

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAPULAGA  
(*Amomum compactum*) TERHADAP *Aeromonas hydrophila* SECARA  
*IN VITRO***

**Skripsi**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh gelar Sarjana Sains



Oleh:  
**Siska Dyah Kusuma Putri**  
**NIM. M0408085**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2012**

*commit to user*

## Halaman Persetujuan Pembimbing

SKRIPSI

· UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAPULAGA (*Amomum compactum*) TERHADAP *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO*

Oleh:  
Siska Dyah Kusuma Putri  
NIM. M0408085

Telah disetujui oleh Tim Pembimbing

Tanda Tangan

Pembimbing I : Dr. Ari Susilowati, M.Si  
NIP.196904 28 199702 2 006

*Ari Susilowati*

Pembimbing II : Dr. Ratna Setyaningsih, M. Si  
NIP. 196607 14 199903 2 001

*Ratna Setyaningsih*

Surakarta, Mei 2012

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Agung Budiharjo, M.Si.  
NIP. 19680823 200003 1 001

**PENGESAHAN**

**SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAPULAGA (*Amomum compactum*) TERHADAP *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO***

Oleh:  
Siska Dyah Kusuma Putri  
NIM. M0408085

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal ...2.9...MAY 2012  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Surakarta, Mei 2012  
Penguji II

Penguji I



Widya Mudyantini, M. Si.  
NIP. 197305 05 199903 2 001



Estu Rethaningtyas N., S.TP., M.Si.  
NIP. 19680709 200501 2 001

Penguji III



Dr. Ari Susilowati, M. Si  
NIP. 196904 28 199702 2 006

Penguji IV



Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si  
NIP. 196607 14 199903 2 001

Mengesahkan



Dekan  
FMIPA UNS

Prof. Ir. Ari Handono Ramelan, M.Sc.(Hons), Ph.D.  
NIP. 19610223 198601 1 001

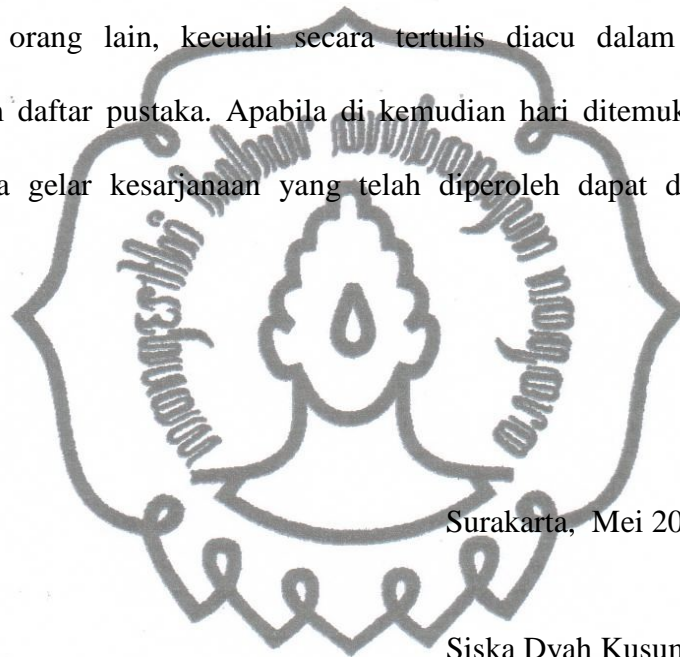
Mengetahui  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Agung Budiharjo, M.Si.  
NIP. 19680823 200003 1 001

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila di kemudian hari ditemukan adanya unsur penjiplakan maka gelar kesarjanaan yang telah diperoleh dapat ditinjau dan /atau dicabut.



Surakarta, Mei 2012

Siska Dyah Kusuma Putri  
NIM. M0408085

## Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *In Vitro*

Siska Dyah Kusuma Putri

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

### ABSTRAK

Salah satu kendala yang menghambat budidaya ikan air tawar adalah kehadiran bakteri patogen yaitu *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). Salah satu upaya pengobatan terhadap penyakit MAS dengan memanfaatkan biji kapulaga (*Amomum compactum*) perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan mengetahui konsentrasi minimum ekstrak biji kapulaga yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

Ekstrak kapulaga dibuat dengan maserasi bertingkat menggunakan tiga pelarut yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dengan konsentrasi 100% untuk masing-masing ekstrak, pelarut, bakteri tanpa ekstrak untuk kontrol negatif dan kloramfenikol untuk kontrol positif. Selanjutnya uji *Minimum Concentration Inhibitory* (MIC) dilakukan dengan menggunakan ekstrak yang zona penghambatannya paling luas. Konsentrasi ekstrak yang diuji 5,71%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34%, 0,17%, 0% (b/v) sebagai kontrol negatif, dan antibiotik kloramfenikol 3,4% sebagai kontrol positif. Analisis data secara statistik dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan uji *Duncans Multiple Range Test* (DMRT) taraf 5%.

Ekstrak biji kapulaga yang dihasilkan dengan pelarut n-heksana sebanyak 11,1 g, etilasetat 10 g dan metanol 15,1 g. Ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol dengan konsentrasi 100% menghasilkan rerata zona hambat berturut-turut 5,25 mm, 6,25 mm dan 5,75 mm. Nilai MIC pada ekstrak etil asetat terhadap *A. hydrophila* adalah 2,70 %.

Kata kunci: Antibakteri, ekstrak kapulaga (*Amomum compactum*), *Aeromonas hydrophila*, *in vitro*

**In Vitro Testing of Antibacterial Activity of Extracts Of Seed Cardamom  
(*Amomum compactum*) against by *Aeromonas hydrophila***

**Siska Dyah Kusuma Putri**

Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences  
Sebelas Maret University

**ABSTRACT**

One of the obstacles that hinder the cultivation of common freshwater fish is the presence of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. These bacteria cause Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS). One effort against MAS on freshwater fish is the use of cardamom seed (*Amomum compactum*). The purpose of this study were to know the antibacterial activity and get the minimum concentration of cardamom seed extract that was able to inhibit *A. hydrophila* in vitro.

Cardamom seed extraction was done by stratified maceration using three solvent i.e. n-hexane, ethyl acetate and methanol. Antibacterial activity was conducted using disc diffusion method by 100 % concentration for each extract, solvents, only bacteria culture without the extract as negative control and positive control for chloramphenicol 3,4%. *Minimum Concentration Inhibitory* test (MIC) performed using extracts of the most widespread inhibitory zone. The extract concentrations tested 5,71%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34%, 0,17%(b/v),and 0% as a negative control, while the antibiotic chloramphenicol as a positive control. Data analysis using Analysis of Variance test (ANOVA) and Duncans Multiple Range test (DMRT) level of 5%.

Cardamom seed extracted by n – hexane, ethylacetate and methanol as a solvent were 11,1 g, 10 g and 15,1 g extract respectively. Inhibition zone of 100% cardamom seed extract with the solvent n - hexane, ethyl acetate and methanol were 5,25 mm, 6,25 mm and 5,75 mm respectively. MIC values in the ethyl acetate extract of *A. hydrophila* was 2,70%.

Key word: Antibacterial, cardamom seed extract (*Amomum compactum*), *Aeromonas hydrophila*, in vitro



MOTTO

“Kegagalan adalah guru yang terbaik”

“Seseorang yang percaya akan kemampuan dirinya akan bersikap positif, optimis dan kreatif melakukan pekerjaan dengan penuh keyakinan dan tanggung jawab untuk meraih sukses”

(Siska Dyah Kusuma Putri)

*commit to user*

## PERSEMBAHAN



Skripsi ini

Kupersembahkan untuk ibuku tercinta,

Elang Winata Kusuma tersayang,

Alm. R. Eko Saputra, M.A terkasih dan teman-

teman tercinta,

Yang senantiasa memberikan dukungan,

Doa dan kasih sayangnya.

Terima kasih .....

*commit to user*



## KATA PENGANTAR

Segala puja dan puji syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul: “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *In Vitro*”. Penyusunan skripsi ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Dalam melakukan penelitian maupun penyusunan skripsi ini penulis telah mendapatkan banyak masukan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat berguna dan bermanfaat baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu pada kesempatan yang baik ini dengan berbesar hati penulis ingin mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya dan sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Ir. Ari Handono Ramelan, M.Sc., Ph.D., selaku Dekan FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta atas ijin penelitian untuk keperluan skripsi.
2. Bapak Dr. Agung Budiharjo, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan ijin dalam penelitian.
3. Ibu Dr. Ari susilowati, M. Si selaku pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan saran-saran selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.
4. Ibu Dr. Ratna Setyaningsih, M. Si selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.
5. Ibu Estu Retnaningtyas N, S. TP., M. Si selaku penelaah I yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan selama penelitian.
6. Ibu Widya Mudyantini, M.Si selaku penelaah II yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan selama penelitian.
7. Dosen di Jurusan Biologi yang telah dengan sabar memberikan pengarahan dan dorongan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.

8. Kepala dan Staff Laboratorium Biologi FMIPA dan Sub Laboratorium Biologi MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
9. Ibuku tercinta Sugiyanti yang telah memberi semangat, dukungan, dan doa demi keberhasilan penulis.
10. Elang Winata Kusuma, A.md yang tiada henti-hentinya memberi semangat dan inspirasi dengan penuh kesabaran dan ketulusan doa demi keberhasilan penulis.
11. Kakakku Alm. R. Eko Saputra, S. Sn, M. A terkasih yang tak henti-hentinya memberikan motivasi, semangat dan dorongan dengan demi keberhasilan penulis.
12. Kepada Eva, Fatimah, Unoviana, Putri dan seluruh teman-teman biologi 2008 yang terus memberikan dorongan dan perhatian sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Semoga seluruh kebaikan yang telah diberikan ini menjadi amal ibadah dan mendapat limpahan rahmat dan hidayah yang berlipat ganda dari Allah SWT.

Akhirnya penulis berharap walaupun skripsi ini masih jauh dari sempurna, namun bermanfaat bagi kita semua. Amin ya Rabbal Alamin.

