

In vitro* analysis: inhibitory effect of *phyllanthus niruri* extract against *Aeromonas salmonicida

Sefti Heza Dwinanti¹, Maya Anggita Savacka¹, Ade Dwi Sasanti¹

Budidaya Perairan, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia, e-mail: sefti.heza@unsri.ac.id

Email corespondence author: sefti.heza@unsri.ac.id

Abstract. The purpose of this research is to explore effectiveness from every part of *Phyllanthus niruri* such as leaves (L), fruits (F), stem (S) and combination (C) of those parts that able to inhibit *Aeromonas salmonicida* growth by using different methods of extraction both infundation and maceration. Experiments has been done at Budidaya Perairan Laboratory, Sriwijaya University. In vitro analysis used tetracycline 30 µg/ml as positive control, bacterial culture at 10¹⁴ CFU/ml and concentration of each part of stone breaker was 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. The result revealed that stone breaker extract produced by infundation and maceration methods exhibited inhibitory activity against *A. salmonicida*. Moreover, only maceration method had bactericidal effect, in fact fruits (F) and combination (C) was the best part of *P. niruri* which had higher inhibition zone than control (antibiotics). It was 16,9 mm and 17,3 mm respectively. However, the extracts are recommended to cure aeromonad infection due to bacterial resistance of tetracycline already increase. Thus, some extraction methods are needed to be developed for further research with minimum inhibition zone is 20 mm.

Key words: *Phyllanthus niruri*, extraction methods, *Aeromonas salmonicida*, fish diseases

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas setiap bagian *Phyllanthus niruri* seperti daun (L), buah (F), batang (S) dan kombinasi (C) yang mampu menghambat pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* menggunakan metode yang berbeda, ekstraksi infundasi maupun maserasi. Percobaan telah dilakukan di Laboratorium Budidaya Perairan Universitas Sriwijaya. Analisis in vitro menggunakan tetra siklin 30 g/ml sebagai kontrol positif, kultur bakteri pada 10¹⁴ CFU/ml dan konsentrasi masing-masing ekstrak adalah 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan dengan metode infundasi dan maserasi menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *A. salmonicida*. Selain itu, hanya metode maserasi yang memiliki efek bakterisidal, ternyata buah (F) dan kombinasi (C) merupakan bagian terbaik dari *P. niruri* yang memiliki zona hambat lebih tinggi daripada kontrol (antibiotik). Masing-masing 16,9 mm dan 17,3 mm. Namun, ekstrak tersebut direkomendasikan untuk menyembuhkan infeksi aeromonad karena resistensi bakteri terhadap tetra siklin sudah meningkat. Oleh karena itu, perlu dikembangkan beberapa metode ekstraksi untuk penelitian selanjutnya dengan zona hambat minimal 20 mm.

Kata kunci: *Phyllanthus niruri*, extraction methods, *Aeromonas salmonicida*, fish diseases



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2021 by author.

1. PENDAHULUAN

Bakteri *Aeromonas* merupakan bakteri patogen yang sering menyerang ikan pada kegiatan budidaya ikan air tawar. Strain bakteri ini terdiri dari *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida*. *A. salmonicida* merupakan bakteri gram negatif bersifat *non-motile* dan menjadi penyebab penyakit furunkolosis pada ikan salmon dan penyakit ulser pada ikan mas (Austin and Austin, 2016). Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 58 tahun

2016 mengelompokkan *A. salmonicida* sebagai agen penyakit golongan II yang dapat menyebabkan *Furunculosis* dan *Carp erythrodermatitis* pada ikan. Menurut Keputusan Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan No. 32/KEP-BKIPM/2015 penyakit ikan golongan II adalah semua hama dan penyakit ikan karantina yang dapat disucihamakan dan/atau disembuhkan dari media pembawa karena teknologi perlakuannya sudah dikuasai.

Kematian yang ditimbulkan akibat kegagalan pengobatan infeksi penyakit furunculosis menjadi masalah yang signifikan dan penyebab kerugian ekonomis pada industri budidaya ikan (Austin and Austin, 2012). Oleh karena itu, antisipasi tindakan pengobatan terhadap kejadian penyakit perlu dikaji lebih lanjut. Pemakaian antibiotik telah banyak digunakan dalam perikanan budidaya dan dianggap sebagai salah satu solusi yang efektif, namun penggunaan antibiotik yang berkepanjangan dapat menyebabkan bakteri menjadi resisten dan juga merusak lingkungan (Manage, 2018). Hal ini mendorong para peneliti mengeksplorasi bahan-bahan obat yang lebih aman dan ramah lingkungan, seperti pemanfaatan tanaman obat.

