

EFEK EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) PADA PERTUMBUHAN BAKTERI (*Edwardsiella tarda*) YANG MENGINFEKSI IKAN LELE SANGKURIANG (*Clarias Gariepinus*) SECARA IN VITRO

Didik Budiyanto¹, Sri Oetami Madyowati², Mertin Rianingsih³

¹²³Jurusan Perikanan, Program Studi Budidaya Perairan
Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo Surabaya
e-mail: ¹dbudiyanto_unitomo@yahoo.com

Abstrak

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus*) Secara In Vitro. Perlakuan penelitian konsentrasi minimum ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang menginfeksi ikan lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus*) secara In Vitro adalah sebagai berikut: kontrol Positif 1 ml DMSO 10% (1 ml suspensi kuman), kontrol Negatif= 1 ml ekstrak daun kelordengan konsentrasi 100% + 1 ml DMSO 10%, perlakuan A. Konsentrasi 50 % (1 ml ekstrak daun kelor 100% + 1 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan B. Konsentrasi 40% (0.8 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.2 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan C. Konsentrasi 30% (0.6 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.4 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan D. Konsentrasi 20% (0.4 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.6 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman)

Hasil penelitian Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro dapat disimpulkan sebagai berikut: pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang di ambil dari ikan lele sangkuriang (*Clarias Gariepinus*), konsentrasi ekstrak dau kelor (*Moringa oleifera*) 20 %, 30%, 40% dan 50% dapat menghambat bakteri *Edwardsiella tarda*., pada konsentrasi ekstrak dau kelor (*Moringa oleifera*) 10% bakteri *Edwardsiella tarda* masih tumbuh dengan baik.

Kata Kunci: *Edwardsiella tarda*, *Moringa oleifera*, *Clarias gariepinus*

Pendahuluan

Indonesia memiliki banyak wilayah laut, pesisir, dan pulau-pulau kecil yang luas dan bermakna strategis sebagai pilar pembangunan ekonomi nasional. Selain memiliki nilai ekonomis, sumber daya kelautan juga mempunyai nilai ekologis, di samping itu, kondisi geografis Indonesia terletak pada geopolitis yang strategis, yakni antara lautan Pasifik dan lautan Hindia yang merupakan kawasan paling dinamis dalam arus peredaran politik, pertahanan, dan kemanan dunia. Kondisi geo-ekonomi dan geo-politik tersebut menjadikan sektor kelautan dan perikanan sebagai sektor yang penting dalam pembangunan nasional.

Kebutuhan masyarakat akan ikan air tawar guna mencukupi protein hewani semakin

hari semakin meningkat seiring dengan pertumbuhan jumlah penduduk dan pola penyediaan menu masyarakat yang terus meningkat dan lebih baik. Untuk memenuhi permintaan pasar perlu terus dikembangkan usaha budidaya ikan.

Permasalahan yang sampai saat ini menjadi kendala pokok pada usaha budidaya ikan adalah serangan penyakit. Serangan penyakit yang merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan usaha budidaya perikanan biasanya disebabkan oleh: virus, bakteri, jamur, dan protozoa (Kamiso, dkk., 1993 dalam Suprayogi, 2006). Menurut Meyer dan Bullock (1973) dalam Austin dan Austin (1999), salah satu penyakit yang membahayakan untuk golongan catfish adalah bakteri *Edwardsiella tarda*. Bakteri ini ditetapkan

sebagai Hama dan Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP. 17/MEN/2006 (Kep. Men, 2006). Bakteri *E. tarda* adalah penyebab penyakit Edwardseilosis/Emphisemathous Putrevactive Disease of Catfish (EPDC) atau Edwardsiella Septicaemia (ES) (Pusat Karantina Ikan, 2008).

Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan di atas adalah dengan mengganti penggunaan antibiotik dengan tanaman herbal yang dapat dijadikan sebagai antibakteri. Pemakaian tanaman herbal dalam dekade terakhir ini cenderung meningkat sejalan dengan berkembangnya industri jamu/obat tradisional, farmasi, kosmetik, makanan, dan minuman (Feriyanto, 2009).

Daun kelor telah diketahui mengandung zat aktif antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Enterobacter aerogene* (Thilza et al. 2010). Hal serupa juga dikemukakan oleh Oluduro, (2012) bahwa ekstrak daun kelor dapat menghambat bakteri Gram negatif (*Escherichia colidan Salmonella typhi*) dan Gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus* sp).