Surakarta, Mei 2012  
Siska Dyah Kusuma Putri

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
HALAMAN MOTTO.....	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat Penelitian .....	5
BAB II. LANDASAN TEORI .....	6
A. Tinjauan Pustaka .....	6
1. Kapulaga ( <i>Amomum compactum</i> ).....	6
A) Deskripsi.....	6
B) Kandungan.....	7
2. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
A) Deskripsi.....	7
B) Penyakit yang disebabkan <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	9
C) Patogenisitas dan Virulensi.....	11
D) Penggunaan Antibakteri untuk Menanggulangi	

Penyakit Pada Ikan .....	11
3. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi.....	13
4. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC).....	15
B. Kerangka Pemikiran.....	16
C. Hipotesis.....	16
BAB III. METODE PENELITIAN.....	17
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	17
B. Alat dan Bahan .....	17
C. Cara Kerja .....	18
D. Analisis Data .....	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
A. Komponen Bioaktif pada Biji Kapulaga.....	25
B. Kurva Standar <i>A. hydrophila</i> .....	26
C. Kurva Pertumbuhan <i>A. hydrophila</i> .....	27
D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga terhadap Pertumbuhan <i>A. hydrophila</i> .....	29
E. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC).....	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
A. Kesimpulan.....	41
B. Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	47
RIWAYAT HIDUP PENULIS.....	55

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 1. Berat dan Warna Ekstrak yang Dihasilkan dari Ekstraksi Bertingkat Biji Kapulaga dengan Pelarut N-Heksana, Etil Asetat dan Metanol.....	25
Tabel 2. Nilai OD dan Jumlah Bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam Hitung Cawan.....	26
Tabel 3. Diameter Zona Hambat Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga terhadap Bakteri <i>A. hydrophila</i> pada Inkubasi Selama 24 Jam.....	31
Tabel 4. Nilai Absorbansi pada Uji MIC Ekstrak Etil Asetat Biji Kapulaga terhadap Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	37
Tabel 5. Nilai Absorbansi pada kontrol positif.....	37

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 1.	Biji Kapulaga ( <i>Amomum Compactum</i> L).....	7
Gambar 2.	Sel dan Koloni <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	9
Gambar 3.	<i>Haemorrhagic Septicemia</i> Akibat <i>A. hydrophila</i> .....	10
Gambar 4.	Alur Kerangka Pemikiran.....	16
Gambar 5	Kurva Standar <i>A. hydrophila</i> .....	27
Gambar 6.	Kurva Pertumbuhan <i>A. hydrophila</i> .....	28
Gambar 7.	Konsentrasi Sel Bakteri dalam Waktu 24 Jam.....	28
Gambar 8.	Zona Penghambatan Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga Konsentrasi 100% terhadap <i>A. hydrophila</i> .....	30
Gambar 9.	Zona Penghambatan Antibakteri Pelarut terhadap <i>A.</i> <i>hydrophila</i> .....	30
Gambar 10.	Kekeruhan Media pada Uji MIC Ekstrak Biji Kapulaga dengan Pelarut Etil Asetat terhadap Pertumbuhan <i>A.</i> <i>hydrophila</i> .....	38
Gambar 11.	Media dan Ekstrak Biji Kapulaga Dengan Pelarut Etil Asetat tanpa Bakteri <i>A. Hydrophila</i> .....	38



## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Hasil Pengukuran Nilai OD Bakteri <i>A. hydrophila</i> Setiap 2 Jam Sekali.....	47
Lampiran 2.	Pertumbuhan Bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam 24 Jam.....	48
Lampiran 3.	Diameter Zona Bening Ekstrak Biji Kapulaga terhadap <i>A. hydrophila</i> .....	48
Lampiran 4.	ANOVA Zona Hambat Ekstrak Biji Kapulaga terhadap <i>A. hydrophila</i> .....	49
Lampiran 5.	ANOVA MIC Ekstrak Biji Kapulaga terhadap Pertumbuhan <i>A. hydrophila</i> .....	51
Lampiran 6	Biji Kapulaga yang Dihaluskan.....	53
Lampiran 7	Maserasi Biji Kapulaga, Biji Kapulaga yang Dievaporasi dan Maserat Biji Kapulaga.....	53
Lampiran 8	Pembuatan Media.....	54
Lampiran 9	Pengenceran Media dan Pengenceran NaCl 0,85%.....	54
Lampiran 10	Jumlah Bakteri pada Pengenceran $10^{-4}$ dan $10^{-5}$ .....	54
Lampiran 11	Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Buah Kapulaga untuk Uji MIC.....	55

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. LATAR BELAKANG MASALAH

Potensi budidaya ikan air tawar cukup besar yaitu sekitar 10 ton/tahun. Pada tahun 2006, ekspor perikanan budidaya di Indonesia mencapai 1.329 juta ton. Nilainya mencapai US \$21 miliar atau sekitar Rp 18,9 triliun (Pasaribu, 2006). Budidaya ikan air tawar dihadapkan pada beberapa kendala. Salah satu kendala penyebab kegagalan budidaya ikan air tawar adalah penyakit. Penyakit yang menyerang ikan tropis air tawar umumnya disebabkan oleh bakteri. Beberapa bakteri yang menginfeksi ikan adalah *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella tarda*, dan *Yersinia ruckeri* (Mariyono dan Sudana, 2002).

Pada tahun 1980, wabah penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* menyebabkan kematian 82.288 ikan di Jawa Barat. Pada tahun 2005, sebanyak 47 ton ikan gurame dan 2,1 juta ekor benih gurame yang siap dipasarkan mati disebabkan oleh penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* di Lubuk Pandan, Sumatera Barat (Zainal, 2009).

*Motile Aeromonas septicemia* (MAS) atau “penyakit merah”, merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila*. MAS merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan semua jenis ikan air tawar baik yang dibudidayakan seperti: ikan mas, lele, patin, nila, dan gurame maupun ikan yang ada di perairan umum. Tingkat kematian akibat penyakit tersebut dapat mencapai 80% dalam periode yang relatif singkat dengan

*commit to user*

kerugian ekonomi yang signifikan. Gejala klinis akibat infeksi bakteri tersebut antara lain: warna tubuh pucat, *haemorrhagic septicemia* atau pendarahan yang meluas di seluruh permukaan tubuh, luka/borok (*ulcer*), perut busung (*dropsy*), sisik terkuak, dan luka pada sirip disertai kematian. Komisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Nasional pada tahun 2006 telah menetapkan jenis penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* sebagai salah satu penyakit ikan utama di Indonesia (Choudhury *et al.*, 2006).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* ternyata selain menyerang pada ikan juga dapat menyerang pada manusia. Pada tahun 2012, seorang warga negara Kanada terpaksa dipotong kakinya untuk mengatasi penyerangan laju dari bakteri *A. hydrophila*. Keganasan bakteri tersebut telah membunuh sejumlah jaringan tubuhnya. Penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* menyerang manusia menyebar di Kanada, Belanda dan hampir seluruh Benua Eropa. Menurut Dr. William Schaffner, Kepala Departemen Pencegahan Penyakit di Vanderbilt University Medical Center, mengatakan, jumlahnya yang terdata sekitar 250 kasus di seluruh Amerika Serikat. Kasus yang terjadi masih langka (Noorastuti, 2012).

Metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Penggunaan terapi kimiawi dan antibiotik untuk penanganan penyakit ikan pada akuakultur telah mendapatkan kritikan tajam (FAO, 2005). Penanganan yang dilakukan di tingkat petani bergantung pada antibiotik seperti oksitetrasiklin dan hijau malachite (Jangkaru, 2007). Penggunaan antibiotik secara berlebihan dan jenis antibiotik

yang tidak tepat mengakibatkan adanya galur resisten dari bakteri *A. hydrophila* dalam budidaya ikan. Muncul masalah lain terkait dengan antibiotik yaitu masalah lingkungan seperti pencemaran air, bau antibiotik yang mencemari perairan (Mohammad dan Abasali, 2010).

Resistensi bakteri terhadap obat-obatan merupakan salah satu proses alamiah yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru (Skou dan Jensen, 2007). Pada penelitian Kaskhedikar dan Chhabra (2010), cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi berbagai antibiotik dapat menimbulkan masalah resistensi yaitu munculnya bakteri yang multiresisten terhadap antibiotik seperti pada isolat *A. hydrophila* yang resisten terhadap antibiotik ampicilin dan kolistin (Tjay dan Rahardja, 2002). Meskipun demikian penggunaan antibiotik tidak bisa 100% ditinggalkan sehingga bahan alam bisa digunakan sebagai pengobatan alternatif.

Indonesia merupakan negara kaya dengan tumbuhan yang berkhasiat untuk obat. Penggunaan tumbuhan sebagai obat telah dikenal sejak zaman nenek moyang dan telah diwariskan secara turun-temurun. Hal ini dapat dilihat dengan banyaknya tumbuhan yang berkhasiat di Indonesia berjumlah kurang-lebih 1 juta spesies tumbuhan (Oswald, 1995).

Banyak jenis bahan alam mengandung senyawa yang bersifat antibakteri. Sejumlah bahan alam mengandung senyawa bersifat bakterisidal (pembunuh bakteri), dan bakteristatik (penghambat pertumbuhan bakteri). Bahan alam untuk obat banyak diperoleh di pekarangan rumah dan mudah dikerjakan oleh siapa saja dalam keadaan yang mendesak sekalipun. Kemajuan ilmu pengetahuan dan

teknologi modern ternyata tidak mengesampingkan begitu saja peranan bahan alam tetapi justru saling melengkapi. Hal ini terbukti dari banyaknya peminat bahan alam (Solikhah, 2009). Beberapa tumbuhan obat tradisional yang telah diketahui dapat dimanfaatkan dalam pengendalian berbagai agen penyebab penyakit ikan adalah sirih (*Piper betle* L.), daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), sambiloto (*Andrographis paniculata*) (Grandiosa, 2010).

Permintaan buah kapulaga untuk obat di Indonesia tahun 1978 sebanyak 97 ton, dan 1979 sebanyak 142 ton. Pada tahun 2006, ketika panen raya pada bulan Juni-Agustus, permintaan melonjak menjadi 3 ton per hari (Yajri, 2009). Mengatasi tingginya permintaan untuk obat manusia dapat digunakan pula bagian lain dari tumbuhan buah kapulaga yang memiliki kandungan senyawa yang sama seperti daun, rimpang maupun akar kapulaga. Sediaan dalam bentuk ekstrak maupun minyak atsiri memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen. Berdasarkan penelitian Maipiliandari *et al.* (2008), ekstrak kapulaga memiliki kemampuan menghambat aktivitas bakteri gram negatif yaitu *E. coli* dengan menghasilkan zona hambat sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/ml. Permintaan buah kapulaga ini sangatlah laku keras di pasaran Indonesia.

Pemakaian ekstrak biji kapulaga sebagai antibakteri pada ikan belum banyak digunakan dan besarnya aktivitas antibakteri dari bahan-bahan tersebut belum banyak diketahui. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang antibakteri ekstrak kapulaga terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*.

## B. PERUMUSAN MASALAH

1. Seberapa besar aktivitas antibakteri dari ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*?
2. Berapa konsentrasi minimum ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*?

## C. TUJUAN

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui besarnya aktivitas antibakteri dari ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*.
2. Mengetahui konsentrasi minimum ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

## D. MANFAAT

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk mengetahui bahwa biji kapulaga (*Amomum compactum*) merupakan antibakteri alternatif kepada masyarakat luas yang terkait dengan perikanan. Penelitian ini diharapkan memperoleh cara alternatif dalam pengendalian penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* yang lebih murah dan mudah. Penelitian ini juga memberikan informasi mengenai penggunaan ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) untuk menghambat bakteri *A. hydrophila*.



