

**SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI PADA EKSTRAK METANOL
JARINGAN LUNAK KERANG DARAH (*Anadara granosa*)
TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi***

Karina Dewiningsih, Ita Widowati, Wilis Ari Setyati

*Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Diponegoro
Email : karina.dewi0303@gmail.com*

Received August 2017, Accepted September 2017

ABSTRAK

Kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan salah satu biota laut yang memiliki potensi di bidang farmakologi sebagai antibakteri dan antimikroba. Senyawa bioaktif dari jaringan lunak *A. granosa* dapat digunakan sebagai bahan antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol jaringan lunak kerang *A. granosa* terhadap bakteri *Vibrio harveyi* dan untuk menelusuri kandungan senyawa aktif pada jaringan lunak *A. granosa* dengan analisis fitokimia. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio harveyi* dilakukan dengan metode difusi. Uji aktivitas antibakteri tersebut menggunakan lima konsentrasi yaitu 1000, 750, 500, 250, 100 ppt dan dua kontrol yaitu kontrol negatif (metanol) dan kontrol positif (enrofloxacin). Analisa aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur zona hambat menggunakan jangka sorong, hal tersebut untuk mengetahui seberapa kuat ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hasil yang diperoleh diketahui bahwa ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *V. harveyi*. Analisa aktivitas antibakteri menggunakan pengukuran dengan jangka sorong menghasilkan zona hambat tertinggi pada konsentrasi 1000 ppt dan zona hambat terendah pada konsentrasi 100 ppt. Maka, dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dan zona hambat yang dihasilkan tergolong kategori lemah.

Kata Kunci : Aktivitas antibakteri, *Anadara granosa*, *Vibrio harveyi*, Ekstrak metanol

ABSTRACT

Blood cockle (Anadara granosa) is marine biota that has potential in pharmacology field as antibacterial and antimicrobial. Bioactive compounds obtained from the extract of A. granosa soft tissue can be

used as anti-bacterial ingredients. This research aims to find out the antibacterial activity of methanol extract of *A. granosa* soft tissue against *Vibrio harveyi* and to explore the active compound in soft tissue of *A. granosa* using phytochemical analysis. The antibacterial activity test was using diffusion method and five concentrations i.e. 1000, 750, 500, 250, 100 ppt, negative control (methanol) and positive control (enrofloxacin). Antibacterial activity analysis was done by measuring the inhibitor zone using calipers to find out how strong the methanol extract of *A. granosa* soft tissue in inhibit the growth of *V. harveyi*. The results showed that the methanol extract of *A. granosa* soft tissue has antibacterial activity against *V. harveyi*. Antibacterial activity analysis using calipers measurements resulted in the highest inhibitor zone at a concentration of 1000 ppt and the lowest inhibitor zone at a concentration of 100 ppt. It can be concluded that the methanol extract of *A. granosa* soft tissue has ability to inhibit the growth of *V. harveyi* and the resulted inhibitor zone are classified as weak categories.

Keywords : Antibacterial activity, *Anadara granosa*, *Vibrio harveyi*, Methanol extract

PENDAHULUAN

Kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan hewan bertubuh lunak (Mollusca) yang banyak ditemukan di perairan Tambak Lorok, Semarang. Penelitian Daluningrum (2009), membuktikan jaringan lunak kerang *A. granosa* menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid dan flavonoid. Senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri dari *Staphylococcus aureus* dan *E. coli*. Ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, *S. aureus* dan *Streptococcus pyogenes* (Eswar *et al.*, 2014). Senyawa metabolit sekunder dari jaringan lunak *A. granosa* berpotensi sebagai antibakteri dan antimikroba, sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam mencari obat alami untuk usaha budidaya perikanan.

Bakteri yang diduga menjadi penyebab penyakit pada budidaya perikanan diantaranya *Vibrio* sp. (Hatmanti, 2009). *Vibrio* sp. merupakan bakteri yang sering menyerang larva udang dan ikan. Menurut Riniatsih (2009), langkah yang dilakukan untuk mencegah infeksi bakteri adalah pemberian pakan yang dicampur antibiotik, namun cara tersebut akan berdampak kontraproduktif karena menimbulkan residu antibiotik dalam jaringan. Cara lain yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak tersebut dengan menggunakan ekstrak jaringan lunak *A. granosa* sebagai bahan antibakteri alami pengganti antibiotik. Penelitian ini melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol jaringan lunak kerang *A. granosa* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah kerang darah (*Anadara granosa*) yang diperoleh dari nelayan perairan Tambak Lorok, Semarang dan bakteri *Vibrio harveyi* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2016 – April 2017.

