

## Penghambatan produksi enzim eksoprotease pada sistem *quorum sensing* *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak metanol rimpang segar dan rimpang kering lengkuas (*Alpinia galanga*)

### Inhibition of exoprotease enzyme production in *Aeromonas hydrophila* quorum sensing system due to methanol extract of fresh and dried galangal rhizome (*Alpinia galanga*)

YASHINTA NOVITASARI, ARTINI PANGASTUTI, RITA RAKHMAWATI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 27 September 2013. Revisi disetujui: 4 Maret 2014.

**Abstract.** Novitasari Y, A Pangastuti, R Rakhmawati. 2012. Inhibition of exoprotease enzyme production in *Aeromonas hydrophila* quorum sensing system due to methanol extract of fresh and dried galangal rhizome (*Alpinia galanga*). *Biofarmasi* 14: 51-61. Motile *Aeromonas* septicemia disease is one of the factors causing the failure of fish farming. The disease is caused by *Aeromonas hydrophila*. One of the virulence factors of *A. hydrophila* is an exoprotease. Exoprotease enzyme molecules are controlled by N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), which is a signal molecule in quorum sensing system. One of the natural resources that have the potential to inhibit the experiment of exoprotease enzyme is Galanga rhizomes (*Alpinia galanga* L.). The rhizomes contain the active compound groups including flavonoids, phenols, and terpenoids. The purposes of this research were to determine the inhibition of *A. hydrophila* exoprotease enzyme production by methanol extracts of fresh and dried rhizomes and the optimal concentration to inhibit the production of exoprotease enzyme. Exoprotease enzyme activity was measured qualitatively by the diameter of clear zone on LB supplemented by skim milk and quantitatively by spectrophotometric method. The methanol extracts of fresh and dried rhizomes were added to *A. hydrophila* culture. The growth, exoprotease activities protein concentration were measured every 2 hours for 10 hours. The test results were analyzed by univariate analysis with significance level of 0.05. The results showed that methanol extract of fresh rhizome was more effective in reducing the activity of *A. hydrophila* exoprotease. 8% methanol extract of fresh rhizome significantly reduced the activity of *A. hydrophila* exoprotease without inhibiting the growth.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, *Alpinia galanga*, exoprotease enzymes, quorum sensing

## PENDAHULUAN

Sektor perikanan mempunyai peranan penting dibidang penyediaan protein hewani bagi masyarakat Indonesia. Usaha budidaya ikan tidak terlepas dari berbagai hambatan dan risiko biologis yang ditimbulkan oleh organisme penyakit (Mariyono dan Agus 2002). Secara ekonomi, masalah ini sangat penting karena dapat merugikan usaha yang disebabkan oleh penyakit ikan dan menimbulkan kematian total, penurunan produksi dan penurunan kualitas ikan (Maulina et al. 2006).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri penyebab penyakit ikan *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) (Tan et al. 1998). Faktor virulensi ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Enzim ini bersifat proteolitik karena mampu menghidrolisis protein sehingga berpotensi sebagai patogen (Thomas et al. 1987).

Eksresi enzim eksoprotease dikontrol oleh suatu molekul senyawa *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (C4-HSL) yang berfungsi sebagai autoinduser pada sistem *quorum sensing* (alat komunikasi interseluler pada bakteri) (Aini dan Setyawan 2006). *Quorum sensing* merupakan mekanisme regulasi biosintesis metabolisme yang

dipengaruhi oleh kepadatan populasi bakteri. Senyawa sinyal akan terakumulasi dengan meningkatnya kepadatan populasi bakteri tersebut.

Semakin banyak populasi bakteri, semakin tinggi konsentrasi C4-HSL di lingkungan sehingga mampu mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease.

Bakteri *A. hydrophila* menggunakan *quorum sensing* sebagai pengontrol virulensinya terhadap organisme lain sehingga *quorum sensing* merupakan target untuk agen kemoterapeutik (Rasch et al. 2004). Menurut Kievit dan Iglewski (2000), *A. hydrophila* yang virulen dapat dijadikan nonvirulen dengan menghambat sistem *quorum sensing*nya. Mekanisme ini dapat dijadikan sebagai cara pencegahan infeksi kronis yang merusak tanpa menggunakan agen yang menghambat pertumbuhan seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping bagi patogen itu sendiri maupun terhadap ikan yang dipelihara. Pemberian antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan organisme patogen menjadi resisten, sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif (Lewis 2001).

Beberapa tumbuhan telah diketahui dapat menghambat sistem *quorum sensing*, misalnya ekstrak etil asetat dan etanol rimpang temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

dengan konsentrasi 4% dapat menghambat aktivitas molekul sinyal *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (C4-HSL) secara optimal pada *A. hydrophila* tanpa mengganggu pertumbuhannya (Lestari 2006), dan ekstrak toluen umbi bawang putih (*Allium sativum*) mempunyai senyawa aktif yang mampu menghambat sistem *quorum sensing* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Persson et al. 2005). Selain itu ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) dapat menghambat pembentukan biofilm dengan sistem *quorum sensing* pada *Vibrio* (Magdalena 2007). Namun penelitian mengenai penghambatan enzim eksoprotease dengan sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* akibat pemberian rimpang lengkuas belum pernah dilaporkan.