Ray-Yu et al. (2007) membuktikan adanya kandungan flavonoid 129 mg di dalam 100 gram daun kelor dalam bentuk kering. Astuti, (2005) dalam Analisa, (2007) mengemukakan terdapat 6,4% saponin dalam 100 gram bahan kering daun kelor. Daun kelor juga mengandung 16,9 gram minyak atsiri dari 7,04 kg bahan kering daun kelor (Chuang et al, 2006).

Berdasarkan penelitian diatas ekstrak daun kelor terbukti mengandung zat antibakteri, sehingga ekstrak daun kelor dapat digunakan sebagai upaya alternatif dalam mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *E. tarda*. Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk menguji Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Yang Menginfeksi

Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro.

Metodologi

1. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian berupa isolate murni bakteri *E. tarda* yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya II, daun kelor berumur kurang lebih dua bulan atau daun yang tidak terlalu muda diperoleh dari lingkungan sekitar di kec. Sedati, Kab. Sidoarjo, etanol 95%, Media Triptic Soy agar (TSA), akuades steril, Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 10%, NaCl fisiologis, H₂O₂ 3%, reagen Kovacs, Reagen uji pewarnaan Gram (gentian violet, lugol iodine, etanol; aseton, dan safranin).

Parafin cair, larutan standar Mc Farland 0.5 (0,05 ml BaCl₂ dan 9,95 ml H₂SO₄), paper oxidase, pH paper, Oxidative-Fermentative (OF) test medium, Simmons's citrat medium, Phenol Red Broth Sugar, Tryptic Sugar Iron Agar (TSIA), Urease, Motility Indol Ornithin (MIO) testmedium, Lysin Iron Sugar (LIA), reagen uji Methyl-Red (MR)/Voges-Proskauer (VP), media uji fermentasi karbohidrat : Glukosa, Maltosa, Manitol, Sorbitol, Arabinosa, Trehalosa , Xylosa, NaCl, Pepton Water, Meat Ekstrak.

Peralatan yang digunakan antara lain oven, mesin giling, timbangan, rotary vacuum evaporator, kertas saring, peralatan gelas, tabung reaksi, jarum ose, lampu bunsen, autoclave, vortex, timbangan analitik dengan ketelitian 0,01g, laminary flow, hot plate stirrer, rak tabung reaksi, alat tulis, mikroskop, refrigerator, termometer dan petridish.

2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang akan didapat menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 2011).

Perlakuan penelitian konsentrasi minimum ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang menginfeksi ikan lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus*) secara In Vitro adalah sebagai berikut: kontrol Positif 1 ml DMSO 10% (1 ml suspensi kuman), kontrol Negatif= 1 ml ekstrak daun kelordengan konsentrasi 100% + 1 ml DMSO 10%, perlakuan A. Konsentrasi 50 % (1 ml ekstrak daun kelor 100% + 1 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan B. Konsentrasi 40% (0.8 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.2 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan C. Konsentrasi 30% (0.6 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.4 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman), perlakuan D. Konsentrasi 20% (0.4 ml ekstrak daun kelor 100% + 1.6 ml DMSO 10% + 1 ml suspensi kuman)

3. Prosedur Penelitian

3.1. Sterilisasi Alat dan Media

Sterilisasi untuk alat-alat yang terbuat dari kaca dan logam disterilisasi dengan Autoclave dengan pengaturan suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atmosfer, dan selanjutnya di oven untuk sterilisasi kering. (BKITP, 2016).

Pengaturan suhu untuk sterilisasi media dibedakan tergantung dengan jenis media yang akan disterilisasi :

Sterilisasi suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atmosfer, untuk jenis bahan TSA, OF, TSIA, LIA, Simmons Citrate, MIO, dan basal untuk campuran karbohidrat.

Sterilisasi suhu 115°C selama 20 menit dan tekanan 1 atmosfer, untuk jenis bahan Urea Agar. (BKITP, 2016).

3.2. Ekstraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Pembuatan ekstrak diawali dengan pengeringan daun kelor pada suhu kamar 25°C dan kemudian digiling menjadi serbuk. Serbuk daun kelor selanjutnya direndam dengan pelarut etanol 95% secukupnya sampai semua serbuk terendam selama 3x24 jam pada suhu kamar 25°C dan disaring dengan kertas saring. Hasil saringan diuapkan dalam rotary vacuum evaporator pada suhu 40°C. Pada akhir proses didapatkan ekstrak murni dengan cairan kental dan berwarna coklat.