Metode Penelitian

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu metode penelitian eksperimen. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian terdiri dari 4 tahap: (1). Ekstraksi jaringan lunak kerang *A. granosa* dengan metode maserasi dan evaporasi (2). Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*, (3). Analisis fitokimia, (4). Analisis Kromatografi Lapis Tipis.

Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang digunakan sebagai alat uji antibakteri dan uji lainnya, disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121⁰ C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Ekstraksi jaringan lunak kerang *Anadara granosa*

Sampel jaringan lunak kerang *A. granosa* dipisahkan dari cangkang, dicuci, dikeringkan. Jaringan lunak *A. granosa* yang telah kering selanjutnya dipotong-potong dan direndam menggunakan metanol teknis dengan metode maserasi (Depkes RI, 2000). Sampel tersebut direndam dengan perbandingan pelarut 1:5 (w/v) yang dilakukan selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan. Larutan hasil perendaman kemudian dimasukkan ke dalam sonikator selama 15 menit pada *ultrasonic bath* 50 KHz. Hal tersebut dilakukan untuk memecah dinding sel jaringan lunak kerang (Tiwari *et al.*, 2009). Larutan metanol yang diperoleh dari hasil perendaman kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 34⁰ C.

Pembuatan Media

Air laut steril 20 ppt

Air laut digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan media biakan bakteri untuk uji aktivitas antibakteri.

Media TSA (*Tryptic Soya Agar*)

Media *Tryptic Soya Agar* adalah media dalam bentuk agar untuk kultur bakteri *Vibrio harveyi* dan media uji aktivitas antibakteri.

Media *marine broth*

Media *marine broth* adalah media dalam bentuk cair yang digunakan untuk kultur antibakteri.

Uji Aktivitas Antibakteri

Penanaman bakteri pada media cair sebanyak satu ose bertujuan untuk mendapatkan bakteri yang murni dan digunakan pada uji aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* dibuat konsentrasi sebesar 1000; 750; 500; 250; 100 ppt (*part per thousand*) (modifikasi Karlina, 2013). Masing-masing konsentrasi ekstrak diteteskan pada *paper disc* ukuran 8 mm sebesar 20 µl dan diletakkan diatas media TSA. Setiap cawan petri yang berisi 7 konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan posisi terbalik. Adanya zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan 3 kali ulangan. Pengamatan zona hambat dilakukan pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam.

Analisis Fitokimia

Harborne (1987), menyatakan analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kerang *A. granosa*, diantaranya meliputi uji flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid dan steroid.

(a) Flavonoid

Sejumlah ekstrak ditambahkan dengan 1 mg serbuk Mg, 3 tetes HCL dan amyl alcohol kemudian bahan-bahan tersebut dikocok. Reaksi bersifat positif apabila terbentuk warna merah, kuning atau jingga.

(b) Alkaloid

Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* dicampurkan dengan beberapa tetes H₂SO₄ dan dibagi dalam 2 tabung. Tabung pertama diteteskan 2-3 tetes reagen Dragendorff sedangkan tabung kedua diteteskan 2-3 tetes pereaksi Meyer. Reaksi bersifat positif apabila pada tabung pertama terbentuk endapan warna jingga dan pada tabung yang kedua terbentuk endapan kekuning-kuningan.

(c) Saponin (uji busa)

Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan akuades yang dihangatkan kemudian dikocok serta ditetaskan HCL. Ekstrak tersebut mengandung senyawa saponin apabila terbentuk busa yang tidak hilang selama 10 menit.

(d) Terpenoid dan steroid

Kedua senyawa ini dapat dideteksi dengan menambahkan 3 tetes anhidrida asetat dan 3 tetes H₂SO₄. Reaksi bersifat positif mengandung senyawa terpenoid apabila menunjukkan warna merah dan bersifat positif mengandung senyawa steroid apabila menunjukkan warna biru.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mendeteksi bercak yang dihasilkan dari pemisahan senyawa yang terdapat pada ekstrak (Wulandari, 2011). Analisis dimulai dengan memotong lempeng KLT dengan panjang sebesar 6 cm dan lebar sebesar 1 cm. Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* dilarutkan dengan pelarut metanol teknis kemudian ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 5 µl.

