

**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum* L.)
TERHADAP BAKTERI *Streptococcus iniae* SECARA *IN VITRO***

Sinchia Ayu Yuhana, Rahayu Kusdarwati, dan Dewa Ketut Meles

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

ABSTRAK

Streptococcus iniae merupakan bakteri patogen penyebab streptococcosis pada budidaya ikan nila di Indonesia dan spesies lainnya di seluruh dunia. Streptococcosis dapat menyebabkan kematian lebih dari 50% populasi dalam tiga hingga tujuh hari setelah terinfeksi. Upaya pengobatan penyakit menggunakan antibiotika menimbulkan efek negatif pada lingkungan, resistensi bakteri patogen, dan residu antibiotika. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif antibakteri dari bahan alam untuk pengobatan penyakit ini. Salah satu bahan alam yang bersifat antibakteri adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) yang mengandung flavonoid.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun kemangi (*O. sanctum* L.) terhadap *S. iniae* secara *in vitro*. Perlakuan yang digunakan adalah P0 (kontrol), P1 (1,56%), P2 (3,125%), P3 (6,25%), P4 (12,5%), P5 (25%), dan P6 (50%) masing-masing diulang 3 kali. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan bakteri pada media kultur. Hasil MIC (konsentrasi pengenceran terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri) dilihat dari kekeruhan media perlakuan dan hasil MBC (konsentrasi pengenceran terendah yang dapat membunuh bakteri) dilihat dari pertumbuhan koloni bakteri pada media TSA. Data dianalisis secara deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kemangi (*O. sanctum* L.) tidak dapat menghambat pertumbuhan maupun membunuh *S. iniae* secara *in vitro*. Oleh karena itu, ekstrak daun kemangi disarankan untuk tidak digunakan sebagai pengobatan streptococcosis pada ikan dan perlu dilakukannya metode ekstraksi bertingkat dalam ekstraksi tumbuhan hijau untuk mendapatkan hasil ekstrak murni.

KATA KUNCI : Antibakteri, *Ocimum sanctum*, *Streptococcus iniae*

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BASIL LEAVES EXTRACT (*Ocimum sanctum* L.)
AGAINST *Streptococcus iniae* BY *IN VITRO***

Sinchia Ayu Yuhana, Rahayu Kusdarwati, and Dewa Ketut Meles

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

ABSTRACT

Streptococcus iniae is a pathogenic bacterial causing streptococcosis in tilapias culture in Indonesia and other species in the world. Streptococcosis can causes mortalities over 50% of population within three until seven days after infection. Effort to treatment this disease using antibiotics can occur negative effects to the environment, pathogenic bacterial resistance, and antibiotics residue. Accordingly, there is a need to develop alternative antibacterial from natural sources to treatment the disease. One of the natural sources that have antibacterial activity is basil leaves extract (*Ocimum sanctum* L.) that contains flavonoid.

This study is to confirm antibacterial activity of basil leaves extract (*O. sanctum* L.) against *S. iniae* by *in vitro*. The experiment use P0 (control), P1 (1,56%), P2 (3,125%), P3 (6,25%), P4 (12,5%), P5 (25%), and P6 (50%) that replicated three times. Observed parameter is bacterial growth on culture media. MIC's value (lowest concentration that can inhibit bacterial growth) was determined from media turbidity and MBC's value (lowest concentration that kills bacteria) was determined from appear colonies in TSA media. The data was analyzed descriptively.

The result showed that basil leaves extract (*O. sanctum* L.) can't inhibit bacteria growth and kill *S. iniae* by *in vitro*. It is recommended that basil leaves extract (*O. sanctum* L.) shouldn't use to treatment streptococcosis in fish and extraction methods need to be stratified in the extraction process of green plants to get the pure extract.

KEYWORDS : Antibacterial, *Ocimum sanctum*, *Streptococcus iniae*

PENDAHULUAN

Streptococcosis merupakan penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Streptococcus iniae* (Tukmechi *et al.*, 2009). Penyebaran *S. iniae* meliputi seluruh dunia dan dapat menginfeksi ikan air tawar dan ikan air laut (Austin and Austin, 1999). Streptococcosis dapat menyebabkan kematian ikan lebih dari 50% populasi dalam tiga hingga tujuh hari setelah terinfeksi (Tukmechi *et al.*, 2009). Penyakit ini telah ditemukan di Indonesia pada budidaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Lubuk Linggau, Sumatera Selatan pada

tahun 2002 dan 2003 (Yuasa *et al.*, 2008) serta pada Keramba Jaring Apung di Danau Maninjau tahun 2010 (Supriyadi dan Gardenia, 2010).

