

**Penghambatan produksi enzim eksoprotease
Aeromonas hydrophila oleh ekstrak rimpang temu lawak
(*curcuma xanthorrhiza* (roxb.))**

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat Sarjana Sains Jurusan Biologi



Oleh :

Umi Lestari

NIM. M0401049

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2006**

PENGESAHAN

SKRIPSI
PENGHAMBATAN PRODUKSI ENZIM EKSOPROTEASE
***Aeromonas hidrophila* OLEH EKSTRAK RIMPANG TEMU LAWAK**
(*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.))

Oleh :
Umi Lestari
NIM. M0401049

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 10 Februari 2006
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Surakarta,

Penguji III/Pembimbing I

Artini Pangastuti, M.Si.
NIP. 132 257 941

Penguji IV/Pembimbing II

Ari Susilowati, M. Si.
NIP. 132 169 255

Penguji I

Dra. Ratna Setyaningsih, M. Si.
NIP. 132 240 377

Penguji II

Agung Budiharjo, M. Si.
NIP. 132 259 223

Mengesahkan :

Dekan F MIPA

Drs. Marsusi, M. S.
NIP. 130 906 776

Ketua Jurusan Biologi

Drs. Wiryanto, M. Si.
NIP. 131 124 613

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 yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan maka gelar kesarjanaan yang diperoleh dapat ditinjau dan atau dicabut.

Surakarta,

2005

Umi Lestari
NIM. M0401049

ABSTRAK

Umi Lestari 2005. **PENGHAMBATAN PRODUKSI ENZIM EKSOPROTEASE *Aeromonas hydrophila* OLEH EKSTRAK RIMPANG TEMU LAWAK (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.))**. Jurusan Biologi. F.MIPA. UNS

Pencegahan penyakit infeksi secara konvensional didasarkan pada penggunaan suatu senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Hal yang harus diperhatikan dalam penggunaan metode konvensional adalah berkembangnya resistensi bakteri terhadap zat anti mikrobia. Penemuan mengenai sistem komunikasi (sistem *quorum sensing*) yang meregulasi virulensi bakteri merupakan cara baru untuk mengontrol bakteri penginfeksi tanpa mengganggu pertumbuhannya.

Bakteri patogen pada ikan, *Aeromonas hydrophila* memproduksi molekul sinyal *N-Butanyl-L Homoserine Lactones* (C4-HSL). C4-HSL meregulasi sintesis enzim eksoprotease, salah satu faktor virulensi pada *A. hydrophila*. Ekspresi enzim eksoprotease dapat dihambat dengan menggunakan senyawa penghambat *quorum sensing*.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui apakah terdapat penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.). Ekstraksi rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dilakukan secara bertingkat dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol.

Hasil pengujian produksi enzim eksoprotease secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan tidak menghambat pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Sedangkan ekstrak rimpang 4% *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa mempengaruhi pertumbuhannya. Secara kuantitatif 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol mampu menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* masing-masing sebesar 93,9% dan 95,6%, tanpa menghambat pertumbuhannya.

Kata Kunci : produksi enzim eksoprotease, *Aeromonas hydrophila*, *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.), penghambatan.

ABSTRACT

Umi Lestari. 2005. **INHIBITION OF EXOPROTEASE PRODUCTION IN *Aeromonas hydrophila* by *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.)**. Department of Biology. Faculty of Mathematic and Natural Science. Sebelas Maret University.

Conventional treatment of infectious diseases is based on compounds that kills or inhibit growth of bacteria. A major concern with this approach is the frequent development of resistance to antimicrobial compounds. The discovery of communication (quorum sensing system) regulating bacterial virulence open up ways to control certain bacterial infectious without interfering with growth.

The fish pathogen *Aeromonas hydrophila* produces quorum sensing signal, *N-Butanyl-L Homoserine Lactones* (C4-HSL). C4-HSL regulate exoprotease synthesis, a virulence factor of *A. hydrophila*. Expression of exoprotease can be blocked using quorum sensing inhibitor.

The purpose of this study was to investigate the inhibit effect of *C. xanthorrhiza* (Roxb.) extract to exoprotease production of *A. hydrophila*. Extraction was done using n-hexan, ethil acetate, and ethanol.

The qualitative exoprotease assay result showed that the n-hexan extract of *C. xanthorrhiza* (Roxb.) had no effect on growth and exoprotease production of *A. hydrophila*. While 4% ethyl acetate and ethanol extract of *C. xanthorrhiza* (Roxb.) can inhibit exoprotease production without affecting *A. hydrophilla* growth. Quantitative exoprotease assay showed that the 4% of ethyl acetate and ethanol extract can inhibit exoprotease production 93,9% and 95,6%. Growth of *A. hydrophila* not affected by this extracts.

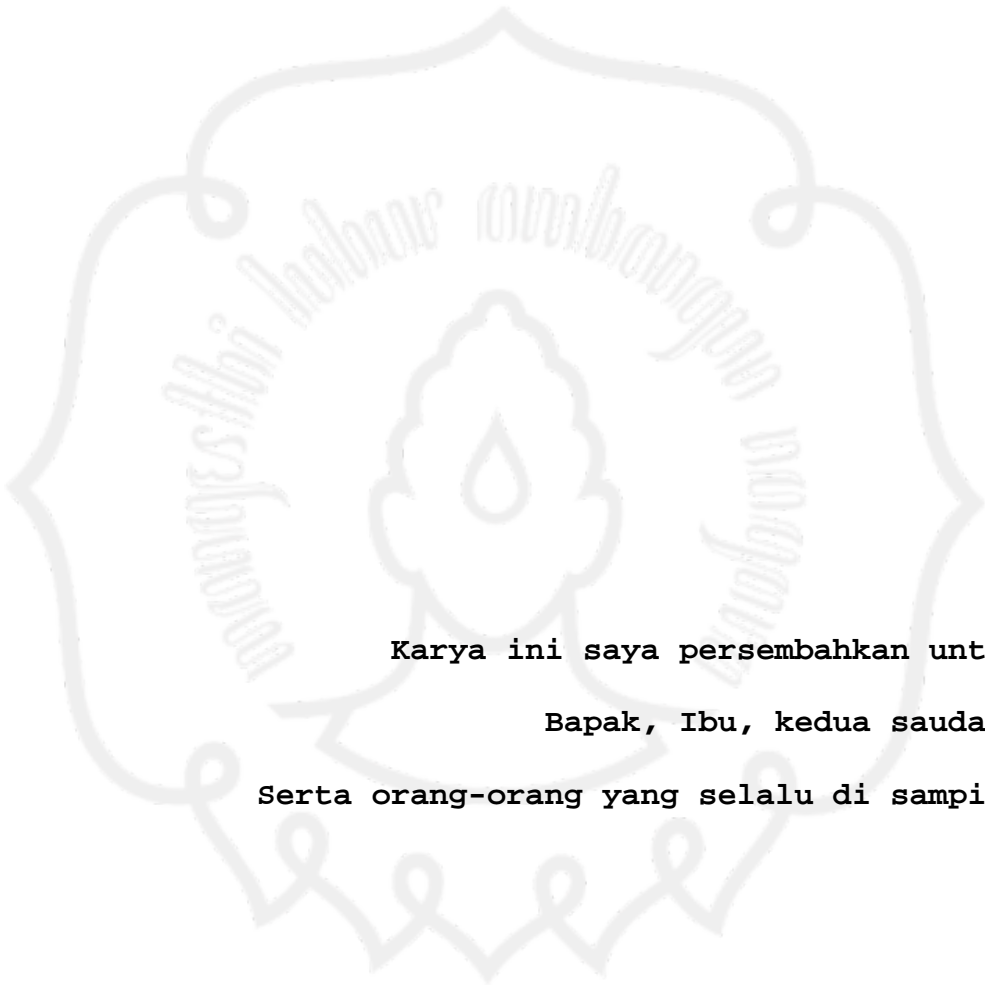
Keywords : Exoprotease production, *Aeromonas hydrophila*, *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.), inhibit.

MOTTO

" Maka ketika kita kembali pada ridha Allah SWT,
meluruskan niat dengan berusaha untuk mencapainya
dengan gigih, Allah SWT pasti akan memudahkan bagi kita
untuk meraih suatu tujuan yang agung ,
yaitu sebuah petunjuk jalan kemudahan "

"Kebanggaan kita terbesar adalah bukan tidak pernah
gagal,
tetapi bangkit kembali setiap kali kita jatuh"

HALAMAN PERSEMBAHAN



Karya ini saya persembahkan untuk :

Bapak, Ibu, kedua saudaraku

Serta orang-orang yang selalu di sampingku

KATA PENGANTAR

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit pada ikan, yang dikenal dengan nama *Motile Aeromonads Septicemia*. Hampir semua ikan budidaya air tawar rentan terhadap penyakit yang diakibatkan oleh *A. hydrophila*.

Salah satu faktor virulensi pada *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Sintesis enzim eksoprotease pada *A. hydrophila* diregulasi oleh suatu sistem yang disebut sistem *quorum sensing*. Sebelum ada penemuan mengenai sistem *quorum sensing* yang berperan dalam ekspresi faktor virulensi pada bakteri, pencegahan infeksi dilakukan dengan menggunakan senyawa-senyawa antimikrobia. Penggunaan senyawa antimikrobia secara terus menerus akan menyebabkan resistensi pada bakteri.

Sistem *quorum sensing* dapat dijadikan target penghambatan oleh senyawa-senyawa kemoterapeutik. Dengan terhambatnya sistem *quorum sensing* diharapkan produksi enzim eksoprotease juga mengalami penghambatan. Salah satu senyawa kemoterapeutik adalah *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.). Penelitian ini berjudul Penghambatan Produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* Oleh Ekstrak Rimpang *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.).

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Masalah	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. LANDASAN TEORI	
A. Tinjauan Pustaka	5
B. Kerangka Pemikiran	16
C. Hipotesis	17
BAB III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat Penelitian	18
B. Alat dan Bahan	18
C. Cara Kerja	19
D. Analisis Data	22

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

- A. Produksi enzim Eksoprotease *A. hydrophila* 23
- B. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* 25

BABV. KESIMPULAN DAN SARAN

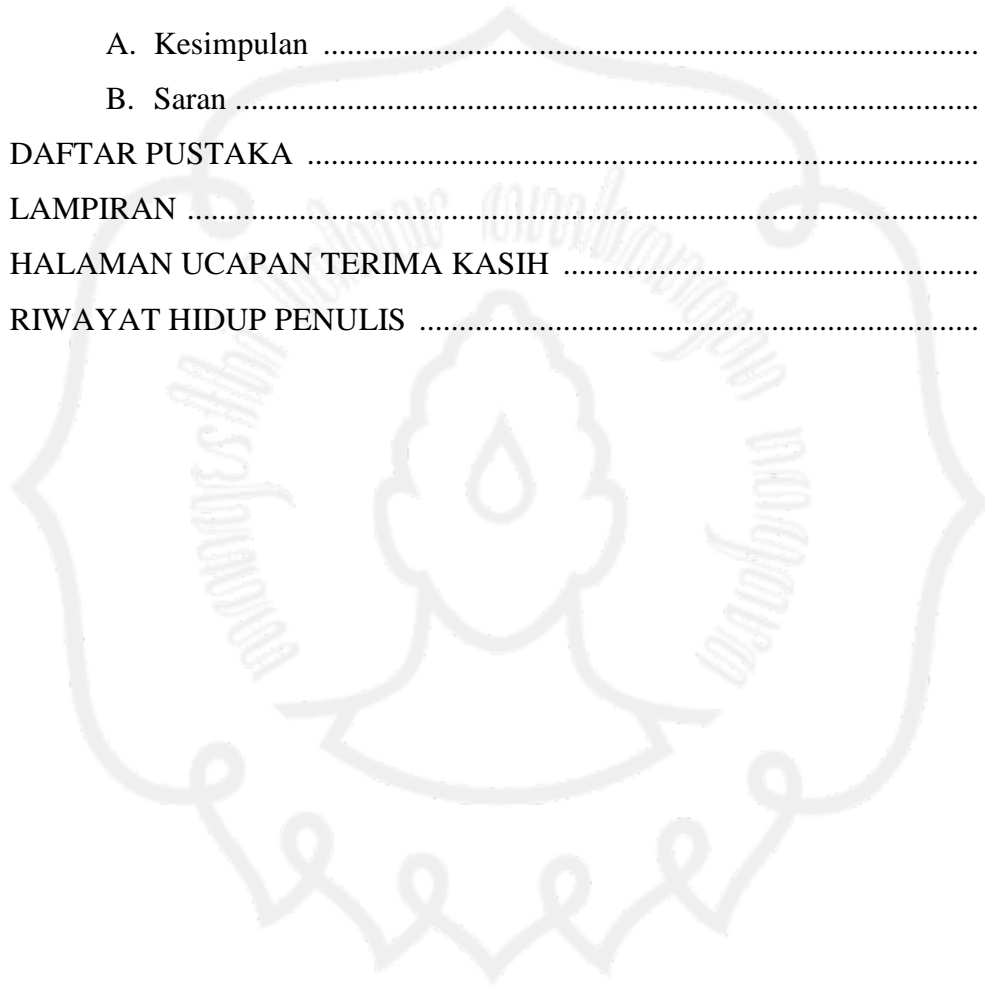
- A. Kesimpulan 44
- B. Saran 44

DAFTAR PUSTAKA 45

LAMPIRAN 50

HALAMAN UCAPAN TERIMA KASIH 66

RIWAYAT HIDUP PENULIS 69



DAFTAR TABEL**Halaman**

Tabel 1. Diameter zona bening dan diameter koloni pada pemberian ekstrak rimpang <i>C. xanthorrhiza</i> (Roxb.) dengan pelarut n-hexan.....	27
Tabel 2. Diameter zona bening dan diameter koloni pada pemberian ekstrak rimpang <i>C. xanthorrhiza</i> (Roxb.) dengan pelarut etil asetat.....	30
Tabel 3. Diameter zona bening dan diameter koloni pada pemberian ekstrak rimpang <i>C. xanthorrhiza</i> (Roxb.) dengan pelarut etanol.....	33

A. DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur kimia <i>N-Butanyl-L-Homoserine Lactones</i> (C4-HSL).....	10
Gambar 2. Pengaturan sistem <i>quorum-sensing</i> pada bakteri gram negatif.....	11
Gambar 3. Target penghambatan sistem <i>quorum sensing</i> <i>P. aeruginosa</i>	13
Gambar 4. Struktur kimia <i>curcumin</i>	24
Gambar 5. kerangka Pemikiran.....	17
Gambar 6. Produksi enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona bening di sekitar biakan <i>A. hydrophila</i>	24
Gambar 7. Penghambatan Aktivitas Enzim Eksoprotease <i>A. hydrophila</i> dengan pelarut n-hexan.....	28
Gambar 8. Penghambatan Aktivitas Enzim Eksoprotease <i>A. hydrophila</i> dengan pelarut etil asetat.....	31
Gambar 9. Penghambatan Aktivitas Enzim Eksoprotease <i>A. hydrophila</i> dengan pelarut etanol.....	34
Gambar10. Kurva Pertumbuhan <i>Aeromonas hydrophila</i>	37
Gambar 11. Kurva produksi Enzim Eksoprotease <i>Aeromonas hydrophila</i>	39
Gambar 12. Grafik Persentase produksi Enzim Eksoprotease <i>Aeromonas hydrophila</i> Pada Jam ke 14.....	41
Gambar 13. Grafik Persentase Penurunan produksi Enzim Eksoprotease <i>Aeromonas hydrophila</i> Pada Jam ke-14.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Nilai OD pada <i>A. hydrophila</i>	50
Lampiran 2. Unit aktivitas enzim eksoprotease <i>A. hydrophila</i>	51
Lampiran 3. Komposisi Media.....	52



BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit pada ikan (Swann and White, 2002). Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* dinamakan *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) (Roberts, 1993). *Aeromonas hydrophila* ditemukan paling banyak di perairan tawar. Hampir seluruh ikan air tawar rentan terhadap penyakit yang diakibatkan oleh bakteri ini (Noga, 1995). Menurut Afrianto (1995), penyakit yang diakibatkan oleh *A. hydrophila* pada ikan budidaya menimbulkan kerugian yang sangat besar sehingga perlu adanya penanganan yang efektif.

Salah satu faktor virulensi ekstraseluler yang disekresikan oleh *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Enzim ini bersifat proteolitik karena dapat mendegradasi albumin, kasein, fibrinogen, dan gelatin sehingga *A. hydrophila* berpotensi sebagai patogen pada ikan (Schotts *et al.*, 1985). Menurut Ellis *et al.* (1995), aktivitas enzim eksoprotease berkorelasi dengan terjadinya infeksi.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu molekul sinyal *N-butanyl-L-homoserine lactone* (C_4 -HSL). Senyawa ini juga berfungsi sebagai alat komunikasi interseluler pada bakteri yang disebut sistem *quorum-sensing*. Dengan sistem *quorum sensing* bakteri dapat mendeteksi adanya bakteri lain serta jumlahnya di lingkungan dan sebaliknya. Ketika hanya satu sel

yang mensekresikan molekul C₄-HSL ke lingkungan maka konsentrasinya sangat rendah, namun apabila populasi bakteri telah mencapai kepadatan tertentu atau telah memenuhi *quorum* maka C₄-HSL yang disekresikan ke lingkungan juga meningkat sehingga mampu mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang berperan sebagai faktor virulensi (Kievit and Iglewski, 2000).

Sebelum adanya penemuan mengenai sistem *quorum sensing* yang berperan dalam ekspresi faktor virulensi, pencegahan infeksi dilakukan dengan menggunakan senyawa antibiotik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri tersebut (Hentzer and Givskov, 2003). Penggunaan senyawa tersebut secara terus menerus akan meningkatkan frekuensi mutasi yang akan menghasilkan generasi bakteri yang resisten (Lewis, 2001). Dengan pengetahuan mengenai sistem *quorum sensing*, dapat dikembangkan suatu cara pengendalian bakteri yang tidak terbatas pada pemberantasan bakteri atau antibiosis. Pengendalian infeksi dapat dilakukan dengan mencegah pengumpulan massa bakteri atau dengan merusak sistem komunikasi interseluler bakteri dan membiarkan bakteri tetap hidup bersama selama perilakunya tidak destruktif (Suwanto, 2005).

Sistem *quorum sensing* dapat dijadikan target terapi antimikrobal. Penghambatan komunikasi antar sel tersebut dapat menurunkan patogenesis suatu bakteri (Kievit and Iglewski, 2000). Beberapa senyawa diketahui dapat menghambat sistem *quorum sensing*. Ekstrak alga *Flustra foliacea* dapat menghambat aktivitas molekul *N-Acyl-Homoserine Lactone* pada *Pseudomonas aeruginosa* tanpa mengganggu pertumbuhannya. Akibatnya produksi enzim

eksoprotease *P. aeruginosa* menurun (Peters *et al.*, 2003). Senyawa furanon yang diisolasi dari Alga *Delisea pulchra* juga dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada bakteri *Vibrio fischeri* dan *Vibrio harveyi* (Rice *et al.*, 1999). Selain itu senyawa *curcumin* yang diisolasi dari *Curcuma domestica* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum* (Rukayadi and Hwang, 2004). Penelitian ini dapat dijadikan dasar pencarian obat atau senyawa yang dapat menghambat sistem *quorum sensing* tanpa harus membunuh bakteri.

Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) mengandung berbagai senyawa yang berpotensi sebagai agen kemoterapeutik. Salah satu senyawa tersebut adalah *curcumin* yang telah terbukti dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum*. Pengetahuan tersebut dapat dijadikan dasar untuk melakukan penelitian untuk menghambat sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* dengan menggunakan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.).

Penghambatan sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* dapat dibuktikan dengan adanya penurunan produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan mengukur aktivitasnya. Oleh karena itu perlu diadakan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease dari *A. hydrophila* setelah pemberian agen kemoterapeutik berupa ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol. Pelarut-pelarut tersebut digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa non polar, semi polar, dan polar yang terkandung pada rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut.

1. Apakah terdapat penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol ?
2. Di antara ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol, manakah yang memiliki kemampuan terbesar untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* ?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb) dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol.
2. Mengetahui jenis ekstrak yang memiliki kemampuan paling besar untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pengembangan metode pengendalian bakteri patogen yang tidak hanya berbasis pada metode antibiosis, serta penggunaan ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb) untuk menurunkan patogenesis *A. hydrophila* dengan cara menghambat produksi enzim eksoprotease.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila merupakan anggota Familia Vibrionaceae, namun beberapa peneliti memasukan Genus *Aeromonas* ke dalam familia tersendiri yaitu Aeromonadaceae (Colle *et al.*, 1996). Sifat khusus yang membedakan Genus *Aeromonas* dengan *Vibrio* adalah resistensi *Aeromonas* terhadap senyawa *vibriostatic 2,4-diamino-6,7-diisoprophyl pteridine* (0/129) dan kurang dapat tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 6% (Brooks *et al.*, 2002).

Aeromonas hydrophila termasuk bakteri gram negatif dan bersifat positif oksidatif (Ko *et al.*, 2003). *Aeromonas hydrophila* berbentuk batang lurus dengan ujung membulat, biasanya motil dengan flagel tunggal. Kadang-kadang flagel bersifat peritrik dalam medium cair saat kultur muda. Bakteri ini bersifat anaerobik fakultatif dan kemoorganotropik karena melakukan respirasi dan fermentasi. *Aeromonas hydrophila* dapat merombak glukosa dengan atau tanpa memproduksi gas. *Aeromonas hydrophila* juga dapat menghidrolisis arginin, *esculin*, dan gelatin serta mereduksi nitrat. Pada pepton cair 1%, bakteri ini dapat memproduksi indol (Holt *et al.*, 2000).

Aeromonas hydrophila merupakan penghuni tetap lingkungan air (Hayes, 2001). Bakteri ini dapat ditemukan di perairan tawar, perairan payau, perairan pantai, dan perairan terklorinasi (Alavandi *et al.*, 1998). Di daerah iklim sedang, *A. hydrophila* dapat mencapai populasi tertinggi pada akhir musim panas

atau awal musim gugur saat temperatur 20-25°C (Gavriel *et al.*, 1998). Di daerah kering, populasi tertinggi di perairan tawar terjadi selama musim dingin (Maalej *et al.*, 2003). Pada media air laut steril yang miskin nutrien, populasi *A. hydrophila* menurun 0,1 CFU/ml setelah 3-5 minggu (Maalej *et al.*, 2004). Selain itu *A. hydrophila* dapat diisolasi dari produk makanan dingin, produk susu, produk ternak ruminansia, dan produk unggas (Ibrahim and Mac Rae, 1991). Bakteri ini juga dapat diisolasi dari air minum, tanah, dan *faeces* (Thune *et al.*, 1993). Pada manusia, hampir 1% tubuh orang sehat mengandung bakteri ini meskipun bukan flora enterik (Araujo *et al.*, 1991)

2. Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila tersebar luas di lingkungan air dan dapat menyebabkan penyakit pada ikan, reptil, amfibi, dan manusia (Ko *et al.*, 2003). Menurut Randy (2003), bakteri ini menyebabkan penyakit pada ikan yang dikenal sebagai *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS), *hemorrhagic septicemia*, *ulcer disease*, atau *red-sore disease*. Istilah-istilah tersebut digunakan untuk menyebut suatu penyakit pada inang berupa luka, septicemia, dan borok pada kulit ikan.

Gejala ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* adalah kehilangan nafsu makan, abnormalitas berenang, insang pucat, kelihatan bengkak, dan borok pada kulit. Borok pada kulit tersebut dikelilingi lingkaran jaringan berwarna merah dan terdapat di beberapa tempat. Organ lain yang biasanya ikut terinfeksi adalah insang, ginjal, hati, limpa, pankreas, dan jaringan otot (Swann and White, 2002). Pada katak atau amfibi lainnya, infeksi oleh *A. hydrophila* menyebabkan

penggembungan serta warna merah pada permukaan ventral kaki dan abdomen sehingga disebut *red leg disease* (Aguilar *et al.*, 1997).

Kenaikan suhu akan menyebabkan ikan rentan terhadap infeksi *A. hydrophila* karena metabolisme tubuh meningkat, penurunan kondisi ikan secara keseluruhan, dan stress. Peningkatan produksi kortikosteroid akibat stress pada ikan akan memudahkan *A. hydrophila* menginfeksi ikan. *Motile Aeromonad Septicemia* akan terjadi saat peningkatan suhu air, penurunan konsentrasi *dissolved oxygen* (DO), serta peningkatan konsentrasi amonia dan CO₂. *Aeromonas hydrophila* juga dapat menular pada manusia melalui luka terbuka atau tertelan bersama air atau makanan, gejalanya adalah diare dan *septicemia* (Krovacek *et al.*, 1994).

3. Patogenisitas dan virulensi

Patogenisitas merupakan kemampuan mikroorganisme untuk menyebabkan penyakit pada inang, sedangkan virulensi adalah derajat patogenisitas dari suatu mikroorganisme. Ada dua macam cara mikroorganisme untuk dapat menyebabkan penyakit :

1. Mikroorganisme menempel pada inang, kemudian melakukan penetrasi dan merusak jaringan pada inang.
2. Penumpukan sisa metabolisme dari mikroorganisme pada jaringan inang.

Tingkat virulensi suatu mikroorganisme dapat meningkat karena adanya beberapa faktor yang meliputi toksin, kemampuan mikroorganisme melawan sistem inang, kondisi lingkungan, dan variasi genetik (Longworth, 2000).

Faktor virulensi dari *A. hydrophila* digolongkan menjadi dua kelompok :

1. Komponen permukaan sel, berupa pili, *S-Layer*, dan lipopolisakarida.
2. Faktor ekstraseluler, berupa enterotoksin, *Glycero-Phospholipid-Cholesterol Acetyltransferase* (GCAT), hemolisin, lipase, dan protease.

(Swift *et al.*, 1995)

4. Mekanisme sistem *quorum sensing*

Quorum sensing merupakan suatu sistem komunikasi antar sel bakteri dalam lingkungan. Bahasa yang digunakan berupa molekul sinyal yang disebut *autoinducer*. Dalam sistem *quorum sensing*, bakteri dapat mendeteksi adanya bakteri lain serta fluktuasi jumlahnya di lingkungan. Sistem ini juga mengontrol tingkah laku bakteri yang hanya akan produktif saat bakteri dalam suatu komunitas, misalnya pembentukan *bioluminescence*, sekresi faktor virulensi, pembentukan biofilm, sporulasi, dan pembentukan pigmen (Taga and Bassler, 2003). Menurut Rice *et al.* (1999), sistem *quorum sensing* digunakan dalam suatu komunitas bakteri untuk berkoordinasi dalam ekspresi gen penyandi fenotipe tertentu.