Meniran (*Phyllanthus niruri*) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat tumbuh secara liar pada daerah tropis dan telah dimanfaatkan dalam kegiatan akuakultur untuk mencegah dan mengobati penyakit dari beberapa bakteri patogen yang menyerang ikan air tawar (Ibrahim *et al.*, 2015; Reverter *et al.*, 2017; Sunitha, Mettilda and Vinoliya, 2017). Beberapa kelebihan yang dimiliki oleh meniran dalam aktivitas pengobatan antara lain mampu mengurangi inflamasi, mengobati penyakit viral dan bakterial, meningkatkan sistem imun dan mengurangi kadar glukosa darah (anti stres) (Sarin *et al.*, 2014). Pemanfaatan meniran untuk mengobati infeksi *A. hydrophilla* telah dilakukan pada ikan mas (Valsa Judit Anto and Balasubramanian, 2015), namun belum dipelajari untuk jenis *A. salmonicida*. Perbedaan karakteristik antara *A. hydrophilla* dan *A. salmonicida* dapat menyebabkan dampak meniran yang berbeda pada *A. salmonicida*. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian terkait pemanfaatan meniran untuk menghambat ataupun membunuh bakteri *A. salmonicida*.

Para peneliti telah mempelajari dan menganalisa bahwa pengaruh dari jenis pelarut yang berbeda seperti methanol, alkohol dan sebagainya serta bagian tanaman yang berbeda seperti daun dan biji akan menghasilkan kualitas ekstrak yang berbeda (Altemimi *et al.*, 2017). Menurut Senja *et al.* (2014) dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi. Metode ekstraksi yang sederhana dan biasa digunakan dalam mengekstrak tanaman yaitu maserasi dan perebusan.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas meniran sebagai antibakteri *A. salmonicida* melalui uji zona hambat. Bagian tumbuhan meniran yang digunakan adalah batang, buah, daun dan campuran dari ketiganya, dan dengan menggunakan dua metode ekstraksi yaitu maserasi dan perebusan,. Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dosis dari berbagai bagian tanaman meniran dan metode ekstraksi efektif yang dapat mengobati infeksi bakteri *A. salmonicida* pada ikan.

2. Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan meniran yang tumbuh di daerah Ogan Ilir, Sumatera Selatan. Ekstraksi meniran dilakukan dengan cara perebusan (infundasi) dan maserasi. Adapun bagian tanaman yang diekstrak adalah buah, batang, dan daun. *Aeromonas salmonicida* yang digunakan adalah tipe atipikal yang diperoleh dari Laboratorium Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Jakarta Timur.

Penelitian ini bersifat kualitatif dan kualitatif, dengan empat tahapan, yaitu preparasi sediaan dari masing-masing bagian tanaman, pembuatan ekstrak, analisis fitokimia dan uji zona hambat ekstrak meniran terhadap *Aeromonas salmonicida*.

2.1 Preparasi Sediaan

Bagian tanaman meniran dicuci bersih kemudian dikeringanginkan selama 4 hari. Selanjutnya dilakukan pemisahan antara daun, buah, dan batang meniran, serta dibuat satu bagian yang merupakan campuran antara daun, buah dan batang meniran. Semua bagian tanaman tersebut dihaluskan dengan menggunakan *blander* hingga terbentuk serbuk.

2.2 Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Metode ekstraksi mengacu pada pedoman teknik modern analisis tanaman (Harborne *et al.*, 1987). Sediaan yang terdiri dari serbuk daun, batang, buah dan campuran meniran kemudian direndam secara terpisah selama 24 jam dengan mencampurkan 500 g bubuk sediaan dengan 1,5 L etanol 96% (1:3). Hasil dari perendaman kemudian disaring dengan menggunakan alat penyaring. Hasil saringan berupa zat cair (filtrat) disimpan, sedangkan ampas yang tersisa sebanyak 300 g direndam kembali dengan 600 ml etanol 96% (1:2). Selanjutnya filtrat diuapkan dengan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 60-70 °C dan ekstrak kemudian disimpan pada refrigador suhu 14 °C.