Rimpang lengkuas mengandung golongan senyawa flavonoid, fenol dan terpenoid (Oka dan Fanny 2008). Pengambilan senyawa aktif dalam rimpang lengkuas dilakukan dengan ekstraksi menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan senyawa yang bersifat polar (polaritas 0,73) sehingga mampu melarutkan senyawa-senyawa polar yang terkandung dalam rimpang lengkuas. Penentuan pelarut ini didasarkan pada tingkat polaritas dan pertimbangan bahwa pelarut tersebut sering digunakan dalam mengekstrak komponen makanan. Senyawa aktif yang terkandung dalam suatu tanaman tersebut dapat terdegradasi jika metode pengolahannya tidak diperhatikan. Salah satu tahap pengolahan yang berpotensi menyebabkan kerusakan senyawa aktif dalam pembuatan simplisia adalah tahap pengeringan. Hal ini dipengaruhi oleh adanya suhu, oksigen, pH, dan cahaya (Octyaningrum 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol baik rimpang lengkuas segar maupun rimpang lengkuas yang dikeringkan terhadap *A. hydrophila*.

Tujuan Penelitian: Mengetahui adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering. Mengetahui jenis ekstrak yang lebih optimal antara ekstrak metanol lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Mengetahui konsentrasi ekstrak metanol terpilih yang optimal dalam menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dari variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2009 sampai bulan April 2010 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Alat untuk ekstraksi: pisau (*cutter*), toples kaca, timbangan elektrik, *rotary evaporator*, erlenmeyer, *beaker glass*, corong pisah, *water bath*, aluminium foil, dan kertas saring.

Alat untuk pemeliharaan kultur: tabung reaksi, neraca analitik, jarum ose, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, *bunsen buchner*, freezer, *laminar air flow*, *hot plate*. Alat untuk pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*: mikropipet dan tip, pelubang gabus, gelas ukur, cawan petri, *syringe filter*, *laminar air flow*, *bunsen buchner*, *vortek*, *hot plate*. Alat untuk pengukuran pertumbuhan dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease: spektrofotometer, kuvet, *syringe filter*, *shaker*, *laminar air flow*, mikropipet dan tip, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, sentrifus, inkubator shaker, dan *hot plate*. Alat sterilisasi: *autoclave*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Bahan utama: Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) yang berumur satu tahun diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Kultur bakteri yang digunakan: Kultur *A. hydrophila* (*wild type*) diisolasi dari ikan gurame yang sakit dan diperoleh dari Jurusan Perikanan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Bahan untuk uji aktivitas enzim: Medium Luria-Bertani broth (LB Broth), Luria-Bertani agar (LB), aquades, kasein, susu skim, *Trichloro Acetic Acid* (TCA), dan buffer fosfat pH 8. Bahan untuk uji protein: pereaksi bradford, BSA (Bovine Serum Albumin). Pelarut ekstrak: metanol, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

### Cara kerja

#### *Ekstrak metanol rimpang lengkuas kering*

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Rimpang lengkuas yang segar dibersihkan dan dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45oC selama dua hari. Setelah ini direndam dengan pelarut metanol selama tiga hari sampai diperoleh filtrat metanol. Filtrat ini diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50oC sampai diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol diuapkan lagi menggunakan *water bath* (Ye dan Li 2006).

#### *Ekstrak metanol rimpang lengkuas segar*

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol. Rimpang lengkuas yang segar dibersihkan dan dipotong kecil-kecil. Setelah itu direndam dengan pelarut metanol selama tiga hari sampai diperoleh filtrat metanol. Filtrat metanol ini diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50oC sampai diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol diuapkan lagi menggunakan *water bath*.

#### *Pembuatan larutan stok*

Ekstrak metanol lengkuas segar dan kering diuapkan semua pelarutnya. Filtrat kental lalu dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 10 mg/mL. Larutan disterilkan dengan cara disaring menggunakan *syringe filter*. Larutan disimpan sebagai stok kemudian larutan stok ini dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% dari volume media LB (Lestari 2006).

### *Pemeliharaan kultur*

*A. hydrophila* ditumbuhkan pada medium agar miring LB secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah tumbuh sebagai biakan, *A. hydrophila* disimpan pada lemari pendingin (4°C) sebagai biakan cadangan (Lestari 2006).