Fenomena *quorum sensing* pada bakteri didasarkan pada prinsip bahwa saat bakteri tunggal melepaskan *autoinducer* ke lingkungan, maka konsentrasinya terlalu rendah untuk dideteksi. Ketika jumlah bakteri telah mencapai konsentrasi tertentu atau telah mencapai *quorum*, maka konsentrasi *autoinducer* di lingkungan akan meningkat dan dapat mengaktifkan faktor transkripsi gen penyandi suatu fenotipe, termasuk faktor virulensi ekstraseluler (Kievit and Iglewski, 2000).

Ada dua tipe sistem quorum-sensing pada bakteri :

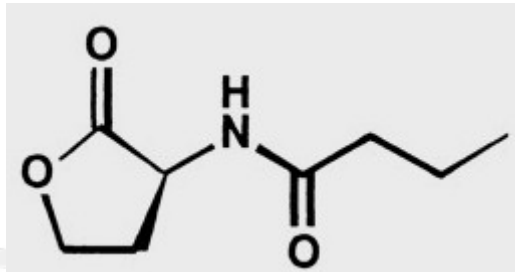
1. Tipe *Autoinducing Polypeptides* (AIPs) pada bakteri gram positif dengan molekul sinyal berupa peptida.
2. Tipe *LuxIR* pada bakteri gram negatif, dengan molekul sinyal *N-acyl-homoserine lactone* (AHLs).

(Taga and Bassler, 2003)

Sistem *quorum sensing* yang mengontrol ekspresi faktor virulensi pada bakteri gram negatif, pertama kali ditemukan pada ekspresi *bioluminescence* (*lux*) *Vibrio fischeri*. Pada sistem ini terdapat empat komponen yaitu molekul sinyal *N-(3-Oxohexanoyl)-L-HSL*, protein regulator LuxI, protein regulator LuxR, dan gen *lux*. Protein regulator LuxI akan mensintesis molekul sinyal *N-(3-Oxohexanoyl)-L-HSL* yang akan disekresikan ke lingkungan. Dalam konsentrasi yang cukup, molekul sinyal tersebut akan masuk kembali ke dalam sel dan mengikat reseptor protein regulator LuxR, selanjutnya akan mengaktifkan faktor transkripsi gen *lux* (Lewenza *et al.*, 1999). Komponen sistem *quorum sensing* pada bakteri gram negatif homolog dengan sistem *quorum sensing* pada *V. fischeri* yaitu tipe *LuxIR*. Secara umum molekul sinyal pada bakteri gram negatif adalah *N-Acyl-Homoserine Lactone* (Rice *et al.*, 1999).

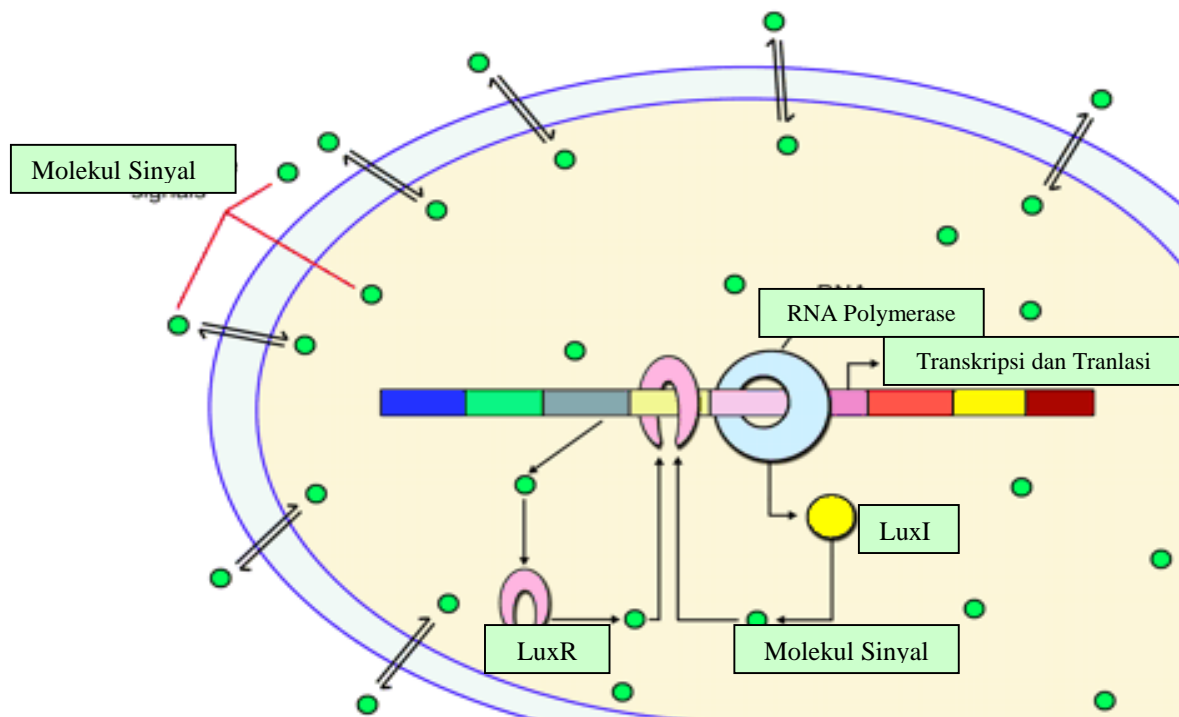
Aeromonas hydrophila merupakan bakteri gram negatif yang dapat memproduksi faktor virulensi ekstraseluler berupa enzim eksoprotease. Produksi enzim ini dikontrol oleh sistem *quorum sensing* yang homolog dengan tipe *LuxIR* (Swift *et al.*, 1997). Molekul sinyal pada *A. hydrophila* adalah *N-Butanyl-L*

Homoserine Lactones (C4-HSL). Struktur kimia dari C4-HSL dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia *N-Butanyl-L-Homoserine Lactones* (C4-HSL)

Sintesis C4-HSL dikontrol oleh protein regulator AhyI yang diekspresikan oleh gen *ahyI*. Selanjutnya C4-HSL disekresikan ke lingkungan. Apabila konsentrasi di lingkungan telah mencapai ambang tertentu maka senyawa ini akan masuk ke dalam sel dan berinteraksi dengan reseptor protein regulator AhyR yang terikat pada rangkaian promotor gen penyandi enzim eksoprotease. Selanjutnya akan mengaktifkan faktor transkripsi *RNA polymerase* untuk mengadakan proses transkripsi (Kievit and Iglewski, 2000). Pengaturan sistem *quorum-sensing* dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2 : Pengaturan sistem *quorum-sensing* pada bakteri gram negatif. Molekul sinyal AHL (warna hijau) diregulasi oleh gen *luxI* yang memproduksi protein LuxI. Apabila konsentrasi tinggi AHL akan masuk ke dalam sel bakteri dan berinteraksi dengan reseptor LuxR, yang terikat pada promotor gen target (*Lux operon*) untuk mengaktifkan *RNA Polymerase*.

5. Penghambatan sistem *quorum-sensing*

Penemuan mengenai penggunaan sistem *quorum sensing* untuk mengontrol produksi faktor virulensi pada bakteri, dapat digunakan sebagai dasar untuk mencari metode pencegahan infeksi oleh bakteri secara efektif (Lynch *et al.*, 2002). Penghambatan sistem *quorum sensing* pada bakteri patogen akan menyebabkan patogenisitasnya menurun (Kievit and Iglewski, 2000). Kemungkinan mekanisme penghambatan sistem *quorum sensing* adalah sebagai berikut :

a. Penghambatan penerimaan molekul sinyal

AHLs dan protein regulator LuxR memiliki spesifisitas antara satu dengan yang lain. Pengikatan reseptor protein LuxR oleh suatu senyawa yang memiliki struktur mirip AHLs (senyawa analog), menyebabkan pengaktifan faktor transkripsi tidak terjadi (gambar 3b). Givskov *et al.* (2000) melaporkan bahwa alga *Delisa pulchra* memproduksi senyawa furanon yang memiliki struktur mirip AHLs. Senyawa ini menjadi senyawa analog AHLs yang mencegah pengaktifan faktor transkripsi pada protein regulator LuxR *Serratia liquefaciens*, *Vibrio fischeri*, dan *Vibrio harveyi*.

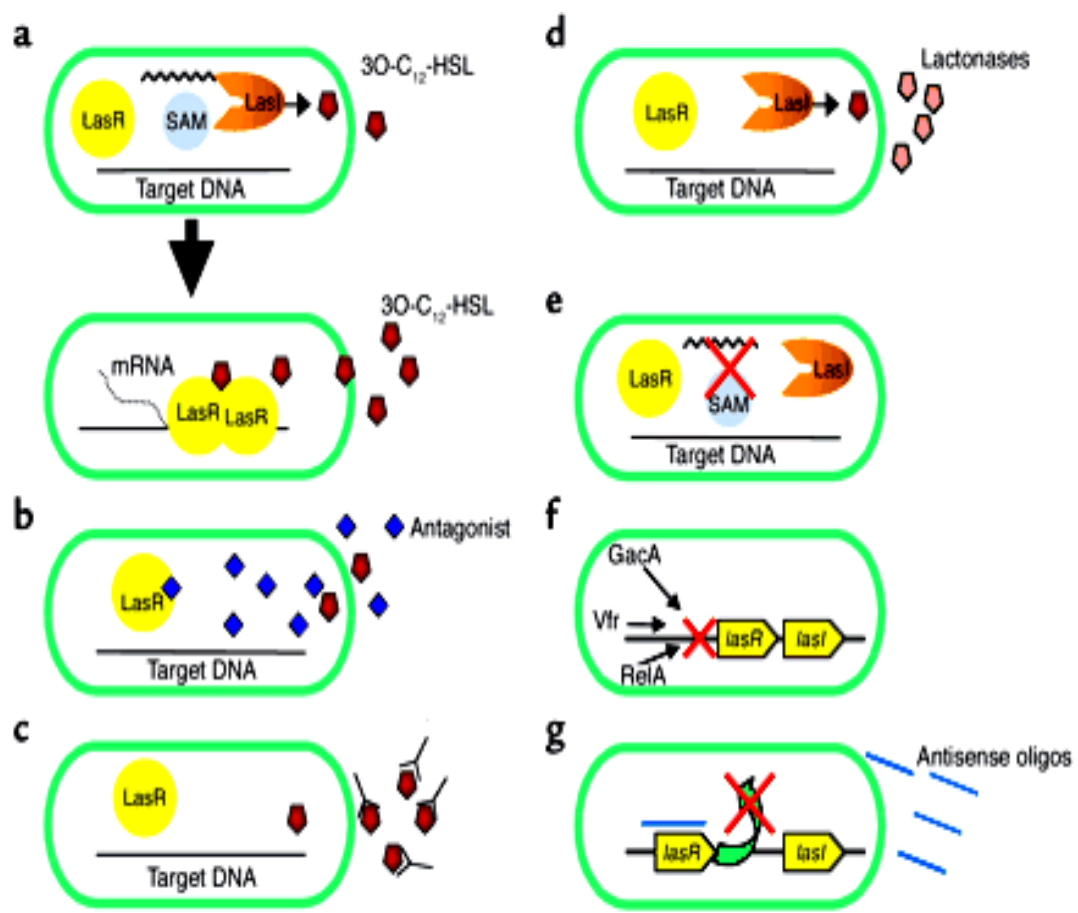
b. Penghambatan aktivitas AHLs.

AHLs merupakan suatu senyawa ekstraseluler, sehingga dapat dijadikan target inaktivasi dan destruksi. Suatu antibodi khusus dapat mengikat dan mencegah aktivitas *N*-(3-oxododecanoy)-*L*-homoserine lactone atau 3O-C₁₂-HSL pada *Pseudomonas aeruginosa* (gambar 3c). Pengetahuan di atas dapat dijadikan dasar untuk mencari agen kemothérapeutik yang dapat mengikat dan mencegah molekul sinyal mengaktifkan faktor transkripsi gen target (Smith and Iglewski, 2003).

c. Penghambatan sintesis AHLs

Reaksi sintesis AHLs terdiri atas serangkaian tahapan yang melibatkan *S*-Adenosyl Methionin (SAM) dan sebagai donor asam amino untuk pembentukan cincin lactone (gambar 3a). Berbagai senyawa analog SAM seperti *S*-Adenosyl Homoserine, *S*-Adenosyl Cysteine, dan Sinefungin terbukti dapat menghambat sintesis AHLs pada *Pseudomonas aeruginosa*

(Parsek *et al.*, 1999). Berbagai mekanisme penghambatan sistem *quorum sensing* pada *P. aeruginosa* dapat dilihat pada gambar 3 :



Gambar 3. Target penghambatan sistem *quorum sensing* *P. aeruginosa*. (a) Protein regulator LasI pada *P. aeruginosa* menggunakan *S-adenosyl methionine* (SAM) dan *acyl-ACP* dalam sintesis 3O-C12-HSL. (b) Pengikatan AHLs analog pada LasR akan mencegah pengaktifan faktor transkripsi. (c) Antibodi khusus mengikat AHLs saat disekresikan ke lingkungan sehingga mencegah masuknya kembali AHLs ke dalam sel bakteri. (d) Proses laktonasi akan mendegradasi AHLs saat di sekresikan ke lingkungan dan mencegah AHLs mengikat protein regulator LasR. (e) Pencegahan ekspresi substrat LasI akan mencegah produksi 3O-C12-HSL (f) Senyawa obat diketahui dapat menghambat berbagai faktor yang mengontrol ekspresi gen *LasI* dan *LasR*. (g) *Specific antisense oligonucleotides* (oligos) dapat berpasangan dengan RNA *LasR* dan *LasI* dan menghambat tranlasi gen yang pada akhirnya akan menurunkan produksi protein

6. Enzim Eksoprotease

Aeromonas hydrophila memproduksi enzim eksoprotease yang juga berperan sebagai faktor virulensi. Peranan utama dari enzim eksoprotease pada suatu bakteri adalah memecah ikatan peptida protein sehingga dihasilkan komponen asam amino dalam bentuk bebas. Asam amino tersebut akan digunakan oleh bakteri sebagai sumber nutrisi bagi bakteri. Namun enzim eksoprotease juga menyebabkan *A. hydrophila* bersifat patogen karena enzim ini dapat merusak jaringan pada inang. Enzim eksoprotease dapat merusak atau mendegradasi jaringan konektif dan jaringan otot seperti kolagen, elastin, gelatin, dan sebagainya. Para ahli menyimpulkan bahwa enzim eksoprotease merupakan faktor virulensi utama di antara produk ekstraseluler lain yang disekresikan bakteri. Fungsi enzim eksoprotease pada bakteri patogen adalah memulai terjadinya infeksi pada jaringan inang (Secades *et al.*, 2001).