## BAB II

### LANDASAN TEORI

#### A. TINJAUAN PUSTAKA

##### 1. Kapulaga (*Amomum compactum*)

###### a) Deskripsi

*A. compactum* adalah tumbuhan asli dan endemik di wilayah perbukitan di Jawa bagian barat. Kapulaga tergolong dalam familia *Zingiberaceae* (jahe-jahenan) dan biasanya berbau aromatis. Kapulaga memiliki batang semu berwarna hijau gelap, memiliki rimpang dan daun yang terletak berseling dengan ujung runcing. Tumbuhan ini biasanya tumbuh mencapai tinggi 2 m. Bagian yang biasa digunakan adalah bagian bijinya (Tjitrosoepomo, 1994).

Buah berbentuk kapsul bulat, berdiameter 1-1,5 cm, bergaris-garis rapat. Buah kapulaga berwarna abu-abu sampai coklat. Buahnya berkumpul dalam tandan kecil dan pendek. Bila masak, buahnya akan pecah dan membelah berdasarkan ruang-ruangnya. Buah kapulaga muncul dari batang semu dekat tanah, dan merayap bersama tandannya yang sepanjang 1 m, ke tanah sekitarnya. Bagian dalam pada buah terdapat biji yang berbentuk bulat telur memanjang. Kapulaga berbuah pada umur 3 tahun. Permukaan biji licin dengan kulit tipis dan beralur agak dalam (Tjitrosoepomo, 1994). Biji agak besar, berukuran 4 mm dan berbentuk pipih berwarna coklat, pada ujungnya terdapat *arrillus* atau selaput biji yang merupakan lapisan tipis berwarna putih dan mempunyai rasa agak manis (Gambar 1) (Hariana, 2008).

*commit to user*



Gambar 1. Biji kapulaga tersusun atas kulit biji (a) dan biji (b)

Tumbuhan ini terutama menyukai wilayah dengan kelembaban yang tinggi, curah hujan yaitu 2.500-4.000 mm pertahun, suhu tahunan yang kurang lebih hangat dan stabil 23-28°C, dan banyak hujan sekurangnya 136 hari dalam setahun. Kapulaga juga menyukai tempat yang setengah ternaungi, pada tanah-tanah dengan pH 5-6,8, dan memiliki kandungan bahan organik yang cukup tinggi (Fauziah, 2008).

#### **b) Kandungan**

Biji dan buah kapulaga yang dikeringkan mengandung 2-4% minyak esensial, yang terutama terdiri dari *1,8-cineol* (hingga 70%), *β-pinen* (16%), *α-pinen* (4%), *α-terpineol* (5%) dan *humulen* (3%) yang merupakan senyawa terpenoid, alkaloid dan fenolik. Rimpang dan akar segar mengandung minyak esensial sekitar 0,1%, yang berisi *1,8-cineol* dan alkaloid yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri dan antijamur. Daun kapulaga juga mengandung flavanoid, alkaloid dan fenolik. Pada kulit batang semu terdapat flavonoid, saponin dan polifenol (Maipiliandari *et al.*, 2008).

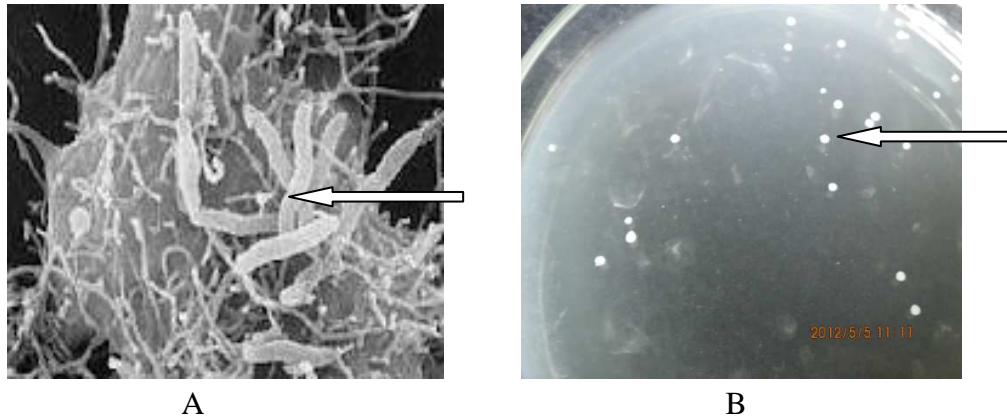
## 2. *Aeromonas hydrophila*

### a) Deskripsi

*A. hydrophila* diisolasi dari manusia dan hewan pada tahun 1950. Bakteri ini adalah yang paling terkenal dari enam spesies *Aeromonas*. *A. hydrophila* juga sangat tahan terhadap berbagai antibiotik tertentu, klorin, dan suhu dingin (Aberoum, 2010). *A. hydrophila* merupakan bakteri gram negatif, aerob fakultatif (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen) yang mengubah karbohidrat menjadi asam dan gas. Bakteri *A. hydrophila* termasuk ke dalam famili *Aeromonadaceae* (Garde *et al.*, 2010). Bakteri ini biasanya terdapat di lingkungan perairan dan saluran gastrointestinal ikan yang sehat. Bakteri ini juga terdapat pada makanan seperti ikan, susu, dan daging merah (Rey *et al.*, 2009). Bakteri ini memiliki inang dengan spektrum yang luas yaitu hewan berdarah dingin dan hewan berdarah panas (Alavandi *et al.*, 1998).

Ciri utama bakteri *A. hydrophila* adalah berbentuk batang, berdiameter 0,3-1,0  $\mu\text{m}$  (Gambar 2A), hidup pada suhu optimal 22°- 28°C (Colle *et al.*, 1996). Koloni bakteri *A. hydrophila* pada media agar berwarna putih kekuningan, bentuk bulat cembung dan reaksi katalase positif (Gambar 2B). Bakteri ini senang hidup di lingkungan perairan bersuhu 15-30° C dan pH antara 5,5-9 (Gufran dan Kordi, 2004).

*A. hydrophila* terdapat di perairan tawar atau laut. *A. hydrophila* tahan terhadap penisilin, sefalosporin, dan eritromisin. Siproflosakin secara konsisten aktif terhadap strain *A. hydrophila* di Amerika Serikat dan Eropa (Rahman, 2008).



Gambar 2. Sel *A. hydrophila* jika dilihat dengan menggunakan SEM (A) (Daskalov, 2005) dan koloni bakteri *A. hydrophila* dalam media Agar TSA (B). Anak panah menunjukkan sel (A) dan koloni (B) *A. hydrophila*.

Pada media air laut steril yang miskin nutrisi, populasi *A. hydrophila* menurun sekitar 0,1 *colony forming unit* (cfu)/ml setelah 3-5 minggu (Mallej *et al.*, 2004). *A. hydrophila* juga dapat diisolasi dari produk makanan dingin, produk susu, produk ternak ruminansia dan produk unggas (Mac Rae *et al.*, 1991).

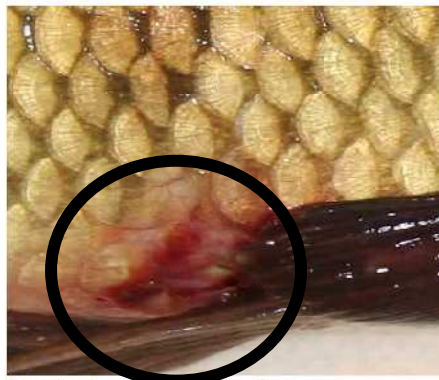
#### b) Penyakit yang disebabkan *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan infeksi pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*), infeksi pada ikan lele (*Clarias sp.*) dan infeksi pada insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Mohammad *et al.*, 2010). *A. hydrophila* telah ditemukan pada berbagai jenis ikan air tawar dan ikan laut dan merupakan organisme oportunistik karena penyakit yang disebabkan mewabah pada ikan-ikan yang mengalami stres atau pada pemeliharaan dengan padat tebar tinggi. Serangan bakteri ini bersifat laten (berkepanjangan), sehingga tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Serangan bakteri ini baru terlihat apabila ketahanan tubuh ikan menurun akibat stres yang disebabkan menurunnya kualitas air, kekurangan pakan atau penanganan ikan yang kurang

baik. Banyak pandangan yang berbeda tentang peran yang tepat dari *A. hydrophila* sebagai patogen pada ikan.

Beberapa peneliti menetapkan bahwa organisme ini hanya sebagai penyerang sekunder pada inang yang lemah, sedang peneliti lain menyatakan bahwa *A. hydrophila* adalah suatu patogen utama ikan air tawar. Kondisi ini dicirikan oleh adanya pengikisan sisik dan *haemorrhagic septicemia*. *Haemorrhagic septicemia* menutupi sampai 75% dari seluruh permukaan tubuh ikan. Hal itu akan menyebabkan tingkat kematian yang tinggi (Brooks *et al.*, 2005).

Tanda-tanda klinis dari infeksi *A. hydrophila* bervariasi. Pada umumnya ditunjukkan dengan adanya *haemorrhagic septicemia* pada kulit ditandai oleh kemunculan luka kecil pada permukaan yang memacu pengeringan lendir pada sisik (Gambar 3), insang, rongga mulut dan borok pada kulit yang meluas ke jaringan otot. Ikan yang terserang *A. hydrophila* juga memperlihatkan gejala-gejala berupa warna tubuh ikan menjadi gelap, kemampuan berenang menurun, mata ikan rusak dan sedikit menonjol, insang berwarna merah dan sisik terkuak (Sanoesi, 2008).



Gambar 3. *Haemorrhagic septicemia* akibat *A. hydrophila* pada ikan *Cyprinus carpio* (tanda lingkaran) (Sanoesi, 2008).



### c) Patogenitas dan virulensi

Patogenitas merupakan kemampuan mikroorganisme untuk menyebabkan penyakit pada inang, sedangkan virulensi adalah derajat patogenesis dari suatu mikroba. Tingkat virulensi suatu mikroba dapat meningkat karena adanya beberapa faktor meliputi produksi toksin, kemampuan mikroba melawan sistem antibodi dari sel inang, kondisi lingkungan dan variasi genetik (Longworth, 2000).

Patogenitas *A. hydrophila* disebabkan oleh serangkaian faktor, termasuk lipopolisakarida (LPS), protein membran luar, pili dan flagella, sistem sekresi tipe III bertindak sebagai struktur adhesi, dan faktor ekstraseluler seperti enzim dan toksin.

