

Inhibition Test of Hot Water Extract of *Rhizophora apiculata* Leaves Against *Edwardsiella tarda* Bacteria in-Vitro

Uji Daya Hambat Ekstrak Air Panas Daun *Rhizophora apiculata* Terhadap Bakteri *Edwardsiella tarda* secara in-Vitro

Ronal Kurniawan^{*1}, Sri Wahyuni¹, Fitriani Armando¹

¹Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau
Kampus Bina Widya KM. 12,5, Simpang Baru, Kec. Tampan, Kota Pekanbaru, Riau 28293

*Correspondent Author: kurniawanronal09@gmail.com

ABSTRACT

One of the plants that have the potential as antibacterial ingredients is *Rhizophora apiculata* leaf because it contains secondary metabolites, such as tannins, saponins, flavonoids, steroids, and terpenoids. This study aims to find out the inhibition of hot water extract of *R. apiculata* leaves in inhibiting the growth of *Edwardsiella tarda*. The research method used is an experimental method which includes sample preparation, extraction, antibacterial activity test using the Kirby-Bauer disc method and applying a Completely Randomized Design (CRD). The doses used were 100% (10000 ppm), 90% (9000 ppm), 80% (8000 ppm), 70% (7000 ppm), 60% (6000 ppm), 50% (5000 ppm), 40% (4000 ppm), 30% (3000 ppm), 20% (2000 ppm), 10% (1000 ppm) and control (*Oxytetracycline*). The results showed that the hot water extract of *R. apiculata* leaves at a dose of 1000-10000 ppm gave various inhibitory diameters ranging from 6.25-10.08 mm and the clear zone formed was classified as medium.

Keywords : *Edwardsiellosis*, *Rhizophora apiculata*, *Antibacteria*.

ABSTRAK

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai bahan antibakteri adalah daun *Rhizophora apiculata* karena mengandung senyawa metabolit sekunder, seperti tanin, saponin, flavonoid, steroid, dan terpenoid. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui daya hambat dari ekstrak air panas daun *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan *Edwardisella tarda*. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yang meliputi preparasi sampel, ekstraksi, uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode cakram *Kirby-Bauer* dan menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dosis yang digunakan adalah 100% (10000 ppm), 90% (9000 ppm), 80% (8000 ppm), 70% (7000 ppm), 60% (6000 ppm), 50% (5000 ppm), 40% (4000 ppm), 30% (3000 ppm), 20% (2000 ppm), 10% (1000 ppm) dan kontrol (*Oxytetracycline*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air panas daun *R. apiculata* dengan dosis 1000-10000 ppm memberikan diameter daya hambat yang bervariasi berkisar antara 6,25-10,08 mm dan daya hambat yang terbentuk tergolong kategori sedang.

Kata Kunci : *Edwardsiellosis*, *Rhizophora apiculata*, *Antibakteri*.

PENDAHULUAN

Akuakultur merupakan bentuk produksi protein dan nutrisi yang paling berkelanjutan, produksi ikan bergantung pada budidaya intensif dan semi intensif, yang mengakibatkan peningkatan wabah penyakit (Little *et al.*, 2016; Kotob *et al.*, 2017). Penyakit ikan umumnya disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, parasit, atau kombinasi dari patogen-patogen tersebut (Lafferty *et al.*, 2015). Infeksi bakteri telah menjadi hambatan utama bagi budidaya (Haenan *et al.*, 2013), mengingat bakteri dapat bertahan hidup dengan baik di lingkungan perairan dan tidak tidak bergantung pada inangnya.

Antibiotik banyak digunakan untuk mencegah dan mengendalikan penyakit bakteri dalam budidaya (Cabello *et al.*, 2016; Santos dan Ramos, 2018). Namun demikian, penggunaan antibiotik jangka panjang, khususnya penggunaan secara berlebihan dan penyalahgunaan menyebabkan munculnya resistensi antibiotik (Baym *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2019; Gao *et al.* 2021). Munculnya resistensi antibiotik pada mikroba seperti *Enterococci*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* dan *Edwardsiella tarda* pada ikan merupakan ancaman potensial transfer gen resistensinya ke patogen manusia melalui rantai makanan (Ogbonne *et al.*, 2018).

