

SECONDARY METABOLITE CHARACTERISTICS OF HETEROTROFIC BACTERIA PRODUCTION AS ANTIMICROBIAL AT DIFFERENT SALINITY

Nadya Apriyola*¹, Feliatra², Yuana Nurulita³

¹Student of the Faculty of Fisheries and Marine Universitas Riau, Pekanbaru

²Lecturer at the Faculty of Fisheries and Marine Universitas Riau, Pekanbaru

³Lecturer of the Faculty of Mathematics and Natural Science Universitas Riau, Pekanbaru

*apriyolanadya@gmail.com

ABSTRACT

This research was conducted from March-June 2019. The purpose of this study was to determine the characteristics of secondary metabolites produced by heterotrophic bacterial from sea water Sungai Kayu Ara Village, Siak Regency as an antimicrobial and to determine the storage time of these bacteria by measuring at the optimal growth time. Five bacterial secondary metabolite extracts used were B, C, D, and H (*B. cereus*) and J (*V. fluvialis*) obtained from the collection of Marine Microbiology Laboratory, Department of Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine sciences, University of Riau. phytochemical test showed that extracts of isolates B, D, and H contained saponin compounds, while isolate J contained flavonoid compounds, however, all extracts contained alkaloid compounds. Antimicrobial test indicated that J extract inhibited *A. Hydrophila* at concentration 500 µg/ml but the extract could not inhibit *V. alginolyticus* and *Pseudomonas* sp concentrations determined. In the bacterial storage time test, the optimal growth of each bacterial concentration at was 7th day incubation and decreased on the 14th day.

Keywords: *Heterotrophic Bacteria, Secondary Metabolites, Phytochemicals, Antimicrobials*

I. PENDAHULUAN

Perairan Desa Sungai Kayu Ara terletak di kawasan Kecamatan Sungai Apit, Kabupaten Siak, Provinsi Riau merupakan perairan muara yang terhubung dengan perairan laut Selat Malaka, dan sangat dipengaruhi oleh berbagai aktivitas antara lain industri, pelayaran, aktivitas rumah tangga dan lain sebagainya. Aktivitas-aktivitas yang berlokasi di daerah aliran sungai dan wilayah pesisir baik langsung maupun tidak langsung berpotensi menyumbangkan bahan organik di perairan. Banyaknya bahan organik yang terakumulasi dapat mempengaruhi distribusi serta aktivitas organisme begitu juga mikroorganisme seperti bakteri.

Mikroorganisme laut pada dasarnya sangat beragam, sebagaimana halnya dengan kerabat mikroorganisme yang ada di darat. Organisme yang dapat dikelompokkan sebagai mikroba laut antara lain adalah protista, sianobakteri (cyanobacteria), bakteri, jamur dan virus. Mikroorganisme tersebut berperan penting dalam proses-proses yang berlangsung dalam kolom-kolom air laut (Afriza *et al.* 2019). Keterlibatan mikroorganisme di lingkungan perairan tidak dapat diabaikan salah satunya bakteri heterotrofik, bakteri ini mampu memanfaatkan bahan organik pada lingkungan tempat tumbuhnya sebagai sumber nutrisi. Bakteri heterotrofik merupakan komponen pada ekosistem laut

yang tidak hanya berperan sebagai dekomposer bahan organik, akan tetapi bakteri tersebut mampu menyerap unsur Fe di perairan (Adly *et al.*, 2015). Bakteri heterotrofik dapat menghasilkan metabolit sekunder, dimana hasil metabolit sekunder tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti bakteri vibrio, aeromonas, dan pseodomonas.

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan atau disintesis pada sel dan grup taksonomi tertentu pada tingkat pertumbuhan atau stress tertentu. Senyawa ini diproduksi hanya dalam jumlah sedikit, tidak terus-menerus, untuk mempertahankan diri dan tidak berperan penting dalam proses metabolisme utama (primer). Senyawa metabolit sekunder memiliki struktur yang lebih kompleks, sulit disintesis, dan masih sedikit (15%) yang telah berhasil diisolasi sehingga memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Mariska, 2013). Kandungan senyawa metabolit sekunder yang termasuk ke dalam golongan metabolit telah terbukti bekerja sebagai derivat antimikroba (Hasanah *et al.*, 2012). Secara umum metabolit sekunder berupa antibiotik, inhibitor enzim, zat pengatur tumbuh, hormon dan insektisida (Purba *et al.*, 2019).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui karakteristik metabolit sekunder produksi bakteri heterotrofik sebagai antimikroba dari air laut Desa Sungai Kayu Ara Kabupaten Siak dan menguji penyimpanan bakteri heterotrofik dengan melihat waktu pertumbuhan optimal.

2. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimen. Ekstrak metabolit sekunder bakteri heterotrofik diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. Hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Hutasoit (2018) bahwa isolat yang

telah teridentifikasi merupakan bakteri heterotrofik, dimana bakteri heterotrofik menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Setiap ekstrak bakteri heterotrofik dilakukan pengujian mulai dari uji fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), analisis MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam setiap ekstrak yang diujikan serta uji penyimpanan bakteri dengan tiga kali pengulangan dan konsentrasi yang berbeda.

Prosedur Penelitian

Uji Fitokimia

Kandungan senyawa metabolit sekunder dapat diketahui dengan suatu metode pendekatan, salah satu yang dapat digunakan adalah metode uji fitokimia (Setyowati *et al.*, 2014).

Pemeriksaan senyawa saponin

Ekstrak sejumlah tertentu lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian akuades yang sudah dihangatkan kemudian dikocok kuat-kuat dan diadukan selama 10 menit. Sampel positif mengandung senyawa saponin apabila terbentuk busa dan tidak hilang selama waktu 15 menit setelah ditetesi HCl.

Pemeriksaan senyawa alkaloid

Pengujian dilakukan dengan sampel sebanyak 2 ml diekstraksi dengan pelarut air dan etanol ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah dengan 5 tetes reagen Dragendroff. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan merah jingga maka positif mengandung alkaloid. Selanjutnya untuk pengujian Alkaloid dengan menggunakan reagen Mayer dilakukan dengan cara mengambil masing-

masing sebanyak 2 mL sampel yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah 3 tetes asam klorida pekat dan 5 tetes reagen Mayer. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan putih, kekuningan maka sampel positif mengandung alkaloid.

Pemeriksaan senyawa steroid dan terpenoid

Pengujian dilakukan dengan cara sampel sebanyak 2 ml diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Jika masing-masing larutan terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid (Ergina *et al.*, 2014).

Untuk uji terpenoid dilakukan dengan sampel sebanyak 2 ml diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. Setelah itu masing-masing ekstrak, ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Jika masing-masing larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina *et al.*, 2014).

Pemeriksaan senyawa flavonoid

Sebagian filtrat dari ekstrak yang sudah dipanaskan dengan campuran alkohol diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1-2 butir logam Mg dan 3 tetes HCl pekat dan kocok dengan kuat, biarkan hingga memisah. Warna kuning kemerahan hingga merah menunjukkan bahwa sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

Pemeriksaan senyawa fenolik

Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan FeCl₃. Jika hasil positif dinyatakan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi hijau gelap atau biru (Putri *et al.*, 2015).

Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Pengujian dengan metode KLT diawali dengan larutan sampel diteteskan pada ujung plat KLT 1-2 cm dari ujung plat. Plat KLT selanjutnya di masukkan ke dalam chamber yang berisi eluen yaitu campuran yang terdiri dari metanol dan etil asetat. Pemilihan pelarut organik tersebut didasarkan atas pendekatan polaritas yang paling sesuai untuk pemilihan pelarut. Plat KLT dibiarkan hingga eluen menyentuh seluruh permukaan plat secara menyeluruh dan dikeringkan. Selanjutnya plat KLT yang telah kering disinari dibawah lampu UV 254 dan 366 untuk melihat endapan hasil pemisahan pelarut dan senyawa dalam bahan. Plat KLT ini difoto dan nilai *R_f* dari noda ditentukan dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak antara titik penotolan ke pusat bercak}}{\text{Jarak antara titik penotolan ke batas elusi}}$$

Angka *R_f* berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Umullia, 2017).

Uji HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Langkah-langkah menganalisa menggunakan HPLC yaitu mula-mula sampel diinjeksi dengan *syringe*. Kemudian sampel masuk ke *injection hall*. Dari *injection hall* ini proses utama cara kerja HPLC dimulai, yaitu dengan memompa sampel ke kolom oleh LC20AT dalam tekanan tinggi. Dari kolom, sampel dijadikan fase bergerak dan diolah dengan fase diam yaitu biasanya H₂SO₄ 0,05 N dan CH₃OH berdasarkan afinitas elektron. Setelah terpisah, dengan berbagai perhitungan matematis, HPLC yang sudah disambungkan dengan komputer ini memberikan pembacaan berupa peak. Elusi gradien didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom.

Uji MIC (*Minimum inhibitory concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Analisis MIC dan MBC dilakukan pada bakteri dan jamur patogen yang menunjukkan aktivitas tertinggi dari analisis antimikroba dengan metode dilusi. Bakteri diremajakan di media NA dan diinkubasi selama 1 hari di dalam inkubator dengan suhu 37°C. Kemudian bakteri diinokulasikan ke media *Muller Hinton Broth* 5 ml, diinkubasi selama 1 hari dan dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,8% apabila nilai OD (*Optical density*) 600 nm lebih besar dari 0,1. Sampel dilarutkan dengan DMSO 50% dengan konsentrasi awal 2000 µg/ml sampai 0,976 µg/ml menggunakan pengenceran bertingkat. Hal yang sama juga dilakukan terhadap kontrol positif *amoxicillin*. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 50%.