Faktor virulensi dari *A. hydrophila* digolongkan 2 kelompok. Pertama, komponen permukaan sel berupa pili, S-layer dan lipopolisakarida. Kedua, faktor ekstraseluler, berupa enterotoksin, hemolisin, lipase dan protease (Swift *et al.*, 1997). Metode tradisional untuk mendeteksi sifat virulensi pada *A. hydrophila* dengan menggunakan tes *in vivo* dan *in vitro* dengan menggunakan model hewan yaitu ikan air tawar seperti ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), dan gurami (*Osphronemus gouramy*) (Octaviani *et al.*, 2011).

### d) Penggunaan Antibakteri untuk Menanggulangi Penyakit pada Ikan

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba. Antibakteri biasanya digunakan untuk menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Mikroba



patogen dapat berbahaya karena kemampuan menginfeksi dan menimbulkan penyakit (Jawetz. *et al.*, 2005)

Berdasarkan daya kerjanya, antibakteri dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antibakteri bakteristatik dan antibakteri bakterisidik. Kelompok pertama menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri, kelompok kedua bekerja mematikan bakteri tersebut. Daya kerja ini nampaknya berkaitan dengan mekanisme kerja antibakteri tersebut. Mekanisme kerja antibiotik dapat dibedakan menjadi lima kelompok yaitu dengan mengganggu metabolisme, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu keutuhan membran, menghambat sintesis protein dan menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri (Setiabudy dan Vincent, 2002).

Metode yang paling banyak digunakan dalam menanggulangi masalah penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Cara ini memiliki dampak negatif karena dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Resistensi mikroba merupakan masalah individual epidemiologi yang menggambarkan ketahanan mikroba terhadap antibiotik tertentu yang berupa resistensi ilmiah. Resistensi ini karena adanya faktor R pada sitoplasma (resistensi ekstrakromosomal) atau resistensi karena pemindahan gen yang resistensi atau faktor R atau R-plasmid. Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman atau penyuntikan sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan. Antibiotik yang sering digunakan untuk pengobatan ikan adalah ampisilin, karbenesilin, kloramfenikol, kanamisin, streptomisin, tetrasiklin dan ritamisin (Kaskhedikar dan Chhabra, 2010).

Berdasarkan penelitian Mariyono dan Sundana (2002), hasil zona hambat yang ditimbulkan oleh antibiotik kloramfenikol terhadap *A. hydrophila* dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan baik. Pemberian kloramfenikol sebesar 5 ppm telah dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Namun, demikian, pemakaian kloramfenikol harus hati-hati, karena antibiotik yang ampuh mempunyai efek samping pada organ tubuh seperti ginjal dan insang. Selain itu, penyalahgunaan atau penggunaan dosis yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi terhadap antibiotik tersebut.

Berkaitan dengan permasalahan tersebut, perlu ada bahan obat alternatif yang lebih aman yang dapat digunakan dalam pengendalian penyakit ikan. Salah satu alternatifnya adalah dengan menggunakan tumbuhan obat tradisional yang bersifat antiparasit, antijamur, antibakteri, dan antiviral. Beberapa keuntungan menggunakan tumbuhan obat tradisional antara lain relatif lebih aman, mudah diperoleh, murah, tidak menimbulkan resistensi, dan relatif tidak berbahaya terhadap lingkungan sekitarnya (Grandiosa, 2010).

### 3. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran (dilusi). *Disc diffusion test* atau uji difusi cakram dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu  $10^5$ - $10^8$  cfu/ml (Hermawan *et al.*, 2007).

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksi dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang.

Metode lempeng silinder yaitu difusi antibiotik dari silinder yang tegak lurus pada lapisan agar padat dalam cawan petri atau lempeng yang berisi biakan mikroba uji pada jumlah tertentu sehingga mikroba dapat dihambat pertumbuhannya.

Metode difusi cakram prinsip kerjanya adalah bahan uji dijenuhkan ke dalam cakram kertas. Cakram kertas yang mengandung bahan tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan 35°C selama 18-24 jam. Zona jernih di sekitar cakram kertas diamati untuk menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan mikroba. Selama inkubasi, bahan uji berdifusi dari cakram kertas ke dalam agar-agar itu, sebiji zona inhibisi dengan demikian akan terbentuk. Diameter zona sebanding dengan jumlah bahan uji yang ditambahkan ke cakram kertas. Metode ini secara rutin digunakan untuk menguji sensitivitas antibiotik untuk bakteri patogen.

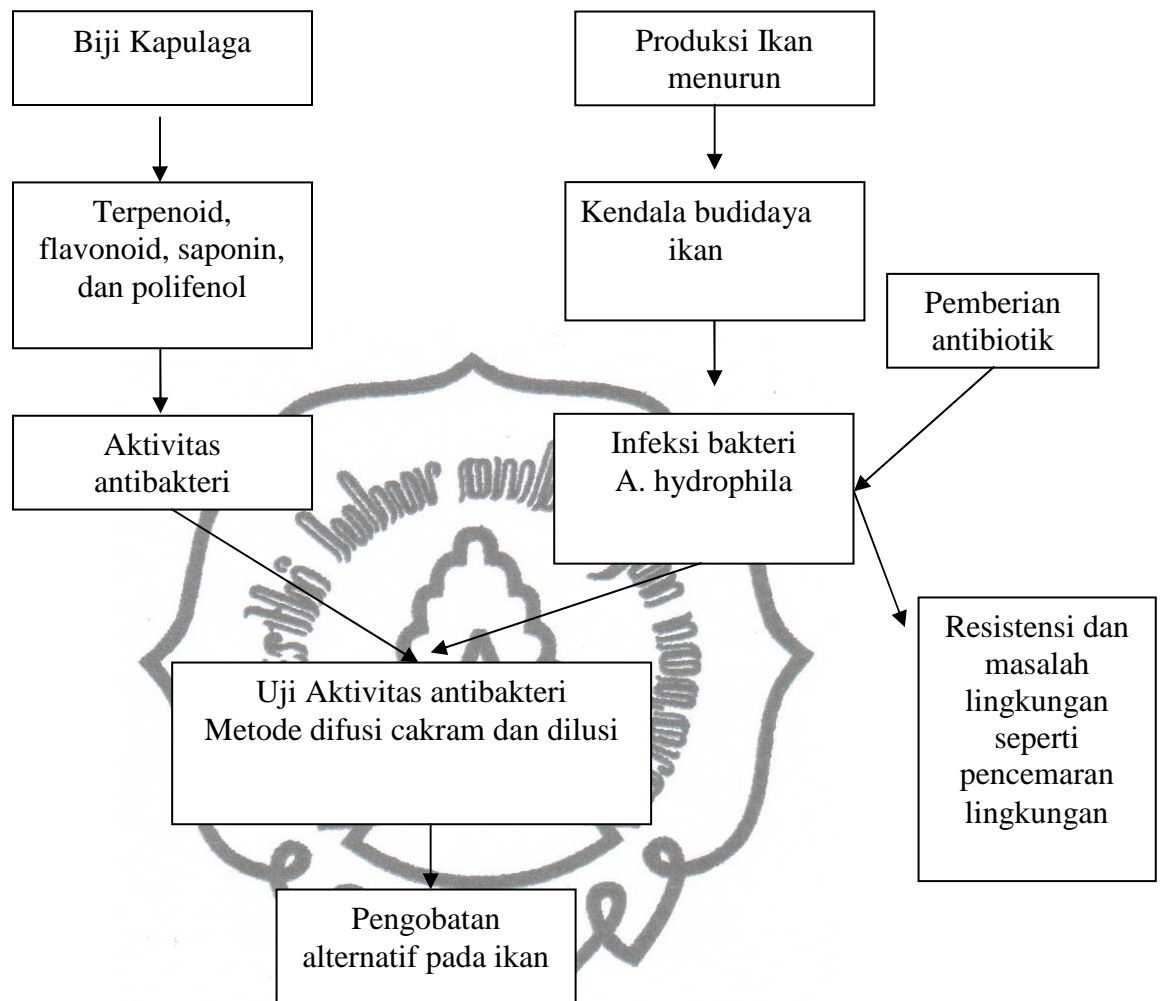
#### 4. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Pengujian MIC dilakukan dengan metode dilusi (pengenceran). Prinsip metode pengenceran adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Dalam uji ini diperlukan suspensi mikroba uji yang dimasukkan dalam medium. Mikroba uji dimasukkan dalam medium yang berisi berbagai konsentrasi bahan antimikroba. Setelah biakan diinkubasi, pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan.

Penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditandai dengan media yang jernih ditetapkan sebagai MIC (Pratiwi, 2008). Uji MIC adalah uji aktivitas antibiotik dengan cara mengetahui konsentrasi terendah dari bahan antibakteri yang masih mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji (Skou dan Jensen, 2007).

#### **B. Kerangka Penelitian**

Industri perikanan mengalami penurunan produksi. Hal ini disebabkan oleh serangan infeksi bakteri, salah satunya adalah *A. hydrophila*. Selama ini penanganan *A. hydrophila* dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi terhadap bakteri tersebut dan toksik bagi lingkungan. Cara alternatif untuk mengatasi masalah ini adalah dengan pemberian ekstrak kapulaga. Ekstrak ini diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Kerangka Pemikiran secara skematis tersaji dalam Gambar 4.



Gambar 4. Alur Kerangka Pemikiran

### C. HIPOTESIS

Ekstrak n-heksana, etil asetat atau metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) mampu menghambat *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Minimum inhibitory concentration* (MIC) akan dapat ditentukan diantara konsentrasi–konsentrasi ekstrak biji kapulaga yang diuji.

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai Maret 2012 bertempat di Laboratorium Biologi FMIPA dan Sub Laboratorium Biologi UPT Laboratorium MIPA Pusat UNS.

#### B. Bahan dan Alat

##### 1. Bahan

Biakan murni *Aeromonas hydrophila* dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang telah diidentifikasi di Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (BBPTO-OT) Tawangmangu Karanganyar, *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan *Trypticase Soy Agar* (TSA), pelarut; aquades, *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC), metanol, etil asetat dan n-heksana, cakram kertas, kloramfenikol.

##### 2. Alat

Alat yang digunakan untuk membiakan bakteri: erlenmeyer 50 ml, tabung reaksi, *shaker*, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, cawan petri, bunsen burner, jarum ose, mikropipet 100  $\mu$ L-1000  $\mu$ L dan mikropipet 20  $\mu$ L-200  $\mu$ L. Alat yang digunakan untuk ekstraksi: blender, toples maserasi, oven, corong pisah, erlenmeyer, dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk uji penghambatan dengan pengukuran zona bening: jangka sorong, cawan petri, mikropipet 100  $\mu$ L-



1000  $\mu$ L dan mikropipet 20  $\mu$ L-200  $\mu$ L. Alat yang diperlukan untuk penentuan MIC: Seperangkat alat spektrofotometer, dan tabung reaksi.