### *Pengujian kualitatif produksi enzim eksoprotease*

Medium yang digunakan adalah LB agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim pada suhu 110°C selama 30 menit. Cawan petri disiapkan kemudian diisi 16 mL medium dengan penambahan ekstrak metanol lengkuas segar dan ekstrak metanol lengkuas kering. Konsentrasi yang digunakan yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10% dengan asumsi pada variasi konsentrasi di atas produksi enzim eksoprotease dapat dihambat tanpa harus menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Isolat *A. hydrophila* yang telah ditumbuhkan dalam media LB Broth selama 12 jam diinokulasikan sebanyak 4 µL pada cawan petri berisi LB agar yang telah dibuat sumuran lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Inokulasi *A. hydrophila* ini dilakukan pada saat fase log. Masing-masing dilakukan dengan tiga kali ulangan. Produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Zona bening terbentuk karena aktivitas proteolitik dari enzim eksoprotease. Diameter zona bening dihitung dengan cara diameter lingkaran total (diameter isolat bakteri+diameter zona bening) dikurangi diameter isolat kemudian dibandingkan dengan kontrol (Lestari 2006).

### *Penyiapan Inokulum Aeromonas hydrophila*

Penyiapan inokulum *A. hydrophila* dilakukan dengan cara memindahkan satu ose biakan bakteri ke dalam 10 ml medium LB Broth secara aseptik, kemudian diinkubasi dalam suhu kamar pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam (Irawan et al. 2003).

### *Pengukuran pertumbuhan A. hydrophila dan pengujian produksi enzim eksoprotease secara kuantitatif*

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease yaitu dengan spektrofotometri. Prinsip pengujiannya berdasarkan pada metode Kunitz (1971) yaitu kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis kasein. Residu kasein yang tidak terhidrolisis akan diendapkan oleh Trichloro Acetic Acid (TCA). Endapan dipisahkan kemudian filtratnya dapat diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm.

Pengujian secara kuantitatif dapat dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik terbesar. Hal ini ditunjukkan dengan luas zona bening paling kecil lalu dibandingkan dengan kontrolnya pada uji kualitatif.

Isolat *A. hydrophila* dari inokulum LB selama 24 jam ditumbuhkan pada 200 mL LB broth yang sudah ditambahkan ekstrak metanol lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, dan 8%. Pada kontrol negatif ditambahkan pelarut DMSO lalu masing-masing medium diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan shaker. Pengukuran

pertumbuhan bakteri dilakukan mulai jam ke-0 dan setiap 2 jam selama 24 jam, 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga dapat diamati ODnya.

Sebanyak satu setengah mL suspensi bakteri yang telah diukur pertumbuhannya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Filtratnya diambil sebanyak 1 mL untuk pengujian aktivitas enzim. Substrat sebanyak 1 mL (kasein 1% dalam buffer fosfat pH 8) diinkubasi dalam *shaking waterbath* 37°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambah 0,5 mL enzim dan 0,5 mL buffer fosfat pH 8 dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan selama 20 menit dengan penambahan 3 mL TCA 5% dicampur dengan sempurna lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Pemisahan filtrat dilakukan dengan sentrifugasi pada putaran 2500 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan peptida hasil hidrolisis substrat oleh protease/sampel. Serapannya ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280nm.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan. Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan dinyatakan dalam besarnya serapan produk (satu unit sama dengan satu absorban) hasil inkubasi selama 20 menit, pada pH 8 dan suhu 37°C.

### *Pengukuran total protein (Bradford 1976)*

Pengukuran total protein dilakukan untuk melihat efek ekstrak terhadap produksi enzim atau terhadap aktivitas enzim. Konsentrasi protein ditentukan melalui metode Bradford (1976) dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan standar protein. Konsentrasi awal larutan BSA adalah 0,3 mg/ml. Konsentrasi standar protein BSA tersebut kemudian dibuat menjadi 0,06 hingga 0,3 mg/ml.

Sebanyak 100 µL sampel ditambah 5 ml pereaksi Bradford, selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 595 nm. Nilai absorbansi dan konsentrasi protein dari standar BSA diplotkan pada grafik Cartesius dengan konsentrasi sebagai absis (sumbu X) dan absorbansi sebagai ordinat (sumbu Y), kemudian ditentukan persamaan garis regresinya.

### **Rancangan penelitian**

Jenis penelitian ini eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu arah. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 1 perlakuan yaitu konsentrasi yang terdiri dari 5 sub perlakuan yaitu konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%.

### **Analisis data**

Analisis yang digunakan adalah analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi besarnya zona bening yang dibandingkan dengan kontrol. Analisis kuantitatif meliputi pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*, aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* berupa absorbansi pada masing-masing perlakuan

dibandingkan pada kontrol. Data ini kemudian dianalisis sidik ragam dengan menggunakan uji *repeated measures* dan dilanjutkan dengan uji tukey taraf 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi rimpang lengkuas

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lengkuas segar dan kering. Rimpang lengkuas yang digunakan sebagai simplisia adalah rimpang yang berumur 1 tahun dan berwarna merah kecoklatan. Umur merupakan periode kritis yang sangat menentukan kualitas dan kuantitas hasil tanaman. Kualitas hasil tanaman meliputi senyawa yang terkandung dan kondisi fisik dari hasil tanaman, sedangkan kuantitas hasil tanaman meliputi banyaknya kandungan senyawa aktif dalam hasil tanaman. Oleh karena itu pemilihan umur tanaman yang tepat dan benar merupakan faktor penentu kualitas dan kuantitas simplisia yang akan digunakan.