Edwardsiella tarda adalah bakteri gram negatif, anaerob fakultatif, pendek, berbentuk batang dan motil dari keluarga Enterobacteriaceae, dan pertama kali dicirikan pada tahun 1965 (Health Canada, 2008). Bakteri ini umumnya berada pada mikroflora usus ikan dan kadang-kadang bersifat oportunistik pada manusia yang menyebabkan gastroenteritis dan diare (Verjan *et al.*, 2005). *E.tarda* merupakan bakteri patogen enterik yang tersebar di seluruh dunia, memiliki keragaman inang yang tinggi, bersifat epizootik, dan zoonosis (Austin dan Austin, 2007). *E.tarda* menyerang spesies ikan komersil penting, seperti belut jepang (*anguilla japonica*), belanak (*Mugil cephalus*), mas (*Cyprinus carpio*), lele (*Clarias batrachus*), betok (*Anabas testudineus*), oscar (*Astronotus ocellatus*) (Park *et al.*, 2012), lele dumbo (*Clarias gariepinus*) (Butar-Butar *et al.*, 2020), patin (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Bera *et al.*, 2020), dan nila (*Oreochromis niloticus*) (Sherif *et al.*, 2021).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai bahan antibakteri adalah daun *Rhizophora apiculata* karena mengandung senyawa metabolit sekunder, seperti tanin, saponin, flavonoid, steroid, dan terpenoid (Syawal *et al.*, 2020). Menurut Fadillah *et al.* (2019), Daun mangrove *R.apiculata* merupakan salah satu bahan obat yang dapat menghambat perkembangan bakteri karena terdapat senyawa bioaktif seperti alkaloid, tanin, saponin, fenol, flavonoid dan terpenoid yang terbukti dapat menekan pertumbuhan bakteri karena bersifat sebagai antibakteri. Ekstrak etanol daun *Rhizophora* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan diameter zona hambat berkisar antara 8,6-16,33 mm, *E.tarda* 6,97-12,27 mm (Syawal *et al.*, 2017), *A. hydrophila* sebesar 6,15-9,08 mm (Syawal *et al.*, 2019).

Berdasarkan uraian di atas, maka penulis tertarik melakukan penelitian tentang uji daya hambat ekstrak daun *R. apiculata* terhadap bakteri *E.tarda*. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui daya hambat dari ekstrak air panas daun *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan *E. tarda*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Pengamatan zona hambat dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yang meliputi preparasi sampel, ekstraksi (*maserasi*), uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode cakram *Kirby-Bauer* dan menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL), untuk mengurangi tingkat kekeliruan maka dilakukan ulangan sebanyak tiga kali. Penentuan dosis yang digunakan mengacu pada Syawal *et al.* (2017). Dosis yang digunakan adalah 100% (10000 ppm), 90% (9000 ppm), 80% (8000 ppm), 70% (7000 ppm), 60% (6000 ppm), 50% (5000 ppm), 40% (4000 ppm), 30% (3000 ppm), 20% (2000 ppm), 10% (1000 ppm) dan kontrol (*Oxytetracycline*).

Pembuatan Ekstrak Daun *R. apiculata*

Proses yang dilakukan dalam pembuatan ekstrak daun *R. apiculata* adalah, sebagai berikut: langkah awalnya adalah mengambil daun, daun yang diambil daun ketiga dan keempat dari pucuk daun serta bagian bakal daun. Daun *R. apiculata* dipotong kecil-kecil dikeringanginkan di dalam ruangan selama 7-10 hari. Daun yang sudah kering, di blender sampai halus dan didapatkan butiran halus. Pada proses selanjutnya, dilakukan proses perendaman (maserasi) dengan pelarut air panas, yang dilakukan dengan cara merendam tepung daun *R. apiculata* menggunakan pelarut air panas sampai tepung tersebut terendam. Perendaman dilakukan selama 15 menit, dan langsung disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan, diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* (RE) pada suhu 60°C untuk memisahkan pelarut dan ekstrak, sehingga didapatkan ekstrak daun *R. apiculata* tersebut dalam bentuk gel. Untuk didapatkan ekstrak dalam bentuk bubuk, maka di lakukan proses *partisi*. Sebelum ekstrak digunakan, ekstrak tersebut diencerkan terlebih dahulu menggunakan larutan DMSO agar ekstrak mudah terlarut dalam aquades dan dapat digunakan untuk pengujian.

Peremajaan Isolat Bakteri *E. tarda*

Bakteri *E. tarda* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau. Isolat ini kemudian dikultur pada media TSA, lalu diinkubasi dalam *inkubator* selama 18-24 jam pada suhu 28-31°C. Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil biakan menggunakan jarum ose, dimasukkan ke dalam media TSB dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 28-31°C. Suspensi bakteri yang akan digunakan terlebih dahulu disetarakan dengan larutan standar *Mc Farland* 1 yang kepadatan bakterinya setara dengan 10⁸ CFU/mL.