Menurut Rodrigues *et al.* (1992), ada dua jenis enzim eksoprotease pada *A. hydrophila*, yaitu :

1. *Serine protease*, memiliki berat molekul 22 kD, stabil pada suhu 56°C selama 10 menit, memiliki aktivitas sitotoksik dan memiliki nilai LC₅₀ sebesar 50 ng/g ikan
2. *Metalloprotease*, memiliki berat molekul 38 kD, stabil pada suhu 56°C selama 10 menit, tidak memiliki aktivitas sitotoksik dan memiliki nilai LC₅₀ sebesar 150 ng/g ikan.

7. *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.)

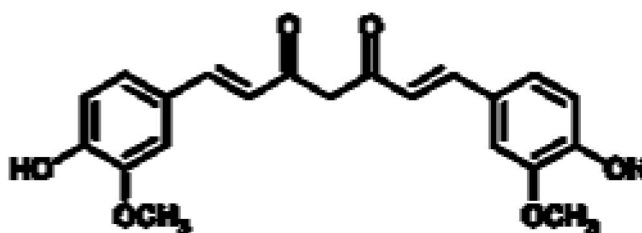
Curcuma xanthorrhiza (Roxb.) atau dikenal dengan nama temu lawak merupakan tanaman asli Indonesia. *C. xanthorrhiza* (Roxb.) termasuk ke dalam Familia Zingiberaceae dan memiliki sinonim *Curcuma javanica*. Tanaman ini telah tersebar luas di berbagai daerah di Indonesia bahkan manca negara (Anonim, 2004).

C. xanthorrhiza (Roxb.) merupakan herba menahun dengan akar rimpang, dan memiliki batang tegak. Rimpang terdiri atas satu rimpang induk berbentuk bulat telur dengan anakan rimpang langsing panjang dan berjumlah 3-4 buah, sebelah dalam berwarna kuning dan sebelah luarnya berwarna kuning pucat. Daun lanset dengan pita merah ungu memanjang di sisi kanan kiri ibu tulang daun. Pelepahnya memeluk batang dan lidah di antara batas pelepah dan helaian daun. Bunga zigomorf, kelopak berupa tabung dengan ujung bertaju, daun mahkota 3 dengan pangkal melekat. Benang sari sempurna 1, ruang sari 2, staminodia 3 selalu serupa dengan daun mahkota. Tangkai putik langsing dengan ujung terjepit di antara ruang sari. Kepala sari melebar. Buah kotak berkatup 3, kadang tidak pecah (Tjitrosoepomo, 1994; Steenis, 1997).

Komponen ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb) terdiri atas :

1. Komponen polar terdiri atas zat tepung, gula, dan polisakarida.
2. Komponen semi polar terdiri atas *curcumin* 62% dan *desmethoxycurcumin* (38%).
3. Komponen non polar (*volatile oil*) terdiri atas *1-cyclo-isoprenemyrcene* (85%), *aromatic sesquiterpene phenol*, *xanthorrhizol* (20%).

Salah satu senyawa yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) adalah *curcumin*. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rukayadi and Hwang (1994), senyawa *curcumin* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada salah satu jenis bakteri gram negatif yaitu *Chromobacterium violaceum*. Struktur kimia dari *curcumin* dapat dilihat pada gambar 4.

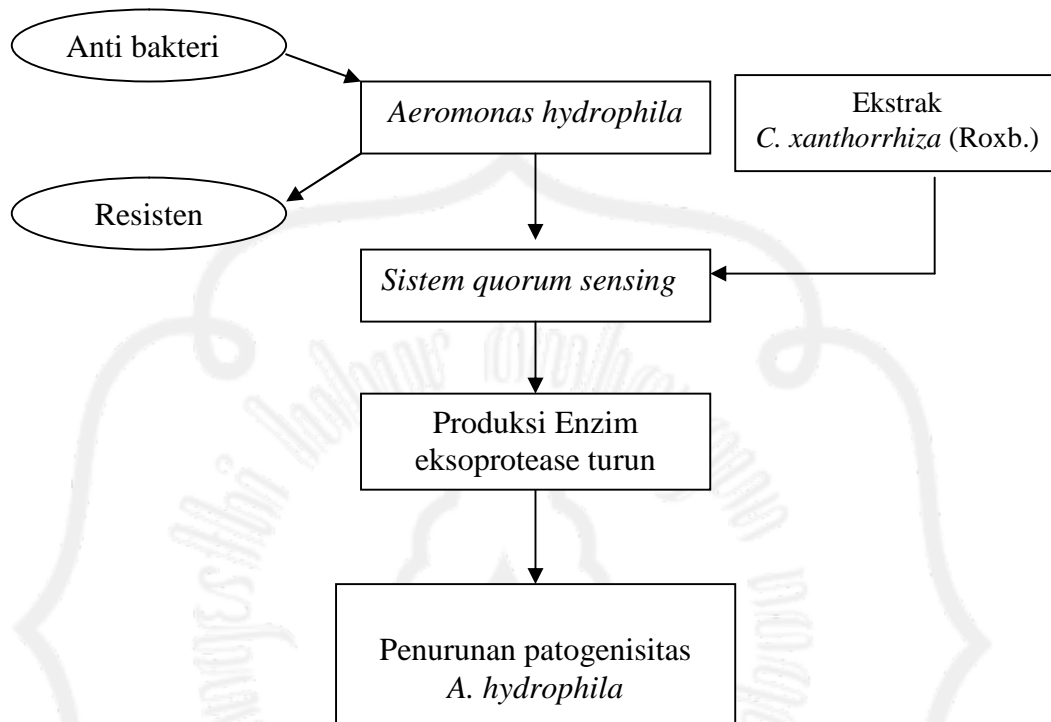


Gambar 4. Struktur kimia *curcumin*.

B. Kerangka Pemikiran

Penggunaan senyawa anti bakteri secara terus menerus akan menimbulkan bakteri yang resisten, sehingga perlu adanya mekanisme baru untuk mencegah infeksi. Salah satu faktor virulensi *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Sintesis enzim eksoprotease *A. hydrophila* diatur oleh sistem *quorum sensing*. Dalam sistem ini bakteri mensekresikan molekul sinyal C₄-HSL ke lingkungan, jika konsentrasi di lingkungan tinggi, C₄-HSL akan masuk kembali ke dalam sel dan mengaktifkan faktor transkripsi gen penyandi enzim eksoprotease. Penghambatan sistem *quorum sensing* oleh suatu agen kemoterapeutik, berupa ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb) diduga akan menyebabkan produksi enzim eksoprotease menurun. Penurunan produksi enzim eksoprotease akan menyebabkan

patogenisitas *A. hydrophila* berkurang. Kerangka pemikiran secara skematis dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. kerangka Pemikiran

3. Hipotesis

1. Terdapat penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.).
2. Ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat memiliki kemampuan terbesar untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai dengan November 2005 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- a. Alat untuk ekstraksi : blender, timbangan elektrik, *rotary evaporator*, *hot plate*, *freezer*, erlenmeyer, *beaker glass*, *aluminium foil*, dan kertas saring.
- b. Alat untuk pemeliharaan kultur, pengukuran pertumbuhan, dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease : Spektrofotometer, *shaker*, mikropipet dan tip, *Laminar air flow*, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, erlenmeyer, pinset, kertas saring, dan *hot plate*.
- c. Alat sterilisasi : *autoclave*

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- a. Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb) yang diperoleh dari daerah Wonogiri.
- b. Kultur murni *A. hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Penyakit Ikan (*Fish Disease*) Jurusan Teknologi Perikanan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. *A. hydrophila* diisolasi dari ikan lele (*Clarias batrachus*) yang sakit.

- c. Medium *Luria-Bertani broth* (LB Broth), *Luria-Bertani agar* (LB), *azocasein*, susu skim, *Trichloro Acetic Acid* (TCA), NaOH dan buffer fosfat pH 7.
- d. Pelarut : n-heksan, etil asetat, dan etanol.

C. Cara Kerja

1. Pembuatan Serbuk Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb)

Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dicuci bersih, kemudian diiris tipis dan dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Irisan rimpang yang sudah kering diblender menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk akan digunakan untuk pembuatan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol.

2. Pembuatan Ekstrak Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Serbuk rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dilarutkan dalam n-heksan (100 mg serbuk/100 ml n-heksan), dikocok dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya ampas dilarutkan dalam pelarut etil alkohol, dikocok dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya, ampasnya dilarutkan dengan etanol, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Masing-masing filtrat dipekatkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Harmani *et al.*, 2001).

2. Pemeliharaan kultur

Aeromonas hydrophila ditumbuhkan pada medium agar miring NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah tumbuh sebagai biakan, *A. hydrophila* pada agar miring disimpan pada lemari pendingin (4°C) sebagai biakan stok.

3. Pengujian Kualitatif Produksi Enzim Eksoprotease

Medium yang digunakan adalah Luria-Bertani (LB) agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim pada suhu 110°C selama 30 menit.

Selanjutnya disiapkan cawan petri yang diisi 16 ml medium dengan penambahan ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dan 0% sebagai kontrol negatif, dengan asumsi pada variasi konsentrasi di atas produksi enzim eksoprotease dapat terhambat tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Sedangkan untuk kontrol positif, pada medium LB agar ditambah dengan pelarut yaitu n-hexan, etil asetat, dan etanol.

Isolat *A. hydrophila* diinokulasikan pada cawan petri yang telah berisi medium padat dengan menggunakan jarum ose dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening pada medium. Zona bening terbentuk karena adanya aktivitas proteolitik dari enzim eksoprotease (Swift *et al.*, 1999).

5. Pengukuran Pertumbuhan Bakteri dan Pengujian Produksi

Enzim Eksoprotease Secara Kuantitatif

Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitas enzim tersebut. Pengujian aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prinsip pengujian aktivitas enzim eksoprotease berdasarkan pada Hanlon dan Hodges (1981) yaitu kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis *azocasein*. Residu *azocasein* yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim protease akan diendapkan oleh *trichloro acetic acid* (TCA). Endapan dipisahkan dan filtrat akan membentuk warna bila direaksikan dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm.

Pengujian secara kuantitatif hanya dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik, ditandai dengan adanya pengurangan luas zona bening jika dibandingkan dengan kontrol. Isolat *A. hydrophila* berumur 24 jam ditumbuhkan pada 200 ml LB broth yang telah ditambah dengan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dan untuk kontrol negatif tidak ditambah dengan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb), sedangkan untuk kontrol positif pada medium LB broth ditambah dengan pelarut, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan *shaker*.

Mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam, 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai

OD (*Optical density*). Setelah diukur pertumbuhannya, suspensi bakteri tersebut disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Satu ml filtrat kemudian dimasukan ke tabung reaksi yang telah berisi 3 ml larutan buffer fosfat (pH 7). Campuran ini kemudian dihangatkan hingga suhunya mencapai 37°C. Sementara itu 2 ml *azocasein* dipanaskan pada penangas air hingga suhunya mencapai 37°C dan ditambahkan ke dalam campuran filtrat dan buffer fosfat, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 4 ml *trichloro acetic acid* (TCA) sehingga terbentuk endapan kuning yang dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman no. 1 atau disentrifugasi. Lima ml filtrat diambil dan ditambah dengan 5 ml larutan NaOH 0,5 M sebelum diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm.

Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan kenaikan pengukuran absorbansi sebesar 0,01 setiap jam pada kondisi pengukuran. Unit aktivitas enzim eksoprotease yang digunakan dalam penelitian ini dinyatakan dalam U/ml, dan ditetapkan dengan rumus :

$$\begin{aligned} \text{U/ml} &= (\text{absorbansi} : 0.01) \times 2 \\ &= \text{Unit Aktivitas/ml sampel} \end{aligned}$$

(Hanlon and Hodges, 1981)

D. Analisis Data

Hasil pengukuran aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* berupa unit aktivitas/ml sampel (U/ml) pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan aktivitas enzim eksoprotease pada kontrol dan penurunannya dinyatakan dalam persentase.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

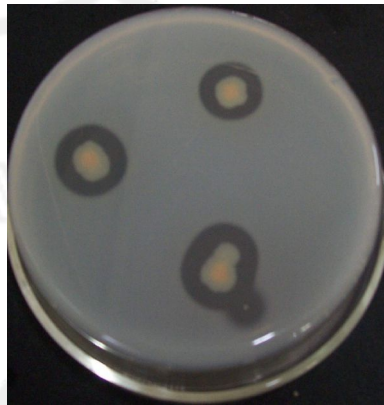
A. Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan lele (*Clarias batrachus*) yang sakit. Dengan demikian diharapkan *A. hydrophila* telah memproduksi faktor-faktor virulensi, di antaranya enzim eksoprotease. Menurut de Figueiredo and Plumb dalam Angka (2000), isolat *A. hydrophila* yang diisolasi dari ikan sakit lebih virulen daripada isolat yang diisolasi dari perairan.

Besarnya jumlah enzim yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme tidak dapat diukur secara langsung. Jumlah enzim yang diproduksi biasanya sangat kecil. Menurut Murray dkk (1997), aktivitas katalisis yang dimiliki oleh suatu enzim memungkinkan untuk mengukur jumlah enzim yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Secara kualitatif, produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dari terbentuknya zona bening pada medium di sekitar biakan *A. hydrophila*. Medium yang digunakan adalah medium *Luria Bertani Agar* (LB Agar) yang ditambah dengan 2% susu skim. Aktivitas katalisis dari enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona bening. Menurut Poernomo dan Purwanto (2005) enzim eksoprotease akan menghidrolisis ikatan peptida protein susu skim menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu asam amino. Selanjutnya asam amino akan masuk ke dalam sel bakteri dan digunakan

sebagai nutrisi. Meskipun secara umum enzim eksoprotease berperan dalam penyediaan nutrisi, namun menurut Leung and Stevenson (1988), pada *A. hydrophila* enzim eksoprotease berperan penting dalam menyebabkan kerusakan jaringan pada ikan. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Produksi enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*.

Secara kuantitatif, produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya dalam mendegradasi senyawa *azocasein*. Pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Menurut Hanlon and Hodges (1981), dari nilai absorbansi filtrat hasil degradasi *azocasein* oleh enzim eksoprotease dapat diperoleh nilai unit aktivitas enzim.

e. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease

Aeromonas hydrophila

Sintesis enzim eksoprotease *A. hydrophila* diregulasi oleh sistem *quorum sensing* (Swift *et al.*, 1999). Penghambatan sistem *quorum sensing* akan menyebabkan produksi enzim eksoprotease menurun, akibatnya patogenesis *A. hydrophila* juga akan berkurang. Penghambatan *sistem quorum sensing* dapat dijadikan suatu cara baru untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri tanpa harus menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Menurut Peters *et al.* (2003) pencegahan penyakit yang diakibatkan oleh bakteri dengan cara menghambat sistem *quorum sensing* akan mengurangi berkembangnya resistensi bakteri oleh zat-zat antimikrobia.

Menurut Hentzer and Givskov (2003), sistem *quorum sensing* dapat dijadikan target penghambatan senyawa-senyawa kemothérapeutik. Pada penelitian ini senyawa kemothérapeutik yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease adalah ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.). Rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) mengandung berbagai jenis senyawa aktif yang pengelompokannya didasarkan pada tingkat kepolaran senyawa-senyawa aktif tersebut. Menurut Chu (2004), ada tiga jenis kelompok senyawa aktif dalam rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.), yaitu senyawa polar, senyawa semi polar, dan senyawa non polar. Untuk mendapatkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) maka dilakukan ekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut non polar, semi polar, dan polar yaitu n-hexan, etil asetat, dan etanol. Salah satu senyawa semi polar yang diduga dapat menghambat

sistem *quorum sensing* adalah *curcumin*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Rukayadi and Hwang (2004) membuktikan bahwa *curcumin* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum*, yang memiliki molekul sinyal C4-HSL.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Swift *et al.* (1999), penghambatan sistem *quorum sensing* untuk mengontrol virulensi dan mencegah infeksi *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa analog C4-HSL pada kultur *A. hydrophila*.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dari tidak terbentuknya atau berkurangnya luas zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*. Sedangkan secara kuantitatif, produksi enzim eksoprotease dianggap terhambat apabila nilai unit aktivitas enzim mengalami penurunan. Selama proses pengujian aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif, pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* harus dilakukan, karena terkait dengan tujuan dari penelitian ini yaitu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya.

Pada penelitian ini apabila secara kualitatif, salah satu jenis ekstrak dapat menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa menghambat pertumbuhannya maka akan dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk mengetahui seberapa besar persentase penurunan produksi enzimnya.

1. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* Secara Kualitatif

- a. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan.

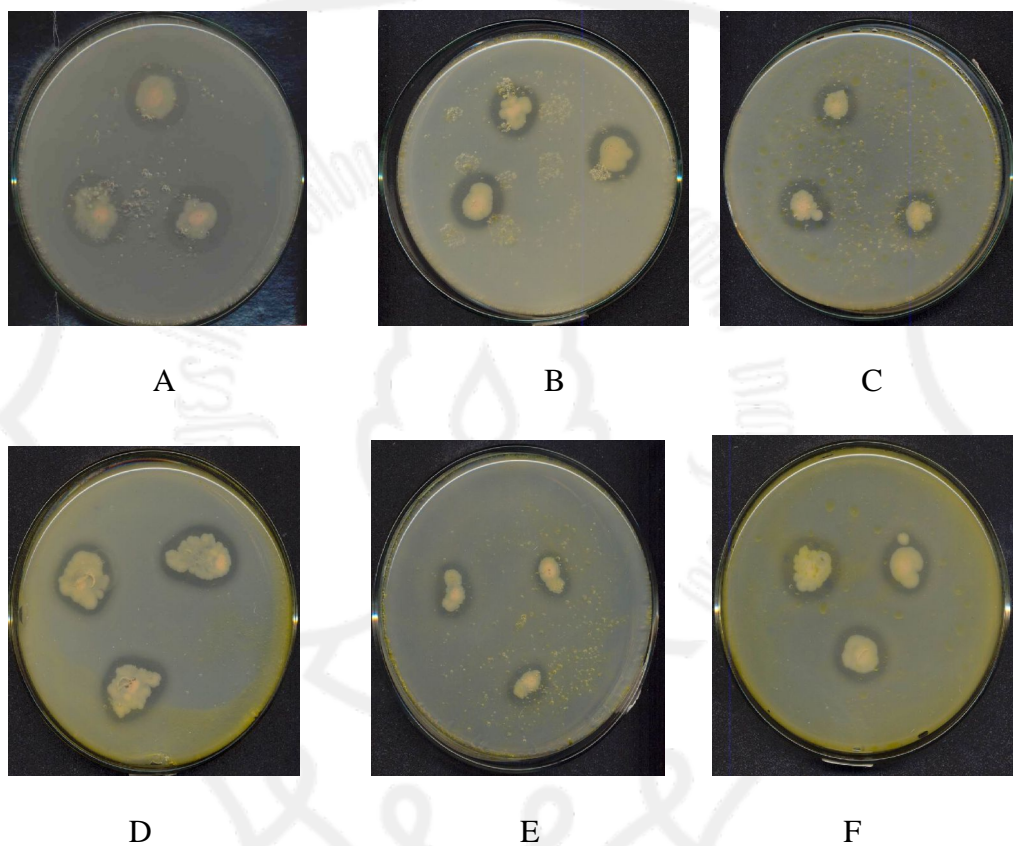
n-hexan merupakan pelarut non polar yang dapat melarutkan senyawa-senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan yang bersifat non polar. Senyawa metabolit sekunder non polar yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) meliputi minyak atsiri yang terdiri atas *1-cyclo-isoprene myrcene* (85%), *aromatic sesquiterpene phenol*, dan *xanthorrhizol* (20%) (Chu, 2004).

Diameter zona bening dan diameter isolat *A. Hydrophila* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel. 1 Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan.

No.	Persentase Ekstrak (%)	Diameter Isolat (mm)	Diameter zona bening (mm)
1	0	14,8	21,0
2	2	14,2	18,5
3	4	11,0	13,0
4	6	17,5	23,5
5	8	10,0	12,0
6	10	14,0	20,0

Dari tabel 1 terlihat bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% tidak menghambat produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini dapat dilihat dari tetap terbentuknya zona bening pada medium LB agar di sekitar biakan *A. hydrophila*, seperti pada gambar 7.



Gambar 7. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan.

Keterangan :

- A : Kontrol positif (n-hexan)
- B : + 2% ekstrak
- C : + 4% ekstrak
- D : + 6% ekstrak
- E : + 8% ekstrak
- F : + 10% ekstrak

Dari gambar 7 terlihat bahwa ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, dan kontrol positif (4% n-hexan), tidak menunjukkan adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini dapat diketahui dengan tetap terbentuknya zona bening pada medium LB agar di sekitar biakan *A. hydrophila*. Diameter zona bening paling kecil terjadi pada pemberian 8% ekstrak yaitu sebesar 10 mm. Diameter zona bening berkurang karena diameter isolat *A. hydrophila* juga mengalami pengurangan maka dianggap bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan pada variasi konsentrasi 2% hingga 10% tidak menghambat produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*, sehingga tidak dilanjutkan pada uji kuantitatif untuk mengetahui berapa persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Dari penelitian ini diketahui bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut n-hexan tidak menghambat aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*. Tidak terhambatnya aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila* diduga karena senyawa-senyawa aktif non polar yang terkandung dalam ekstrak tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing*. Selain itu ekstrak yang bersifat non polar memungkinkan ekstrak tidak dapat larut sempurna dengan medium sehingga tidak terjadi proses penghambatan aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*.

b. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.) dengan Pelarut Etil Asetat.

Senyawa semi polar yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) di antaranya adalah *curcumin* (62%) dan *desmethoxycurcumin* (38%). Untuk dapat melarutkan kedua senyawa di atas maka harus dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut semi polar. Salah satu jenis pelarut semi polar yang biasa digunakan dalam proses ekstraksi adalah etil asetat.

Diameter zona bening dan diameter isolat *A. hydrophila* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel. 2 Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat

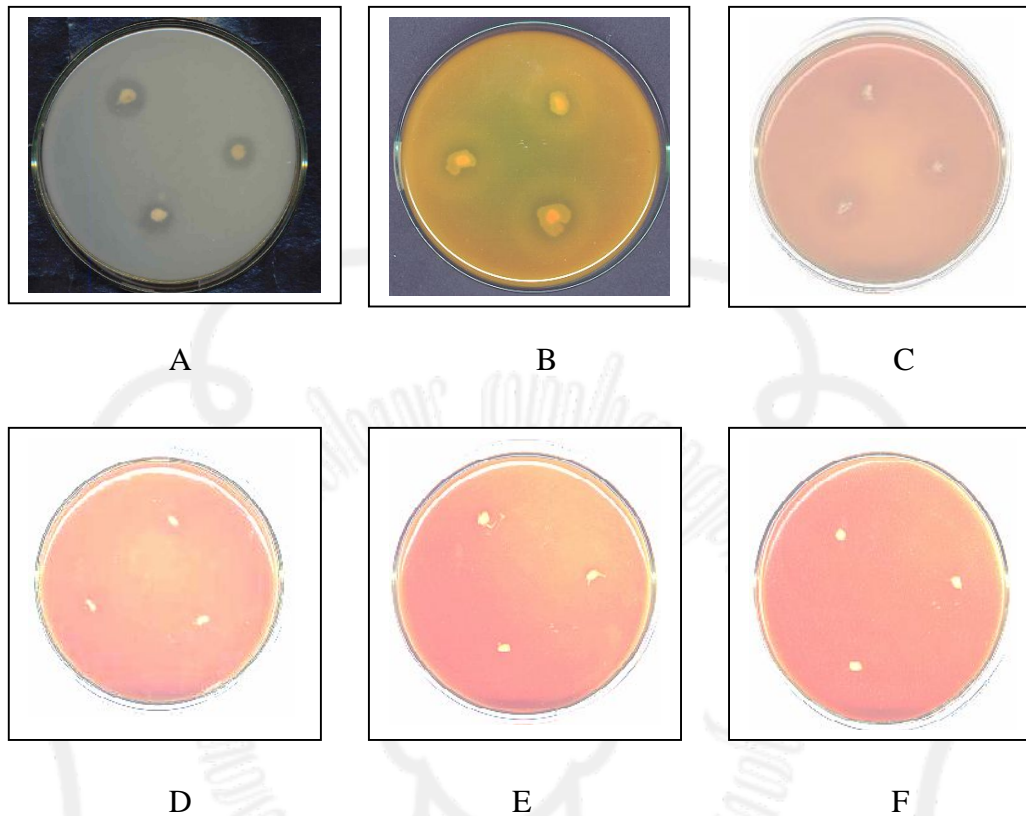
No.	Persentase Ekstrak (%)	Diameter isolat (mm)	Diameter zona bening (mm)
1	0	11,0	13,0
2	2	12,5	14,0
3	4	7,0	-
4	6	5,0	-
5	8	5,0	-
6	10	5,0	-

Keterangan:

- : tidak terbentuk zona bening

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat mampu menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa disertai penghambatan pertumbuhan. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak

rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat.