Microtiter plate disiapkan dan di setiap sumur pada *microtiter plate* diisi dengan 140 µg/ml media MHB, kedalam sumur pertama (2000 µg/ml) dimasukkan sampel sebanyak 20 µl dan bakteri patogen 20 µl, kemudian dihomogenkan. Setelah itu *microtiter plate* diinkubasi selama 1 hari, kemudian resazurin sebanyak 20 µl ditambahkan ke dalam setiap sumur *microtiter plate* untuk mendeteksi pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan perubahan warna dari biru ke merah muda dan diinkubasi selama 1 hari. Tiga sumur (yang memberikan aktivitas bakteriostatik) sebanyak 100 µl diinokulasi ke cawan petri dengan media NA dan diinkubasi selama 1 hari. Kemudian dihitung koloni bakteri yang tumbuh pada plate NA untuk menentukan MBC.

Uji Penyimpanan Bakteri

Uji penyimpanan bakteri heterotrofik dilakukan untuk mengetahui tingkat pertumbuhan bakteri dengan penambahan konsentrasi gula anau 1%, 3%, dan 5% diuji atau diamati dalam waktu 0, 7, dan 14 hari. Pengujian dilakukan dengan

menyiapkan air laut salinitas 27 ppt sebanyak 2L disterilkan ± 15 menit (*autoclave*), gula anau diencerkan sebanyak 5 gr/L, kemudian disiapkan 10 botol uji dan dimasukkan air laut 200 ml yang telah disterilkan kesetiap botol, tuang gula aren 1 gram dalam 200 ml ditambah dengan konsentrasi yang telah ditentukan (1%, 3%, dan 5%) dan putih telur 5% dari volume air (10 ml/botol) tambahkan bakteri heterotrofik (*V. fluvialis*) yang sudah dikultur sebanyak 2 ose. Perhitungan bakteri dengan menggunakan spektrofotometer.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Fitokimia

Komponen yang terdapat dalam ekstrak dianalisis golongan senyawanya dengan tes uji warna dengan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa saponin, flavonoid, fenolik, alkaloid, steroid dan terpenoid. Pereaksi-pereaksi spesifik yang digunakan kebanyakan bersifat polar sehingga bisa berinteraksi dengan sampel berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ke-5 ekstrak mengandung alkaloid, hanya ekstrak B, D, dan H mengandung saponin, serta hanya ekstrak J mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Penambahan Mg dan HCl pekat akan mereduksi flavonoid sehingga menghasilkan larutan yang berwarna kuning kemerahan, hingga merah.

Senyawa bahan aktif flavonoid yang merupakan senyawa polar yang mempunyai gugus hidroksil atau gula, sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dan air (Ergina *et al.*, 2014). Flavonoid mempunyai banyak manfaat dibidang kesehatan diantaranya sebagai antioksidan, antidermatosis, kemopreventif, dan antikanker (Saraswati, 2015). Hasil analisis

kandungan kimia ekstrak bakteri heterotrofik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji Fitokimia metabolit sekunder produksi bakteri heterotrofik

Senyawa Metabolit Sekunder	Ekstrak					Keterangan
	B	C	D	J	H	
Saponin	+	-	+	-	+	(+) bila terbentuk busa selama \pm 15 menit
Flavonoid	-	-	-	+	-	(+) bila terbentuk warna kuning kemerahan hingga merah
Fenolik	-	-	-	-	-	(-) tidak terbentuk warna biru-ungu
Steroid dan Terpenoid	-	-	-	-	-	(-) untuk senyawa steroid tidak terbentuk warna hijau dan untuk senyawa terpenoid tidak terbentuk warna merah atau ungu
Alkaloid (Dragendorff)	-	-	-	-	-	(-) tidak terbentuk endapan jingga
(Mayer)	+	+	+	+	+	(+) bila terbentuk endapan putih