Waktu pemanenan untuk rimpang bervariasi tergantung penggunaan. Tetapi pada umumnya pemanenan dilakukan pada saat tanaman berumur 8-10 bulan. Sebagai bahan obat, rimpang dipanen setelah tua yaitu umur 9-12 bulan setelah tanam. Rimpang yang dipanen pada umur tersebut menghasilkan kadar senyawa aktif yang tinggi. Faktor-faktor yang dapat meningkatkan kadar senyawa aktif sangat tergantung pada lingkungan antara lain jenis tanah, unsur hara, curah hujan, temperatur dan cahaya. Penanaman rimpang dilakukan pada saat awal musim hujan dan dipanen pada pertengahan musim kemarau untuk mendapatkan hasil yang optimal (Sembiring 2007).

Rimpang lengkuas diekstrak untuk diambil senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi terhadap rimpang segar dan kering. Maserasi adalah proses perendaman simplisia dengan menggunakan pelarut pada temperatur ruangan (Depkes RI 2000). Selama proses maserasi, wadah selalu dalam keadaan tertutup untuk menghindari kemungkinan terjadinya proses oksidasi oleh udara luar dan untuk menghindari pengaruh cahaya (sinar matahari) terhadap stabilitas senyawa-senyawa yang akan diambil. Pemilihan metode maserasi dikarenakan cara pengerjaannya mudah, menggunakan peralatan yang sederhana dan jika menggunakan metode ekstraksi dengan pemanasan yang terlalu tinggi, dikhawatirkan senyawa aktif yang terkandung akan rusak, sehingga pemilihan metode ekstraksi dengan maserasi dianggap lebih tepat.

Tujuan dilakukan pengeringan dalam ekstraksi lengkuas adalah untuk mengurangi kadar air pada bahan. Menkes (1994) mensyaratkan kadar air kurang dari 10%. Hal ini bertujuan untuk menjamin penyimpanan, serta mencegah pertumbuhan jamur yang dapat menurunkan mutu simplisia. Selain ekstraksi menggunakan simplisia (rim pang kering) juga menggunakan rimpang segar. Rimpang lengkuas diekstrak dalam kondisi segar supaya pelarut lebih mudah berpenetrasi ke dalam rimpang sehingga zat-zat yang terdapat dalam sampel lebih mudah terekstraksi. Selain itu juga diharapkan senyawa aktif yang dikehendaki dalam rimpang tidak mengalami kerusakan

oleh adanya metode pengeringan. Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut. Bila permukaan potongan simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari makin luas, maka penyarian akan bertambah baik (Nur 2009).

Ekstraksi rimpang lengkuas segar dan kering menggunakan metanol sebagai larutan penyarinya. Metanol merupakan pelarut polar dengan indek polaritas 0,73 yang mampu menarik senyawa-senyawa polar dari rimpang lengkuas (Solehudin 2001). Metanol banyak digunakan untuk ekstraksi tanaman obat dan dapat menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya (Noor et al. 2006). Hasil skrining fitokimia rimpang lengkuas mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid, dan steroid (Nurhayati 2010).

Ekstrak metanol rimpang lengkuas dipekatkan untuk mendapatkan hasil ekstrak berupa pasta berwarna coklat tua kehitaman. Pemekatan berarti peningkatan jumlah *partial solute* (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental atau pekat (Depkes RI 2000). Pemekatan ini bertujuan untuk menguapkan pelarut metanol yang masih tersisa sehingga didapatkan ekstrak kental (Arifin et al. 2006).

### Produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

Isolat *A. hydrophila* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan gurame (*Osporonemus gouramy*) yang sakit sehingga bakteri ini telah memproduksi faktor virulensinya. Faktor virulensi bakteri ini salah satunya adalah enzim eksoprotease (Khajanchi et al. 2009). Faktor virulensi tersebut berkaitan dengan kepadatan sel yang tinggi pada fase eksponensial/fase stasioner.

Enzim eksoprotease merupakan eksotoksin yang diproduksi oleh bakteri *A. hydrophila*. Enzim eksoprotease adalah enzim proteolitik yang berfungsi untuk melawan pertahanan tubuh inang untuk berkembangnya penyakit dan mengambil persediaan nutrisi inang untuk berkembang biak (Baehaki et al. 2005). Enzim eksoprotease ini juga merupakan faktor virulensi utama pada bakteri *A. hydrophila* sehingga perlu diturunkan produksinya jika ingin mencegah patogenitasnya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing*, dengan molekul sinyal C4-HSL (Swift et al. 1999).