Keterangan :

- A : Kontrol (etil asetat)
- B : + 2% ekstrak
- C : + 4% ekstrak
- D : + 6% ekstrak
- E : + 8% ekstrak
- F : + 10% ekstrak

Dari gambar 8 dapat dilihat bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10% menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sekaligus menghambat produksi enzim eksoprotease. Terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila* dapat dilihat dari

kecilnya diameter koloni yaitu hanya 5 mm atau sama dengan diameter isolat awal yaitu sebelum diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sedangkan penghambatan produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dari tidak terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*. Pada konsentrasi 2%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh dan memproduksi enzim eksoprotease. Pada konsentrasi 4%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh namun tidak terbentuk zona bening.

Penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga karena senyawa anti bakteri yang terkandung dalam ekstrak juga semakin meningkat. Pada konsentrasi 4% *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh, namun aktivitas enzim eksoprotease mengalami penurunan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya penghambatan sistem *quorum sensing* yang mengatur sintesis enzim eksoprotease oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak yaitu *curcumin*. Menurut Rukayadi and Hwang (2004), *curcumin* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum*, yang memiliki molekul sinyal berupa C4-HSL atau sama dengan molekul sinyal pada *A. hydrophila*. Penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* oleh ekstrak pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%, diduga karena adanya *curcumin* yang juga berperan sebagai senyawa antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Negi *et al.* (1999) menunjukkan bahwa *curcumin* dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

c. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol.

Etanol merupakan senyawa yang dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, kumarin, antrakinon, dan steroid (Anonim, 1986). Etanol bersifat polar sehingga mampu melarutkan senyawa-senyawa polar pada rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) yang di antaranya adalah zat tepung, gula dan polisakarida.

Diameter zona bening dan diameter isolat *A. hydrophila* dapat dilihat pada tabel 3.

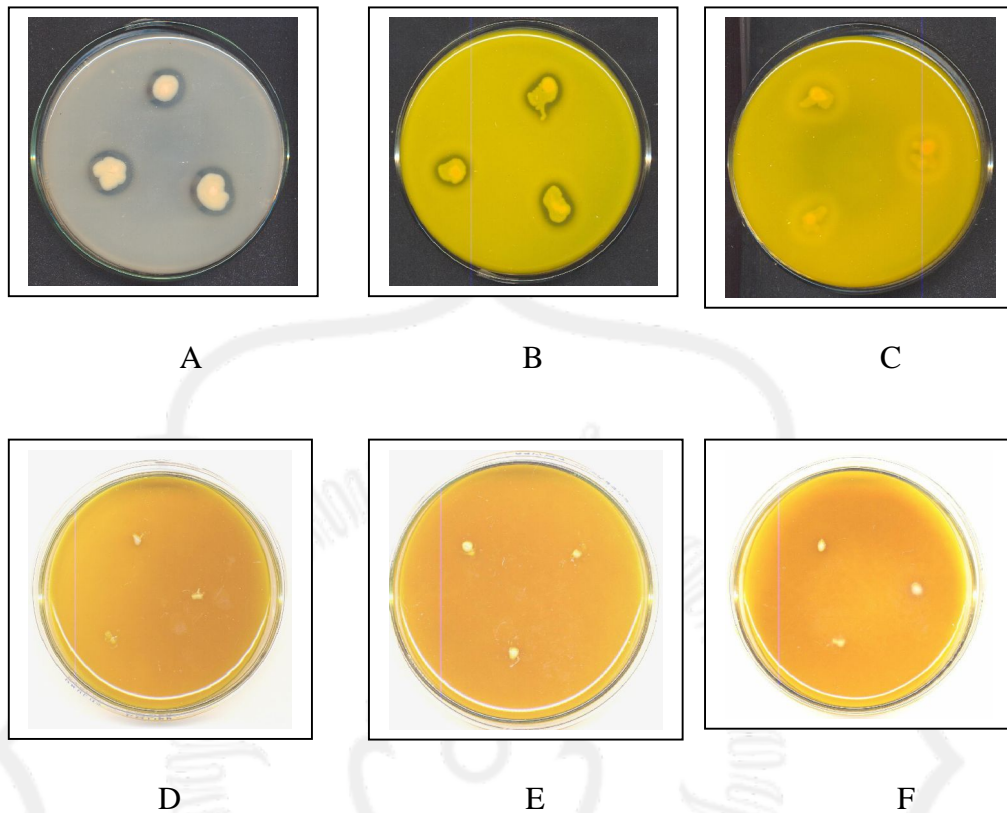
Tabel. 3 Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol.

No.	Persentase Ekstrak (%)	Diameter Isolat (mm)	Diameter zona bening (mm)
1	0	12,0	15,0
2	2	11,5	14,0
3	4	10,5	10,0
4	6	5,0	-
5	8	5,0	-
6	10	5,0	-

Keterangan:

- : tidak terbentuk zona bening

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol mampu menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa disertai penghambatan pertumbuhan. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol.

Keterangan :

- A : Kontrol positif (etanol)
- B : + 2% ekstrak
- C : + 4% ekstrak
- D : + 6% ekstrak
- E : + 8% ekstrak
- F : + 10% ekstrak

Dari gambar 9 terlihat bahwa pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol menyebabkan penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%. Penghambatan produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dari tidak terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*, sedangkan penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* dapat dilihat dari tidak bertambahnya

diameter isolat *A. hydrophila* yaitu 5 mm atau sama dengan diameter isolat awal sebelum diinkubasi. Pada konsentrasi 4%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh tetapi terjadi penurunan aktivitas enzim eksoprotease, karena diameter zona bening yang terbentuk di sekitar biakan *A. hydrophila* lebih kecil jika dibandingkan dengan kontrol (etanol) yaitu hanya 10 mm jika dibandingkan dengan diameter zona bening pada kontrol yaitu sebesar 15 mm. Pada konsentrasi 2%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh dan tetap memproduksi enzim eksoprotease sehingga terbentuk zona bening dengan diameter 14 mm di sekitar biakan bakteri.

Senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease adalah senyawa gula. Menurut Secades and Guijaro (1999), glukosa dan senyawa gula yang lain dapat menghambat produksi enzim eksoprotease pada *Yersinia ruckeri*. Produksi enzim eksoprotease pada *Y. ruckeri* juga diregulasi oleh sistem *quorum sensing* tipe LuxIR.

Penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga karena senyawa anti bakteri yang terkandung dalam ekstrak juga semakin meningkat. Pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%, pertumbuhan *A. hydrophila* terhambat. Senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol adalah senyawa gula. Menurut Jawetz *et al.* (1996), senyawa gula memiliki gugus polar yang dapat menurunkan tegangan muka dinding sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri, akibatnya pertumbuhan bakteri terhambat.

2. Penghambatan Aktivitas Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

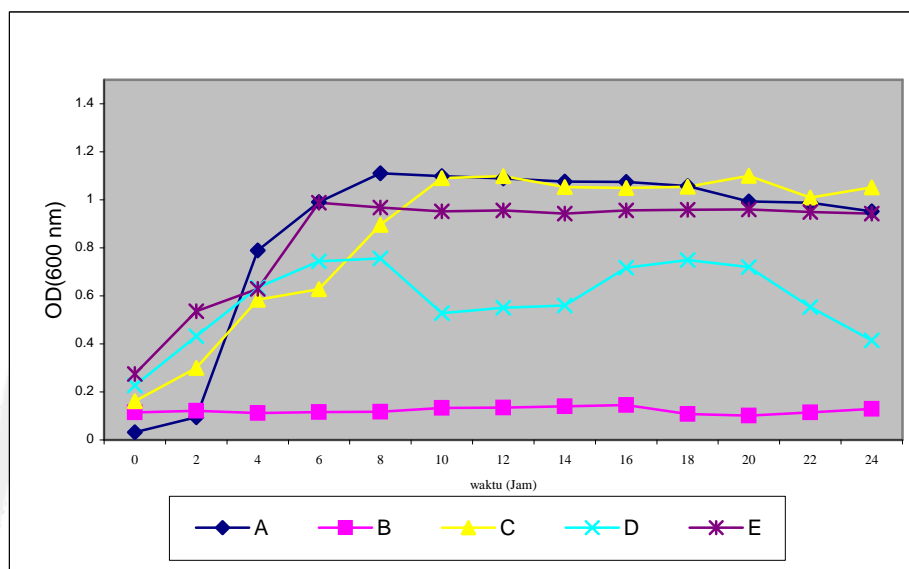
Secara kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.). Ada dua macam pengukuran pada uji kuantitatif yaitu pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dalam mendegradasi *azocasein* dan pengukuran nilai *Optical Density* (OD) untuk mengetahui pertumbuhan *A. hydrophila*. Uji kuantitatif hanya dilakukan pada perlakuan yang secara kualitatif menunjukkan penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya. Dari uji kualitatif diketahui bahwa 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya, sehingga uji kuantitatif hanya dilakukan pada kedua perlakuan tersebut.

a. Kurva pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*

Pengukuran pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan karena terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*. Penghambatan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh terhambatnya sistem *quorum sensing* yang mengatur sintesis enzim tersebut oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.), sehingga produksi enzim eksoprotease juga mengalami penurunan.

Pengukuran nilai OD *A. hydrophila* dilakukan pada panjang gelombang 600 nm dan dilakukan tiap 2 jam sekali selama 24 jam. Dari pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada gambar 10.



Gambar 10. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila* selama 24 jam.

Keterangan :

- A : Kontrol Negatif (tanpa pemberian pelarut)
- B : Kontrol Positif (4% etil asetat)
- C : Kontrol Positif (4% etanol)
- D : +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat
- E : +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol

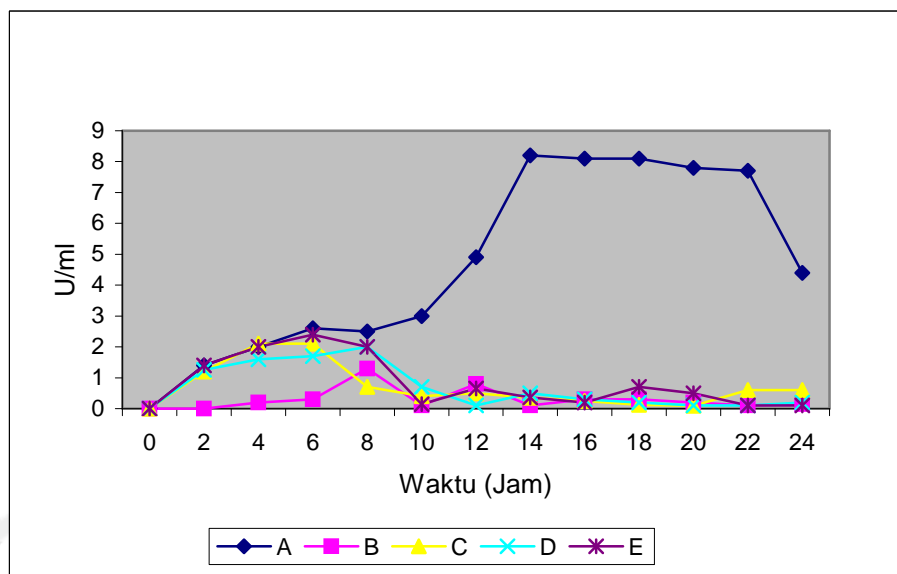
Dari kurva pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui bahwa dengan pemberian 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*, meskipun ada penurunan nilai OD jika dibandingkan dengan kontrol positif (4% etanol) dan kontrol negatif. Sedangkan pemberian 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat menyebabkan *A. hydrophila* agak terhambat jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan pada kontrol positif (4% etil asetat) pertumbuhan *A. hydrophila* terhambat dengan nilai OD relatif sama dari jam ke-0

hingga jam ke-24. Penghambatan diduga karena senyawa etil asetat dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*, sedangkan ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* karena kandungan etil asetat pada ekstrak relatif lebih sedikit setelah mengalami proses penguapan dengan *rotary evaporator*.

Gambar 10 menunjukkan fase-fase pertumbuhan *A. hydrophila* dengan pemberian 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol. Secara umum fase lag terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-2, fase log terjadi pada jam ke-2 hingga jam ke-6 dan fase stationer terjadi pada jam ke-6 hingga jam ke-24. Menurut Schlegel dan Schmidh (1994), pada fase lag pertumbuhan bakteri berlangsung lambat karena bakteri harus beradaptasi dengan medium baru. Pada fase log pertumbuhan bakteri berlangsung cepat karena ketersediaan nutrisi yang cukup. Selanjutnya pada fase stationer pertambahan jumlah bakteri sangat sedikit karena ketersediaan nutrisi yang semakin terbatas.

Kurva pertumbuhan *A. hydrophila* selanjutnya dibandingkan dengan kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*, untuk memastikan bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease bukan disebabkan karena terjadinya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Pengukuran nilai unit aktivitas enzim eksoprotease dilakukan bersamaan dengan pengukuran nilai OD *A. hydrophila*. Dari pengukuran unit aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* diperoleh kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* seperti pada gambar 11.