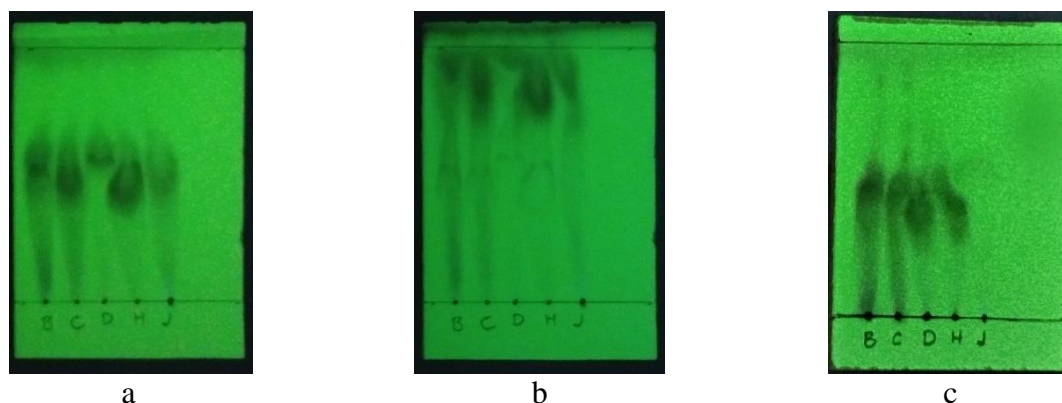
Pada hasil penelitian uji alkaloid ekstrak bakteri heterotofik menunjukkan hasil negatif dengan menggunakan uji Dragondroff namun menunjukkan hasil positif menggunakan uji Mayer. Hal tersebut sesuai dengan Skrining fitokimia secara kualitatif yang dilakukan oleh Naz dan Bano (2013), untuk menguji keberadaan alkaloid pada tanaman saliera menunjukkan hasil negatif dengan menggunakan uji Dragondroff dan menunjukkan hasil uji positif menggunakan uji Mayer. Perbedaan hasil skrining fitokimia dapat disebabkan oleh perbedaan kepekaan metode uji yang digunakan terhadap jumlah kandungan kimia dari bahan alam yang diuji. Alkaloid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mengganggu penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Cushnie *et al.*, 2014).

Uji kualitatif saponin positif ditandai dengan terbentuknya busa yang

dapat bertahan selama 5 menit. Busa yang ditimbulkan saponin karena adanya kombinasi struktur senyawa penyusunnya yaitu rantai sapogenin nonpolar dan rantai samping polar yang larut dengan air. Sehingga busa yang ditimbulkan dapat bertahan selama kurang lebih 5-10 menit (Khotimah, 2016). Saponin dikenal sebagai senyawa nonvolatil yang larut dalam air dan alkohol tapi tidak dalam eter (Illing *et al.*, 2017). Mekanisme kerja antibakteri dari saponin dengan cara meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga membran menjadi tidak stabil dan mengakibatkan hemolisis sel (Dewi dan Hertriani, 2015).

Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Eluen yang digunakan pada uji ini terdapat beberapa perbandingan yaitu etil asetat : metanol (1:1), etil asetat : metanol (1:2), etil asetat : metanol (2:1), dapat dilihat pada Gambar 1 dan nilai *R_f* dapat dilihat pada Tabel 2..



Gambar 1. Uji KLT ekstrak B, C, D, H dan J pengamatan pada sinar UV 254 nm.

Keterangan: a). 1:1 (Etil : Metanol), b). 1:2 (Etil : Metanol) dan c). 2:1 (Etil : Metanol)

Pada Gambar a dan c dari noda yang terdapat menunjukkan senyawa cenderung bersifat semi polar, dan pada Gambar b

noda yang terdapat menunjukkan bahwa senyawa bersifat polar yang mana eluen bergerak naik hingga mengenai batas elusi.

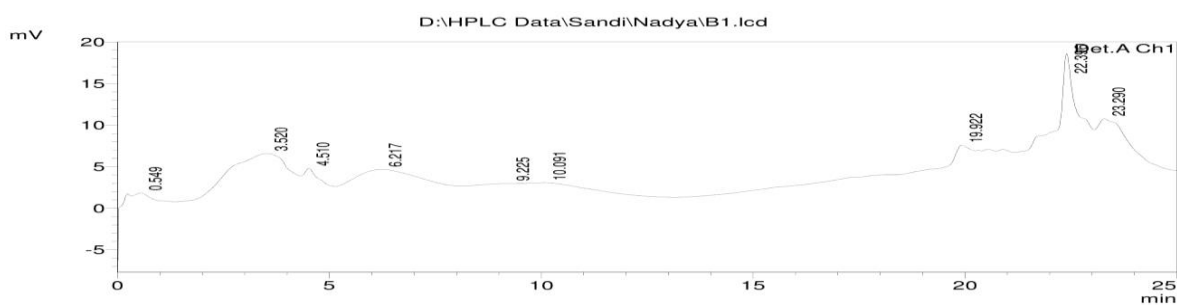
Tabel 2. Nilai *R_f* dari setiap ekstrak yang diujikan

Ekstrak	Nilai <i>R_f</i>			Keterangan
	Etil asetat : Metanol (1:1)	Etil asetat : Metanol (1:2)	Etil asetat : Metanol (2:1)	
B	0.26	0.93	0.26	Fluoresensi biru muda
C	0.32	0.92	0.23	Fluoresensi biru muda
D	0.32	0.00	0.21	Fluoresensi hijau muda
H	0.26	0.91	0.16	Fluoresensi hijau muda
J	0.31	0.98	0.00	Fluoresensi biru muda

Berdasarkan nilai *R_f* dengan beberapa eluen, senyawa yang dihasilkan cenderung dari semi polar hingga polar. Terlihat dari eluen yang cenderung polar menghasilkan senyawa dengan *R_f* tinggi yang memiliki nilai di atas 0,9.