Penggunaan etanol 95% dalam proses ekstraksi dikarenakan pelarut tersebut dapat mengisolasi

senyawa flavonoid (Wijono, 2003) dan secara umum dapat mengisolasi flavonoid, saponin dan tanin (Kasolo et al, 2010).

Ekstrak daun kelor selanjutnya diencerkan dengan DMSO 10% sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan (Poeloeng dan Soeripto, 1998 dalam Hermawan, 2007).

3.3. Pembuktian Isolat *E. tarda*

Isolat bakteri *E. Tarda* diperoleh dari Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya II, dari hasil kegiatan Pemantauan tahun 2017. Sebelum digunakan isolat bakteri tersebut diuji kebenarannya apakah karakteristik bakteri tersebut sesuai dengan karakteristik bakteri *E. tarda* (Tabel 1). Bakteri dimurnikan dengan mengambil koloni bakteri dari media TSA miring, goreskan dengan jarum ose steril pada TSA cawan petri. Media TSA yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27-30°C. Berikut cara uji yang dilakukan pada pembuktian isolat bakteri *E. tarda*:

Uji Pendugaan (Presumptive Tests) *Edwardsiella tarda*

• Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Uji TSIA bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan glukosa, laktosa dan sukrosa. Cara kerjanya, yaitu ambil inokulum bakteri dengan jarum ose steril dari isolasi bakteri yang telah dimurnikan di TSA baru kemudian bekasnya yang masih tersisa diinokulasi ke dalam TSIA dengan cara menggoreskan dan di tusuk. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 27-30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada bagian miring dan tusukan tegak, timbul atau tidaknya gas dan H₂S dari bagian tusukan tegak. Jikawarna berubah merah berarti alkali (K), kuning berarti asam (A), dan tanpa perubahan berarti (NC). Jika menghasilkan gas, media terlihat seperti terbelah atau ada ruang dari bagian bawah. Jika timbul warna hitam dari bagian bawah dan sepanjang garis inokulasi media berarti terjadi pembentukan H₂S. (BKITP, 2016).

- **Uji Gram**

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pewarnaan Gram merupakan salah satu teknik pewarnaan yang diferensial. Cara kerjanya yaitu, teteskan akuades steril di atas objek glass, suspensikan satu ose bakteri pada akuades di atas objek gelas tersebut. Fiksasi di atas apibunsen, setelah itu diwarnai dengan meneteskan Gram A (gentian violet) hingga menutupi suspensi dan didiamkan selama 1(satu) menit kemudian bilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Gram B (lugol iodine) ditetaskan hingga menutupi suspensi bakteri dan dibiarkan selama 1(satu) menit, buang pewarnaan Gram B (tidak perlu bilas dengan air mengalir). Kemudian tetesi dengan Gram C (etanol; aseton), setelah itu bilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Gram D (safranin) ditetaskan hingga suspensi bakteri tertutupi dan dibiarkan selama 2 (dua) menit kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Hasilnya dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x, jika preparat berwarna biru atau ungu kristal maka termasuk Gram positif, apabila preparat berwarna merah maka termasuk Gram negatif (BKITP, 2016).

- **Uji Katalase**

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui sifat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Cara kerjanya, yaitu larutan H₂O₂ 3% ditetaskan pada objek glass, kemudian ambil satu koloni bakteri lalu celupkan ke dalam larutan H₂O₂ 3% dengan tusuk gigi steril. Pengamatan dilakukan dengan melihat gelembung udara (busa) dalam waktu ±3 detik maka katalase positif (+), jika tidak timbul gelembung udara (busa) maka katalase negative (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Oksidase**

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya enzim oksidase pada bakteri. Cara kerjanya, yaitu ambil potongan kertas oksidase dan oleskan pada sediaan bakteri murni, di tunggu sampai 30 detik. Hasil positif didapat apabila paper oksidase berubah warna ungu dan hasil negatif apabila paper oksidase tetap berwarna putih atau tidak ada perubahan. (BKITP, 2016).