Analisis ini menggunakan 2 larutan eluen, diantaranya kloroform dan metanol PA (*Pro analysis*). Kedua eluen tersebut dibuat menjadi 2 perbandingan yaitu 9:1 dan 6:4. Hasil KLT dilakukan dengan penampakan noda yang timbul pada permukaan lempeng dan dilihat dibawah UV 366 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Komponen bioaktif kerang darah (*A. granosa*)

Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* yang dihasilkan berupa pasta kental berwarna hijau tua. Nilai rendemen yang didapat dari proses evaporasi sebesar 4,5%. Munandar (2015), menyatakan perbedaan nilai rendemen disebabkan oleh perbedaan jenis kepolaran yang digunakan.

Analisis fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid dan steroid. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia

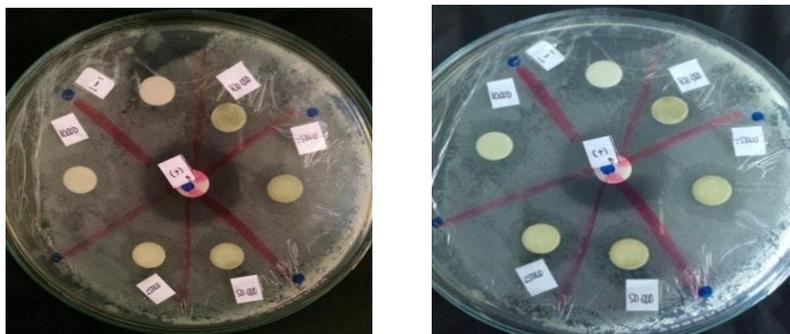
No	Analisis Fitokimia	Hasil	Keterangan
1	Flavonoid	(+)	Larutan berwarna kuning kehijauan
2	Alkaloid		
	a. Dragendroff	(+)	Terdapat endapan berwarna jingga
	b. Meyer	(+)	Larutan berwarna kekuningan

3	Saponin	(+)	Terbentuk busa
4	Terpenoid	(-)	Tidak ada tanda
5	Steroid	(+)	Larutan berwarna hijau kehitaman

Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Munandar (2015), menyatakan senyawa flavonoid memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak permeabilitas dinding sel, mengobati gangguan fungsi hati dan memungkinkan sebagai antimikroba dan antivirus. Alkaloid merupakan grup terbesar senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat kandungan beracun dan sering digunakan dalam pengobatan. Senyawa tersebut memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan pencegahan dari infeksi. Saponin bersifat amfifilik, sifat tersebut yang menyebabkan saponin dapat membentuk busa karena saponin dapat membentuk ikatan lipid dari membrane sel (Detha, 2016). Senyawa steroid juga berperan sebagai antibakteri dan antifungi. Senyawa tersebut merusak membran sel bakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri (Dewi, 2016).

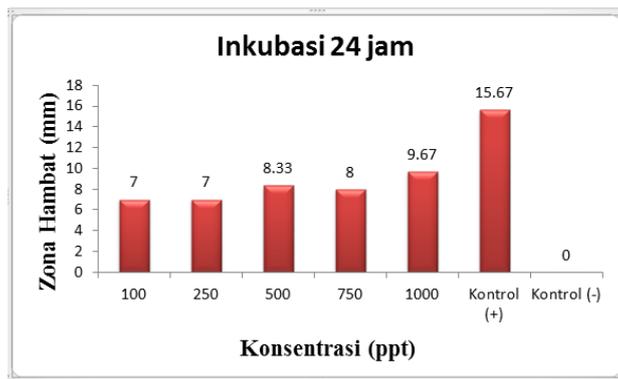
Uji Aktivitas Antibakteri

Ekstrak metanol jaringan lunak kerang *A. granosa* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* pada semua konsentrasi ekstrak dengan ditandai adanya daerah bening di sekitar *paper disc*. Daerah bening yang dihasilkan oleh ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* dapat dilihat pada Gambar 1.