Upaya yang telah dilakukan untuk pengobatan penyakit ini adalah menggunakan antibiotika yang dapat menimbulkan resistensi bakteri patogen dan residu antibiotika pada ikan dan manusia (Irawan, 2000 *dalam* Sugiani, 2004). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri dari tanaman obat (Agarwal *et al.*, 1996 *dalam* Joshi *et al.*, 2009). Daun kemangi (*Ocimum sanctum*

L.) mengandung minyak esensial yang bersifat antibakteri (Sharma, 2003 dalam Parag *et al.*, 2010). Selain minyak esensial, daun kemangi juga mengandung flavonoid yang bersifat antibakteri. Flavonoid dapat menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi sel (Cushnie and Lamb, 2005). Dalam beberapa penelitian disebutkan bahwa bahan antibakteri daun kemangi lebih efektif terhadap bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Joshi *et al.*, 2009). Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai daya antibakteri ekstrak daun kemangi terhadap *S. iniae* sebagai salah satu upaya pengobatan penyakit streptococcosis.

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak daun kemangi (*O. sanctum* L.) dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh *S. iniae* secara *in vitro*. Manfaat yang diharapkan adalah hasil penelitian dapat menjadi dasar bagi perkembangan ilmu Bakteriologi Ikan serta dapat memberikan informasi apakah ekstrak daun kemangi dapat bermanfaat sebagai antibakteri terhadap *S. iniae* untuk pengobatan streptococcosis.

METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan pada 29 Juli–22 September 2011 di Laboratorium Bakteriologi Balai Karantina Ikan (BKI) Kelas I Juanda Surabaya dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya.

Penelitian menggunakan metode dilusi cair (*broth dilution assay*) untuk mengetahui *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Metode ini menggunakan antibakteri dengan kadar menurun secara bertahap kemudian media

diinokulasi bakteri uji dan diinkubasi (Whitman, 2004). Perlakuan yang diberikan adalah pengenceran bertingkat dari ekstrak daun kemangi yaitu P0 (kontrol), P1 (1,56%), P2 (3,125%), P3 (6,25%), P4 (12,5%), P5 (25%), dan P6 (50%).

Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

Serbuk kemangi sebanyak 500 gram dimaserasi dalam etanol selama 3 x 24 jam dalam suhu kamar. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun kemangi sebanyak 55 ml.

Pelaksanaan Uji MIC dan MBC

Tahap pertama yaitu menyiapkan konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan metode pengenceran (dilusi). Pengenceran pertama (tabung 1) dilakukan dengan mengambil 4 ml larutan stok hasil ekstraksi, ditambah 4 ml DMSO 10% lalu dihomogenkan sehingga didapatkan konsentrasi 50%. Pengenceran kedua (konsentrasi 25%) dilakukan dengan mengambil 4 ml dari tabung 1, dimasukkan ke dalam tabung 2, ditambah 4 ml DMSO 10% lalu dihomogenkan. Cara yang sama dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,56%. Pada konsentrasi 1,56% larutan diambil 4 ml lalu dibuang.

Tahap kedua adalah inokulasi bakteri. Setiap tabung reaksi yang telah berisi 1 ml *Tryptone Soy Broth* (TSB), diinokulasi 1 ml suspensi bakteri yang telah disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5. Isolat bakteri didapat dari BKI Kelas I Juanda Surabaya. Setiap tabung kemudian diberi label perlakuan.

Tahap ketiga adalah memasukkan 1 ml ekstrak daun kemangi pada setiap tabung reaksi yang telah berisi suspensi bakteri dan TSB sesuai dengan label perlakuan. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 27-28°C

selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan MIC dengan melihat kekeruhan media.

Pelaksanaan uji MBC dilakukan setelah uji MIC, yaitu dengan mengambil bakteri dari masing-masing tabung reaksi MIC lalu diinokulasikan pada media *Tryptone Soy Agar* (TSA) dalam cawan petri. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 27-28°C selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni bakteri pada media TSA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan identifikasi bakteri. Hasil identifikasi ditunjukkan pada Tabel 1. Tabel 1. Hasil identifikasi isolat bakteri di BKI Kelas I Juanda Surabaya

