

**BIOAKTIVITAS ANTIVIBRIOSIS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA PADA EKSTRAK YEAST DARI SEDIMEN
EKOSISTEM MANGROVE KARIMUNJAWA**

**Sabrina Alisha Devi¹, Wilis Ari Setyati¹, Dyah Ayu Wulandary², Ega
Saputra², Sakti Imam Muchlissin³**

¹*Departemen Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro Semarang*

²*Departemen Akuakultur Universitas Diponegoro Semarang*

³*Laboratorium Tropical Marine Biotechnology Universitas Diponegoro
Semarang*

E-mail : wilisarisetiati@yahoo.co.id

Received August 2018, Accepted September 2018

ABSTRAK

Yeast adalah mikroorganisme yang tidak dapat membentuk misellium. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan mengidentifikasi golongan senyawa dari ekstrak yeast. Metode penelitian yang dilakukan antara lain 1). Sampling dan isolasi, 2). Kultur Massal, 3). Uji Bioassay dengan bakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio cholerae*, (4). Analisis fitokimia, (5). Identifikasi Molekular menunjukkan bahwa isolat KM 3 memiliki kemiripan 99% dengan *Candida fermentati*. KM 3 memiliki aktivitas antibakteri. Uji fitokim yang dilakukan mengidentifikasi golongan senyawa saponin, flavonoid, kuinon, tanin, alkaloid, steroid, dan triterpenoid.

Kata Kunci : Karimunjava, Uji Fitokimia, Identifikasi Molekular, *Candida fermentati*

ABSTRACT

*Yeast is a microorganism that can not create misellium. Aims of this study is to investigate antibacterial activity and to identify class of compounds from yeast extract. The methods of this study include 1). Sampling and isolation, 2). Mass Culture, 3). Bioassay Test with *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*, (4). Phytochemical analysis, (5). Molecular Identification showed that KM3 isolate has a 99% similarity to *Candida fermentati*, KM 3 has antibacterial activity. Phytochemical tests were performed to identify classes of saponins, flavonoids, quinones, tannins, alkaloids, steroids, and triterpenoids.*

Keywords : Karimunjava, Phytochemical Analysis, Molecular Identification, *Candida fermentati*

PENDAHULUAN

Bakteri *Vibrio* termasuk ke dalam bakteri gram negatif (Ananta WS *et al.*, 2011). *Vibrio cholerae* dan *Vibrio harveyi* merupakan 2 jenis bakteri patogen yang paling banyak ditemui. Kedua jenis bakteri tersebut memiliki flagela di salah satu ujung polarnya. *Vibrio cholerae* tumbuh baik pada suasana basa (pH 8,0- 9,5) dan dapat tumbuh dalam keadaan aerob dan anaerob. Pada media Thiosulphate Citrate Bile Salt (TCBS) koloni *Vibrio harveyi* berwarna putih sampai hijau dengan pusat koloni berwarna hijau tua (Utami *et al.*, 2016). Karakteristik lain dari bakteri *Vibrio harveyi* yaitu bersifat patogen oportunistik, dimana jika kondisi lingkungan dan inangnya memburuk akan merubah sifatnya dari saprofitik menjadi patogenik (Widanarni *et al.*, 2004).

Yeast atau yang biasa disebut dengan ragi adalah jamur yang tidak dapat membentuk miselium. Yeast biasanya diisolasi dari bahan bakar, air, tumbuhan, hewan dan serangga. Persediaan yeast di alam tidak sebanyak bakteri. Saat keadaan aerob maupun anaerob yeast tetap dapat tumbuh (Wina, 1999). Ukuran partikel yeast lebih besar dibandingkan dengan bakteri. Potensi yang dimilikinya untuk menghambat pertumbuhan bakteri serta resisten terhadap antibiotik dan sulfamid, dimana hal ini terjadi secara genetik. (Montes de Oca *et al.*, 2016).

MATERI DAN METODE

Metode Penelitian

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu metode penelitian eksperimen. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian terdiri dari 5 tahap: 1). Sampling dan isolasi, 2). Kultur Massal, 3). Uji Bioassay dengan Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio cholerae*, (4). Analisis fitokimia, (5). Identifikasi Molekular.

Lokasi Sampling dan Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah sedimen Mangrove yang diperoleh dari Balai Taman Nasional Karimunjawa dan bakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio cholerae* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Tropical Marine Biology Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan April-Juli 2018.