2.3 Pembuatan Ekstrak dengan Metode Perebusan

Sediaan yang terdiri dari serbuk daun, batang, buah dan campuran yang digunakan di ekstrak dengan metode perebusan. Sebanyak 500 g bubuk meniran direbus dengan 3 L

akuades selama 30 menit, dihitung sejak pelarut mulai mendidih. Setelah selesai perebusan, larutan disaring menggunakan saringan teh untuk memisahkan antara bubuk dan hasil ekstraksi.

2.4 Uji Fitokimia

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan terpenoid (Harborne *et al.*, 1987). Uji fitokimia yang dilakukan bersifat kualitatif, yang berarti hanya untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa tapi tidak mengetahui jumlah senyawa tersebut.

2.5 Uji Zona Hambat Ekstrak Terhadap Bakteri *Aeromonas salmonicida*

Uji tantangan dilakukan untuk melihat kemampuan ekstrak meniran dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida*. Kepadatan bakteri yang digunakan adalah 10^{14} CFU/ml. Sebanyak 100 μ l isolat cair *A. salmonicida* diteteskan diatas media *Tryptic Soy Agar* (TSA) lalu diratakan dengan spatula. Selanjutnya kertas Whatman No.42 berdiameter 6 mm, yang telah direndam dalam ekstrak meniran konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% selama 15 menit, ditempelkan pada media TSA. Pengenceran ekstrak meniran baik dengan metode maserasi dan perebusan menggunakan pelarut berupa akuades. Kontrol positif berupa kertas whatman No.42 yang direndam dengan antibiotik tetrasiklin 30 μ g/ml, sedangkan kontrol negatif berupa kertas whatman no.42 yang hanya direndam dengan akuades steril. Setelah diinkubasi selama 24 jam, zona hambat yang terbentuk pada setiap perlakuan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3. Hasil dan Pembahasan

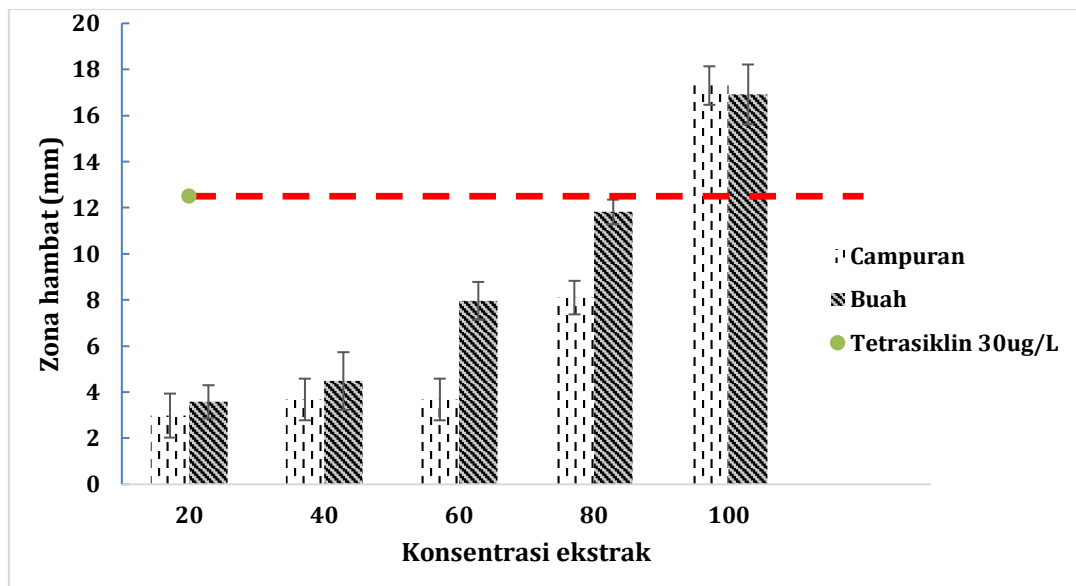
Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa metode ekstraksi menentukan senyawa yang dapat diikat oleh pelarut (Tabel 1). Jumlah senyawa terbanyak diperoleh dengan metode maserasi pada bagian buah, sedangkan yang paling sedikit diperoleh pada bagian batang. Metode perebusan menghasilkan jumlah senyawa yang sama untuk semua bagian tanaman yaitu sebanyak empat jenis.