No.	Karakteristik	BKI Juanda Surabaya	Pustaka
1	Warna koloni pada media TSA	Putih	Putih (1,2,3)
2	Pewarnaan Gram	Gram positif	Gram positif (1,2,3)
3	Morfologi sel	Kokus	Kokus (1,2,3)
4	Oksidase	-	- ⁽¹⁾ / NR ⁽²⁾
5	Katalase	-	- (1,2,3)
6	TSIA, Gas, H ₂ S	As/As, Gas -, H ₂ S-	ND, ND, H ₂ S - ⁽²⁾
7	Motilitas	-	- (1,2,3)
8	VP	-	- (2,3)
9	Arginin	-	- (1,2)
10	Glukosa	+	+ ⁽²⁾
11	Sukrosa	+	+ (2,3)
12	Manitol	+	+ (1,2,3)
13	Inositol	-	- ⁽³⁾
14	Maltosa	+	+ (2,3)

Keterangan: ND = *not determine*; As/As = Asam/Asam; + = reaksi positif; - = reaksi negatif

¹= Holt *et al.* (1994); ²= Buller (2004); ³= Whitman (2004)

Tabel 2. Hasil pengamatan MIC ekstrak daun kemangi terhadap *S. iniae*

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
P0 (Kontrol)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)
P1 (1,56%)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)
P2 (3,125%)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)
P3 (6,25%)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)
P4 (12,5%)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)	Keruh (kuning)
P5 (25%)	Keruh (hijau)	Keruh (hijau)	Keruh (hijau)
P6 (50%)	Keruh (hijau)	Keruh (hijau)	Keruh (hijau)

Tabel 3. Hasil pengamatan MBC ekstrak daun kemangi terhadap *S. Iniae*

Ulangan	Perlakuan						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: + = terdapat koloni bakteri pada media TSA

Berdasarkan pengamatan, konsentrasi 25% dan 50% berwarna hijau pekat. Pertumbuhan bakteri pada konsentrasi

ini tidak dapat diamati dengan jelas akibat pekatnya larutan ekstrak. Pada konsentrasi 12,5% mulai terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning dan warna semakin jernih pada konsentrasi 1,56%. Setelah diinkubasi 24 jam, tabung pada konsentrasi 1,56–12,5% terlihat keruh. Kekeruhan media adalah akibat pertumbuhan bakteri yang telah dibandingkan dengan kontrol perlakuan (P0). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut, ekstrak daun kemangi tidak dapat menghambat pertumbuhan *S. iniae* (Tabel 2). Berdasarkan pengamatan MBC (Tabel 3), ekstrak daun kemangi tidak dapat membunuh *S. iniae* secara *in vitro*. Hal ini diketahui dari adanya koloni *S. iniae* yang tumbuh pada media TSA pada konsentrasi tertinggi (50%).

Semua perlakuan yang diberikan telah sesuai dengan prosedur penelitian. Penelitian dilakukan secara aseptik dan terkontrol. Media yang digunakan serta volume dan kepadatan suspensi bakteri yang diinokulasikan telah dilakukan secara tepat. Ekstrak daun kemangi yang digunakan juga telah diuji sebelumnya menggunakan metode yang sama terhadap *Micrococcus luteus* dan diketahui ekstrak daun kemangi mampu membunuh *M. luteus* pada konsentrasi 50%.

Pengamatan MIC tidak dapat dilakukan karena larutan terlalu pekat. Larutan berwarna hijau pekat disebabkan adanya klorofil daun dan bahan lainnya yang ikut terekstraksi. Seharusnya dalam mengisolasi suatu senyawa harus dipastikan senyawa tersebut bebas dari bahan atau komponen lain yang tidak berguna dan dapat mengganggu dalam analisis. Penghilangan klorofil, lemak daun, dan bahan pengotor lain harus dilakukan pada tahap awal sebelum pemekatan, dengan cara mencuci ekstrak berulang-ulang menggunakan n-heksana. Apabila setelah ekstraksi ulang

residu jaringan tidak berwarna hijau, dapat dianggap semua senyawa yang memiliki berat molekul rendah telah terekstraksi (Harborne, 1987).

Terdapat beberapa dugaan yang dapat menjelaskan ketidakmampuan ekstrak daun kemangi dalam menghambat dan membunuh *S. iniae* secara *in vitro*. Salah satunya yaitu *S. iniae* resisten terhadap bahan aktif dalam ekstrak daun kemangi. Dzidic *et al.* (2008) menyatakan salah satu mekanisme resistensi bakteri yaitu inaktivasi antibiotik dengan memproduksi enzim. Salah satu enzim yang dapat menginaktivasi antibiotik adalah β -glukoronidase. Aktivitas β -glukoronidase merupakan proses detoksifikasi utama dan mengonversi sejumlah besar xenobiotik dan zat-zat endogen menjadi lebih hidrofilik (Tephly and Burchell, 1990 dalam Beaud *et al.*, 2005). *S. iniae* merupakan bakteri yang mampu menghasilkan β -glukoronidase (Austin and Austin, 1999) sehingga diduga bahan aktif dalam ekstrak daun kemangi dapat diuraikan oleh β -glukoronidase menjadi senyawa lain yang tidak bersifat toksik bagi bakteri.