Isolasi dan Purifikasi Yeast

Kegiatan penelitian dimulai dengan mengambil sampel sedimen mangrove dari Mangrove Tracking, Desa Kemojan, Karimunjawa. Sedimen dibawa ke Laboratorium dengan menggunakan Plastik *Ziplock*

dan dimasukkan ke dalam *Cool Box*. Sampel sedimen mangrove sebanyak 0.2 gram dimasukkan kedalam Erlenmeyer dengan 20 ml air laut steril ditambahkan serbuk sari pinus untuk menarik Yeast dengan Inkubasi 5-7 hari (Marchan *et al.*, 2017).

Uji Bioassay dengan *Vibrio harveyi* dan *Vibrio Chlorela*

Metode Overlay (Radjasa, 2008) sebagai seleksi untuk mengetahui ada tidaknya potensi terbentuknya zona hambat. Isolat Yeast diambil dari sediaan di media miring dan dilakukan dotting pada media PDA serta diinokulasi selama 2x24 jam pada Inkubator. Isolat bakteri patogen ditanam pada media Nutrien Broth dengan Inkubasi 1x 24 jam pada 5 mL di-*shaker*. Suspensi mikroba asosiasi diambil 0,5 mL (1% dari total volume *soft agar*) dan dimasukkan ke dalam 50 mL media Nutrien Agar. Data hasil Overlay disajikan dalam bentuk tabel dengan informasi terbentuknya aktivitas zona hambat dinotasikan tanda *plus* (+) sedangkan tanda *minus* (-) menunjukkan bahwa tidak terbentuk zona hambat sehingga diperoleh data kualitatif.

Kultur massa Yeast

Isolat yang diperoleh dikultur dengan 2 media yang berbeda, pertama dengan media modifikasi menurut Burja *et. al* (2007) dengan komposisi Yeast extract 2g/L, Monosodium glutamate 8g/L, Glukosa 20g/L serta media PYG cair menurut (Leano *et. al*, 2003) mycological peptone 1g/L, Yeast Extract 10g/L, Glukosa 10g/L. Isolat dikultur dengan bertingkat dari volume 5 ml selama 1 hari, selanjutnya dipindahkan ke 45ml, hingga pada media 200 ml. sehingga diperoleh total 250 ml media cair yang berisi dengan kultur yeast.

Uji Golongan Senyawa

(a) Saponin (uji busa)

Ekstrak Yeast ditambahkan akuades dimasukkan ke dalam tube sebanyak 10 µl dan dididihkan selama 5 menit kemudian digojok dengan vortex selama 10 detik. Ekstrak yang mengandung saponin ditandai dengan terbentuk busa yang tidak hilang selama 10 menit.

(b) Flavonoid

Ekstrak ditambahkan dengan aquades dimasukkan ke dalam tube sebanyak 10 µl dengan ditambahkan 10 µl serbuk Mg, 4 µl HCl dan 8 µl *amyl alcohol* kemudian larutan digojok kuat dan biarkan hingga terpisah. Hasil positif apabila terbentuk warna kuning sampai merah pada lapisan amilalkohol (pada layer bagian atas).

(c) Kunion

Ekstrak ditambahkan akuades dimasukkan kedalam tube sebanyak 10 µl ditambah dengan Natrium Hidroksida (NaOH) 4 µl. Hasil positif terbentuk apabila terbentuk warna kuning

(d) Tanin atau senyawa Fenolik

Ekstrak ditambahkan akuades dan dimasukkan kedalam Cawan Porselin sebanyak 10 µl ditambahkan larutan besi (III) Klorida (FeCl₃) 1%.

(e) Alkaloid

Ekstrak ditambahkan akuades dan dimasukkan kedalam Cawan Porselin sebanyak 10 µl ditambahkan dengan pereaksi Dragendrof 20 µl. Terbentuk endapan coklat dapat teridentifikasi bahwa ekstrak mengandung senyawa alkaloid

(f) Terpenoid dan steroid

Kedua senyawa ini dapat dideteksi dengan menambahkan 10 µl anhidrida asetat dan 5 µl H₂SO₄. Reaksi bersifat positif mengandung senyawa terpenoid apabila menunjukkan warna merah dan bersifat positif mengandung senyawa steroid apabila menunjukkan warna biru.