- **Uji Motility Indole, Ornithin Dekarboxilase (MIO)**

Uji MIO ornithine bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzimatik bakteri untuk mengkarboksilase ornithin menjadi bentuk amine, dan uji MIO indole bertujuan untuk mengetahui produksi indol dari tryptophane. Cara kerjanya, yaitu tusukan kultur bakteri murni pada bagian media MIO dengan posisi tegak lurus. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C media ditetesi dengan larutan Kovacs melalui pinggir tabung sampai terlihat bentuk cincin di bagian atas indol. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna media. Hasil MIO motil, bakteri tumbuh menyebar dari tusukan dan media menjadi keruh dan permukaan banyak bakteri (terlihat warna putih). Non motil, bakteri hanya tumbuh pada garis tusukan. Sedangkan uji MIO indole dengan menetes media MIO dengan Kovacs Indole, jika hasil membentuk cincin berwarna merah Indol positif (+), jika tidak berbentuk cincin berwarna merah, indol negatif (-). Uji Ornithin Dekarboxilase jika media MIO berwarna tetap ungu atau semu ungu, ornithine positif (+), jika MIO berwarna kuning, ornithine negatif (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Oksidatif/Fermentatif (O/F)**

Uji oksidatif/fermentatif (O/F) bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri memecah karbohidrat (glukosa) dalam keadaan aerob (oksidatif) atau anaerob (fermentatif). Cara kerjanya, yaitu ambil kultur bakteri murni dengan jarum ose steril, tusukan ke dalam 2 (dua) tabung. Tabung pertama ditutup dengan parafin cair steril, tabung yang satu tidak ditutup parafin. Pengamatan dilakukan dengan melihat warna tabung setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Hasil fermentatif (F), jika kedua media berubah warna menjadi kuning, sedangkan bersifat oksidatif (O), jika perubahan warna menjadi kuning hanya pada media tanpa parafin cair. Bersifat Non Reaksi (NR), jika tidak terjadi perubahan pada kedua tabung media O/F tersebut (tetap berwarna hijau). (BKITP, 2016).

- **Uji Fermentasi Karbohidrat Glukosa**

Uji glukosa bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri memfermentasi glukosa,

yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna media dari merah menjadi kuning disertai atau tidak gas CO₂. Cara kerjanya, yaitu ambil kultur bakteri murni dengan jarum ose steril, inokulasi ke dalam media glukosa. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Jika warna media berubah dari orange menjadi kuning bersifat asam (A) berarti positif (+), jika warna media berubah orange menjadi merah bersifat alkali berarti negatif (-). (BKITP, 2016).

Uji Kepastian (Confirmatory tests) Edwardsiella tarda

- **Uji Urease**

Untuk mengetahui apakah bakteri mampu menghasilkan enzim urease, enzim urease akan mengubah urea menjadi amoniak (basa). Cara kerjanya, yaitu ambil kultur bakteri murni dengan jarum ose steril, gores ke dalam media Urea Agar. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Jika media berubah warna dari peach menjadi merah muda berarti positif (+), jika media berubah warna dari peach menjadi kuning berarti negatif (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Simmon's Citrate**

Uji Simmon's Citrate bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memanfaatkan citrate sebagai sumber karbon. Cara kerjanya dimulai dengan ambil kultur bakteri murni dengan jarum ose steril, gores ke dalam media Simmon's Citrate. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Pengamatan dilakukan pada perubahan warna media, apabila warna media berubah dari warna hijau menjadi biru atau hitam maka positif (+). Sedangkan apabila tidak terjadi perubahan warna maka negatif (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Lysine Iron Agar(LIA)**

Uji LIA bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri memproduksi lysine. Cara kerjanya dimulai dengan mengambil bakteri murni dengan jarum ose steril, tusuk pada

bagian butt (tegak) kemudian gores pada bagian slunt (miring) pada media Lysine Iron Agar. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Hasilnya jika bagian tusukan dan goresan berwarna ungu (alkali) berarti positif (+), dengan atau tanpa H₂S. Bagian tegak diselimuti warna hitam dari H₂S yang hanya memproduksi pada kondisi alkali. Jika bagian tusukan berwarna kuning dan goresan berwarna ungu atau bagian tusukan dan goresan berwarna kuning berarti negatif (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Methyl red(MR)/Voges-proskover(VP)**

Uji MR bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasi glukosa untuk menghasilkan asam, sedangkan uji VP bertujuan untuk mendefinisasi bakteri yang mampu menghasilkan acetyl carbinol (aceton) dari fermentasi glukosa. Cara kerjanya, yaitu ambil kultur bakteri murni dengan mengambil steril, inokulasikan ke dalam tabung MRVP. Selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Media MRVP yang sudah ditumbuhi bakteri di tuang menjadi 2 (dua) bagian yang sama. 1 (satu) bagian untuk uji MR (Methyl Red) ditetesi dengan Reagen MR, dengan hasil jika warna media menjadi merah berarti positif (+), jika warna media menjadi kuning berarti negatif (-). 1 (satu) bagian lagi ditetesi dengan Reagen VP Barrits dengan perbandingan bagian sebagai berikut: VP 1 (α - naphthol): VP 2 (KOH 40%) = 1 : 1/2 : 1/4, dikocok atau di biarkan sekitar 10 menit. Jika media menjadi merah berarti positif (+), jika media menjadi perunggu berarti negative (-). (BKITP, 2016).