### C. Cara kerja

#### 1) Pembuatan Serbuk Biji Kapulaga

Biji kapulaga dicuci bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Biji kapulaga yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup (Lampiran 6). Serbuk akan digunakan untuk pembuatan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol.

#### 2) Pembuatan Ekstrak Kapulaga

Menurut Harmani *et al.*, (2001), ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol yang masing-masing bersifat non polar, semi polar, dan polar (Lampiran 7a). Serbuk kapulaga 550 g dilarutkan dalam n-heksana sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  liter), dikocok dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut etil asetat sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  liter), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut metanol sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  liter), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Masing-masing filtrat dipekatkan dengan cara dievaporasi dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental (Lampiran 7b dan 7c). Ekstrak agak kental diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan diperoleh ekstrak yang lebih kental. Konsentrasi

ekstrak dibuat dengan menambahkan CMC 0,1% sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

### 3) Penyiapan Media untuk Pertumbuhan Bakteri.

Komposisi TSB: *peptonase from casein* 17,0 gr, *peptone from soymeal* 3,0 g, *D(+)* glukosa 2,5 g, *sodium choride* 5,0 g, *dipotassium hydrogen phospat* 2,5 g, aquades 1000 ml pH akhir 7,3. TSA: TSB ditambahkan *agar bacteriological*. Media TSB dan TSA yang akan digunakan untuk menumbuhkan bakteri beserta peralatan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Lampiran 8).

### 4) Pembuatan Kurva Standar *A. hydrophila*

Hubungan antara nilai absorbansi dan jumlah bakteri per ml didapatkan melalui pembuatan kurva standar dengan menentukan plot antara nilai absorbansi dan nilai hitung cawan. Sebanyak 1 ose biakan bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan dalam 10 ml media TSB digoyangkan di atas *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam sampai media menjadi keruh. Kemudian 5 ml biakan bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 5 ml media TSB, dilakukan pengenceran berseri sebanyak 5 tabung yang berisi media TSB sehingga diperoleh perbandingan 1: 1/2: 1/4: 1/8: 1/16 (Lampiran 9a). Masing-masing tabung reaksi yang berisi media dan biakan bakteri diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Setelah diketahui nilai OD, 1 ml biakan bakteri ditumbuhkan ke dalam 9 ml garam fisiologis 0,85% dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan *vortek* (pengenceran  $10^{-1}$ ). Biakan bakteri diambil 1 ml dari pengenceran  $10^{-1}$  dan

dimasukkan ke dalam garam fisiologis 9 ml dalam tabung reaksi lain (pengenceran  $10^{-2}$ ). Seri pengenceran dibuat sampai pengenceran  $10^{-5}$  (Lampiran 9b). Masing-masing biakan dalam tabung reaksi diambil 100  $\mu$ l biakan bakteri diteteskan pada media TSA dalam cawan petri dan diratakan dengan batang kaca penyebar selama 48 jam kemudian diinkubasi dengan suhu  $29^{\circ}\text{C}$ . Setiap pengenceran diambil 2 kali untuk ditumbuhkan pada cawan petri yang berbeda (2 ulangan). Metode yang digunakan adalah *spread plate*. Jumlah bakteri dihitung jika jumlah koloni yang tumbuh antara 30-300. Jika yang memenuhi syarat 30-300 ada dua tingkat pengenceran maka jika perbandingan lebih dari atau sama dengan 2:1, dipilih pengenceran yang lebih dulu. Jika perbandingan kurang dari 2:1, hasilnya dirata-rata. Jika ada kontaminasi yang menutupi lebih dari separuh petri, koloni dalam cawan tersebut tidak dapat dihitung. Jumlah sel per ml dihitung dengan cara membagi jumlah koloni dengan faktor pengenceran dan volume suspensi yang disebar. Kurva standar dapat diperoleh dengan nilai regresi  $y = bx + a$ , dengan  $y$  = nilai absorbansi,  $x$  = jumlah sel bakteri.

##### 5) Pembuatan Kurva Pertumbuhan *A. hydrophila*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase log bakteri sehingga dapat diketahui waktu yang tepat yaitu fase log untuk melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila*. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara memindahkan satu ose biakan bakteri ke dalam 10 ml media TSB kemudian digoyangkan diatas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu  $29^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, 5 ml biakan bakteri tersebut dipindahkan dalam 95 ml media serupa dan diukur nilai absorbansi setiap

2 jam selama 24 jam pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer sehingga didapatkan nilai *optical density* (OD). Media steril digunakan sebagai blangko. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan plot antara waktu dan log jumlah bakteri per ml (Grandiosa, 2010).

#### 6) Penyiapan Biakan Bakteri

Satu ose bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan di media TSB 10 ml, digoyangkan dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam, kemudian 5 ml suspensi bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 95 ml media TSB, sehingga diperoleh volume 100 ml biakan bakteri. Biakan bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan adalah biakan bakteri pada fase log dengan kepadatan  $10^6$ - $10^8$  cfu/ml ditentukan berdasarkan nilai OD yang didapatkan dari kurva standar.

#### 7) Uji Penghambatan dengan Metode Difusi Cakram

Bulatan cakram kertas berdiameter 5 mm ditetesi dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol masing-masing dengan konsentrasi 100%, pelarut n-heksana, etil asetat, metanol, CMC 0,1%, biakan bakteri sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 3,4% yang digunakan sebagai kontrol positif.

Cakram kertas ditetesi dengan larutan uji, dikeringanginkan kemudian ditetesi kembali dengan ekstrak sampai ekstrak yang terserap sebanyak 5 $\mu$ l. Dengan pinset steril, bulatan cakram kertas yang telah kering tersebut dilekatkan dalam media TSA dalam cawan petri yang sebelumnya telah diinokulasi dengan 0,1 ml suspensi bakteri dengan kerapatan sekitar  $10^8$  sel/ml. Kemudian biakan

disimpan dalam lemari pendingin selama  $\pm 2$  jam agar proses difusi ekstrak kapulaga berjalan dengan baik. Setelah itu, keseluruhan cawan petri diinkubasi pada suhu  $29^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan dengan empat ulangan.

Pengamatan penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong yang merupakan diameter zona penghambatan (Brooks dan Morse, 2005). Ekstrak yang menunjukkan diameter zona penghambatan paling besar terhadap pertumbuhan bakteri kemudian diujikan lebih lanjut.

#### 8) Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Percobaan MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri setelah dikontakkan dengan ekstrak dengan beberapa konsentrasi kemudian diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak ditentukan berdasarkan hasil uji penghambatan metode difusi. Ekstrak biji kapulaga yang paling luas zona penghambatannya dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), dan 0% sebagai kontrol negatif, antibiotik kloramfenikol sebesar 3,4% sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), tanpa bakteri diukur dan digunakan sebagai pembanding. Penentuan MIC dilakukan dengan metode dilusi/pengenceran, media yang digunakan adalah TSB.

Sebanyak 10 ml TSB ditambahkan pada setiap tabung uji. Sejumlah 400  $\mu\text{l}$  ekstrak tiap konsentrasi dan 400  $\mu\text{l}$  kultur bakteri dengan kepadatan  $10^7$ - $10^8$  *cfu/ml* dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda. Ekstrak masing-masing

konsentrasi sebanyak 400 µl ditambahkan dalam media TSB steril untuk digunakan sebagai pembanding. Perlakuan tersebut menggunakan lima ulangan. Pengamatan MIC dilakukan dengan melihat adanya kekeruhan pada media sebagai indikasi adanya pertumbuhan bakteri setelah 24 jam inkubasi pada suhu 29°C dan bila medianya bening diindikasikan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri.

Tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran nilai OD dengan spektrofotometer ( $\lambda$  595 nm) (Lukistyowati 2005). Apabila hasil pengukuran terhadap nilai MIC merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentasi penghambatan:  $1 - (\text{OD Uji}/\text{OD kontrol})$  (Sherlock *et al.*, 2010).

#### **D. Analisis Data**

Analisis data meliputi secara statistik dengan *Analisis of Varians* (ANOVA) dan dilanjutkan uji Duncans Multiple Range Test (DMRT) taraf 5%.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Komponen Bioaktif pada Biji Kapulaga

Pemisahan komponen bioaktif biji kapulaga dengan menggunakan metode ekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Maserasi 550 g berat kering biji kapulaga menghasilkan ekstrak kental sebanyak 2,018% menggunakan pelarut n-heksana, 1,188% menggunakan pelarut etil asetat, dan 2,745% menggunakan pelarut metanol dari massa awal. Ekstrak kental dari masing-masing pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Berat dan warna ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi bertingkat biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol

	Pelarut ( $\pm 2,5$ L)		
	N-heksana	Etil asetat	Metanol
Berat Ekstrak(g)	11, 1 g	10 g	15, 1 g
Warna Ekstrak	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman	Hitam Kecoklatan

Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah n-heksana, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dengan pelarut n-heksana ini dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar alami terutama senyawa-senyawa lilin, minyak nabati dan sebagian minyak atsiri yang terkandung dalam biji kapulaga. Ekstraksi dengan pelarut etil asetat dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa semi polar seperti alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga. Pelarut metanol digunakan untuk menarik senyawa-senyawa polar seperti fenolik, karbohidrat, asam amino dan protein yang terkandung dalam biji kapulaga. Proses maserasi

perlu disertai dengan pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk dan maserat dapat lebih homogen. Pengadukan juga dapat menimbulkan sirkulasi sehingga ekstraksi dapat berlangsung optimal. Pelarut akan mengalir secara berulang-ulang ke dalam serbuk. Perpindahan pelarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah tidak terjadi apabila konsentrasi di dalam dan di luar sel dalam keadaan seimbang. Maserasi dengan n-heksana, etil asetat dan metanol dilakukan dalam waktu 24 jam, dengan asumsi bahwa dengan rentang waktu tersebut senyawa yang diinginkan telah terambil.

