

IDENTIFIKASI PERUBAHAN MORFOLOGI SEL *Aeromonas hydrophila* TERHADAP PAPAN EKSTRAK DAUN MANGROVE *Rizophora mucronata*

Mikhaell A.P. Panjaitan^{a*}, Eddy Suprayitno^a Hardoko^a

^aFakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Kota Malang, Indonesia

*Koresponden penulis: mikhaell_thp@ub.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi perubahan morfologi sel *A. hydrophila* menggunakan *scanning electron microscopy* dan mengetahui senyawa antibakteri dari *R. mucronata*. Prosedur penelitian meliputi ekstraksi, uji aktivitas antibakteri, uji total fenol, SEM dan LC-MS. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri pada ekstrak daun *R. mucronata* yang telah dimurnikan. Uji total fenol menunjukkan peningkatan total fenol dari ekstrak kasar sebesar $7,13 \pm 0,04\%$ menjadi $8,55 \pm 0,03\%$ dalam ekstrak fraksi metanol. Kerusakan sel *A. hydrophila* akibat paparan ekstrak daun *R. mucronata* diamati dengan uji SEM. Hasil uji menunjukkan bahwa ada kerusakan sel yang disebabkan oleh paparan ekstrak (pemanjangan ukuran sel, pembengkakan atau pengembungan sel, dan pembentukan lubang pada permukaan dinding sel). Uji LC-MS mendeteksi *chlorogenic acid* terkandung dalam ekstrak *R. mucronata*, yang diketahui bersifat antibakteri.

Kata kunci : asam klorogenat, senyawa fenolik, SEM

Abstract

This study aims to identify the cell morphology changes of *A. Hydrophila* using scanning electron microscopy and to investigate the antibacterial compound from *R. mucronata*. The research procedure includes extraction, antibacterial activity test, total phenol test, total phenol test, SEM and LC-MS. The results showed an increase of antibacterial activity in purified *R. mucronata* leaf extract. The total phenol test figured an increase in the total phenol of the crude extract from $7.13 \pm 0.04\%$ to $8.55 \pm 0.03\%$ in the spread methanol fraction extract. The cell damage of *A. Hydrophila* resulting from exposure to *R. mucronata* leaf extract was observed by the SEM test. It describes that there is some cellular damage caused by the exposure of extract (the lengthening of cell size, swelling or cellular bloat, and the formation of holes on the cell wall surface). The LC-MS detected chlorogenic acid contained in the extract of *R. mucronata*, known as antibacterial.

Keywords : chlorogenic acid, phenolic compounds, SEM

PENDAHULUAN

Rhizophora mucronata merupakan salah satu jenis mangrove yang diketahui memiliki senyawa bioaktif mulai dari akar, batang, bunga, buah, dan daun. Senyawa bioaktif tersebut berasal dari hasil metabolit sekunder seperti saponin [1], alkaloid [2] dan flavonoid [3] yang masuk kedalam senyawa fenolik. Senyawa fenolik diketahui berpotensi menjadi agen antibakteri dengan cara merusak struktur protein pada membran sel bakteri yang menyebabkan lisis nya sel bakteri [4]. Selain itu senyawa tersebut dapat merusak stabilitas dan fluiditas membran fosfolipid bilayer

bakteri [5]. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perubahan morfologi sel *A. Hydrophila* terhadap paparan ekstrak *R. mucronata* dan mengidentifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dari *R. mucronata*.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Daun *R. mucronata* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan daun yang masih menempel pada pohon dan berwarna hijau segar dengan panjang daun 10-15 cm.

Article history:

Diterima / Received 13-01-2020

Disetujui / Accepted 19-03-2020

Diterbitkan / Published 30-04-2020

©2020 at <http://jfmr.ub.ac.id>

Sampel kemudian dikeringkan dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk.

Ekstraksi and Fraksinasi

Proses ekstraksi daun *R.mucronata* dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut metanol. Perbandingan pelarut dan serbuk yaitu 1:2 [6]. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan Rotary evaporator pada suhu 40°C [7]. Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat dan n-heksan. Fraksinasi dilakukan dengan metode corong pisah yang bertujuan untuk memurnikan senyawa dalam ekstrak dengan cara menarik senyawa lain yang memiliki kepolaran berbeda [8]. Sejumlah ekstrak dimasukkan kedalam corong pemisah dan ditambahkan pelarut n-heksan dan etil asetat kemudian dikocok perlahan. Corong pemisah didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Setelah itu kedua lapisan tersebut dipisahkan dengan cara mengalirkan melalui kran dan di uapkan pada suhu 40°C sampai kering.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji Aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram [9, 6]. *A. hidrophila* dikultur dalam 10 ml media Agar Miring TSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji aktivitas antibakteri dimulai dengan mengambil bakteri uji dengan menggunakan *Cotton swab* steril dan disebar di permukaan media agar miring TSA pada cawan petri kemudian diberi kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak dan di aplikasikan di media agar miring TSA pada cawan petri yang berisi bakteri uji. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C [6]. Zona hambat merupakan daerah zona bening dikurangi diameter cakram.