Pengamatan Daya Hambat

Pengamatan daya hambat ekstrak daun *R. apiculata* terhadap bakteri *E. tarda* dilakukan berdasarkan metode cakram *Kirby-Bauer* dengan *disk blank* yang berdiameter 6 mm. Tahap awal *disk blank* diberikan larutan ekstrak daun *R. apiculata* sebanyak 50 µL dengan kepadatan bakteri 10⁸ CFU/mL dengan menggunakan mikropipet sesuai dosis yang telah ditentukan (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%), *oxytetracyclin* sebagai kontrol, dan didiamkan selama ±3 menit. Selanjutnya *disk blank* diletakkan di atas media TSA yang telah berisi inokulan bakteri *E. tarda* dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 28-31°C. Setelah 24 jam, dilakukan pengukuran zona hambat dengan mengukur diameter daerah bening (*clear zone*) yang terbentuk menggunakan jangka sorong

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daya Hambat Ekstrak Daun *R. Apiculata*

Hasil pengukuran daya hambat ekstrak *R. apiculata* pada dosis 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan *oxytetracycline* memiliki zona hambat yang berbeda. Diameter zona hambat berkisar antara 6,25 – 10,08 mm, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan daya hambat (Tabel 1).

Tabel 1. Pengukuran daya hambat ekstrak air panas daun *R. apiculata* terhadap bakteri *E. tarda*

Konsentrasi Ekstrak Daun <i>R. apiculata</i> (ppm)	Zona Hambat (mm) pada setiap ulangan			Rata-rata
	I	II	III	
<i>Oxytetracycline</i> *	16,67	16,56	16,27	16,5
10000	10,20	10,06	9,98	10,08
9000	9,66	9,55	9,52	9,58
8000	9,26	9,21	9,20	9,22
7000	8,96	8,93	8,89	8,93
6000	8,57	8,33	8,21	8,37
5000	7,85	7,65	7,45	7,65
4000	7,37	6,91	6,89	7,06
3000	6,57	6,47	6,40	6,48
2000	6,38	6,35	6,30	6,34
1000	6,28	6,27	6,21	6,25

Keterangan : Diameter *disk blank* 6 mm, * = Antibiotik (kontrol)

Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak daun *R. apiculata* dengan pelarut air panas dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. tarda*, dimana pada pelarut air panas dengan dosis 10-100% menghasilkan rata-rata diameter zona hambat berkisar antara 6,25 – 10,08 mm. Dosis ekstrak daun *R. apiculata* yang digunakan akan memberikan pengaruh terhadap diameter zona hambat. Dapat dilihat bahwa zona hambat yang terbentuk seiring dengan besarnya dosis yang digunakan. Semakin besar dosis, semakin besar juga diameter zona hambat yang dihasilkan. Pada dosis 100% menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dosis yang lain. Penurunan luas zona hambat yang dihasilkan pada dosis yang lebih rendah kemungkinan terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar (Dewi, 2010). Luas daya hambat yang dihasilkan oleh antibiotik *Oxytetracylin* sebesar 16.41 mm, menunjukkan bahwa antibiotik yang digunakan masih jauh lebih ampuh membunuh bakteri, namun penggunaan antibiotik secara terus menerus dan tidak terkontrol maka dapat menimbulkan resisten pada bakteri patogen. Menurut Lee dan Wendy (2017), *Oxytetracylin* termasuk jenis antibiotik yang dapat membunuh *E. tarda* dengan diameter daya hambat mencapai 16,7 mm.

Rhizophora apiculata terdapat kandungan bahan aktif seperti, alkaloid, steroid, saponin, fenol, flavonoid, dan terpenoid yang berperan sebagai antibakteri dan antiseptik untuk menekan pertumbuhan bakteri. Sebagian besar tanaman ini mengandung senyawa yang beracun bagi bakteri patogen seperti fenol yang berperan dalam penghancuran dinding sel serta presipitasi (penguapan) dan denaturasi protein yang pada akhirnya dapat melisis sel bakteri (Poomphozil dan Kumarasamy, 2014). Hal inilah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang diduga disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung didalamnya.

Kandungan flavonoid mampu menghambat metabolisme energi sehingga penyerapan aktif berbagai metabolit dan biosintesa makromolekul terhambat. Saponin juga yang menyebabkan sitoplasma bocor dan mengakibatkan kematian sel tersebut (Nuraina, 2015). Serta efek antibakteri tanin, antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik. Selain itu, tanin bersifat astringen (zat yang menciutkan) membentuk kompleks ikatan tanin terhadap enzim dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin dengan ion logam yang dapat menambah toksisitas tanin (Negara, 2013). Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan yang terbesar. Alkaloid memiliki kemampuan antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Seran *et al.*, 2022).

