaan dilakukan selama 8 hari dan pada hari kelima diberi *A. hydrophila* sebanyak  $10^6$  cfu/ml dan diamati sampai hari ke 7. Respon makan, refleksi ikan, kelainan klinis, mortalitas pada akhir penelitian diamati. Untuk mengetahui kondisi lingkungan pengujian, maka dilakukan pula pengukuran parameter lingkungan meliputi suhu, salinitas, pH.

### 5. Teknik Pengumpulan Dan Analisis Data

Pada akhir percobaan dilakukan pengukuran sejumlah parameter dengan cara sebagai berikut: Penelitian dirancang dengan mengikuti percobaan yang disusun dengan pola rancangan acak kelompok. Untuk melihat adanya

perbedaan antar perlakuan dilakukan pengujian  $BNT\alpha 0,01$ . Potensi senyawa untuk menghambat sel normal ditentukan dengan menghitung  $IC_{50}$  dengan menggunakan sel normal (Vero) dalam satuan ppm. Efektifitas Senyawa Kandidat Fitofarmaka ditentukan berdasarkan tingkat mortalitas ikan uji. Parameter yang diamati meliputi respon makan, refleks ikan, kelainan klinis yang terjadi pada organ pada akhir penelitian diamati.

### C. HASIL DAN PEMBAHASAN

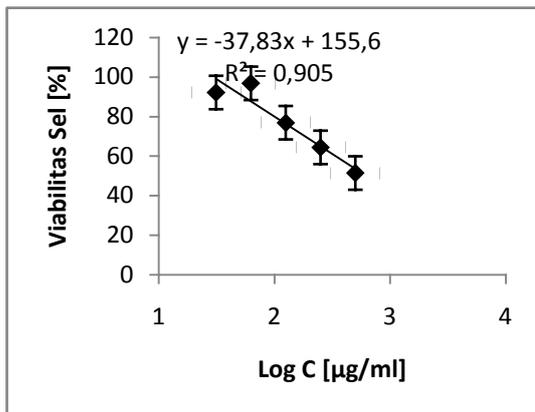
Untuk penelusuran kandungan senyawa kimia pada tahap lanjutan difokuskan pada kulit batang tumbuhan *Avecennia spp.* Ini dilakukan berdasarkan potensi penghambatan komponen yang cukup tinggi yang diperoleh terhadap bakteri *A. hydrophyla*. Selain itu komponen dari senyawa ini dapat dengan mudah diisolasi. Hasil penelitian terdahulu diperoleh 4 komponen dari kulit batang *Avicennia sp* dan telah dilakukan fraksinasi dan purifikasi parsial yaitu senyawa 1, senyawa 2, senyawa 3 dan gabungan fraksi 5. Penelitian selanjutnya difokuskan pada komponen yang memiliki aktivitas lebih tinggi yaitu pada kelompok senyawa yang memiliki polaritas rendah. Berdasarkan hasil fraksinasi, maka diperoleh 14 fraksi yang selanjutnya fraksi 3 dan 4 yang memiliki aktivitas antibakteri digabung menjadi satu yang diberi kode 3-4. Gabungan fraksi 3-4, difraksinasi lebih lanjut sehingga diperoleh fraksi 3-4.1 dan 3-4.2 yang aktif menghambat bakteri uji. Selanjutnya komponen fraksi ini yang digunakan sebagai senyawa kandidat fitofarmaka. Akibat rendahnya perolehan dari komponen ini dan banyaknya jumlah senyawa yang digunakan untuk pengujian mortalitas, maka fraksi yang dianggap

paling tinggi aktivitasnya digunakan sebagai agen antibakteri.

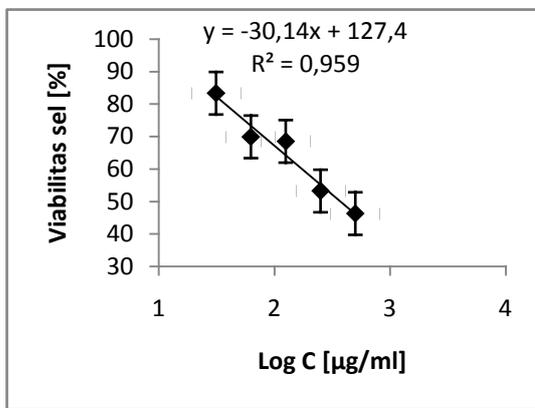
Kemampuan menghambat bakteri uji dari masing-masing komponen yang telah dipurifikasi menunjukkan potensi yang cukup bagus sebagai kandidat fitofarmaka. Kemampuan menghambat bakteri uji dari komponen bioaktif tersebut berpotensi membunuh atau mengganggu jika diaplikasi pada ikan budidaya. Untuk mengetahui sejauhmana komponen tersebut tidak menimbulkan efek yang merugikan, maka dilakukan pengujian  $IC_{50}$  terhadap sel normal (vero). Hasil pengujian menunjukkan semua komponen yang diuji tidak ada satupun yang berpotensi sebagai senyawa yang merugikan sel normal. Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Berdasarkan perhitungan  $IC_{50}$  diperoleh nilai dari masing-masing komponen berturut-turut: komponen bioaktif A, B, C dan D adalah 619,44; 371,54; 1.196.740 dan 221,820  $\mu\text{g/ml}$ . Terlihat bahwa nilai  $IC_{50}$  untuk semua komponen bioaktif berada diatas 100  $\mu\text{g/ml}$  sebagai nilai yang menjadi dasar potensi inhibisi dari sel normal. Bahkan kompone C memiliki nilai yang sangat tinggi yang menunjukkan rendahnya efek merugikan dari komponen tersebut terhadap ikan uji.