Uji Total Fenol

Uji total fenol dilakukan untuk mengetahui senyawa fenol pada ekstrak kasar dan ekstrak fraksi. Pengujian total fenol daun *R. mucronata* dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan pereaksi asam sulfanilat.

Identifikasi kerusakan sel *A. hydrophila*

Uji SEM dilakukan untuk melihat pengaruh ekstrak daun mangrove terhadap sel *A. Hydrophila*. Senyawa fenol yang terkandung di dalam sampel diduga berperan dalam aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh *R. Mucronata*. Senyawa fenol diketahui bersifat antibakteri dengan cara merusak stabilitas dan fluiditas dari membran fosfolipid bilayer [5,10]. Uji ini dilakukan dengan 2 perlakuan yang berbeda yaitu tanpa pemberian ekstrak (4 mL suspensi bakteri 1x24 jam) dan dengan pemberian ekstrak fraksi metanol (2 mL suspensi bakteri 1x24 jam ditambah dengan 2 mL ekstrak fraksi metanol) sehingga dapat dideteksi kerusakan yang terjadi pada *A.hydrophila* yang diakibatkan oleh pemberian ekstrak fraksi metanol.

Identiikasi senyawa antibakteri

LC-MS digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri. Analisis LC-MS dilakukan pada ekstrak yang memiliki aktifitas antibakteri paling baik sebanyak 5 g. Pengujian LC-MS dengan cara pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Komponen tersebut akan dipisahkan antara fase diam dan fase gerak. Pemisahan komponen sampel dengan cara melewatkan sampel pada kolom yang kemudian diukur kadar tiap komonen menggunakan detector MS (*Mass Spectrometry*) [11].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun *R. Mucronata*

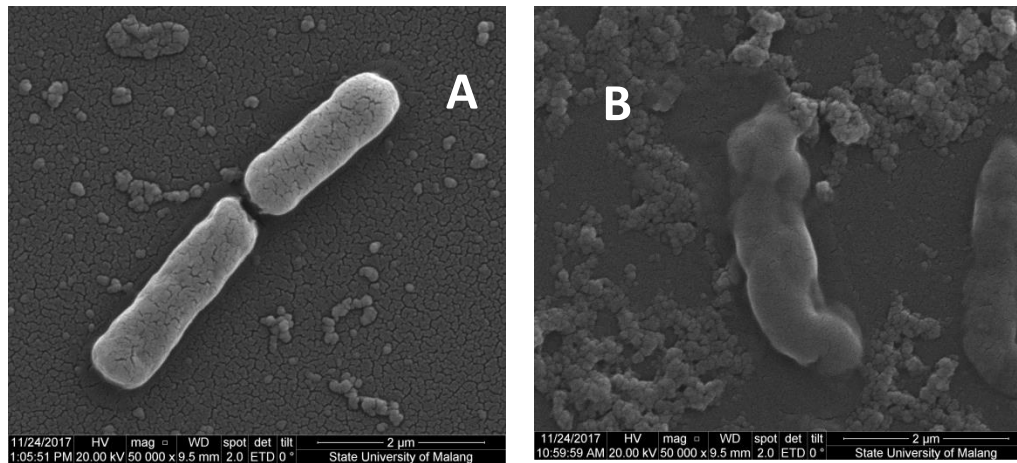
Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan 2 sampel yaitu ekstrak kasar dan ekstrak fraksi metanol. Dari hasil zona hambat yang terbentuk diketahui bahwa ekstrak kasar memiliki zona hambat ($6,5 \pm 0,58$ mm) lebih kecil daripada ekstrak fraksi metanol ($7,1 \pm 0,2$ mm). Hal tersebut menunjukkan bahwa proses pemurnian senyawa yang dilakukan meningkatkan aktivitas antibakteri dari daun *R. mucronata*.

Total Fenol

Pengukuran total fenol bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa fenol yang terkandung dalam kedua jenis ekstrak.