Gambar 11. Kurva produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*

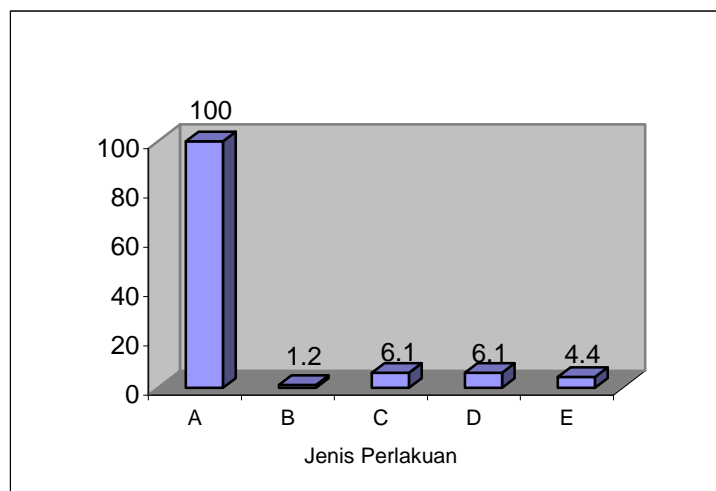
Keterangan :

- A : Kontrol Negatif (tanpa pemberian pelarut)
- B : Kontrol Positif (4% etil asetat)
- C : Kontrol Positif (4% etanol)
- D : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat
- E : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol

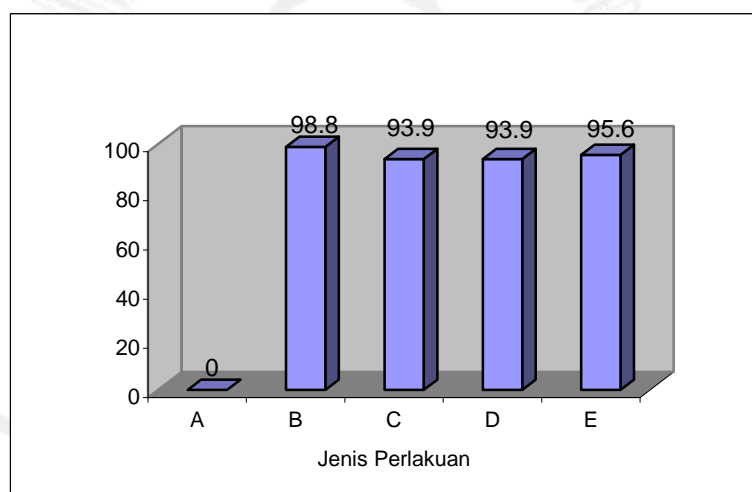
Dari gambar 11 terlihat bahwa produksi enzim eksoprotease baru terdeteksi pada jam ke-2 atau pada saat *A. hydrophila* mengalami fase log, kecuali pada kontrol positif (4% etil asetat) produksi enzim baru terdeteksi pada jam ke-4. Menurut penelitian yang dilakukan oleh O'Reilly dan Day (1983) aktivitas proteolitik pada *A. hydrophila* terdeteksi pada saat fase log. Produksi enzim eksoprotease tertinggi terjadi pada jam ke-14, atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stationer. Sedangkan produksi enzim eksoprotease bersifat konstan pada jam ke-14 hingga jam ke-24. Produksi enzim eksoprotease tertinggi terjadi pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stationer, hal ini diduga terkait dengan penyediaan nutrisi bagi *A. hydrophila*.

Dari kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat bahwa 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini dapat diketahui dari menurunnya nilai unit aktivitas enzim. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (etil asetat dan etanol). Penghambatan produksi enzim eksoprotease mulai terjadi pada jam ke-8 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki awal fase stationer.

Produksi enzim eksoprotease tertinggi pada kontrol negatif terjadi pada jam ke-14 dan produksi enzim pada jam tersebut dianggap 100%. Dengan demikian diperoleh persentase penurunan aktivitas enzim eksoprotease dari seluruh perlakuan. Nilai persentase diperoleh dengan membandingkan nilai unit aktivitas perlakuan dengan kontrol kemudian dikalikan 100%. Grafik Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14 dan persentase penurunannya dapat dilihat pada gambar 12 dan gambar 13.



Gambar 12. Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14



Gambar 13. Persentase penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14

Keterangan :

A : Kontrol Negatif (tanpa pemberian pelarut)

B : Kontrol Positif (4% etil asetat)

C : Kontrol Positif (4% etanol)

D : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat

E : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etano

Dari gambar 13 dapat dilihat bahwa penghambatan terbesar terjadi pada kontrol positif (4% etil asetat) yaitu sebesar 98,8%. Aktivitas enzim eksoprotease terhambat diduga karena pertumbuhan *A. hydrophila* juga terhambat. Penghambatan terhadap aktivitas enzim eksoprotease juga terjadi pada kultur *A. hydrophila* yang ditambah dengan 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol tanpa menghambat pertumbuhannya. Persentase penurunannya masing-masing adalah 93,9% dan 95,6%.

Pada pemberian 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol menyebabkan aktivitas enzim eksoprotease menurun tanpa menghambat pertumbuhannya. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (4% etanol). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* adalah gula, polisakarida dan zat tepung. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Secades dan Guijjaro (1999), senyawa glukosa dan senyawa gula yang lain dapat menghambat produksi enzim eksoprotease *Yersinia ruckeri*. Produksi enzim eksoprotease pada bakteri gram negatif tersebut juga diregulasi sistem *quorum sensing* tipe LuxIR. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (4% etanol) sehingga diduga ada pengaruh pelarut terhadap proses penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Menurut Katri *et al.* (2003), etanol dan *erythromycin* atau kombinasi keduanya dapat menghambat produksi *pyocynin*, protease, hemolisin dan lektin pada *Pseudomonas aeruginosa*. Produksi keempat senyawa di atas juga diregulasi oleh sistem *quorum sensing*.

Pada kontrol positif (4% etil asetat), produksi enzim mengalami penurunan sebesar 98,8% dibandingkan dengan kontrol negatif. Produksi enzim eksoprotease menurun diduga karena pertumbuhan *A. hydrophila* juga terhambat. Sedangkan pada penambahan 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) pertumbuhan *A. hydrophila* tidak terhambat, namun aktivitas enzim eksoprotease menurun sebesar 93,9% jika dibandingkan kontrol negatif. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* kemungkinan disebabkan adanya senyawa *curcumin* pada ekstrak. Menurut Rukayadi and Hwang (2004) *curcumin* mampu menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum*, meski mekanisme penghambatannya belum diketahui.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Terdapat penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat dan etanol.
2. Ekstrak yang memiliki kemampuan terbesar dalam menghambat produksi enzim eksoprotease adalah ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol yaitu sebesar 95,6%, meski demikian diduga terdapat pengaruh pelarut terhadap penghambatan produksi enzim tersebut.

B. SARAN

Diharapkan ada penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa pada ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) yang berperan dalam menghambat aktivitas enzim eksoprotease serta analisis ekspresi gen untuk mengetahui secara pasti mengenai adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.).

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Alavandi, S., S. A. Ananthan., and G. Kang. 1998. Prevalence In Vitro Secretory Activity, and Cytotoxicity of *Aeromonas* Species Associated with Childhood Gastroenteritis in Chennai (Madras), India. *Jpn. J Med. Sci. Biol.* (51) : 1-12.
- Angka, S. L. 2001. *Studi Karakterisasi dan Patologi Aeromonas hydrophila Pada Ikan Lele Dumbo (Clarias gariepinus)*. Makalah Falsafah Sains Institut Pertanian Bogor.
- Anguilar, A., S. Merino., X. Rubires., and M. Thomas. 1997. Influence of Osmolarity on Lipopolysaccharides and Virulence of *Aeromonas hydrophila* Serotype 0:34 Strain Grown at 37°C. *Infect Immun.* 65 (4) : 1245-1250.
- Anonim, 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2004. Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza*). <http://www.situshijau.co.id/tanaman/obat/t.htm>.
- Araujo, R. M. R. M. Arribas., and R. Pares. 1991. Distribution of *Aeromonas* Species in Waters with Different Levels of Pollution. *J. Appl. Bact.* (71) : 182.
- Brooks, G. F., J. S. Butel., and S. A. Morse. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology*. MC Graw Hill, Boston.
- Colle, J. G., A. G. Fraser., and B. P. Marmion. 1996. *A Practical Medical Microbiology*. Churchill Livingstone, New York.
- Chu, J. H. K. 2005. *Curcuma xanthorrhiza*. [http : // www. thedao.com/temulawak.htm](http://www.thedao.com/temulawak.htm).
- Ellis, A. E., T. S. Hasting., and A. L. S. Munro. 1981. The Role of *Aeromonas salmonicida* Extracellular Product in the Pathology of Furunculosis. *J Fish Dis.* (4) : 41-51.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.

- Gavriel, A. A., J. P. Landre., and A. J. Lamb.1998. Incidence of Mesophilic *Aeromonas* Within A Public Drinking Water Supply in North-East Schotland. *J. Appl. Microbiol.* (84) : 383-392.
- Harmani., M. J. Djas dan N. Said. 2001. Penapisan Hayati Antimikrobal Ekstrak Buah Pisang Batu (*Musa brachicarpa*). *Jurnal Natural.* 1 (1) : 34-37.
- Hanlon, G and N. A. Hodges. 1981. Bacitracin and Protease Production in Relation to Sporulation During Exponential Growth of *Bacillus Licheniformis* on Poorly Utilized Carbon and Nitrogen Sources. *J. Bacteriol.* 162 (2) : 427-431.
- Hayes, J. 2000. *Aeromonas hydrophila*. <http://www.hmsc.orst-edu/classes/hydrophilahayes>.
- Hentzer, M and M. Givskov. 2003. Pharmacological Inhibition of Quorum Sensing for the Treatment of Chronic Bacterial Infection. *J. Clint. Invest.* (112) : 1300-1307.
- Holt, J. G., N. R. Krieg., P. H. A. Sneath., J. T. Staley., and S. T. Williams. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Lippincott William and Wilkins, Baltimore.
- Ibrahim, A and I. C. Mac Rae. 1991. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria sp* in Red Meat and Milk Sample in Brisbane, Australia. *Int. J. Food. Microbiol.* (12) : 263.
- Jawetz, E., J. Melnick., E. Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Katri, N. M., N. Garber., N. Gilboa-Garber. 2003. Submic Erythromycin-Ethanol Combination Effect on *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence in Absence and Presence of Choline. *Abstract from The Second Annual Meeting of The Israel Association of Veterinary Microbiology and Immunology.* (59) : 1-2
- Kievit, T.R and B. H. Iglewsski. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationship. *Infect. and Immun.* P. 4839-4849.
- Ko, C. W., S. R. Chiang., H. C. Lee., H. J. Tang., Y. Y. Wang., and Y. C. Chuang. 2003. In vitro and In Vivo Activities of Fluoroquinolones Againsts *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 47 (7) : 2217-2222.
- Krovacek, K., V. Pasquale., S. B. Baloda., V. Soprano., M. Conte., and S. Dumontet. 1994. Comparison of Putative Virulence Factors in

- Aeromonas hydrophila* Strains Isolated From Marine Environmental and Human Diarrheal Cases in Southern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* (60) : 1379-1382.
- Leung, K. Y and R. M. W. Stevenson. 1988. Tns-Induced Protease Deficient Strains of *Aeromonas hydrophila* with Reduced Virulence for Fish. *Infect Immun.* (56) : 2639-2644.
- Lewenza, S., B. Conway., E. P. Greenberg., and P. A. Sokol. 1999. Quorum-sensing in *Burkholderia cepacia* : Identification of *luxRI* Homologs *CepRI*. *Journal of Bacteriology.* (181) : 748-750.
- Lewis, K. 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* (45) : 999-1007.
- Longworth, D. L. 2000. *Hand Book of Infectious Disease*. Spring house Corporation, Spring House.
- Lynch, M. J. 2002. The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* (4) : 18-28.
- Maleej, S., A. Mahjoubi., A. Elazri., and S. Dukan. 2003. Simultaneous Effect of Factors on Motile *Aeromonas* Dynamics in an Urban Effluent and in the Natural Sea Water. *Water Res.* (37) : 2865-2874.
- Maleej, S., M. Denis., and S. Dukan. 2004. Temperature and Growth, Phase Effect on *Aeromonas hydrophila* Survival in Natural Sea Water Microcosms : Role of protein synthesis and Nucleid Acid Content on Viable but Temporarily non Culturable Response. *Microbiology.* 150 : 181-187.
- Murray, R. K., D. K. Granner., P. A. Mayes., V. W. Rodwell. 1997. *Biokimia Harper* (Diterjemahkan Oleh A. Hartono). Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Negi, P. S., G. K. Jayaprakasha., L. J. M. Rao., and K. K. Sakhariah. 1999. Antibacterial Activity of Turmeric Oil : A by Product From Curcumin Manufacture. *J. Agric. Food. Chem.* 47. (10) : 4297-4300.
- Noga, E. J. 1995. *Fish Disease : Diagnosis and Treatment*. The C. V. Mosby Company, Missouri.
- O'Reilly and D. F. Day. 1983. Effect of Cultural Conditions of Protease Production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* (45) : 1132-1135.