Selanjutnya pengujian viabilitas ikan uji terhadap bakteri uji menunjukkan bahwa perlakuan D, E, F dan KTR tidak berbeda nyata pada uji Beda Nyata Terkecil pada taraf kepercayaan 1%. Ini menunjukkan bahwa keempat perlakuan tersebut memiliki kemampuan meningkatkan viabilitas ikan uji yang lebih tinggi dibanding 3 perlakuan lainnya yang berbeda tidak nyata (A, B dan C).



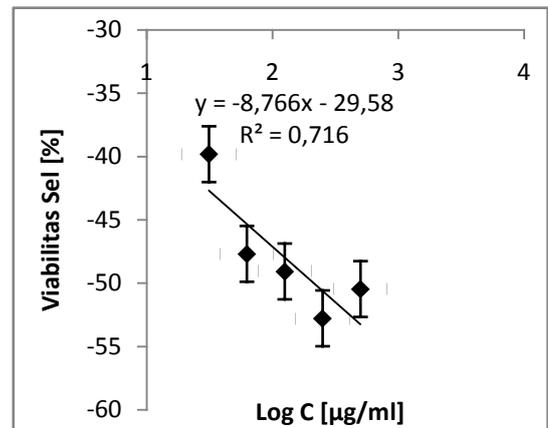
1



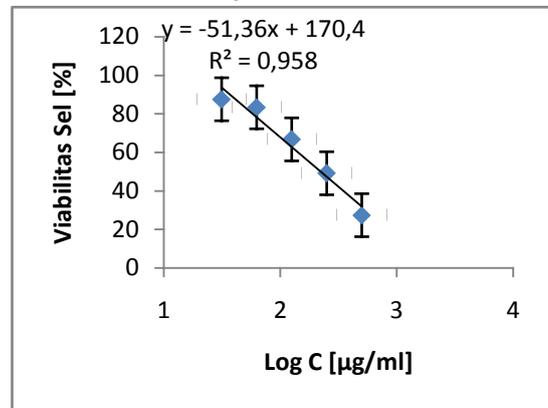
2

**Gambar 3.** Hubungan viabilitas sel dengan konsentrasi komponen bioaktif A (1) dan B (2)

Berdasarkan pengamatan terhadap ikan uji, maka pada perlakuan D, E, F dan KTR menunjukkan kondisi ikan yang jauh lebih sehat dibanding 3 perlakuan lainnya. Kondisi fisik air pada 3 perlakuan terakhir lebih jernih dan tidak menimbulkan bau yang kurang sedap. Sementara itu jika dibanding dengan 3 perlakuan pertama, kondisi fisik air terlihat sangat keruh dan berbau kurang sedap. Ini disebabkan oleh pertumbuhan bakteri uji yang tidak/kurang dihambat oleh komponen bioaktif. Hal ini menunjukkan bahwa semakin sedikit jumlah senyawa bioaktif, maka populasi bakteri patogen makin tinggi, sehingga mempengaruhi kesehatan ikan uji.



3



4

**Gambar 4.** Hubungan persen viabilitas sel terhadap konsentrasi komponen bioaktif C(3) dan D(4).

**Tabel 1.** Persentase viabilitas ikan uji setelah diberi perlakuan senyawa bioaktif dan *A. hydrophila* setelah 8 hari perlakuan

Perlakuan	Viabilitas Ikan Uji (%)			Rata-Rata
	I	II	III	
A	50	0	25	25 <sup>a</sup>
B	25	75	25	41.67 <sup>a</sup>
C	0	25	0	8.33 <sup>a</sup>
D	100	100	75	91.67 <sup>b</sup>
E	100	50	75	75 <sup>b</sup>
F	75	100	75	83.33 <sup>b</sup>
KTR	100	75	100	91.67 <sup>b</sup>

**Keterangan:** Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji Beda Nyata Terkecil pada tarap kepercayaan 1%

Menurut Sukanto dan Peramiarti, 2004 bahwa sebagai patogen oportunistik, kemampuan *A. hydrophyla* dalam menimbulkan penyakit terhadap ikan sangat dipengaruhi oleh besar populasinya. Besar populasi memiliki korelasi positif dengan prevalensi penyakit. Hal ini berarti bahwa semakin besar populasi bakteri, maka semakin besar jumlah ikan yang terserang penyakit.