Uji HPLC (*Hight Performance Liquid Chromatography*)

Hasil HPLC pada ekstrak B, C, D, H, dan J menunjukkan keluarnya puncak pada masing-masing ekstrak memiliki waktu yang berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 2, 3, 4, 5 dan 6.

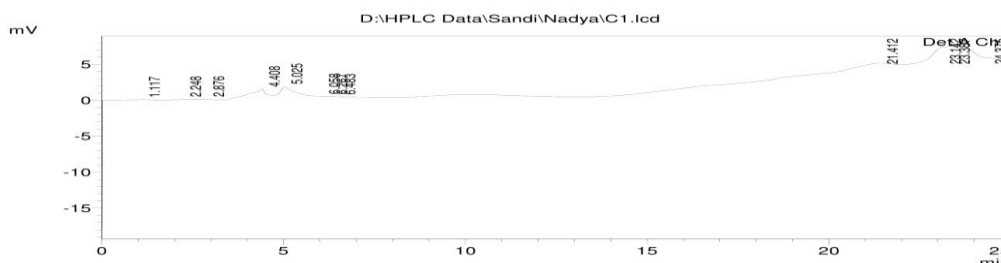


Gambar 2. Hasil HPLC sampel B

Keterangan: Det.A Ch1= 254nm, tR = 22.396 menit , Det.A Ch2= 366nm, tR = 3.283 menit

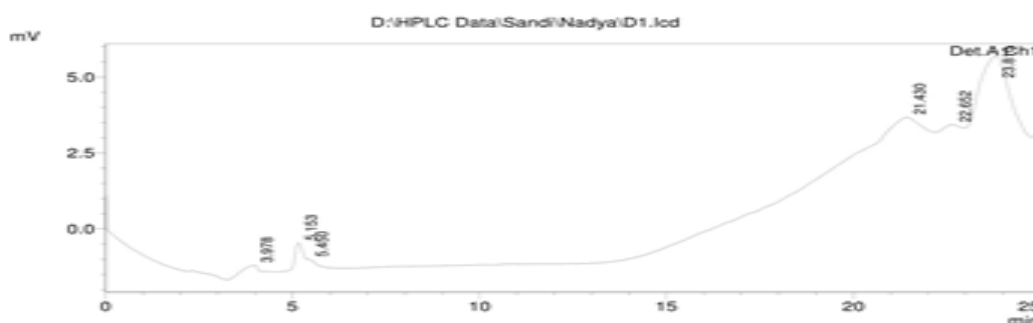
Pada ekstrak B terdapat 1 puncak senyawa dimana senyawa keluar pada fase diam bersifat non polar karena senyawa tertahan pada fase gerak (Gambar 3). Pada ekstrak C terdapat 1 puncak senyawa pada

waktu retensi 23.387 menit, dimana senyawa keluar pada fase diam bersifat non polar karena senyawa tertahan pada fase gerak (Gamabr 4).



Gambar 3. Hasil HPLC sampel C

Keterangan: Det.A Ch1= 254nm, t_R = 23.387 menit, Det.A Ch2= 366nm, t_R = 23.638 menit

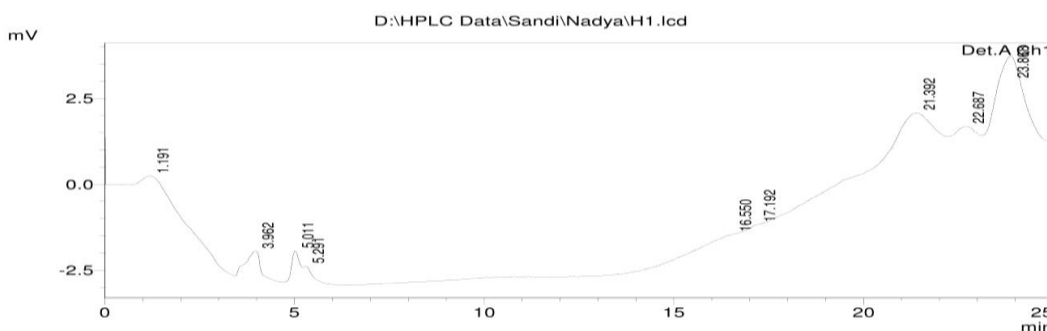


Gambar 4. Hasil uji kemurnian menggunakan HPLC sampel D

Keterangan: Det.A Ch1= 254nm, t_R = 23.810 menit, Det.A Ch2= 366nm, t_R = 23.810 menit