- **Uji Fermentasi Karbohidrat Lain: Maltosa, Manitol, Sorbitol, Arabinosa, Trehalosa dan Xylosa**

Uji fermentasi Karbohidrat ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri melakukan fermentasi karbohidrat. Caranya yaitu dengan ambil kultur bakteri murni dengan jarum ose steril, inokulasikan ke dalam media fermentasi karbohidrat tersebut. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Jika warna berubah dari

orange menjadi kuning bersifat asam (A) berarti positif (+), jika warna media berubah dari orange menjadi merah bersifat alkali (A) berarti negatif (-). (BKITP, 2016).

3.4. Penyiapan Suspensi Bakteri E. tarda

Setelah yakin bahwa isolat bakteri yang digunakan adalah E. tarda, maka selanjutnya dilakukan penyiapan suspensi bakteri E. tarda. Pembuatan suspensi bakteri dimulai dengan meremajakan stok kultur bakteri E. tarda dalam media TSA. Selanjutnya agar tidak terjadi kontaminasi diletakkan dalam laminar air flow selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Selanjutnya beberapakoloni bakteri diambil menggunakan ose steril, kemudian dicampur dengan NaCl fisiologis sebanyak 10 ml dan dihomogenkan dengan cara divortex sampai didapat kekeruhan yang sama dengan suspensi standart Mc Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml).

Suspensi standart Mc Farland 0.5 dibuat dengan mencampurkan 0,05 ml larutan barium klorida (BaCl_2) dan 9,95 ml larutan asam sulfat (H_2SO_4) (Baronet al.1994). Penggunaan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml karena bakteri E. tarda menginfeksi channel catfish pada konsentrasi 108 CFU/ml (Andriyanto dkk, 2009).

3.5. Penentuan Minimum Inhibitor Concentration (MIC)

Minimum Inhibitor Concentration adalah konsentrasi minimum dari suatu bahan yang mengandung zat atau senyawa mikroorganisme. MIC bertujuan untuk menentukan dosis terendah yang dapat menghambat patogen dengan jumlah paling tinggi. Tahap pelaksanaan uji MIC dimulai dengan memasukkansuspensi E. tarda yang telah disetarakan dengan Mc Farland 0.5 sebanyak 1 ml ke dalam 25 tabung yang sudah berisi ekstrak daun kelor dengan berbagai konsentrasi. Tabung kontrol positif berisi 1 ml DMSO 10% dan 1 ml suspensi kuman. Tabung kontrol negatif berisi 1 ml ekstrak daun kelor dan 1 ml DMSO 10%. Kemudian seluruh tabung dihomogenkan dan diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan seluruh tabung reaksi terhadap kekeruhan media secara visual.

3.6. Penentuan Minimum Bacterial Concentration (MBC)

Setelah dilakukan uji MIC, kemudian dilakukan uji MBC untuk mengetahui pertumbuhan bakteri. Caranya, yaitu satu ose dari masing-masing pengenceran tabung diambil, kemudian diinokulasikan pada media TSA dalam cawan petri. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 27-30°C, pertumbuhan bakteri pada media TSA diamati. Hasil negatif ditunjukkan apabila pada media TSA masih terlihat adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan apabila tidak ada pertumbuhan bakteri berarti ekstrak daun kelor menunjukkan hasil positif atau bersifat bakterisidal karena zat tersebut mampu membunuh bakteri (Forbes et al. 1997).

3.7. Parameter Uji

Parameter uji yang diukur pada penelitian ini adalah konsentrasi pengenceran terendah dari ekstrak daun kelor yang menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri E. tarda.

4. Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisa dengan menggunakan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC) yaitu dengan 5 perlakuan dan 5 kali ulangan.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan Minimum Inhibitor Concentration (MIC) pada penelitian Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro disajikan pada tabel berikut ini.

Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor (%)	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	Ulangan V
50	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh
40	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh
30	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh
20	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh
10	Jernih	Jernih	Jernih	Jernih	Jernih
Kontrol (+)	Jernih	Jernih	Jernih	Jernih	Jernih
Kontrol (-)	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh	Keruh

Tabel 2. Hasil Pengamatan Uji MIC secara visual

Keterangan:

Jernih = Transisi dari warna coklat pekat ke warna yang jernih
 Keruh = Dominasi warna ekstrak daun kelor (coklat pekat)
 Kontrol (+) = Bakteri E. tarda dan DMSO 10% (jernih)
 Kontrol (-) = Ekstrak daun kelor dan DMSO 10% (coklat pekat)

Minimum Inhibitor Concentration (MIC) merupakan suatu cara untuk menentukan konsentrasi anti bakteri terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Forbes et al. 1997). Hasil pengamatan secara visual pada uji Minimum Inhibitor Concentration (MIC) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 50% hingga konsentrasi 20% menunjukkan warna coklat keruh. Konsentrasi 10% warna coklat semakin memudar, karena konsentrasi ekstraknya semakin sedikit.

Hasil pengamatan uji Minimum Inhibitor Concentration (MIC) sulit untuk dievaluasi, sehingga tidak dapat ditentukan konsentrasi minimum ekstrak daun kelor yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri E. tarda. Hal ini disebabkan karena hasil dari pengenceran pada konsentrasi 50% sampai dengan 10% menunjukkan kekeruhan yang disebabkan oleh warna dasar ekstrak daun kelor yaitu coklat pekat.

Hasil pengamatan uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC) pada penelitian Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro disajikan pada tabel berikut ini.

Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor (%)	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	Ulangan V
50	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+	+	+
Kontrol (-)	-	-	-	-	-

Tabel 3. Hasil pengamatan uji MBC

Keterangan:

+ = Ada pertumbuhan koloni bakteri
 - = Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri
 Kontrol (+) = Bakteri E. tarda dan DMSO 10%
 Kontrol (-) = Ekstrak daun kelor dan DMSO 10%

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) merupakan konsentrasi antibakteri yang mampu mencegah pertumbuhan bakteri setelah dibiakkan ke media yang bebas zat antibakteri (Gillespie, 1994). Pada metode Minimum Bactericidal Concentration (MBC) seluruh suspensi dalam tabung uji Minimum Inhibitor Concentration (MIC) ditanamkan pada media TSA.

Pada Tabel 3 dapat dilihat pada ulangan pertama sampai ketiga ekstrak daun kelor pada konsentrasi 50% sampai 20% tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri E. tarda, sedangkan pada konsentrasi 10% terdapat pertumbuhan koloni bakteri E. tarda. Berdasarkan hasil tersebut ekstrak daun kelor mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri E. Tarda pada konsentrasi 50% sampai dengan konsentrasi 20% dengan konsentrasi minimum yang dapat membunuh bakteri E. Tarda adalah konsentrasi 20%. Sedangkan konsentrasi 10% ekstrak daun kelor tidak bersifat bakteri sidal terhadap bakteri E. tarda yang ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri E. tarda pada media.

Hasil kontrol negatif (1 ml ekstrak daun kelor dan 1 ml DMSO 10%), tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri E. tarda dan tidak ada pertumbuhan koloni bakteri lain pada media. Dapat disimpulkan bahwa tidak terjadi kontaminasi selama perlakuan pemberian ekstrak daun kelor.

Hasil uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC) pada kontrol positif (1 ml suspensi bakteri E. tarda 1,5x10⁸CFU/ml dan 1 ml DMSO 10%), menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri E. tarda. Hal ini menunjukkan suspensi bakteri E. tarda 1,5x10⁸CFU/ml yang digunakan untuk semua ulangan 1, 2, 3, 4 dan ulangan 5, berada dalam kondisi hidup.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah zat antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC) bertujuan

untuk mengetahui konsentrasi terendah zat antibakteri dalam membunuh bakteri. Semua perlakuan yang diberikan dalam keadaan terkontrol, seperti saat proses pengenceran berseri ekstrak daun kelor dan saat proses pemberian suspensi bakteri *E. tarda* tepat dalam jumlah yang sama, penggunaan media yang tepat, tidak terjadi kontaminasi serta tidak terjadi penurunan suhu selama proses inkubasi.

DMSO 10% digunakan sebagai pelarut sampel dan kontrol. Hal ini dikarenakan DMSO merupakan salah satu pelarut yang sangat polar, sehingga mampu melarutkan air ataupun pelarut polar yang lain. Selain itu DMSO tidak bersifat racun, sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktifitas antibakteri (Vignes, 2000). Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *E. tarda* pada control positif (1 ml suspensi bakteri *E. tarda* 1,5x10⁸CFU/ml dan 1 ml DMSO 10%).