Dugaan lainnya yaitu adanya selubung kapsul pada beberapa strain dari *S. iniae* (Baiano and Barnes 2009). Kapsul pada *S. iniae* tersusun atas polisakarida kompleks (Locke *et al.*, 2007). Bahan aktif dalam ekstrak daun kemangi, yang bersifat lipofilik, secara *in vitro* efektif sebagai antibakteri. Aktivitas antibakterinya dikarenakan kemampuan bahan aktif tersebut membentuk ikatan dengan protein terlarut dan dengan dinding sel bakteri. Semakin lipofilik suatu zat, akan semakin merusak membran sel (Cowan, 1999). Namun dengan adanya kapsul bakteri yang bersifat hidrofilik dapat menyebabkan bahan aktif ekstrak daun kemangi yang bersifat

lipofilik tidak dapat berikatan dengan dinding sel.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan yang dapat diambil yaitu ekstrak daun kemangi (*O. sanctum* L.) dalam berbagai konsentrasi (1,56–50%), yang dilakukan sesuai dengan prosedur penelitian, tidak mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri *S. iniae* secara *in vitro*. Saran yang dapat diberikan yaitu ekstrak daun kemangi (*O. sanctum* L.) disarankan untuk tidak digunakan mengobati penyakit pada ikan yang disebabkan oleh *S. iniae* dan perlu dilakukan metode ekstraksi bertingkat dalam proses ekstraksi tumbuhan hijau untuk mendapatkan hasil ekstrak murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, B. and D. A. Austin. 1999. Bacterials Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. 3rd rev. ed. Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Baiano, J. C. F. and A. C. Barnes. 2009. Toward Control of *Streptococcus iniae*. Synopsis. *Emerging Infect. Dis.*, 15(12): 1891-1896.
- Beaud, D., P. Tailliez, and J. Anba-Mondoloni. 2005. Genetic Characterization of the β -glucuronidase Enzyme from a Human Intestinal Bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiol.*, 151: 2323-2330.
- Buller, N. B. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. A Practical Identification Manual. CABI Publishing. pp. 127.
- Cowan. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Review. *Clinical Microbiol.*, 12(4): 564-582.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb. 2005. Review: Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26: 343–356.
- Dzidic, S., J. Suskovic, and B. Kos. 2008. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol.*, 46(1): 11-221.
- Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. *Terjemahan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Penerbit ITB. Bandung. Hal. 6-7.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual*[®] of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. A Waverly Company. London.
- Joshi, B., S. Lekhak, and A. Sharma. 2009. Antibacterial Property of Different Medical Plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum*, and *Origanum majorana*. Kathmandu University *J. Sci, Eng, and Tech.*, 5(1): 143-150.
- Locke, J. B., K. M. Colvin, A. K. Datta, S. K. Patel, N. N. Naidu, M. N. Neely, V. Nizet, and J. T. Buchanan. 2007. *Streptococcus iniae* Capsule Impairs Phagocytic Clearance and Contributes to Virulence in Fish. *J. Bacteriol.*, 189(4): 1279-1287.

- Parag, S., N. Vijayshree, B. Ranu, and B. R. Patil. 2010. Antibacterial Activity of *Ocimum sanctum* Linn. and its Application in Water Purification. *Res. J. Chem. Environ.*, 14(3): 46-50.
- Sugiani, D. 2004. *Streptococcus* spp.: Karakteristik, Virulensi, dan Immunogenisitas pada Ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thesis. Institut Pertanian Bogor. Hal. 1-11.
- Supriyadi, H. dan L. Gardenia. 2010. Streptococcosis pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Budidaya di Danau Maninjau. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur: 905-910.
- Tukmechi, A., R. Hobbenaghi, H. R. Holasso, and A. Morvaridi. 2009. Streptococcosis in a Pet Fish, *Astronotus ocellatus*: A Case Study. *Int. J. Biol. Life Sci.*, 1(1): 30-31.
- Whitman, K. A. 2004. Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures. with contributions by Neil G. MacNair. Iowa State Press. A Blackwell Publishing Company. pp. 121-243.
- Yuasa, K., T. Kamaishi, K. Hatai, M. Bahnnan, and P. Borisuthpeth. 2008. Two Cases of Streptococcal Infections of Cultured Tilapia in Asia. In Bondad-Reantaso, M.G., C.V. Mohan, M. Crumlish, and R.P. Subasinghe (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture*, 4: 259-268. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.