Hasil maserasi biji kapulaga untuk pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki nilai rendemen yang tinggi jika dibandingkan dengan biji teratai dan agak rendah jika dibandingkan dengan daging biji kepel. Untuk rendemen maserasi biji teratai dengan pelarut n-heksana sebanyak 0,84%, etil asetat sebanyak 0,95% dan etanol sebanyak 7,34% (Fitrial *et al.*, 2008). Untuk biji kepel (*Stelechocarpus buharol*) rendemen maserasi dengan pelarut metanol sebanyak 18,76% (Sumartini, 2008). Jika dibandingkan dengan hasil maserasi biji belimbing dengan menggunakan pelarut metanol rendemennya hanya sekitar 1,41% (Sukadana, 2009). Rendemen maserasi biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol lebih besar. Hasil rendemen maserasi untuk biji dan biji sangat kecil dibandingkan dengan maserasi bagian-bagian lain pada tumbuhan seperti daun atau akar. Perbedaan rendemen dari hasil maserasi dikarenakan perbedaan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dan

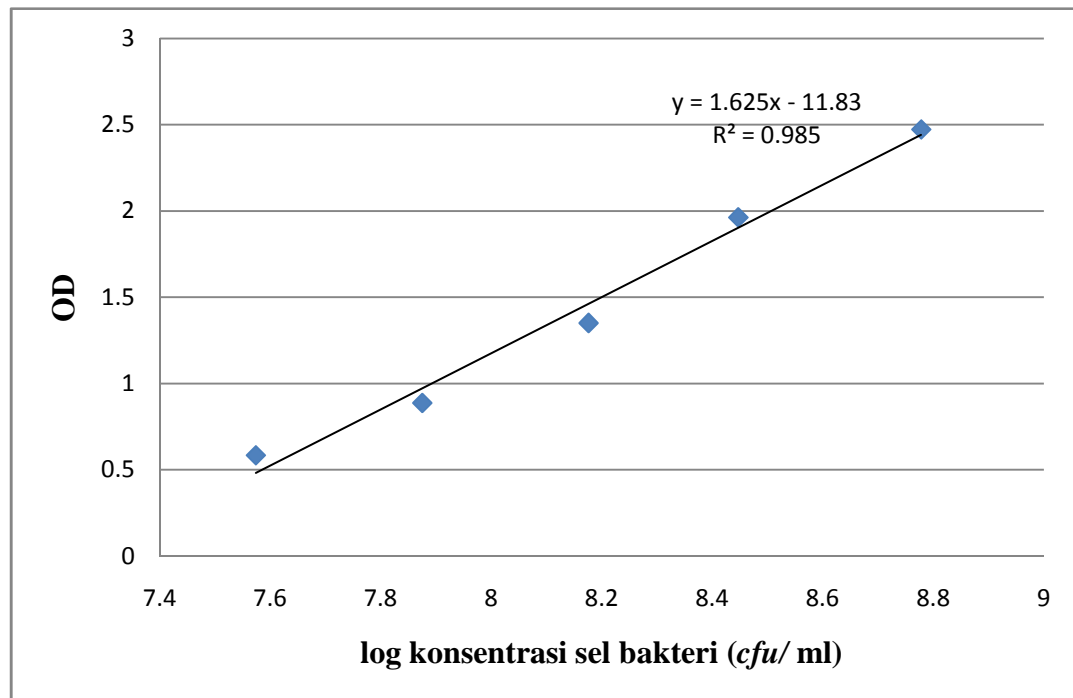
kemampuan pelarut untuk mengambil kandungan senyawa aktif yang berada di dalam suatu simplisia.

### B. Kurva Standar *A. hydrophila*

Penentuan kepadatan *A. hydrophila* yang mampu mencapai aktivitas antibakteri dilakukan dengan membuat kurva standar *A. hydrophila*. Suspensi *A. hydrophila* diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm sehingga diperoleh OD yang kemudian dikorelasikan dengan jumlah bakteri pada hitung cawan Tabel 2. Nilai OD dan jumlah bakteri hasil hitungan cawan (Lampiran 10a dan 10b) dibuat kurva standar *A. hydrophila* sehingga diperoleh persamaan  $y = 1,625x - 11,83$  dapat dilihat pada Gambar 5.

Tabel 2. Nilai OD dan jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam hitung cawan

Pengenceran Tabung ke-	OD	Jumlah bakteri	Log jumlah bakteri
1	2,4724	$6 \times 10^8$	8,778
2	1,9631	$3 \times 10^8$	8,477
3	1,3510	$1,5 \times 10^8$	8,176
4	0,8876	$7,5 \times 10^7$	7,875
5	0,5846	$3,75 \times 10^7$	7,574

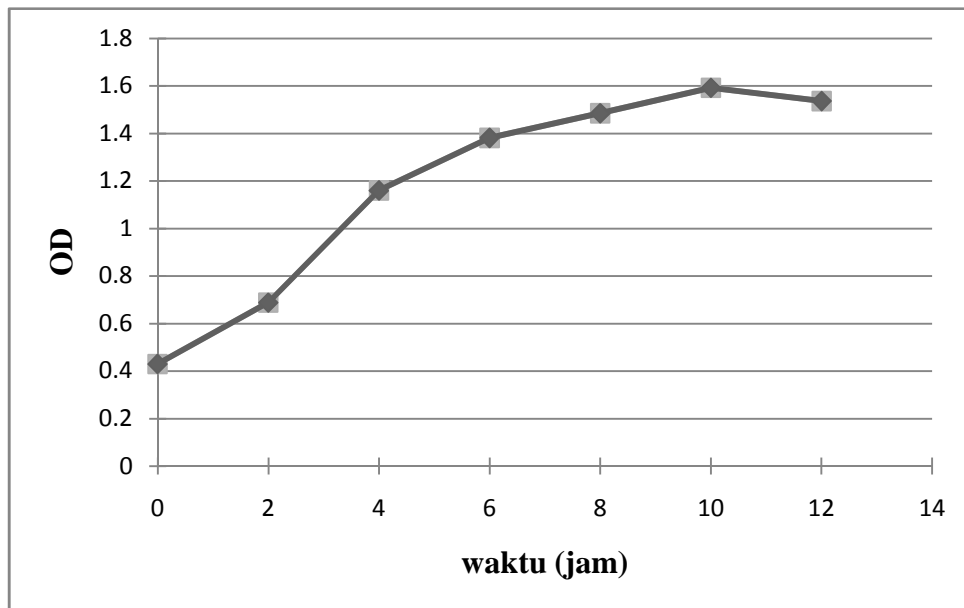


Gambar. 5. Kurva Standar *A. hydrophila*

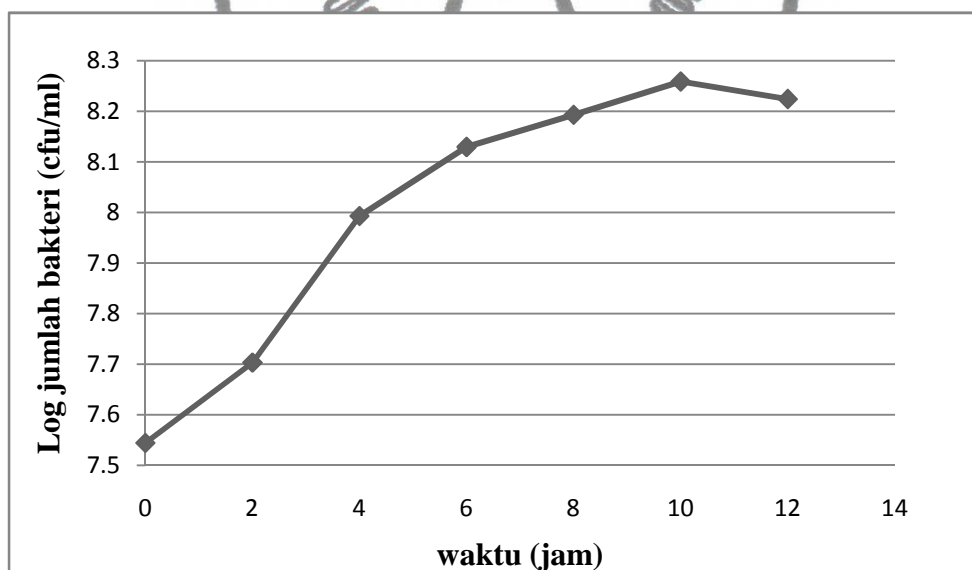
Uji virulensi *A. hydrophila* melalui penyuntikan menunjukkan bahwa bakteri tersebut sangat virulen terhadap ikan nila dan menyebabkan infeksi pada kepadatan  $10^6$  cfu/ml, ikan uji telah mengalami kematian sebesar 50% dalam waktu 96 jam (Mangunwardoyo *et al.*, 2010). Berdasarkan kurva standar tersebut, kepadatan *A. hydrophila* sebesar  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml dicapai pada nilai  $OD \leq 1$ .

### C. Kurva Pertumbuhan *A. hydrophila*

Pengukuran kurva pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui fase log dari pertumbuhan bakteri yang nantinya akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Pengukuran nilai OD *A. hydrophila* dilakukan pada panjang gelombang 595 nm dan dilakukan 2 jam sekali selama 24 jam (Lampiran 1). Dari pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva Pertumbuhan *A. hydrophila* selama 24 jam.



Gambar 7. Konsentrasi sel bakteri dalam waktu 24 jam

Dari kurva pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui bahwa pada jam ke 10 terjadi kestabilan nilai OD karena telah memasuki fase stasioner. Berdasarkan kurva pertumbuhan ditentukan bahwa bakteri yang digunakan untuk inokulum

*commit to user*

berumur 6 jam dengan kepadatan  $1,29 \times 10^8$  cfu/ml (Gambar 6 dan 7) dan (Lampiran 2). Menurut Schlegel dan Schmidh (1994), pada fase lag pertumbuhan bakteri berlangsung lambat karena bakteri harus mulai beradaptasi dengan medium baru.

Pada fase log pertumbuhan bakteri berlangsung cepat karena ketersediaan nutrisi yang cukup. Selanjutnya pada fase stasioner pertumbuhan jumlah bakteri semakin sedikit karena ketersediaan nutrisi yang semakin terbatas. Bakteri akan mengalami fase kematian setelah melewati fase 24 jam. Kondisi tersebut terkait dengan ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang tepat untuk kehidupan bakteri tersebut (Purwoko, 2007).

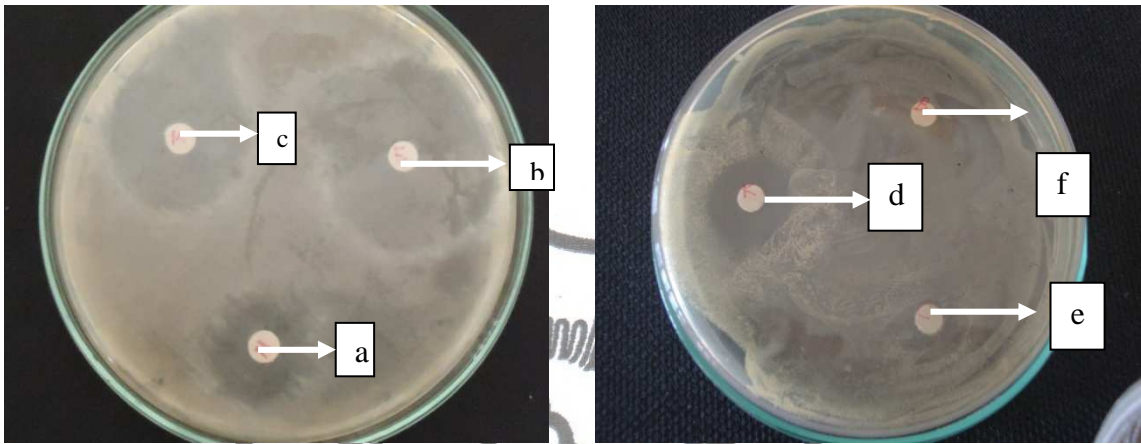
Selama masa pertumbuhan *A. hydrophila* yang ditumbuhkan dalam media akan mengeluarkan metabolit primer maupun sekunder yang dapat menurunkan kualitas nutrisi dalam media. Kondisi tersebut dapat mempengaruhi aktivitas dan patogenitas bakteri (Maturin dan Peller, 1998).