Identifikasi Molekular

Ekstraksi Yeast menggunakan Metode Chelex (Lee, et al, 2006). Selanjutnya dilakukan tahap amplifikasi PCR menggunakan master mix Promega, pada komposisi *Forward* ITS 1 1ul, *Reverse* ITS 4 1ul, DNA Template 1 ul, Promega 12,5 ul, serta aquabides hingga volume total 25 ul. Proses PCR terdiri dari 35 siklus, yaitu *pre-denaturasi* pada 95⁰ C selama 3 menit, *Denaturasi* pada 95⁰ C selama 30 detik, *Annealing* pada 56,7⁰ C selama 30 detik, *ekstension* pada 72⁰ C selama 45 detik dan *hold* pada suhu 4⁰ C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fitokimia

Ekstrak yeast didapatkan dari 4 isolat dengan kode T 2, KM 1, KM 2, dan KM 3 yang berasal dari 2 media yaitu media PYG Broth dan MSG. Berat ekstrak yeast pada isolat T 2, KM 1, KM 2 dan KM 3 secara berturut-turut sebanyak 2,9 mg, 3,7 mg, 5,1 mg, dan 22,4 mg pada media PYG

Broth dan Pada media MSG sebanyak 31,6 mg, 26,4 mg, 15,4 mg dan 6,4 mg. Hasil ekstrak yang didapatkan melalui maserasi dan evaporasi. Hasil uji fitokimia dengan menggunakan media PYG Broth dan media MSG dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia media PYG Broth

Golongan Senyawa	T2	KM 1	KM 2	KM 3
Saponin	-	-	-	-
Flavanoid	+	-	+	-
Kuinon	+	-	+	-
Tanin	+	-	+	+
Alkanoid	+	-	+	+
Steroid	-	-	-	-
Triterpenoid	-	-	-	-

Tabel 2. Hasil uji fitokimia Media MSG

Golongan Senyawa	T2	KM 1	KM 2	KM 3
Saponin	+	-	-	+
Flavanoid	-	-	-	+
Kuinon	-	+	+	+
Tanin	+	+	+	+
Alkanoid	+	+	+	+
Steroid	-	-	-	-
Triterpenoid	-	-	-	-

Menurut Sangi et al, (2008), Penentuan kandungan kimia dilakukan melalui analisis fitokimia secara kualitatif. Analisis fitokimia secara kualitatif ini merupakan suatu metode analisis awal untuk meneliti kandungan senyawa-senyawa kimia. Ekstraksi dari sedimen mangrove pada uji fitokimia dengan media PYG broth pada golongan saponin, steroid dan triterpenoid didapatkan hasil negatif pada semua sampel, pada golongan flavonoid dan kuinon sampel T2 dan KM2 hasilnya positif flavonoid merupakan senyawa fenolik diketahui memiliki aktivitas antibakteri menurut Mohamad *et al* (2012), flavonoid memiliki sifat lipofilik yang dapat menghancurkan dinding sel bakteri dan menurut Nuraini (2007) yang menyatakan bahwa golongan flavonoid dan tanin memiliki aktivitas antibakteri. Golongan senyawa tanin dan Alkaloid T2, KM2, dan KM3 hasilnya positif. Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan, terutama angiosperm. Lebih dari 20% spesies angiosperm mengandung alkaloid (Wink, 2008).

Hasil dari ekstraksi dari sedimen mangrove pada uji fitokimia dengan media MSG pada golongan senyawa saponin didapatkan hasil positif pada T2 dan KM3, pada golongan senyawa flavonoid positif pada KM3, hasil dari kuinon positif pada sampel KM1, KM2, dan KM3; pada tanin dan alkaloid positif pada semua sampel; sedangkan pada steroid dan triterpenoid hasilnya negatif pada semua sampel.

Uji Bioassay Antibakteri

Uji Bioassay antibakteri pada 4 isolat Yeast dengan bakteri uji *Vibrio harveyi* dan *Vibrio cholerae* menunjukkan hasil positif hanya pada sampel KM3 yang mampu membentuk zona hambat (lihat Tabel 3).

Tabel 3. Uji Bioassay Antibakteri

Bakteri Uji	T 2	KM 1	KM 2	KM 3
<i>Vibrio harveyi</i>	-	-	-	+
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-	+

Penanaman bakteri pada media dengan teknik penggoresan bertujuan untuk mendapatkan bakteri yang murni dan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri (Riyanto et al, 2013).

Identifikasi Molekuler

Hasil identifikasi molekuler dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Identifikasi Molekuler

Kode Isolat	Panjang Basanukleotida	Kedekatan Spesies	Persen Kemiripan	Accession Number
KM 3	612	<i>Meyerozyma caribbica</i> (<i>Candida fermentati</i>)	99%	KM402049

Hasil identifikasi molekuler diperoleh bahwa isolat KM 3 memiliki kedekatan dengan *Candida fermentati* dengan kemiripan 99%.