Selanjutnya gejala klinis yang ditemukan pada ikan uji pada 3 perlakuan pertama berbeda dengan 3 perlakuan akhir. Terlihat ikan uji pada 3 perlakuan pertama kulitnya sangat pucat dan cukup banyak lendir pada sisik dibanding 3 perlakuan akhir yang kulitnya terlihat cerah dan tidak menunjukkan adanya lendir yang berlebih (Gambar 5b ). Ini menunjukkan bahwa ikan uji mengalami tingkat stress yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya. Hal yang sama ditunjukkan bahwa pH air untuk 3 perlakuan pertama lebih rendah ( $\pm$ pH 5-6) dibandingkan 3 perlakuan terakhir ( $\pm$ pH 6,7-7).

#### D. KESIMPULAN

Penelitian dilakukan dengan metode skrining senyawa aktif dengan menggunakan kolom kromatografi dan pengujian antibakteri dengan metode difusi agar. Uji  $IC_{50}$  dilakukan dengan menggunakan sel vero yang dilanjutkan dengan uji mortalitas ikan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua komponen bioaktif dari *Avicennia* sp memiliki nilai  $IC_{50} > 200\mu\text{g/ml}$ , viabilitas ikan uji lebih tinggi dengan konsentrasi senyawa 15-25g/Kg pakan dan berbeda nyata dengan 1-10g/Kg pakan pada Uji BNT1%. Komponen bioaktif dari tumbuhan mangrov tersebut berpotensi digunakan sebagai kandidat fitofarmaka.

#### E. UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan terima kasih kepada DP2M DIKTI atas biaya penelitian yang diberikan dalam Program Hibah Bersaing Tahun 2010 dengan No Kontrak: Nomor: 907/H36/PL/2010 tanggal 06 April 2010

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin dan Rante, H. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak Daging Siput Bakau Terhadap *Artemia salina* Leach, Jurnal Farmasi dan Farmakologi, Vol 10 No. 1, Maret 2006.
- Angka, S.L., Yunita, I., Sutarna, I.K.J. 2002. Aktivitas Antibakteri dari Fitofarmaka secara *In Vitro* dan *In Vivo* terhadap *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo. J.Mikrobiologi Indonesia 7 (2): 47-50.
- Bracket, J.B., and Little, J.M. 1994. Recent Trend in Fish Chemotherapeutans. Aquaculture Toward The 21 st Century. Proc. INFOFISH-AQUATECH, Int.Conf. Colombo, 225-228.
- Burrens, N.S., Clement, J.J. 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.
- Darminto, Alimuddin Ali., Iwan Dini, 2009a. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Potensial Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophyla* dari Kulit Batang Tumbuhan *Aveccennia sp*” Jurnal Ilmiah Kimia dan Pendidikan Kimia “CHEMICA” V. 10 NO 2 Hal 92-98.
- Darminto, Alimuddin Ali., Iwan Dini 2009b. Potensi Ekstrak Etanol Kulit batang Tumbuhan Mangrove (*Aveccennia spp*) dalam Menghambat Pertumbuhan bakteri *Aeromonas*

- hydrophyla*” Jurnal Kajian, Penelitian, dan Pengajaran Biologi “BIONATURE” V. 10 No 2 Hal 56 – 59.
- Darminto., Alimuddin Ali., Iwan Dini, 2010. Kajian Pengembangan dan Produksi Kandidat Fitofarmaka Antibakterial pada Tumbuhan Mangrove untuk Penanggulangan Penyakit Bakterial Ikan. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing. Lembaga Penelitian UNM Makassar
- Iguchi, S.M., Aikawa, Tersebut dan Matsumoto, J.J, 1982. Antibacterial Activity of Snail Mucus Mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72A: 571-574.
- Kamiso,H.N, 2004. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya. Makalah Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV, Purwekerto.
- Lightner, D.V, 1988. Diseases of Aquaculture in America. Di dalam Sindermann dan Lighter, D.V (eds). *Diseases Diagnmotic and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier. Tokyo: 8 –133.
- Linington, R.G., Roberstson, M.G., Gauthier, A., Finlay, B.B., Soest, R., Anderson, R.J. 2002. Caminoside, An Antimicrobial Glycolipid Isolated from the Marine Sponges *Caminus spaeroconia*. *Org Lett*. Nov 14 Nov; 4 (23). 4089-4092.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods*, **65** (1-2):55-63.
- Rahmaniar, 1996. Produk Alam Laut Sebagai *Lead Compound* untuk Farmasi dan Pertanian. Makalah pada Seminar Perspektif Baru dalam Drug Discvovery. Ujung Pandang 26 Okt 1996. 1-5
- Sukanto., Peramiarti, 2004. Prevalensi *Vibrio* dan *Aeromonads* Perairan Tambak Pantura Wilayah Eks Karesidenan Pekalongan Jawa Tengah. Prosiding, Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity, Purwekerto,