#### **D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga terhadap Pertumbuhan *A. hydrophila***

Ketahanan mikroorganisme terhadap suatu antibakteri dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan antibiotik komersial. Metode ini dikembangkan oleh Kirby-Bauer dikenal dengan *Kirby-Bauer Disk Method*. Prinsip kerja metode ini yaitu kemampuan difusi antibiotik yang diberikan pada suatu cakram kertas untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji pada medium kultur (Atlas *et al.*, 1984). Hasil uji antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona hambat oleh

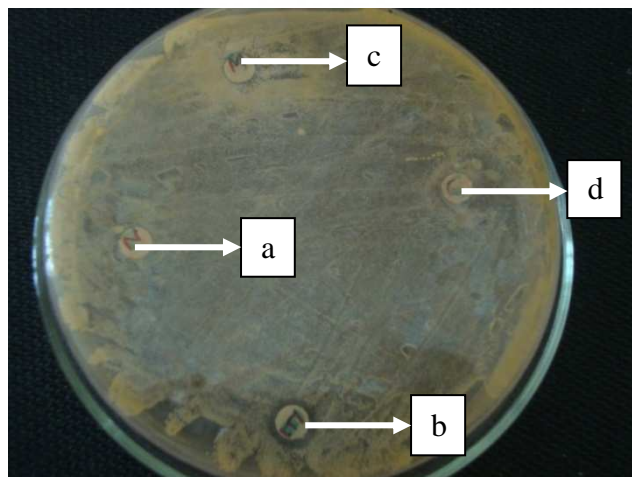


adanya pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol biji kapulaga pada *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 8 dan 9.



Gambar 8. Zona penghambatan antibakteri ekstrak biji kapulaga konsentrasi 100% terhadap bakteri *A. hydrophila*:

- (a) Ekstrak kapulaga dengan pelarut n-heksana
- (b) Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat
- (c) Ekstrak kapulaga dengan pelarut metanol
- (d) Kloramfenikol 3,4%
- (e) Tanpa perlakuan
- (f) CMC 0,1 %



Gambar 9. Zona penghambatan antibakteri pelarut terhadap bakteri *A. hydrophila*:

- (a) Pelarut n-heksana
- (b) Pelarut etil asetat
- (c) Pelarut metanol
- (d) Pelarut CMC 0,1%

Ukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas pada mikroorganisme uji tergantung pada beberapa faktor. Faktor ini antara lain, adalah densitas dan viskositas medium kultur, kemampuan difusi antibiotik, konsentrasi antibiotik pada cakram kertas, sensitivitas mikroorganisme uji terhadap antibiotik dan interaksi antara antibiotik dan medium (Atlas *et al.*, 1984). Selain itu juga ditentukan oleh tipe medium yang digunakan (Larkin, 2000).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji kapulaga yang diujikan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Aktivitas penghambatan ini ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekeliling cakram kertas. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* oleh ekstrak biji kapulaga pada berbagai pelarut dapat dilihat pada Tabel 3 dan Lampiran 3.

Tabel 3. Diameter zona hambat antibakteri ekstrak biji kapulaga 100% terhadap bakteri *A. hydrophila* pada inkubasi selama 24 jam

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)
Pelarut n-heksana	0 <sup>a</sup>
Pelarut etil asetat	0,75 <sup>a</sup>
Pelarut metanol	0 <sup>a</sup>
Pelarut CMC 0,1%	0 <sup>a</sup>
Ekstrak n-heksana	5,25 <sup>b</sup>
Ekstrak etil asetat	7,00 <sup>c</sup> *
Ekstrak Metanol	5,75 <sup>b</sup>
Kloramfenikol <b>3,4%</b>	5,5
Tanpa perlakuan	0

Keterangan: : \* : Diameter zona hambat terbesar

Angka-angka pada kolom yang sama yang didampangi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%

Menurut Davis dan Stout (1971) ketentuan kekuatan daya antibiotik-antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah.

Hasil pengukuran zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak biji kapulaga dengan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki daya hambat yang sedang terhadap bakteri *A. hydrophila* yaitu sekitar 5-6,25 mm setelah dikurangi dengan masing-masing pelarut. Namun, ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut metanol yaitu sebesar 6,25 mm setelah dikurangi pelarut etil asetat. Sedangkan kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sebesar 5,5 mm. Hal ini diketahui dengan adanya zona bening pada biakan bakteri di cawan petri.

Hasil penelitian Mulia *et al.*, (2011) menyatakan bahwa ekstrak biji mengkudu dengan pelarut etil asetat terhadap bakteri *A. hydrophila* memiliki daya hambat sedang sebesar 6,02 mm untuk konsentrasi 17,8 mg/ml. Penelitian Maipiliandri (2008) menyatakan bahwa ekstrak biji kapulaga memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri gram negatif. Biji kapulaga dengan pelarut metanol memiliki daya hambat sedang terhadap bakteri *E. coli* sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/ml.

Ardiansyah (2007) mengatakan bahwa secara umum mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh

beberapa faktor yaitu gangguan pada senyawa penyusun dinding bakteri, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Mekanisme pertama mengganggu pembentukan dinding sel, mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antimikroba dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel, komponen bioaktif dapat mengganggu dan mempengaruhi integritas membran sitoplasma yang dapat mengakibatkan kebocoran materi intraseluler, mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, penghambatan pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat, dan menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel. Mekanisme ketiga menginvasi enzim, mekanisme yang terjadi menunjukkan bahwa kerja enzim akan terganggu dan mempertahankan kelangsungan aktivitas antimikroba, sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energi dalam jumlah besar mempertahankan kelangsungan aktivitasnya. Akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat atau jika kondisis ini berlangsung lama akan mengakibatkan pertumbuhan mikroba terhenti (inaktif). Efek senyawa antimikroba dapat menghambat kerja enzim jika mempunyai spesifitas yang sama antara ikatan kompleks yang menyusun struktur enzim dengan komponen senyawa antimikroba.

Mekanisme keempat menginaktivasi fungsi material genetik, komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA), menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik yang selanjutnya akan mengaktifasi atau merusak materi genetik sehingga terganggunya proses pembelahan untuk pembiakkan.

Perbedaan zona hambat tersebut juga dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri. Perbedaan zona hambat untuk antibiotik kloramfenikol dikarenakan kloramfenikol yang digunakan dalam penelitian ini bukan menggunakan kloramfenikol murni sehingga memiliki zona hambat yang berbeda jika menggunakan kloramfenikol murni, media yang digunakan pada penelitian sebelumnya berbeda dengan penelitian ini sehingga diperoleh hasil yang berbeda. Komposisi media yang berbeda menyebabkan perbedaan aktivitas dari bakteri.

Kloramfenikol sebagai kontrol positif dalam penelitian ini digunakan karena merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan *A. hydrophila*. Kloramfenikol mampu bergabung dengan subunit ribosom sehingga menghambat sintesis protein (Brooks *et al.*, 2002; Noga, 2000).

Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan luas zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut metanol dan n-heksana pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana dan metanol tidak berbeda nyata. Ekstrak etil asetat memberikan



penghambatan tertinggi. Hal ini berarti senyawa yang paling baik untuk penghambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah semi polar seperti alkaloid. Senyawa ini diduga sebagai senyawa antimikroba dikarenakan mempunyai sifat sebagai pengkhelat/pengikatan senyawa berefek spasmolitik. Efek spasmolitik dapat mengerutkan dinding sel *A. hydrophila* sehingga sel bakteri terganggu permeabilitasnya. Selain itu senyawa alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga diperkirakan mempengaruhi hambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Kemampuan senyawa semi polar untuk menghambat pertumbuhan berkaitan dengan komponen dinding sel bakteri yang tidak bersifat absolut hidrofobik maupun absolut hidrofilik. Kanazawa *et al* (1995) menyatakan bahwa suatu senyawa antimikroba dengan bakteri diperlukan keseimbangan hidrofobik-hidrofilik. Diduga senyawa semi polar mempunyai afinitas lebih tinggi untuk berinteraksi dengan dinding sel, sehingga ekstrak semi polar lebih efektif menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* daripada senyawa polar (metanol) dan nonpolar (n-heksana). Sifat hidrofilik diperlukan untuk menjamin senyawa dapat larut dalam fase air yang merupakan tempat hidup mikroba, tetapi senyawa yang bekerja pada membran sel yang hidrofobik memerlukan pula sifat lipofilik, sehingga senyawa antibakteri memerlukan keseimbangan hidrofobik-lipofilik untuk memperoleh aktivitas yang optimum.

Alkaloid dapat mengganggu bakteri dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein. Komponen alkaloid juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap perkembangbiakan spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat



dalam perkembangbiakan. Senyawa alkaloid yang mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Senyawa alkaloid mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel. Ikatan peptidoglikan ini secara mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Jenis bakteri yang digunakan adalah bakteri gram negatif dengan dinding sel terdapat peptidoglikan yang tipis atau sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung fosfolipid, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Setelah menerobos dinding sel, senyawa akan menyebabkan kebocoran isi sel dengan cara merusak ikatan hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan tekanan terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Robinson, 2005).