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air panas *R. apiculata* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. tarda* mulai dari konsentrasi 1000 ppm, dan daya hambat yang terbentuk tergolong kategori sedang.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, B., and Austin, D.A.**, 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing Ltd., Chichester
- Baym, M., Stone, L.K., Kishony, R.**, 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. Science (New York, N.Y.) 351:aad3292. 10.1126/science.aad3292
- Bera, K.K., Kumar, S., Paul, T., Prasad, K.P., Shukla, S.P., Kumar, K.**, 2020. Triclosan induces immunosuppression and reduces survivability of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* during the challenge to a fish pathogenic bacterium *Edwardsiella tarda*. Environmental Research, 186:109575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109575>
- Butar-Butar, O.D., Suryanto, D., Ilyas, S.**, 2020. Detection of *Edwardsiella tarda* Infection of Catfish (*Clarias gariepinus*) in Central Tapanuli Regency, North Sumatra, Indonesia. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Sciences, 13(1): 6-13. <https://doi.org/10.9790/2380-1301020613>
- Cabello F.C., Godfrey H.P., Buschmann A.H., Dölz, H.J.**, (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. Lancet Infect. Dis. 16 e127–e133. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)00100-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)00100-6)
- Dewi, F.K.**, 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Skripsi. FMIPA. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 38 hlm.

- Du B., Yang Q., Wang R., Wang R., Wang Q., Xin Y., 2019. Evolution of antibiotic resistance and the relationship between the antibiotic resistance genes and microbial compositions under long-term exposure to tetracycline and sulfamethoxazole. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16:4681. [10.3390/ijerph16234681](https://doi.org/10.3390/ijerph16234681)
- Fadillah, N., Waspodo, S., Azhar, F., 2019. The Addition of Mangrove Leaf Extract *Rhizophora apiculata* in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for Vibriosis Prevention. *Journal of Aquaculture Science*, 4(2):91-101. <https://doi.org/10.31093/joas.v4i2.75>
- Gao, Y., Chen, Z., Yao, W., Li, D., Fu, X., 2021. Gentamicin Combined with Hypoionic Shock Rapidly Eradicates Aquaculture Bacteria in vitro and in vivo. *Front. Microbiol.* 12:64186. doi: [10.3389/fmicb.2021.641846](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641846)
- Haenen O. L., Evans J. J., Berthe F., 2013. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* 32 497–507. [10.20506/rst.32.2.2245](https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2245)
- Health Canada., 2008. *Edwardsiella tarda*—Material Safety Data Sheets (MSDS). Public Health Agency of Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds57e-eng.php>
- Kotob, M.H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., El-Matbouli, M., 2017. Erratum to: the impact of co-infections on fish: a review. *Vet. Res.* 48:26. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0432-7>
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., et al., (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7 471–496. [10.1146/annurev-marine-010814-015646](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646)
- Lee, S.W., Wendy, W., 2017. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*). *Veterinary World*, 10(7): 803-807. [10.14202/vetworld.2017.803-807](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.803-807)
- Little, D.C., Newton, R.W., Beveridge, M.C., 2016. Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proc. Nutr. Soc.* 75, 274–286. <https://doi.org/10.1017/s0029665116000665>
- Negara, A.A., 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Bakau Hitam *Rhizophora mucronata* terhadap Bakteri Penyebab Diare. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor . Bogor. 28 hlm.
- Nuraina., 2015. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun *Garcinia benthami* Pierre dengan Metode Dilusi. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. 36 hlm.
- Ogbonne, F.C., Ukazu, E.R., Egbe, F.C., 2018. Antibiotics Resistance Pattern and Plasmid Profiling of *Edwardsiella tarda* Isolated from *Heterobranchus longifilis*. *Journal of Biosciences and Medicines*, 6(4): 95-105. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.64008>
- Poompozhi, S., Kumarasamy, D., 2014. Studies on Phytochemical Constituents of Some Selected Mangroves. *J of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 10 (2): 2.
- Santos, L., Ramos, F., 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Seran, F., Jasmanindar, Y., Salosso, Y., 2022. Phytochemical testing and antibacterial activity of binahong leaves (*Anredera cordifolia*) against *Vibrio alginolyticus* bacteria in-vitro. *Jurnal Aquatik*, 5(1): 1-8
- Sherif, A.H., Gouda, M.Y., Al-Sokary, E.T., Elseify, M.M., 2021. *Lactobacillus plantarum* enhances immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research*, 52(3): 1001-1012. <https://doi.org/10.1111/are.14955>
- Syawal, H., Hakim, L., Effendi, I., 2020. Phytochemical analysis of *Rhizophora apiculata* leaf extract and its inhibitory action against *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa*. *AAAL Bioflux*, 13(4): 2242-2249
- Syawal, H., Karnila, R., Dirta, A., Kurniawan, R., 2017. Ekstrak Daun *Rhizophora* sp. Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Edwardsiella tarda*. *Jurnal Veteriner*, 18(4): 604-609
- Syawal, H., Yuharmen., Kurniawan, R., 2019. Sensitivitas Ekstrak Daun *Rhizophora apiculata* dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Ruaya*, 7(2): 34-38
- Verjan, N., Ikuo, H. and Takashi, A., 2005. Genetic Loci of Major Antigenic Protein Genes of *Edwardsiella tarda*. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 71, 5654-5658. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5654-5658.2005>