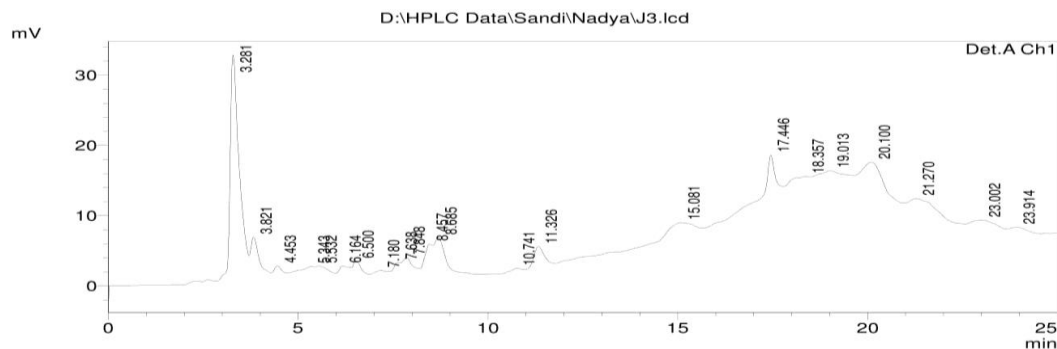
ekstrak D terdapat 1 puncak senyawa pada waktu retensi 23.810 menit, dimana senyawa keluar pada fase diam bersifat non polar karena senyawa tertahan pada fase gerak (Gambar 5). Sedangkan ekstrak H

terdapat 1 puncak senyawa pada waktu retensi 23.810 menit, dimana senyawa keluar pada fase diam bersifat non polar karena senyawa tertahan pada fase gerak (Gambar 6).



Gambar 5. Hasil HPLC sampel H

Keterangan: Det.A Ch1= 254nm, t_R = 23.868 menit, Det.A Ch2= 366nm, t_R = 3.912 menit



Gambar 6. Hasil HPLC sampel J

Keterangan: Det.A Ch1= 254nm, t_R = 3.281 menit, Det.A Ch2= 366nm, t_R = 18.079 menit

Pada ekstrak J terdapat 1 puncak senyawa pada waktu retensi 3.281 menit, dimana senyawa bersifat polar akan keluar terlebih dahulu karena tidak tertahan pada fase diam yang bersifat non polar.

Metode HPLC yang digunakan adalah fase terbalik dengan sistem gradien elusi, yaitu fase diam bersifat non polar (oktadesil silika atau ODS) sedangkan fase geraknya bersifat polar dengan gradien elusi asetonitril larut dalam air 70-90 dan dirunning selama 20 menit. Pada ekstrak B, C, D, H dan J diberi perlakuan yang sama dalam pengujian ini untuk mendapatkan perbandingan hasil antara semua ekstrak uji. Hasil yang didapat dari semua ekstrak yaitu B, C, D, H dan J memiliki waktu retensi yang berbeda-beda sehingga

kemungkinan dapat dikatakan bahwa setiap senyawa memiliki panjang gelombang yang berbeda-beda dan ada yang tidak terdeteksi pada detektor.

Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Konsentrasi yang digunakan pada uji aktivitas antimikroba *V. fluvialis* dimulai dari 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.062, 1.953 dan 0,976 $\mu\text{g/ml}$ dengan menggunakan metode dilusi. Mikroba yang digunakan pada uji ini ialah dari bakteri patogen yaitu *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus*. Dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji antimikroba metode dilusi ekstrak J bakteri *V. fluvialis*

Senyawa	<i>A. hydrophila</i>		<i>Pseudomonas</i> sp		<i>V. alginolyticus</i>	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak J	500	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>Amoxisilin</i>	31,25	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
DMSO	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Hasil uji MIC pada Tabel 3 menunjukkan bahwa ekstrak J memiliki aktivitas menghambat pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$, pada konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$ dan 1000 $\mu\text{g/ml}$ tidak ada aktivitas hambat terhadap *A. hydrophila* dan kontrol positif *amoxisilin* sebesar 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat saja disebabkan ekstrak memiliki aktivitas optimum pada konsentrasi

tertentu. Ekstrak masih mengandung banyak senyawa yang aktivitasnya bisa saja berbeda-beda. Rimpork *et al.* (2015), menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, maka akan semakin besar kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus* tidak terdapat aktivitas

menghambat. Sementara pada uji MBC tidak terdapat aktivitas membunuh terhadap semua patogen yang diujikan. Maryani (2013) mengatakan bahwa konsentrasi ekstrak semakin pekat maka senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya akan semakin banyak sehingga memberikan pengaruh terhadap aktivitas.