Banyaknya enzim yang diproduksi oleh suatu bakteri tidak bisa diukur secara langsung (Aini 2006). Pengukuran produksi enzim oleh *A. hydrophila* dapat dilakukan karena adanya aktivitas katalisis yang dimiliki enzim eksoprotease (Adinarayana et al. 2005). Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui dengan cara kualitatif dan kuantitatif.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dari terbentuknya zona bening pada medium di sekitar biakan *A. hydrophila*. Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar

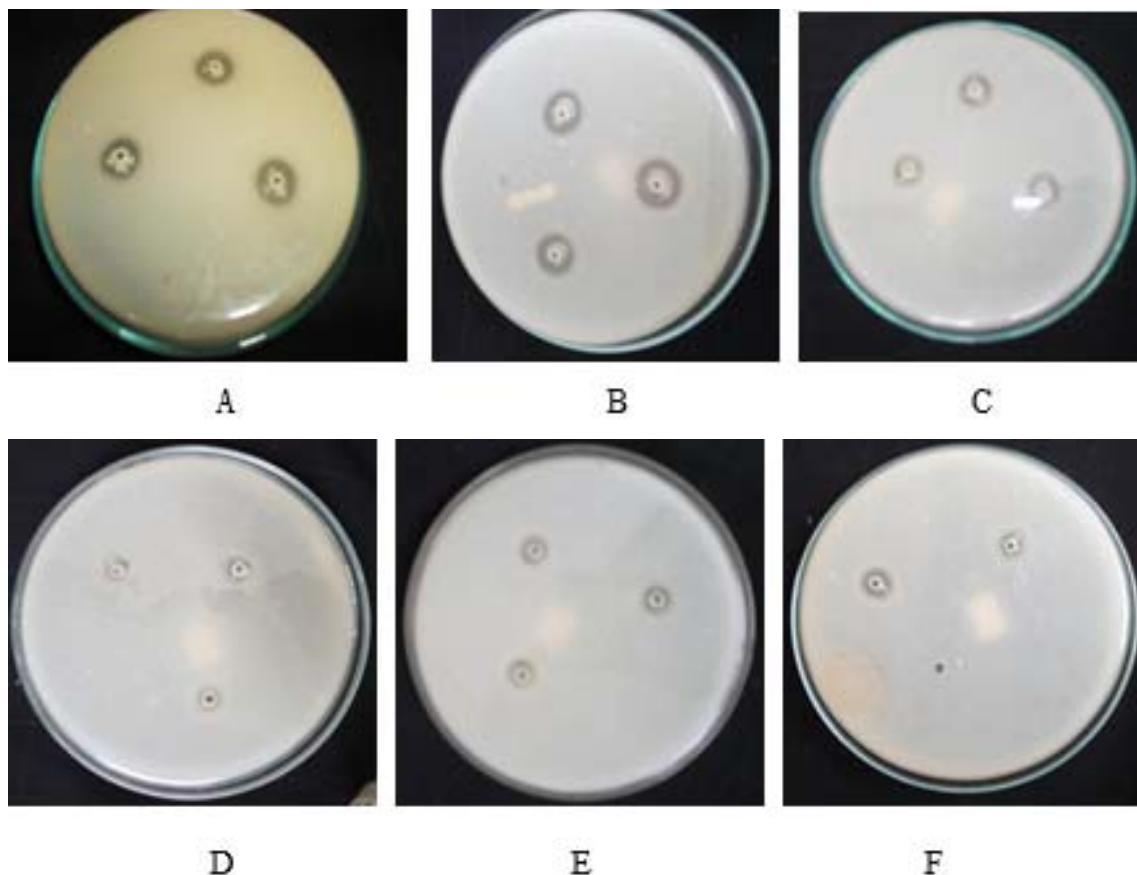
koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhyastuti dan Dewi 2001).

Isolat *A. hydrophila* ditumbuhkan dalam media LB Agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Media ini digunakan dalam uji kualitatif produksi enzim eksoprotease karena pada media ini terdapat kasein yang terkandung dalam susu skim sehingga dapat memacu aktivitas enzim proteolitik. Susu skim tersuspensi dalam media LB Agar. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur *plate agar*, bakteri akan mensekresikan eksoprotease. Suspensi susu skim ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada kultur media padat LB. Kasein yang terkandung dalam susu skim berfungsi sebagai substrat bagi enzim eksoprotease. Kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino dengan adanya enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Berkurangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona lisis (zona jernih) di sekitar koloni bakteri. Semakin luas zona jernih berarti semakin banyak produksi enzim eksoprotease yang disintesis sehingga kasein yang terhidrolisis juga semakin banyak begitu juga sebaliknya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1. Sementara Gambar 2 menunjukkan