Hasil pengamatan uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) pada konsentrasi 50% sampai 20% menunjukkan warna coklat keruh yang disebabkan oleh dominasi warna coklat pekat dari ekstrak daun kelor. Konsentrasi 10% warna coklat semakin memudar, karena konsentrasi ekstraknya semakin sedikit.

Hasil dari uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) belum dapat menunjukkan daya hambat ekstrak daun kelor terhadap bakteri *E. tarda*. Hal ini dikarenakan warna keruh yang dihasilkan merupakan dominasi dari warna ekstrak daun kelor yaitu coklat pekat, sehingga tidak diamati pertumbuhan bakteri pada media.

Hasil pengamatan uji MBC ekstrak daun kelor pada konsentrasi 50%, 40%, 30%, dan 20% bersifat bakterisidal yang ditandai dengan tidak terlihat pertumbuhan koloni bakteri *E. tarda* pada media. Hal ini disebabkan karena senyawa antibakteri flavonoid, saponin dan minyak atsiri yang terkandung dalam ekstrak daun kelor mampu mematikan seluruh bakteri yang terdapat pada media. Ekstrak daun kelor pada konsentrasi 10% masih terdapat pertumbuhan bakteri pada media TSA. Gillespie (1994) mengemukakan bahwa zat antibakteri bersifat bakterisidal ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media.

Sifat bakterisidal pada ekstrak daun kelor disebabkan oleh adanya zat antibakteri berupa flavonoid (Ray-Yu et al.2007), saponin (Astuti, 2005 dalam Analisa, 2007), tanin (Vinothet al, 2012) dan minyak atsiri (Chuang et al, 2006). Dari beberapa zat anti bakteri diatas, flavonoid merupakan zat antibakteri yang paling banyak terkandung dari hasil ekstraksi dengan menggunakan etanol 95% (Kasoloet al. 2010).

Flavonoid dapat mendenaturasi protein sehingga menyebabkan aktifitas metabolisme sel bakteri berhenti karena semua aktifitas metabolisme sel bakteri dikatalisis oleh suatu enzim yang merupakan protein (Trease dan Evans 1978 dalam Rosilawati dkk, 2010). Selain itu flavonoid juga mampu melepaskan energi tranduksi terhadap membran sitoplasma bakteri dan mampu menghambat motilitas bakteri (Mirzoeva et al. 1997 dalam Sabir, 2005).

Saponin dapat merusak membran sitoplasma pada bakteri yang tersusun oleh 60% protein dan 40% lipid yang umumnya bersifat fosfolipid (Jaya, 2010). Selain itu saponin juga memiliki molekul yang dapat menarik air (hidrofilik) dan molekul yang dapat melarutkan lemak (lipofilik) sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan kehancuran kuman (Dwidjoseputro, 1994 dalam Rosilawati dkk, 2010).

Secara garis besar mekanisme tanin sebagai antibakteri adalah dengan merusak membran sel bakteri, senyawa astrigent tanin dapat menginduksi pembentukan ikatan senyawa kompleks terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu ikatan kompleks tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri (Akiyama et al., 2001 dalam Khunaifi, 2010).

Selain mengandung flavonoid, saponin dan tanin, ekstrak daun kelor juga mengandung senyawa antibakteri minyak atsiri (Chuang et al, 2006). Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi

serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (Parwata dan Dewi, 2008).

Secara umum mekanisme kerja suatu zat antibakteri dapat diduga dengan meninjau struktur serta komposisi sel bakteri tersebut. Suatu sel hidup yang normal memiliki sejumlah besar enzim yang melangsungkan proses-proses metabolik dan juga protein lainnya, asam nukleat serta senyawa-senyawa lain. Membran semipermeable mempertahankan integritas kandungan selular, membran tersebut secara selektif mengatur keluar masuknya zat antara sel dengan lingkungan luar. Membran ini juga termasuk tempat terjadinya beberapa reaksi enzim. Dinding sel tidak hanya merupakan pelindung bagi sel, akan tetapi juga berperan dalam proses fisiologis tertentu. Kerusakan pada salah satu komposisi sel bakteri tersebut dapat mengawali terjadinya perubahan yang menuju pada matinya sel bakteri (Pelzcar dan Chan, 2009).

Kesimpulan

Hasil penelitian Konsentrasi Minimum Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* yang Menginfeksi Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias Gariepinus*) Secara In Vitro dapat disimpulkan sebagai berikut :

Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang di ambil dari ikan lele sangkuriang (*Clarias Gariepinus*).