Perbedaan zona hambat berbagai volume ini disebabkan selain faktor volume, metode dilusi, jenis bakteri, jenis bahan antimikroba juga menentukan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri, adanya perbedaan jumlah kandungan senyawa aktif (Febrianti, 2019).

Uji Penyimpanan Bakteri

Hasil pengamatan uji penyimpanan bakteri pada ekstrak J (*V. fluvialis*) yang sudah diberi penambahan gula aren dengan konsentrasi 1%, 3% dan 5% serta putih telur ayam ras sebanyak 5% dari volume air laut yang digunakan dan diinkubasi selama 0, 7 dan 14 hari serta dispektrofotometer hingga menyamai kepadatan 10^8 . Jumlah pertumbuhan koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 4, grafik pertumbuhan bakteri *V. fluvialis* dapat dilihat pada Gambar 7.

Tabel 6. Jumlah bakteri heterotrofik (CFU/ml)

Kode isolat	H0 10^8 CFU/ml	H7 10^8 CFU/ml	H14 10^8 CFU/ml
J1U1	20,5 x 10^8	87,9 x 10^8	63,2 x 10^8
J1U2	36,4 x 10^8	83,7 x 10^8	79,6 x 10^8
J1U3	21,7 x 10^8	63,1 x 10^8	60,7 x 10^8
J3U1	29,5 x 10^8	86,1 x 10^8	67,9 x 10^8
J3U2	10,8 x 10^8	97,6 x 10^8	75,8 x 10^8
J3U3	15 x 10^8	99,1 x 10^8	78,1 x 10^8
J5U1	20,5 x 10^8	132,1 x 10^8	83,1 x 10^8
J5U2	15,2 x 10^8	127,1 x 10^8	64,2 x 10^8
J5U3	15,6 x 10^8	96,1 x 10^8	68,7 x 10^8
Kontrol J	37,2 x 10^8	113,2 x 10^8	77,3 x 10^8

Tabel 6 menunjukkan perhitungan jumlah bakteri heterotrofik tertinggi pada kode isolat J5U1 pada hari ke-7 yaitu $132,1 \times 10^8$ CFU/ml dan terendah pada kode isolat J3U2 pada hari ke-0 yaitu $10,8 \times 10^8$ CFU/ml.

Pada penelitian ini sumber nutrisi yang digunakan adalah gula aren (gula merah) dan putih telur ayam ras. Menurut Lempang (2012), gula aren mengandung glukosa yang cukup tinggi, kekhasan gula aren dari segi kimia yaitu mengandung sukrosa kurang lebih 84% dibandingkan dengan gula tebu dan gula bit yang masing-masing hanya 20% dan 17% sehingga gula aren mampu menyediakan energi lebih tinggi dari gula bit dan gula tebu.

Semakin lama waktu penyimpanan maka presentase viabilitas bakteri semakin

menurun. Hal ini berkaitan dengan daya tumbuh bakteri yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan terutama suhu dan medianya.

Rendahnya tingkat kelangsungan hidup bakteri yang didapatkan pada penelitian ini dipengaruhi oleh faktor nutrisi, kadar atau konsentrasi bahan preservasi (penyimpanan) dan suhu. Waluyo (2012), menyatakan bahwa sel sangat memerlukan nutrisi untuk mensintesis protoplasma sebagai sumber karbon, sumber nitrogen, metabolit penting (vitamin) dan juga asam amino. Bakteri tumbuh pada lingkungan yang sesuai, apabila lingkungannya tidak optimal maka pertumbuhan bakteri akan berjalan lambat, tidak tumbuh atau bahkan mati.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa karakteristik metabolit sekunder produksi bakteri heterotrofik dari uji fitokimia pada 5 ekstrak bakteri heterotrofik mengandung senyawa saponin diantaranya pada ekstrak B, D dan H, senyawa flavonoid pada ekstrak J dan senyawa alkaloid ada pada kelima ekstrak yaitu B, C, D, H dan J. Pada uji antimikroba metode dilusi menunjukkan ekstrak J dapat menghambat bakteri patogen *A. hydrophila* pada konsentrasi 500µg/ml sementara pada *V. alginolyticus*

dan *Pseudomonas* sp belum dapat menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri pada konsentrasi yang ditentukan, dan pada uji penyimpanan bakteri, pertumbuhan optimal setiap konsentrasi bakteri pada waktu inkubasi hari ke 7 dan mengalami penurunan pada hari ke 14.