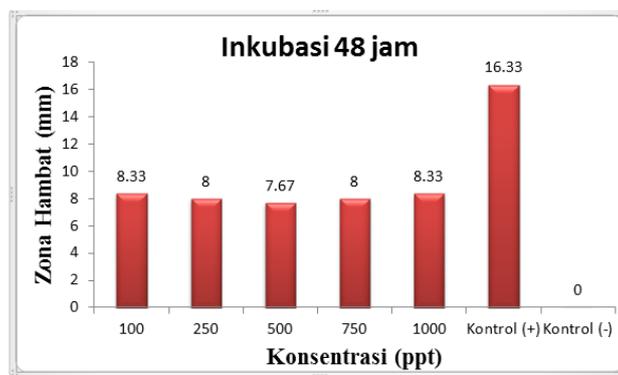


Gambar 1. Zona hambat hasil uji aktivitas antibakteri

Hasil perhitungan uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* terhadap bakteri *Vibrio harveyi* dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4. Ekstrak jaringan lunak *A. granosa* pada masa inkubasi 24 jam dengan konsentrasi 100; 250; 500; 750 dan 1000 ppt menghasilkan zona hambat sebesar 7; 7; 8.33; 8 dan 9.67 mm. Kontrol positif yang digunakan adalah enrofloxacin menghasilkan zona hambat sebesar 15.67 mm, sedangkan kontrol negatif (metanol) tidak menghasilkan zona hambat.

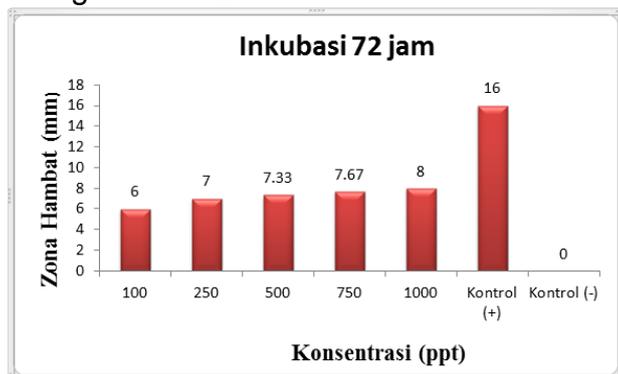


Gambar 2. Hasil perhitungan zona hambat pada masa inkubasi 24 jam



Gambar 3. Hasil perhitungan zona hambat pada masa inkubasi 48 jam

Ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* pada inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 100; 250; 500; 750 dan 1000 ppt menghasilkan zona hambat sebesar 8.33; 8; 7.67; 8 dan 8.33 mm. Kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 16.33 mm dan kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat.



Gambar 4. Hasil perhitungan zona hambat pada masa inkubasi 72 jam

Ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* pada inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 100; 250; 500; 750 dan 1000 ppt menghasilkan zona

hambat sebesar 6; 7; 7.33; 7.67 dan 8 mm. Kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 16 mm dan kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat.

Rinawati (2014), menyatakan aktivitas antibakteri dengan diameter 20 mm atau lebih dikategorikan kuat, diameter 16 – 20 mm dikategorikan sedang, diameter ≤ 10 mm dikategorikan lemah. Berdasarkan pernyataan tersebut, zona hambat yang dihasilkan ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* termasuk kategori zona hambat lemah. Konsentrasi ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* mempengaruhi hambatan pertumbuhan *Vibrio harveyi*, hal tersebut ditunjukkan dari konsentrasi ekstrak jaringan lunak *A. granosa* yang semakin tinggi menunjukkan zona hambat yang semakin besar.

Kemampuan ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* tersebut dikarenakan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Senyawa-senyawa tersebut diidentifikasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Saptiani, 2012). Perlakuan kontrol negatif menggunakan metanol teknis tidak menunjukkan adanya zona hambat, hal ini membuktikan bahwa metanol tidak memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Zona hambat paling tinggi dihasilkan oleh kontrol positif.

Aktivitas penghambatan ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* pada kelima konsentrasi mulai mengalami penurunan pada masa inkubasi 48 jam, hal tersebut ditandai dengan peningkatan kekeruhan yang dihasilkan pada media TSA. Zona hambat yang awalnya jernih berubah menjadi agak keruh menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan bakteri pada zona tersebut.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Hasil yang diperoleh dari pemisahan kromatografi lapis tipis menghasilkan nilai R_f. Nilai R_f yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai R_f hasil kromatografi lapis tipis

Ekstrak	Eluen (kloroform : metanol)	Fraksi	Nilai R _f (cm)
	9:1	1	0,08
		2	0,17
		3	0,25
		4	0,33
Metanol	6:4	1	0,1
2		0,2	
3		0,47	