Tabel 1 Perbandingan hasil fitokimia meniran dengan metode ekstraksi maserasi dan perebusan

Senyawa	Maserasi				Perebusan			
	Daun	Buah	Batang	Campuran	Daun	Buah	Batang	Campuran
Alkaloid	-	+	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	-	+	+	+	+	+
Tanin	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+	+	+	+	+
Terpenoid	-	+	+	+	+	+	+	+
Steroid	+	+	-	+	-	-	-	-
Jumlah Senyawa	4	6	3	5	4	4	4	4

Berdasarkan Tabel 1, dua bagian tanaman yang memiliki jumlah senyawa teratas adalah buah (Bu) dan campuran (C) dengan metode maserasi. Beberapa senyawa antibakterial yang dimiliki oleh meniran diantaranya adalah alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid (Bereksi *et al.*, 2018). Berdasarkan Tabel 1, dapat dilihat bahwa metode ekstraksi mempengaruhi jenis dan konsentrasi senyawa yang terukur. Alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid dan steroid adalah senyawa yang bersifat polar sehingga dapat larut dalam ethanol ataupun air. Akan tetapi, daya ikat dari masing-masing senyawa tersebut berbeda. Hasil uji fitokimia ekstrak buah meniran menunjukkan metode maserasi memiliki kemampuan mengikat senyawa yang lebih baik. Hanya saja, apabila semua bagian tanaman digabungkan maka ada senyawa yang tidak terdeteksi. Hal ini menunjukkan bahwa ketika akan melakukan ekstraksi harus mempertimbangkan bagian tanaman yang akan digunakan. Sementara itu, metode perebusan menghasilkan jumlah senyawa yang sama pada setiap bagian tanaman dengan jumlah jenis senyawa yang lebih sedikit dibandingkan metode maserasi.

Hasil uji fitokimia tersebut, dijadikan acuan untuk melakukan pengujian lanjutan terhadap bagian meniran yang memiliki kemampuan potensial untuk menghambat atau membunuh bakteri *Aeromonas salmonicida* secara *in vitro*. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk uji lanjutan (zona hambat) adalah buah dan campuran. Berdasarkan uji zona hambat, kemampuan ekstrak buah atau campuran? pada konsentrasi 100% mempunyai aktivitas zona hambat yang lebih baik dari antibiotik tetrasiklin 30 µg/L. Sedangkan, pada perlakuan kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat. Secara umum, semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka kemampuan menghambat bakteri semakin baik (Gambar 1).



Gambar 1. Zona hambat dari masing-masing bagian tumbuhan dengan konsentrasi berbeda

Pendugaan kemampuan kedua ekstrak yang bekerja sama baiknya dengan antibiotik dapat didekati dengan menggunakan persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh untuk bagian tanaman campuran yaitu $y = 0,1653x - 2,77$ dengan nilai $R^2 = 0,752$ sehingga untuk memperoleh zona hambat sebesar 12,5 mm maka konsentrasi yang dibutuhkan adalah 92,37%. Sedangkan untuk buah memiliki persamaan regresi linear yaitu $y = 0,1701x - 1,254$ dengan nilai $R^2 = 0,9521$, sehingga untuk mencapai zona hambat yang sama dengan antibiotik dibutuhkan konsentrasi sebesar 80,85%. Hal ini menunjukkan pemanfaatan buah meniran untuk menghambat bakteri *Aeromonas salmonicida* lebih baik dibandingkan dengan campuran.