Saran

Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dengan pemisahan dan fraksinasi lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa murni dan mengetahui struktur senyawa potensial dengan analisis spektroskopi NMR dan MS.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adly, CL., JE. Tremblay, RT. Powell, E. Armstrong, G. Peers, and NM. Price. (2015). Response of Heterotrophic Bacteria in a Mesoscale Iron Enrichment in the Northeast Subarctic Pacific Ocean. *Limnology and oceanography*, volume 60 pages 136-148.
2. Afriza, D., I. Effendi, YI. Siregar. (2019). Isolation, Identification and Antagonism Test of Heterotrophic Bacteria in Mangrove Plants Against Pathogenic Bacteria (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Pseudomonas* sp.). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, volume 24(1), pages 61-68.
3. Cushnie, TP., B. Cushnie, and AJ. Lamb. (2014). Alkaloids: an Overview of their Antibacterial, Antibiotic-enhancing and Antivirulence Activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, volume 44(5) pages 377-386.
4. Dewi, ZY., A. Nur, dan T. Hertriani. (2015). Efek Antibakteri dan Penghambatan Biofilm Ekstrak Sereh (*Cymbopogon nardus* L) terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Artikel penelitian. Maj Ked Gi Ind*, volume 1(2) pages 136-141.
5. Ergina., S. Nuryanti, dan ID. Pursitasari. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademik Kimia*. Volume 3(3) pages 165- 172.
6. Febrianti, DR. (2019). Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam Banjar (*Citrus reticulata*) Terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Pharmascience*, volume 6(1) pages 10-17.
7. Hasanah, NF., D. Pringgenies, Y. Sri, dan Wulandari. (2012). Karakterisasi Metabolit Sekunder Bakteri Symbiont Gastropoda *Conus miles* dengan Metode GC-MS sebagai Antibakteri MDR (Multi Drug Resistant). *Journal of Marine Research*, volume 1(2) pages 197-202.
8. Hutasoit, AY. (2018). Uji Metabolit Sekunder Bakteri Heterotrofik dari Air Laut Desa Sungai Kayu Ara Kabupaten Siak Terhadap Bakteri Patogen. [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Riau. Riau.
9. Illing, I., W. Safitri, dan Erfiana. (2017). Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengen. *Jurnal. Dinamika*, Volume 8(1) pages 66-84.
10. Khotimah, K. (2016). Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain pada Ekstrak Metanol Daun *Carica pusbencens* Lenne and *K. Koch* dengan

- LC/MS (Liquid chromatograph-tandem Mass Spectrometry). [Skripsi]. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
11. Lempang, M. (2012). Pohon Aren dan Manfaat Produksinya. Info. *Teknis EBONI*, volume 9(1) pages 37-54.
 12. Mariska. I. (2013). *Metabolit Sekunder Jalur Pembentukan dan Kegunaannya*. BB Biogen. Bogor
 13. Maryani, C. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jarak Tintir (*Jatropha multifida* L.) terhadap Pertumbuhan (*Staphylococcus aureus*) Secara In Vitro. [Skripsi]. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
 14. Naz, R., and A. Bano. (2013). Phytochemical Screening, Antioxidants and Antimicrobial Potential of Lantana camara in Different Solvents. *Asian Pacific J Trop Dis*, volume 3(6) pages 480- 486.
 15. Purba, TMT., I. Effendi, Feliatra. (2019). Effectiveness Test of Nipah Extract as Larvacide on mosquito Larvae (*Aedes aegypti*). *Asian Journal of Aquatic Sciences*, volume 2(1), pages 72-78
 16. Putri, WS., NK. Warditiani, dan LPF. Larasanty. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). [Skripsi]. Fakultas Matematika dan IPA. Universitas Udayana. Jimbaran.
 17. Rimpoporok, S., BJ. Kepel, dan KV. Siagian. (2015). Uji Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia Steenis*), Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Secara In-vitro. *Pharmacon*, volume 4(4) pages 15-21.
 18. Saraswati, FN. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Limbah Kulit Pisang Kepok Kuning (*Musa balbisiana*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Propionibacterium acne*). [Skripsi]. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta
 19. Setyowati. WAE., SRD. Ariani, Ashadi, B. Mulyani, dan CP. Rahmawati. (2014). Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinusmurr*) Varietas Petruk. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI. Prodi Pendidikan Kimia Jurusan FMIPA FKIP Universitas Surakarta. Surakarta.
 20. Umullia, HF. (2017). Bioaktivitas Fungi Kode Sal 6 Asosiasi Spons *Stylissa Flabelliformis* dari Perairan Pulau Menjangan, Taman Nasional Bali Barat. [Skripsi]. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
 21. Widiastuti. (2014). Kemampuan Metabolit Sekunder Bakteri Laut Menghambat Pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus*. *Agritech*, volume 21(3) pages 104-107.
 22. Waluyo, L. (2012). *Mikrobiologi Umum*. UMM Press. Malang.