Ekstrak metanol jaringan lunak kerang darah (*A. granosa*) dengan eluen kloroform:metanol sebesar 9:1 menghasilkan 4 fraksi dengan nilai R_f

0,08; 0,17; 0,25 dan 0,33, sedangkan eluen kloroform:metanol 6:4 menghasilkan 3 fraksi dengan nilai R_f 0,1; 0,28 dan 0,47. Pemisahan yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan pemisahan berdasarkan polaritas, artinya ketertarikan ekstrak terhadap fase diam dan fase gerak tergantung kedekatan polaritas ekstrak terhadap fase diam dan fase gerak (Wulandari, 2011).

Perbandingan eluen kloroform:metanol (9:1) menghasilkan nilai R_f terbaik yang terletak pada fraksi ketiga dan keempat, sedangkan perbandingan eluen (6:4) menghasilkan nilai R_f terbaik terletak pada fraksi kedua dan ketiga. Hal ini dibuktikan oleh Wulandari (2011), bahwa nilai R_f terbaik untuk deteksi UV yaitu 0.2 – 0.8. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai R_f bervariasi yaitu sifat dan ukuran lempeng, dimensi dan jenis ruang, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak dan metode persiapan sampel KLT.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* terhadap *Vibrio harveyi* memberikan hasil positif yaitu terbentuknya zona hambat. Ekstrak tersebut berpotensi sebagai antibakteri. Konsentrasi 1000 ppt menghasilkan daya hambat tertinggi dan konsentrasi 100 ppt menghasilkan daya hambat terendah, namun zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak metanol jaringan lunak *A. granosa* tergolong kategori lemah. Ekstrak ini mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Pemisahan senyawa dengan metode KLT diperoleh hasil bahwa terdapat 4 fraksi terbaik yang dihasilkan oleh perbandingan eluen kloroform:metanol (9:1).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dr. Ir. Ita Widowati, DEA dan Dr. Dra. Wilis Ari Setyati, MSi sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini serta semua pihak terkait yang telah memberikan bantuan dan fasilitas dalam penulisan jurnal ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Daluningrum, I. P. W., E. Salamah., K. Tampubolon., 2009. Penapisan awal komponen bioaktif dari kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai senyawa antibakteri [e-journal]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Direktorat Jendral POM – Depkes RI.

- Detha, A., F.U. Datta. 2016. Antibacterial Activity of Sopi on Farms. Jurnal Kedokteran Hewan, 4: 153-158
- Dewi, C.S.U., D. Soedharma, M. Kawaroe. 2012. Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Lamun *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan, 3 (2): 23-27.
- Eswar, A., Ramamoorthy, K., Mohanraj, M., Gokulakrishnan, S.. and Sankar, G. 2014. In-vitro antibacterial activity and Brine Shrimp Lethality Test on selected three marine Mollusks from Velar Estuary, Parangipettai. International Journal of Current Research, 6: 9075-9078.
- Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Institut Teknologi Bandung, Bandung. (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro). 195-245.
- Hatmanti, A., R. Nuchsin., D. Julinasari. 2009. *Screening* Bakteri Penghambat Untuk Bakteri Penyebab Penyakit pada Budidaya Ikan Kerapu dari Perairan Banten dan Lampung. Makara, Sains, 13 (1): 81-86.
- Karlina, C.Y., M. Ibrahim., G. Trimulyono., 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Krokot (*Portulaca oleracea*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *E. coli*. Lenterabio, 2 (1): 87 – 93.
- Munandar, A., S. Haryati., 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak kerang lokan (*Batissa*, sp.). Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan, 4 (1): 57-62 .
- Rinawati, N.D., 2014. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Jurnal Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. 1-13 .
- Riniatsih I., W. A. Setyati. 2009. Bioaktivitas Ekstrak dan Serbuk Lamun *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* pada *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio harveyi*,. 14 (3): 138 -141.
- Saptiani, G., S.B. Prayitno., S. Anggoro., 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jeruju (*Acanthus ilicifolius*). Jurnal Veteriner., 13 (3): 257-262.
- Tiwari, BK, Donnell OPC, Cullen JP. 2009. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. J Food Eng: 166-171.
- Wulandari, L. 2011. Kromatografi Lapis Tipis. PT. Taman Kampus Presindo: Jember. 1-184.