Kontrol berupa pelarut n-heksana, dan metanol tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Sedangkan pada pelarut etil asetat terdapat zona hambat meskipun tidak terlalu besar. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan mempengaruhi uji aktivitas antibakteri meskipun sedikit. CMC dalam penelitian sebagai pelarut tidak mempengaruhi hasil penelitian. CMC adalah derivat dari selulosa. CMC dapat diuraikan secara biologi oleh berbagai macam bakteri aerob maupun anaerob. Hasil penguraiannya berupa fragmen CMC yang lebih kecil dari gula. Selain itu, struktur molekul CMC terlalu besar untuk dapat menetrasi dinding sel bakteri. Ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat

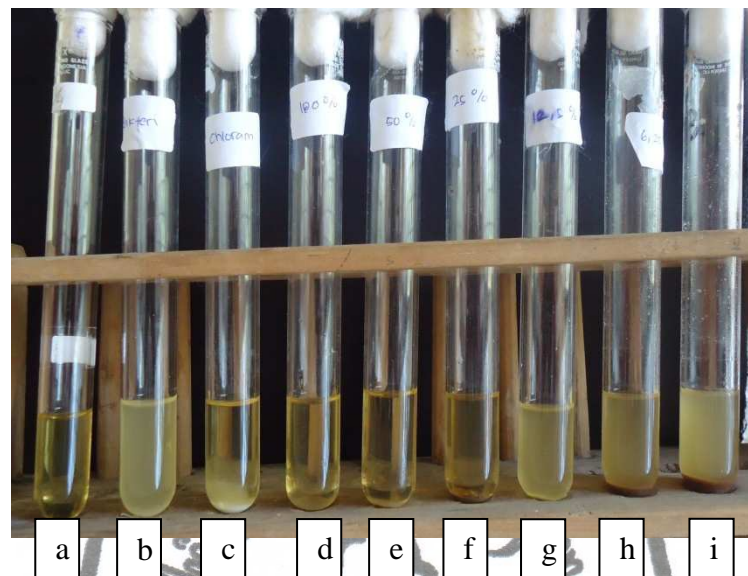
diujikan lebih lanjut untuk mengetahui besarnya nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

#### **E. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)**

Pengujian aktivitas antimikrobia dari ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan menggunakan metode kontak langsung antara bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Metode MIC ini digunakan untuk mendapatkan nilai MIC dari suatu ekstrak antimikroba. Uji MIC menggunakan metode dilusi/ pengenceran.

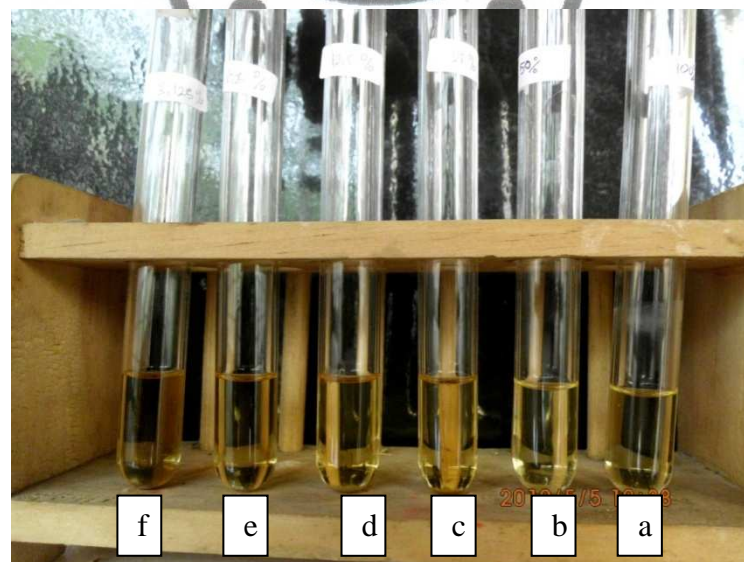
Uji MIC didefinisikan sebagai nilai terendah dari konsentrasi antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah diinkubasi 24 jam. MIC digunakan sebagai petunjuk konsentrasi antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan mikrobia dan juga memberi petunjuk mengenai dosis yang diperlukan dalam pengobatan penyakit (Andrews, 2001). Penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditandai dengan media yang jernih ditetapkan sebagai MIC. Berdasarkan Sherlock *et al* (2010), pengamatan terhadap nilai MIC dengan menggunakan nilai absorbansi merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentasi penghambatan:  $1 - (\text{OD Uji} / \text{OD kontrol})$ .

Nilai MIC dipengaruhi oleh bakteri uji yang digunakan, jumlah inokulum yang digunakan, komposisi dari kultur media, waktu inkubasi, kondisi inkubasi seperti suhu, pH, dan aerasi. Nilai MIC dilihat dari tingkat kekeruhan tabung dapat dilihat pada Gambar 10 dan 11.



Gambar 10. Kekeruhan media pada uji MIC biji kapulaga dengan pelarut etil asetat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*:

- |                        |                   |                   |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| (a) Media              | (d) Ekstrak 5,41% | (g) Ekstrak 0,68% |
| (b) Tanpa perlakuan    | (e) Ekstrak 2,70% | (h) Ekstrak 0,34% |
| (c) Kloramfenikol 3,4% | (f) Ekstrak 1,35% | (i) Ekstrak 0,17% |



Gambar 11. Media dan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat tanpa bakteri:

- |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| (a) Ekstrak 5,41% | (c) Ekstrak 1,35% | (e) Ekstrak 0,34% |
| (b) Ekstrak 2,70% | (d) Ekstrak 0,68% | (f) Ekstrak 0,17% |

Uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dengan melihat tingkat kekeruhan media, untuk ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, dan kloramfenikol dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan gejala bening pada media. Untuk ekstrak konsentrasi 0,68%, 0,34% dan 0,17% menunjukkan gejala kekeruhan (Gambar 11). Tabung reaksi ekstrak tanpa bakteri dan media tidak ada yang menunjukkan gejala kekeruhan yaitu pada ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17%. Semua konsentrasi menunjukkan gejala bening (Gambar 12). Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak dengan tidak terkontaminasi bakteri lain dan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pengamatan ini digunakan sebagai pembandingan dengan pengamatan uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan pengamatan ini konsentrasi ekstrak 1,35% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya untuk memastikan nilai MIC dilakukan spektrofotometri. Nilai absorbansi menunjukkan besarnya cahaya dalam spektrofotometer yang diserap oleh sel dalam kuvet, yang berbanding lurus dengan jumlah sel tersebut. Hasil pengukuran nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 4 dan Lampiran 5.

Tabel 4. Nilai absorbansi pada uji MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga terhadap bakteri *A. hydrophila*

Konsentrasi Ekstrak	Perlakuan (OD)		Selisih (OD)	Persentase penghambatan	Aktivitas
	Bakteri	Tanpa bakteri			
5,41%	0,1417	0,1415	0,0002	99,96% <sup>a</sup>	Menghambat
2,70%	0,1677	0,1638	0,0039	99,78% <sup>a</sup>	Menghambat
1,35%	0,2124	0,1365	0,0759	95,87% <sup>b</sup>	-
0,68%	0,3333	0,1300	0,2033	88,96% <sup>c</sup>	-
0,34%	0,8386	0,1245	0,7141	61,26% <sup>d</sup>	-
0,17%	1,6559	0,1238	1,5321	16,89% <sup>e</sup>	-

Tabel 5. Nilai absorbansi pada kontrol

Perlakuan	OD	Persentase penghambatan
Kloramfenikol 3,4%	0,2592	85,94%
Bakteri	1,8436	-

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama yang didampingi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

Pertumbuhan bakteri dapat diketahui dengan adanya kekeruhan pada media. Jumlah bakteri dapat diukur dengan cara mengetahui kekeruhan (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlahnya. Cahaya yang dipancarkan pada spektrofotometer akan mengenai sel sehingga sebagian cahaya akan diserap dan sebagian lagi diteruskan. Banyaknya cahaya yang diabsorpsi sebanding dengan banyaknya sel bakteri pada batas-batas tertentu (Purwoko, 2007).



Nilai MIC ditentukan berdasarkan dari konsentrasi terendah dengan nilai OD yang paling kecil. Nilai OD yang terkecil menyatakan adanya penurunan nilai absorbansi yang berarti terjadi penurunan jumlah sel setelah inkubasi. Nilai OD terbesar menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi yang masih terdapat pertumbuhan bakteri. Masih adanya pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak tersebut belum dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan pengamatan OD konsentrasi ekstrak 2,70% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* karena konsentrasi minimal yang memiliki persentase penghambatan 100% .

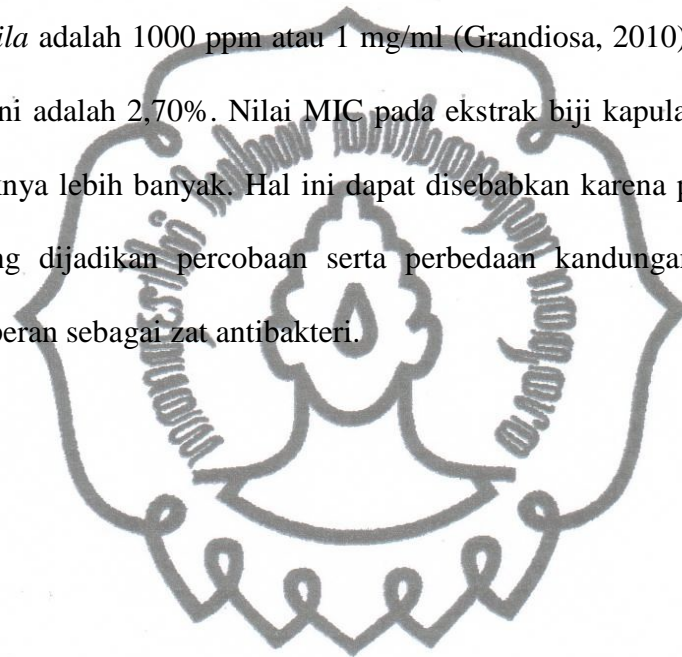
Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan konsentrasi 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% sebanding atau tidak beda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95% terhadap ekstrak 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% (Tabel 4 dan Lampiran 5). Hasil pengukuran OD nilai MIC biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* tercapai pada konsentrasi 2,70%.

Aktivitas bakteriostatik ekstrak etil asetat biji kapulaga dinyatakan dalam nilai MIC, yaitu pada konsentrasi minimal yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% lebih baik jika dibandingkan dengan kloramfenikol. Kloramfenikol memiliki persentase penghambatan 85,94% sedangkan ekstrak etil



asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sebanyak 99,78%.

Jika dibandingkan dengan nilai MIC ekstrak tanaman lain, seperti ekstrak etil asetat bunga kecombrang nilai MIC ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium* adalah 4 mg/ml (Naufalin, 2005) dan ekstrak jintan hitam terhadap *A. hydrophila* adalah 1000 ppm atau 1 mg/ml (Grandiosa, 2010). Nilai MIC pada penelitian ini adalah 2,70%. Nilai MIC pada ekstrak biji kapulaga dapat tercapai jika ekstraknya lebih banyak. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

1. Ekstrak biji kapulaga yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap *A. hydrophila* adalah ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar *A. hydrophila* adalah senyawa semipolar.
2. Nilai MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga (*A. compactum*) terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah pada konsentrasi 2,70%.

#### B. Saran

1. Perlu dilakukan partisi, isolasi dan purifikasi terhadap ekstrak etil asetat biji kapulaga untuk mengetahui golongan senyawa dan aktivitasnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penghambatan senyawa antibakteri ekstrak etil asetat biji kapulaga terhadap bakteri uji secara pasti dengan metode *in vivo*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada bagian lain pada tanaman kapulaga seperti akar, rimpang, batang dan bunga.