KESIMPULAN

Hasil penelitian yang didapatkan adalah pada uji fitokimia pada media PYG Broth golongan saponin, steroid dan triterpenoid didapatkan hasil negatif pada semua sampel, pada golongan flavonoid dan kuinon sampel T2 dan KM2 positif, Golongan senyawa tanin dan Alkaloid T2, KM2, dan KM3 hasilnya positif. Sedangkan pada media MSG

golongan senyawa saponin didapatkan hasil positif pada T2 dan KM3, senyawa flavonoid positif pada KM3, senyawa kuinon positif pada sampel KM1, KM2, dan KM3; senyawa tanin dan alkaloid positif pada semua sampel; sedangkan pada steroid dan triterpenoid hasilnya negatif pada semua sampel. Uji aktivitas antibakteri terdapat zona bening pada isolat dengan kode KM3 dengan nama spesies *Candida fermentati*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan Terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi dan Pendidikan Tinggi (KEMRISTEKDIKTI) dalam program Program Kreativitas Mahasiswa PKM yang telah memberikan dana penelitian. Semua teman-teman dan staf Laboratorium Tropical Marine Biotechnology, FPIK Undip yang telah membantu jalannya dan kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ananta WS, I P, IGM Wijaya P., IGP Dhinarananta, P. Yuniadi A. Dan M. Agus Hendrayana. 2011. Identifikasi Serotipe Bakteri *Vibrio cholerae* Terisolasi dari Es Bahan Pengawet Ikan Yang Digunakan Oleh Pedagang Hasil Laut Pasar Modern dan Pasar Tradisional di Kota Denpasar.
- Burja, A. M., Armenta, R. E., Radianingtyas, Helia, Barrow C. J. 2007. Evaluation of Fatty acid Extraction Methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. *J. Agric. Food Chem.* 2007,554795-4801.
- Leano, E. M., Gapasin, R. S..J., Polohan, Bernice, Vrijmoed, L.L.P., 2003. Growth and Fatty Acid Production of *Thraustochytrids* from Panay Mangroves Philippines. *Fungal Diversity*.
- Lee, Y. K., Hyun Jung Jung and Hong Kum Lee. 2006. Marine Bacteria Associated with The Korean Brown Alga, *Unidaria pinnatifida*. *The Journal of Microbiology*, 44 (6): 694-698.
- Marchan, Loris Fossier, K. J. L. Chang, P. D. Nichols, J. L. Polglase, W. J. Mitchell, and T. Gutierrez. 2017. *Screening of New British Thraustochytrids Isolates for Docosahexaenoic Acid (DHA) Production. Journal of Applied Phycology.* 1–13.
- Mohamad R,Widyastuti, Suradikusumah, dan Darusman. 2012. Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol, dan Flavonoid Total dari Enam Tumbuhan Obat Indonesia. *Tradd. Med. J.* Vol 18:29-34.

- Montes de Oca, R., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Monroy, H., Pérez L.S., Zamora, J.L. and Gutiérrez, A. 2016. *Yeast: Description and Structure*.
- Nuraini AD. 2007. Ekstraksi Komponen Antibakteri dan Antioksidan dari Biji Teratai (*Nymphaea pubescens Willd*) [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Radjasa, O. K. 2008. Growth Inhibition of Medically Antibiotic Resistant Bacteria by Sponge-Associated Bacteria. *Journal of Coastal Development*, 11 (2): 75-80.
- Riyanto E.I., I. Widowati dan A. Sabdono. 2013. Skrining Aktivitas Antibakteri Pada Ekstrak *Sargassum polycystum* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus* Di Pulau Panjang Jepara. Skrining Aktivitas Antibakteri Pada Ekstrak *Sargassum polycystum* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus* Di Pulau Panjang Jepara.
- Sangi, M., M. R. J. Runtuwene, Herny E. I. Simbala dan Veronica M. A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat Di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.* 1(1) : 47-53.
- Utami, W, Sarjito dan Desrina. 2016. Pengaruh Salinitas Terhadap Efek Infeksi *Vibrio harveyi* Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 5(1): 82 – 90.
- Widanarni, D. Meha, S. Nuryati, Sukenda dan A. Suwanto. 2004. Uji Patogenisitas *Vibrio harveyi* Pada Larva Udang Windu Menggunakan 23kan Resisten Rifampisin sebagai Penanda Molekuler. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 3(3): 23 – 27.
- Wina, E. 1999. Pemanfaatan Ragi (Yeast) sebagai Pakan Imbuhan Untuk Meningkatkan Produktivitas Ternak Ruminansia. *WARTAZOA*. 9(2): 1 – 8.
- Wink, M. (2008). Ecological Roles of Alkaloids. Wink, M. (Eds.) *Modern Alkaloids, Structure, Isolation Synthesis and Biology*, Wiley, Jerman: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.