Kandungan total fenol pada ekstrak kasar dengan pelarut metanol sebesar $7,13 \pm 0,04\%$, sedangkan pada ekstrak fraksi metanol sebesar $8,55 \pm 0,03\%$. Hasil uji menunjukkan bahwa kandungan fenol dalam ekstrak kasar mengalami peningkatan setelah dilakukan proses pemurnian dengan corong pisah. Peningkatan total kandungan fenol dalam ekstrak diduga berperan dalam peningkatan kemampuan hambat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Mekanisme kerja antibakteri

senyawa golongan fenol yaitu dengan cara inaktivasi protein pada membrane sel [12] [13]. Selain itu beberapa senyawa golongan fenol yang berikatan dengan protein dapat menyebabkan struktur protein seperti dinding sel maupun membrane sel menjadi rusak. Hal tersebut menyebabkan terganggunya fungsi permeabilitas selektif, pengangkutan aktif dan pengendalian susunan protein yang mengakibatkan lisisnya sel bakteri [4].



Gambar 1. Kerusakan sel *A. hydrophila* dilihat menggunakan SEM (50.000x).
A : tanpa perlakuan (kontrol), B : sel terpapar ekstrak

Pengamatan kerusakan sel *A. hydrophila*

Pengamatan kerusakan sel *A. hydrophila* menggunakan SEM bertujuan untuk melihat pengaruh senyawa yang terkandung dalam ekstrak terhadap sel *A. hydrophila*. Hasil pengamatan kerusakan sel *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pengamatan kerusakan sel *A. hydrophila* menunjukkan bahwa pada sel bakteri tanpa perlakuan pemberian ekstrak memiliki bentuk sel yang tetap utuh (berbentuk batang), sedangkan sel pada bakteri dengan perlakuan pemberian ekstrak mengalami kerusakan (cenderung berbentuk bundar serta lebih pendek). Pada perlakuan pemberian ekstrak terjadi pemanjangan ukuran sel. Menurut Wang and Johson (1992), terjadinya pemanjangan ukuran sel mengindikasikan adanya kerusakan sel [14]. Kerusakan lainnya

pada *A. hydrophila* yaitu terjadinya pembengkakan atau pengembungan sel. Hal tersebut dapat terjadi akibat akumulasi senyawa antibakteri di dalam sel sehingga membuat sel tersebut membesar serta diikuti dengan kebocoran dan kematian sel [15,16]. Selain itu, kerusakan yang ditimbulkan adalah dengan terbentuknya lubang-lubang pada permukaan dinding sel. Senyawa antibakteri mampu membuat lubang pada dinding sel sehingga menyebabkan dinding sel rusak [17].

Identifikasi senyawa Antibakteri menggunakan LC-MS

Uji LC-MS menggunakan ekstrak fraksi metanol. Hasil uji mendeteksi ada empat senyawa yang terkandung di dalam ekstrak fraksi metanol. Hasil uji LC-MS dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil LC-MS ekstrak fraksi metanol daun *R. mucronata*

Retention Time	Molecular Mass	Molecular Formula	Compound
3.101	163.0394	C ₉ H ₆ O ₃	3-hydroxycoumarin
3.101	355.1031	C ₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid
5.93	209.1545	C ₁₃ H ₂₀ O	β-Ionone
10.90	284.2966	C ₁₈ H ₃₇ NO	Stearamide

Berdasarkan hasil uji LC-MS didapatkan bahwa senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri yaitu *chlorogenic acid*. Senyawa chlorogenic acid merupakan senyawa fenolik alami yang juga ditemukan pada buah apricot (*Prunus Armeniaca L.*), biji kopi hijau serta daun teh. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, antivirus, dan anti diabet [18,19,20,21,22].

Senyawa *chlorogenic acid* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif dengan bentuk sel rod-shape seperti *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *pseudomonas flourescens* [19]. Bakteri *A. Hydrophila* diketahui merupakan bakteri gram negatif dengan bentuk sel rod shape. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa *chlorogenic acid* diindikasikan mampu menghambat bakteri gram negatif dengan bentuk sel *rod shape* dengan cara berikatan dengan membran luar sel, merusak membrane, mengganggu intrasel dan melepaskan makromolekul sitoplasma, yang beujung pada kematian sel [21].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Terjadi perubahan morfologi sel *A.hydrophila* seperti pembengkakan atau pengembangan sel dan terbentuknya lubang-lubang pada permukaan dinding sel.
2. Uji LC-MS menunjukkan ekstrak *R.mucronata* mengandung senyawa chlorogenic acid yang diketahui bersifat antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Mahato, S.B., Sarkar, S.K and Poddar, G. 1988. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 27 : 3037-3067.
- [2] Gurudeeban, S, Ramanathan, T, and Satyavani, K. 2013. Antimicrobial and

Radical Scavenging Effet of Alkaloid Extracts from *Rhizophora mucronata*.