Serangan penyakit dari bakteri *A. salmonicida* di ikan pada tahun 2006 dapat diatasi dengan pemberian tetrasiklin sebanyak 30 $\mu\text{g/L}$, akan tetapi pada awal tahun 2020 telah dilaporkan bahwasannya ikan telah resisten dengan dosis antibiotik tersebut (Uhland and Higgins, 2006; Zdanowicz, Mudryk and Perliński, 2020). Hal ini menunjukkan bahwa, penggunaan antibiotik dalam jangka waktu lama dan berkelanjutan memberikan dampak yang tidak baik seperti resistensi bakteri terhadap antibiotik. Menurut Lamy *et al.* (2012) bakteri *Aeromonas* memiliki sensitifitas terhadap tetrasiklin yang dikelompokkan menjadi *Susceptible* (S) apabila zona hambat >19 mm, *Intermediete* (I) apabila zona hambat 17-18 mm dan *Resisten* (R) apabila zona hambat yang terbentuk <17mm. Jika meniran digunakan sebagai obat untuk mengatasi penyakit yang disebabkan bakteri *A. salmonicida* dengan mengacu nilai zona hambat kelompok *susceptible* (S) yaitu sebesar >19 mm, maka diperlukan konsentrasi minimal ekstrak 137,75% untuk campuran dan 124,95% untuk buah. Hal ini menunjukkan bahwa buah meniran tidak efektif untuk digunakan sebagai kandidat obat infeksi *A. salmonicida*, karena konsentrasi ekstrak tertinggi (100%) telah terlewat.

4. Kesimpulan

Semua bagian meniran memiliki zat antibakterial yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida*. Metode maserasi menghasilkan ekstrak dengan kemampuan membunuh *A. salmonicida* yang lebih baik dibandingkan metode perebusan. Bagian tumbuhan meniran yang memiliki aktifitas antibakterial terbaik adalah buah dan campuran antara batang, buah, dan daun.

5. Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sriwijaya yang telah mendanai secara penuh penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Altemimi, A. *et al.* (2017) 'Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts', *Plants*, 6(4). doi: 10.3390/plants6040042.
- Austin, B. and Austin, D. A. (2012) *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish*. 5th edn, *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 5th edn. New York: Springer Netherlands.
- Austin, B. and Austin, D. A. (2016) *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish*. 6th edn, *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 6th edn. Switzerland: Springer International Publishing.
- Bereksi, M. S. *et al.* (2018) 'Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants extracts commonly used in algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria', *Pharmacognosy Journal*, 10(3), pp. 507–5012.
- Harborne, J. B. *et al.* (1987) *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 2nd edn, *Penerbit ITB, Bandung*. 2nd edn. Bandung: ITB Press.
- Ibrahim, M. *et al.* (2015) 'Determination of Effective Dosage of Phyllanthus niruri to Modulate Stress in Tilapia, *Oreochromis niloticus*', *Bioengineering and Bioscience*, 3(4), pp. 68–71.
- Lamy, B. *et al.* (2012) 'Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using Enterobacteriaceae breakpoints', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(9), pp. 2369–2377.
- Manage, P. M. (2018) 'Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review', *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 23(1), pp. 13–27.
- Reverter, M. *et al.* (2017) 'Use of Medicinal Plants in Aquaculture', in *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, pp. 223–262.

- Sarin, B. *et al.* (2014) 'An overview of important ethnomedicinal herbs of phyllanthus species: Present status and future prospects', *The Scientific World Journal*, 2014, pp. 1–12.
- Senja, R. Y. *et al.* (2014) 'The Comparison of Extraction Method and Solvent Variation on Yield and Antioxidant Activity of Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra Extract', *Traditional Medicine Journal*, 19(1), pp. 43–48.
- Sunitha, C., Mettilda, S. and Vinoliya, J. (2017) 'Effect of dietary intake of Phyllanthus niruri L. on fingerlings of freshwater fish, Cyprinus carpio L', 5(1), pp. 352–359.
- Uhland, F. C. and Higgins, R. (2006) 'Evaluation of the susceptibility of Aeromonas salmonicida to oxytetracycline and tetracycline using antimicrobial disk diffusion and dilution susceptibility tests', *Aquaculture*, 257(1–4), pp. 111–117.
- Valsa Judit Anto, A. and Balasubramanian, V. (2015) 'Therapeutic effect of phyllanthus emblica on disease induced common carp Cyprinus carpio by Aeromonas hydrophila', *International Journal of Zoological Research*, 11(3), pp. 96–101.
- Zdanowicz, M., Mudryk, Z. J. and Perliński, P. (2020) 'Abundance and antibiotic resistance of Aeromonas isolated from the water of three carp ponds', *Veterinary Research Communications*, 44(1), pp. 9–18.