Konsentrasi ekstrak dau kelor (*Moringa oleifera*) 20%, 30%, 40% dan 50% dapat menghambat bakteri *Edwardsiella tarda*.

Pada konsentrasi ekstrak dau kelor (*Moringa oleifera*) 10% bakteri *Edwardsiella tarda* masih tumbuh dengan baik.

Daftar Pustaka

Analysa, L. 2007. Efek Penggunaan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Dalam Pakan Terhadap Berat Organ Dalam, Glukosa Darah Dan Kolesterol Darah Ayam Pedaging. Skripsi. Universitas Brawijaya Malang. hal. 8, 11.
 Andriyanto, S., Haririah., Y. Yulianti., S. H. I. Purnomo., S. T. Astuti., Nurlaila., T.

Samudro., dan B. P. Priosoeryanto. 2009. Deteksi *Edwardsiella tarda* Secara Imunohistokimia Pada Ikan Patin (*Pangasius pangasius*). Indonesia Journal of Veterinary Science and Medicine. hal. 7-8.

Balai Karantina Ikan Kelas I Surabaya II (BKITP). 20016. Prosedur Kerja Laboratorium Bakteriologi. Balai Karantina Ikan Kelas I Surabaya II. Surabaya. hal. 3-7.

Balai Uji Standart Karantina Ikan (BUSKI). 2009. Laporan Uji Coba: Deteksi *Edwardsiella tarda* Dengan Metode Fluorescent Antibody Technique (FAT). Balai Uji Standar Karantina Ikan. Pusat Karantina Ikan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta. hal. 4-5.

Chuang, P., Lee, W., Chou, j., Murungan, M., Shieh, B. And Chen, H. 2006. Anti-fungal Activity of Extracts and Essential Oil of *Moringa oleifera* Lam. Institute of Bioabrcultural Sciences. Academia Sinica. Bioresource Technology 98. pp. 233.

Feriyanto. N. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Keprok (*Citrus nobilis* L) Terhadap *Staphylococcs* dan *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. hal. 1.

Janda. J. M., S. L. Abbott., S. Kroske-Bystrom., W. K. W. Cheung., C. Powers., R. P. Kokka., and K. Tamura. 1991. Pathogenic Properties of *Edwardsiella tarda* Species. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 29, No. 9. pp. 1997.

Jaya, A. M. 2010. Isolasi Dan Uji Efektifitas Antibakteri Senyawa Saponin Dari Akar Putri Malu (*Mimosa pudica*). Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi. UIN Maulana Malik Ibrahim. hal. 64.

Kasolo, J. N., G. S. Bimenya., L. Ojok., J. Ochieng and J. W. Ogwal-Okeng. 2010. Phytochemical And Uses Of *Moringa oleifera* Leaves In Uganda Rural Communities. Journal Of Medicinal Plants Research Vol. 4(9). pp. 754, 756.

Khunaifi, M. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap

- Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Malang Maulana Malik Ibrahim. Malang. hal. 18-19.
- Mariyono dan A. Sundana. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 7 No. 11. Subang. hal. 33.
- Navie. S., and S. Csurhes. 2010. Weed Risk Assessment Horseradish Tree (*Moringa oleifera*). Biosecurity Queensland. Department of Employment, Economic Development and Innovation. Brisbane. pp. 12.
- Oluduro. A. O. 2012. Evaluation of Antimicrobial Properties and Nutritional Potentials of *Moringa oleifera* Leaf in South-Western Nigeria. Malaysian Journal of Microbiology. Vol 8 (2). pp. 62.
- Parwata, I. M. O. A., dan P. F. S. Dewi. 2008. Isolasi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Dari Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L.). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. Bukit Jimbaran. hal. 101.
- Pressley. M. E., P. E. Phelan III., P. E. Witten., M. T. Mellon., and C. H. Kim. 2005. Pathogenesis and Inflammatory Response to *Edwardsiella tarda* Infection in the Zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*. pp. 502.
- Savan. R., A. Igarashi., S. Matsuoka., and M. Sakai. 2003. Sensitive and Rapid Detection of *Edwardsiellosis* in Fish by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, No.1. pp. 621.
- Suprayogi. 2006. Efektivitas Antibiotika Tetracycline Terhadap *Edwardsiella tarda* Yang Ditularkan Pada Ikan Karper (*Cyprinus carpio* L.). Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hal. 8.
- Wijono, S. H. 2003. Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid Pada Daun Katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr). *Makara Sains* Vol. 7. No. 2. hal. 63.