- [3] Nurdiani, R, Firdaus, M and Awaludin, A. 2012. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Methanol Extract of Mangrove Plant (*Rhizophora mucronata*) from Porong River Estuary. *Journal Basic Science And Technology*, 1 (2), 27-29, 2012 ISSN : 2089-8185.
- [4] Susanti, A. 2008. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indicaless*) Terhadap *Escherichia coli* secara In Vitro. *Jurnal Universitas Airlangga* Vol 1. No 1.
- [5] Tarahovsky, Y., Kim, Y.A., Yagolnik, E.A., Muzafarov, E.N. 2014. Flavonoid membrane interactiona : Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Bhiophysica Acta (BBA)- Biomembranes* Volume 1838 : 1235-1246.
- [6] Ravikumar, S., Granadesign, M., Suganthi, P., and Ramalakshmi, A. 2010. Antibacterial potential of Chosen Mangrove Plants Against Isolated Urinary Tract Infectious Bacterial Pathogens. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. Vol 2 No 3 : 94-99.
- [7] Lim, C. J., Basri, M., Lian, G.C Omar, D. 2017. Phytoinhibitory activities and ectraction optimalizion of potent invasive plants as eco-friendly weed suppressant against *Echinochloa (L.) Link*. *Industrial Crops and Products* 100 : 19-34.
- [8] Hardoko, Sasmito, B.S., Puspitasari, Y.E. 2016. Antidiabetic and Antioxidant Activities of Tannin Extract of Rizophora mucronata Leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* Vol. 8 No. 3:143-148

- [9] Kim, J., Marshall M.R., Wie, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food born pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2839-2845
- [10] Mulyani, Y., Bachtiar, E., dan Kurnia, M.U. 2013. Peranan Senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophyla* pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika* Vol. IV No. 1. ISSN 0853-2523
- [11] Vogeser, M. And Seger, C. 2008. A Decade of HPLC-MS/MS In the Routine Clinical Laboratory Goals for Futher Development. *Clinical Biochemistry.* 41 : 649-662.
- [12] Singh, I.P., Bharate, S.B. 2005. Anti-HIV Natural Products. *Journal Current Science* Vol. 89 No. 2 : 269-290
- [13] Ko, W.W., Chiang, S.R., Lee, H.C., and Chuang, Y.C. 2003. In Vitro and In Vivo Activities Of Fluoroquinolones Against *Aeromonas hydrophila* Antimicrobial Agedated Chemotherapy. *Journal Clinic Microbial* May 47 :2217-2222.
- [14] Wang, L.L and Johnson, E.A. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and environmental microbiology* Vol 58 No. 2 : 624-629.
- [15] Asriani, Laksmi, B.S., Yasni, S., Sudirman, I. 2007. Mekanisme Antibakteri metabolit Lb. Plantarum kik dan Monoasilgliserol minyak kelapa terhadap bakteri patogen pangan. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan* Vol. XVIII No. 2 : 126-133
- [16] Jawetz, E. Melnick J.L. and Adelberg, E.A. 2001. Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Edisi 20. EGC, Jakarta.
- [17] Nursidika, P., Saptarini, O., Rafiqua, N. 2014. Aktivitas Antimikrob Fraksi Etanol Buah Pinang (*Areca catechu* L) Pada Bakteri Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*. *MKB* Vol 46 No 2.
- [18] Zhang, J.S., Zang, J.J., Wu, N., Li, J., Wang. 2013. Separation and purification of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* Thunb. Leaves exact with macroporous resins. *J.Med. Plant Res.* Vol 7 No. 24 : 1784-1792
- [19] Mujtaba, A., Masud, T., Ahmad, A., Ahmed, W., Jabbar, S., Levin, R.E. 2017. Antibacterial Activity by Chlorogenic acid Isolated Through Resin From Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) *Pakistan Journal of Agricultural Research.* Vol 30 Issue 2 : 144-148.
- [20] Farah, A., Monteriro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S. 2008. Chlorogenic Acids from Green Coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition* Vol 138 No. 12 : 2309-2315
- [21] Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science.* Vol 76. No 6.
- [22] Kabir, F. Katayama, S., Tanji, N., Nakamura, S. 2014. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J Korean Soc Appl Biol Chem* Vol. 57 No. 3 : 359-365