- Parsek, M. R., D. L. Val., B. L. Hanzeika., J. E. Cronan Jr., and E. P. Greenberg. 1999. Acyl Homoserine Lactone Quorum-sensing Signal Generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (96) : 4360-4365.
- Peters, L., G.M. Konig., A.D. Wright., R. Pukall., E. Stackebrandt., L. Eberl., and K. Riedel. 2003. Secondary Metabolites of *Flustra foliacea* and Their influence on Bacteria. *Appl. and Envirom. Microbiol.* P. 3469-3475.
- Purnomo, A. T. dan D.A. Purwanto. 2001. *Karakterisasi Enzim Proteolitik Bacillus Subtilis FNCC 0059*. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Rice, S. A., M. Givskov., P. Steinberg., and S. Kjelleberg. 1999. Bacterial Signal and Antagonist : The Interaction Between Bacteria and higher Organism. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1) : 23-31.
- Robert, R. J. 1993. Motile Septicemia. In Inglis, V., R. J. Robert., N. R. Bromage. Bacterial Disease of Fish. *Blackwell Scientific Publ*, p : 143-147.
- Rodrigues, L. A., A. E. Ellis and T. P. Nieto. 1992. Purification and Characterization of an Extracellular Metalloprotease, Serine Protease, and Hemolysin of *Aeromonas hydrophila* Strain B₃₂ : All are Lethal for Fish. *Microb. Pathogen.* (13) : 17-24.
- Rukayadi, Y and J. K. Hwang. 2004. *Inhibition of Quorum Sensing for the Conol of Bacterial Infection*. Buku Panduan dan Kumpulan Abstrak Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia
- Secades, P and J. A. Guijarro. 1999. Purification and Characterizatio of an Extracellular Proteases from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Appl. and Envirom. Microbiol.* 65 (9) : 3969-3975.
- Smith, R. S and B. H. Iglewski. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing as a Potential Antimicrobial Taarget. *J. Clint. Invest.* (112) : 1460-1465.
- Stenis, C. G. G. J. V. 1997. *Flora : Untuk Sekolah di Indonesia*. PT. Pradnya Paramita, Jakarta.
- Suwanto, A. 2005. Strategi Baru Mengendalikan Penyakit Infeksi. [http:// www.kompas.com/kompas-cetak/0211/081/iptek/mema36.htm](http://www.kompas.com/kompas-cetak/0211/081/iptek/mema36.htm).
- Swift, S., A. V. Karlyshev., E. L. Durant., M. K. Winson., S. R. Chhabra., S. Macintyre., and G. S. Stewart. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* : Identification af the LuxRI

homologs AhyRI and AsaRI and Their Cognate N-Acyl-Homoserine Lactones Signal Molecules. *J. Bacteriol.* 179 (17) : 5271-5281.

Swift, S., M.J. Lynch., L. Fish., D. F. Kirke., J.M Tomas., G. S. A. B. Stewart., and P. Williams. 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Eksoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. and Immun.* (4) : 18-28

Taga, M. E and B. L. Bassler. 2003. Chemical Communication Among Bacteria. *PNAS.* (100) : 14549-14554.

Thune, R. L., M. C. Jhonson., T. E. Graham., R. I. Amborski. 1986. *Aeromonas hydrophila* beta-Hemolysin : Purification and Examination of its Role in Virulence in O-group Channel Catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish. Dis.* (9) : 55-61.

Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Tortora, G. J., B. R. Funke and C. L. Case. 1994. *Microbiology : An Introduction Fifth Edition*. The Benyamin/ Cummings Publishing Company Inc, Redwood City.

Wallman, S. 1997. Luria-Bertani Medium. [http:// biotech.nhtc.edu/v/SOP/medial.html](http://biotech.nhtc.edu/v/SOP/medial.html).

Lampiran 1. Nilai OD pada *Aeromonas hydrophila*

Jam ke-	Nilai <i>optical density</i>				
	A	B	C	D	E
0	0.0313	0.1150	0.1615	0.2273	0.2740
2	0.0949	0.1210	0.3000	0.6330	0.5355
4	0.7887	0.1120	0.5845	0.6346	0.6300
6	0.9913	0.1163	0.6275	0.7440	0.9875
8	1.1107	0.1176	0.8965	0.7560	0.9680
10	1.0987	0.1326	1.0910	0.5276	0.9520
12	1.0892	0.1343	1.0980	0.5510	0.9560
14	1.0754	0.1400	1.0530	0.5606	0.9425
16	1.0745	0.1453	1.0500	0.7176	0.9565
18	1.0568	0.1076	1.0545	0.7490	0.9590
20	0.9928	0.1013	1.1011	0.7203	0.9605
22	0.9876	0.1153	1.0090	0.5540	0.9500
24	0.9515	0.1286	1.0520	0.4143	0.9430

Keterangan :

A : Kontrol Negatif (tanpa pemberian pelarut)

B : Kontrol Positif (4% etil asetat)

C : Kontrol Positif (4% etanol)

D : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetat

E : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol

Lampiran 2. Unit aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Jam ke-	Unit aktivitas/ml (U/ml)				
	A	B	C	D	E
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,40	0,00	1,25	1,25	1,30
4	2,40	0,20	2,40	2,40	1,60
6	2,60	0,30	2,50	2,30	1,70
8	2,50	1,30	2,13	2,13	2,00
10	3,00	0,10	0,70	0,70	0,14
12	4,90	0,80	0,40	0,10	0,65
14	8,20	0,10	0,50	0,50	0,36
16	8,10	0,30	0,30	0,30	0,20
18	8,10	0,30	0,20	0,20	0,70
20	7,80	0,20	0,10	0,10	0,50
22	7,70	0,10	0,10	0,10	0,10
24	4,40	0,15	0,20	0,20	0,10

Keterangan :

A : Kontrol Negatif (tanpa pemberian pelarut)

B : Kontrol Positif (4% etil asetat)

C : Kontrol Positif (4% etanol)

D : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etil asetatE : + 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* (Roxb.) dengan pelarut etanol

Lampiran 3. Komposisi Medium

1. Luria-Bertani (LB) Broth dalam 1 Liter (Wallman, 1997)

Tryptone.....	10.0 g
Yeast Ekstrakt.....	5.0 g
NaCl.....	10.0 g
Glukosa.....	5.0 g

2. Luria-Bertani (LB) Agar dalam 1 Liter (Wallman, 1997)

Tryptone.....	10.0 g
Yeast Ekstrakt.....	5.0 g
NaCl.....	10.0 g
Agar.....	15.0 g

3. Nutrient Agar

Agar.....	10.0 g
Pepton.....	10.0 g
NaCl.....	10.0 g
Yeast Ekstrakt.....	10.0 g
Beef Extract.....	10.0 g

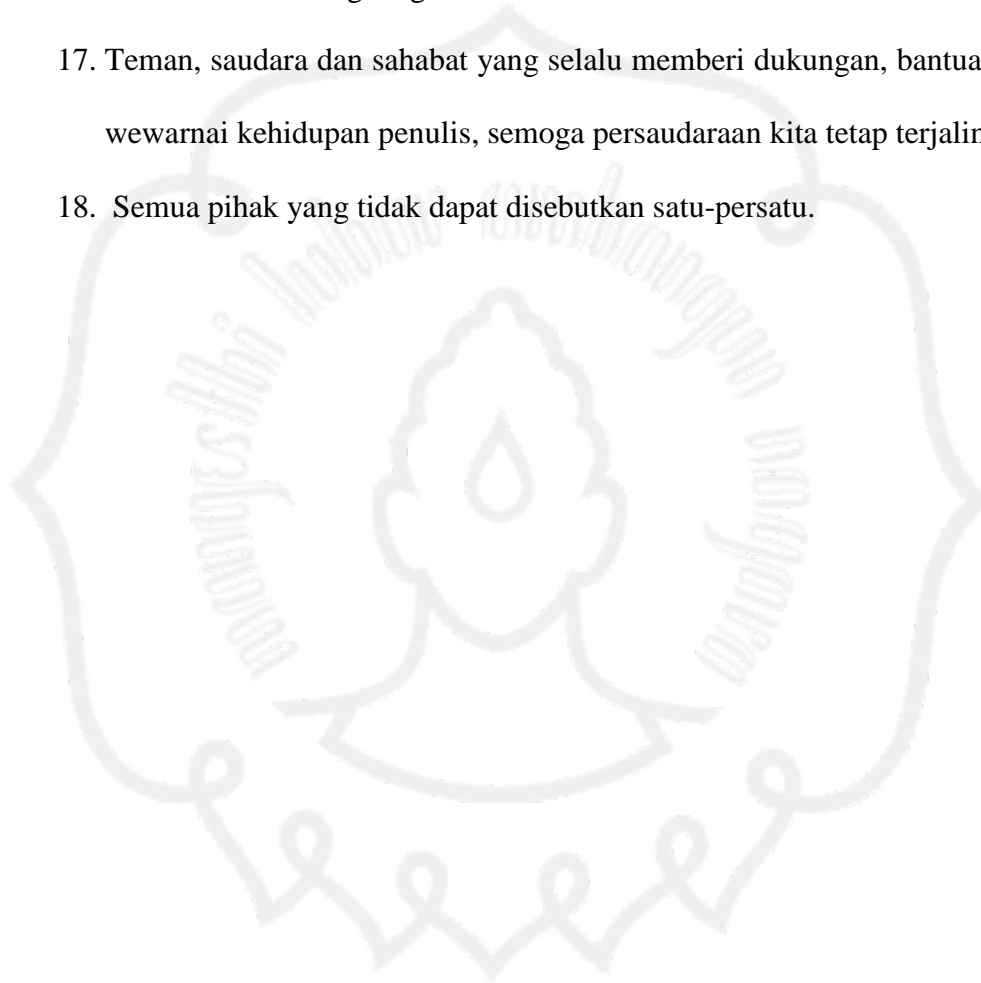
UCAPAN TERIMAKASIH

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“PENGHAMBATAN PRODUKSI ENZIM EKSOPROTEASE *Aeromonas hydrophila* OLEH EKSTRAK RIMPANG TEMU LAWAK (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.))”**. Penyusunan naskah skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Drs. Marsusi, M. S selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Bapak Drs. Wiryanto, M. Si selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.
3. Ibu Artini Pangastuti, M. Si selaku pembimbing I yang telah membimbing dan mengarahkan dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Ari Susilowati, M. Si selaku pembimbing II yang telah membimbing dan mengarahkan dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi.
5. Ibu Dra. Ratna Setyaningsih M. Si, selaku penguji I yang telah memberikan masukan pada skripsi ini dan selaku pembimbing akademik yang telah memberikan masukan selama masa studi penulis.
6. Bapak Agung Budiharjo, M. Si selaku penguji II yang telah memberikan masukan pada skripsi ini.
7. Ibu Nita Etikawati, M. Si selaku penelaah wakil dari Jurusan yang telah memberi masukan pada proposal penelitian ini.

8. Bapak dan Ibu yang telah memberikan seluruh kasih sayang kepada penulis. Keluarga mbak Wury serta mas Hari atas segala bantuan dan dorongan semangat yang diberikan.
9. Kepala Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan izin penelitian, beserta seluruh staff yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian di laboratorium.
10. Bapak Baharudin, staff Laboratorium Penyakit Ikan Jurusan Teknologi Perikanan Fakultas Teknologi pertanian UGM.
11. Fauziah Asri Latifah, thanks for being such a good friend and always being there.
12. Mury, Ami, Aminah, Nunung, Yoan, Annis, Wiwin, Eni untuk semua bantuan, dorongan semangat, perhatian, dan persaudaraan yang indah selama penelitian serta Nuraini (B'02) yang telah banyak membantu.
13. Teman-teman Kost Annur, mbak Uam, mbak Dessy, mbak Lely, Ima, Nanie, Berry, Ennis, Dwi, Nur dan teman-teman eks Annur atas persaudaraan dan persahabatan yang kita jalin serta temanku di Bandung atas support yang diberikan.
14. Teman-teman seperjuangan di Lab, mbak Anik, mbak Tatik, mbak Evi, mas Oga, mas Desta, mbak Dewi, mbak Nanda, mas Meko, dan teman-teman kimia 2001 yang kerja di Lab. Lingkungan, terima kasih atas segala kerjasamanya, serta mbak Mavitra atas bantuanya.

15. Teman-teman Biologi angkatan 2001, Hanif, Harni, Erma, Dian, Endah, Dony, Husna, Erlis, Arni, Hesti, Dini, Hafsah, Hesti, Nurdiya, Puspita, Yeyen, Santi, mbak Vitri, Wahyu, Srisug, Yana, Erna, Ika, Ipung, Atik, Deni, Tommy, Ikwi, Hermanto, Laksito, Setiawan, Rahmat, Danang.
16. Rekan-rekan Biologi angkatan 2000 dan 2002.
17. Teman, saudara dan sahabat yang selalu memberi dukungan, bantuan serta mewarnai kehidupan penulis, semoga persaudaraan kita tetap terjalin.
18. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.



RIWAYAT HIDUP PENULIS

Penulis dilahirkan di Wonogiri pada tanggal 9 Mei 1983. Tahun 1995 penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD Banyak Prodo I. Selanjutnya, penulis menyelesaikan pendidikan menengah di SLTPN I Tirtomoyo pada tahun 1998 dan SMUN 2 Wonogiri pada tahun 2001. Penulis diterima sebagai mahasiswa di Jurusan Biologi FMIPA UNS melalui jalur UMPTN pada tahun 2001.

Selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi FMIPA UNS, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi serta Mikrobiologi Bahan Makanan dan Obat. Penulis pernah menjabat sebagai Kepala Biro Administrasi Keuangan SKI FMIPA pada periode 2004/2005 dan sebagai staff Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi HIMABIO pada periode 2003/2004.