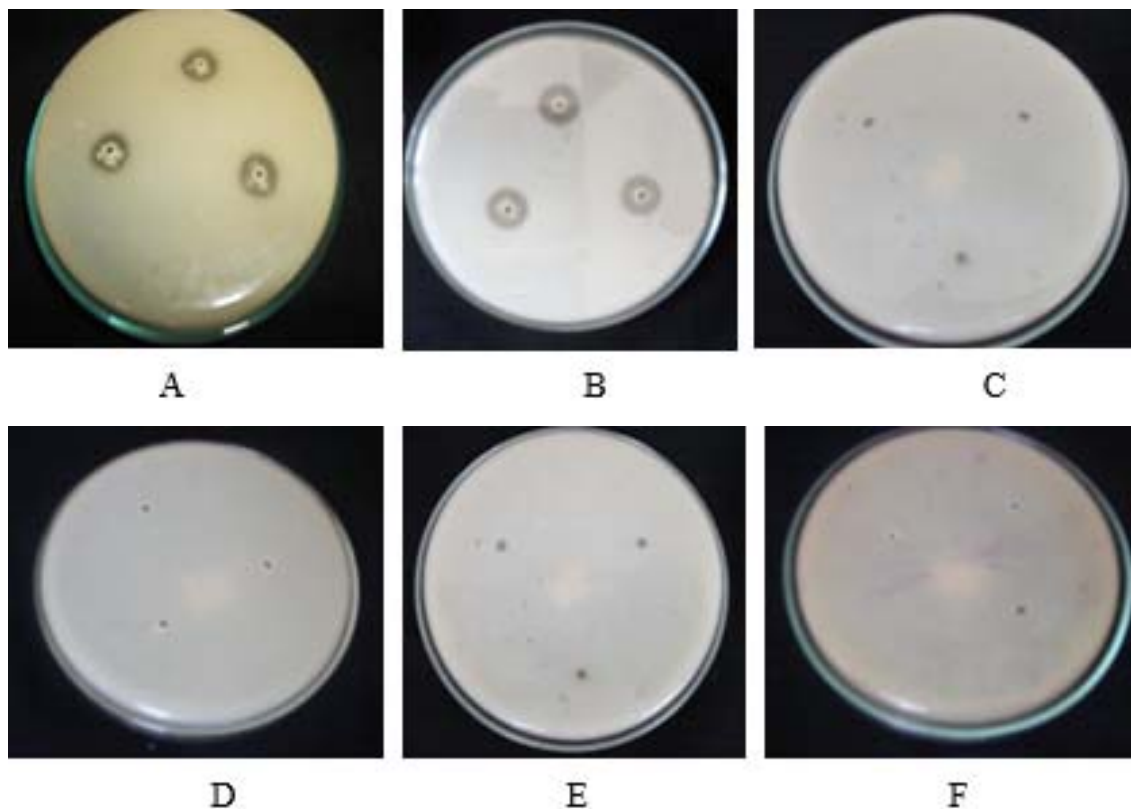
penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dan Gambar 3 menunjukkan penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar.



**Gambar 1.** Produksi enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona lisis di sekitar biakan *A. hydrophila*



**Gambar 2.** Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Keterangan: A: Kontrol (media LB Agar), B: LB Agar ditambah 2% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, C: LB Agar ditambah 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, D: LB Agar ditambah 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, E: LB Agar ditambah 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, F: LB Agar ditambah 10% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering



**Gambar 3.** Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar. Keterangan: A: Kontrol (media LB Agar), B: LB Agar ditambah 2% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, C: LB Agar ditambah 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, D: LB Agar ditambah 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, E: LB Agar ditambah 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, F: LB Agar ditambah 10% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Pada pembuatan media susu skim, susu yang digunakan harus disterilisasi secara terpisah. Sterilisasi ini merupakan pemanasan susu yang bertujuan untuk mematikan beberapa mikroba dan dilakukan dengan pemanasan pada suhu 110°C selama 30 menit. Jika susu langsung diautoklaf bersama-sama dengan komponen media lainnya, maka susu akan pecah dan menghambat pengamatan terhadap aktivitas protease mikroba.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya dalam mendegradasi substrat. Substrat yang digunakan yaitu senyawa kasein. Jumlah enzim yang disekresikan ke luar sel oleh bakteri sangat sedikit. Oleh karena itu pengukuran produksi enzim dapat dilakukan dengan mengukur aktivitas katalisis enzim. Pengukuran aktivitas katalisis enzim ini dilakukan menggunakan metode spektrofotometri.

### **Penghambatan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* secara kualitatif**

#### *Penghambatan produksi enzim eksoprotease oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering*

Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan kemampuan dari isolat *A. hydrophila* untuk merombak protein dengan membandingkan antara zona bening di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni. Hasil dari penelitian ini dapat diamati besarnya zona bening di sekitar

koloni setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%. Diameter zona bening dapat dilihat pada Tabel 1.

Zona bening yang terbentuk setelah inkubasi bakteri selama 24 jam menunjukkan bahwa protein pada susu telah dipecah oleh protease yang dihasilkan dari bakteri menjadi asam amino. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dari tiap konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% mengalami penurunan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan, tetapi belum optimal karena masih terbentuk zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Oleh karena itu ekstrak metanol rimpang lengkuas kering ini tidak dilanjutkan pada uji kuantitatif.

Pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% belum optimal menghambat sistem *quorum sensing* karena masih terbentuk zona bening di sekitar koloni. Pengeringan merupakan kegiatan yang penting artinya dalam pengawetan bahan maupun pengolahan hasil pertanian. Pengeringan adalah pengeluaran air sampai kadar air yang seimbang dengan keadaan udara atmosfer normal atau pada kadar air dimana penurunan mutu bahan oleh kapang, aktivitas enzim dan serangga dapat diabaikan. Penelitian ini menggunakan metode pengeringan dengan cara panas buatan yaitu oven pada suhu 45°C. Pengeringan

menggunakan oven memiliki keuntungan antara lain tidak tergantung cuaca, kapasitas pengeringan dapat dipilih sesuai yang diperlukan, tidak memerlukan tempat yang luas, dan kondisi pengeringan dapat dikontrol (Reco dan Yustina 2003).

Bahan pangan yang dikeringkan umumnya memiliki nilai gizi yang lebih rendah dibandingkan bahan segarnya. Selama pengeringan terjadi perubahan warna, tekstur, aroma, dan lain-lain. Pada umumnya bahan yang dikeringkan akan berubah warna menjadi coklat. Perubahan warna ini disebabkan oleh reaksi-reaksi baik enzimatis maupun non enzimatis.

Efek lainnya adalah terjadi "case hardening" yaitu keadaan dimana bagian luar atau permukaan bahan sudah kering, sedangkan bagian dalam masih basah. Apabila suhu pengeringan terlalu tinggi, hal ini akan menyebabkan bagian permukaan cepat mengering dan menjadi keras sehingga menghambat penguapan air selanjutnya.

Pada proses pengeringan rimpang lengkuas ini terjadi pengurangan kadar air karena sebagian air pada rimpang menguap selama pemanasan. Selama pemanasan tersebut, kandungan senyawa aktif pada rimpang lengkuas mengalami penurunan. Lama pengeringan menyebabkan banyaknya kerusakan senyawa aktif yang terkandung dalam lengkuas serta senyawa lain seperti vitamin, pigmen juga ikut mengalami penguapan.

#### *Penghambatan produksi enzim eksoprotease oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar*

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, 8, dan 10% sudah dapat menghambat produksi enzim eksoprotease hingga tidak terbentuk lagi zona bening di sekitar koloni. Hal ini disebabkan oleh penurunan produksi enzim eksoprotease. Penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh penghambatan sistem *quorum sensing* yang meregulasi sintesis enzim eksoprotease oleh senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol rimpang lengkuas. Konsentrasi 4% dari uji kualitatif merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk menurunkan aktivitas enzim eksoprotease karena dari konsentrasi 4, 6, 8, dan 10 % yang dapat menurunkan produksi enzim eksoprotease, konsentrasi 4% merupakan konsentrasi paling kecil dan sudah mampu menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Apabila sistem *quorum sensing* terhambat, maka produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* menurun sehingga kasein yang terhidrolisis juga akan berkurang dan diameter zona bening berkurang bahkan tidak terbentuk lagi.

Ekstrak metanol rimpang lengkuas segar memiliki aktivitas yang lebih optimal daripada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Hasil pengujian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar terhadap aktivitas enzim eksoprotease menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang diujikan dapat menghambat aktivitas enzim eksoprotease

*A. hydrophila* sedangkan pada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan seluruh konsentrasi ekstrak yang diujikan ternyata masih terbentuk zona bening di sekitar koloni. Menurut Magdalena (2007), ekstrak laos segar mempunyai pengaruh terbaik dalam menekan pembentukan biofilm *V. cholerae*.

#### *Penghambatan produksi enzim eksoprotease Aeromonas hydrophila secara kuantitatif*

Pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan tiga macam pengukuran, yaitu pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*, pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dalam mendegradasi kasein, dan pengukuran kadar protein. Berdasarkan uji kualitatif diketahui bahwa ekstrak metanol rimpang lengkuas segar mampu menghambat produksi enzim eksoprotease sehingga dilanjutkan dengan pengukuran secara kuantitatif.

**Tabel 1.** Diameter zona bening pada pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering

Persentase ekstrak metanol rimpang lengkuas kering (%)	Diameter zona bening (mm)
0	9,6
2	7,4
4	5,7
6	2,4
8	2,4
10	1,4

**Tabel 2.** Diameter zona bening pada pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Persentase ekstrak metanol rimpang lengkuas segar (%)	Diameter zona bening (mm)
0	9,6
2	9
4	tidak terbentuk zona bening
6	tidak terbentuk zona bening
8	tidak terbentuk zona bening
10	tidak terbentuk zona bening

**Tabel 3.** Hasil analisis statistik pertumbuhan dan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* dengan pemberian konsentrasi 4, 6, 8% dan DMSO

Konsentrasi ekstrak metanol rimpang lengkuas segar	Absorbansi pertumbuhan <i>A. Hydrophila</i>	Absorbansi aktivitas enzim eksoprotease
Kontrol	4,796a	8,400a
4%	5,121a	6,408ab
6%	4,725a	6,950ab
8%	4,867a	3,550b
DMSO	5,350a	7,729ab

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama (dalam kolom yang sama) menunjukkan tidak berbeda nyata dalam uji tukey pada taraf uji 5%

Pengukuran kekeruhan medium pada selang waktu tertentu dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri memperbanyak sel dalam medium. Data-data yang diperoleh dibuat kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui bahwa penurunan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan oleh terhambatnya pertumbuhan bakteri tersebut. Akan tetapi, penurunan aktivitas enzim eksoprotease disebabkan penurunan produksi enzim eksoprotease oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol rimpang lengkuas segar yang dapat menghambat sistem *quorum sensing* bakteri.

Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke medium kultur. Kekeruhan tersebut diukur dengan mengukur turbiditas medium pada panjang gelombang 600 nm selama 24 jam. Kultur bakteri yang semakin keruh menunjukkan semakin banyak jumlah selnya. Pertumbuhan *A. hydrophila* sudah mengalami fase kematian pada jam kesepuluh. Hal ini disebabkan oleh keterbatasan substrat, kepadatan populasi yang tinggi, tekanan parsial oksigen yang rendah, dan timbunan produk metabolisme yang toksik. Populasi *A. hydrophila* bertambah secara cepat dan teratur menjadi dua kali lipat pada interval waktu (waktu generasi) yang singkat selama inkubasi. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel lebih kurang 10 menit (Samsundari 2006).

Kurva pertumbuhan pada Gambar 4 terlihat bahwa kerapatan optik kultur medium pada kontrol dari jam 0-2 sudah menunjukkan kenaikan. Fase ini merupakan fase eksponensial. Fase ini menunjukkan bahwa sel mulai memperbanyak diri, ukuran sel mulai membesar, dan kurva mulai naik menunjukkan terjadinya pertumbuhan populasi. Fase eksponensial terjadi ketika aktivitas metabolisme sel paling tinggi, kecepatan pembelahan maksimum, serta waktu generasi paling pendek dan konstan.

Jumlah populasi bakteri cenderung konstan setelah jam kedua. Pada saat itu bakteri memasuki fase stasioner. Fase ini terjadi sampai jam kesepuluh. Pada fase ini menunjukkan adanya kompetisi sesama bakteri dalam memperebutkan nutrisi dan ruang sehingga jumlah bakteri yang hidup hampir sama dengan jumlah bakteri yang mati. Kerapatan optik sangat menurun setelah jam kesepuluh. Pada fase ini bakteri mulai memasuki fase kematian. Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah tertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pemberian konsentrasi 4, 6, dan 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, pertumbuhan *A. hydrophila* berlangsung dengan normal dimana ekstrak tidak berpengaruh terhadap terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*.

Pemakaian DMSO digunakan sebagai pelarut ekstrak dan merupakan kontrol negatif. Pengujian terhadap DMSO digunakan untuk memastikan bahwa penambahan DMSO tidak mempengaruhi pertumbuhan *A. hydrophila*. Apabila dibandingkan dengan kontrol negatif, pemberian konsentrasi 4, 6, dan 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas

segar tidak menunjukkan perbedaan nyata pada pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO maupun ekstrak tidak berpengaruh<sup>lyiii</sup> pada pertumbuhan bakteri. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil analisis statistik variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim eksoprotease dapat dilihat pada Tabel 3.

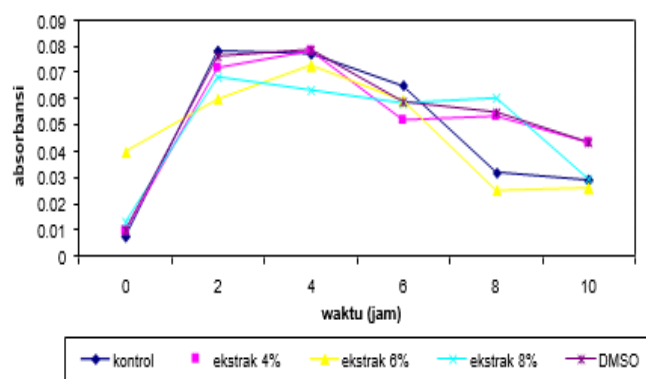
Uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan antara kontrol dengan pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar pada seluruh konsentrasi ekstrak yang diujikan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Uji statistik juga menunjukkan bahwa pemakaian DMSO sebagai pelarut ekstrak tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini berarti penggunaan DMSO sebagai pelarut tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan ataupun penurunan aktivitas enzim.

Aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* di medium LB Broth diketahui dengan mengukur kemampuan enzim eksoprotease menghidrolisis substrat menggunakan metode Kunitz (1971). Pengukuran dilakukan selama 24 jam, tetapi pertumbuhan bakteri pada jam kesepuluh sudah mengalami kematian. Oleh karena itu pengukuran aktivitas enzim eksoprotease juga dilakukan hanya sampai jam kesepuluh. Pengukuran enzim eksoprotease dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm dan dilakukan bersamaan dengan pengukuran absorbansi pertumbuhan *A. hydrophila*.

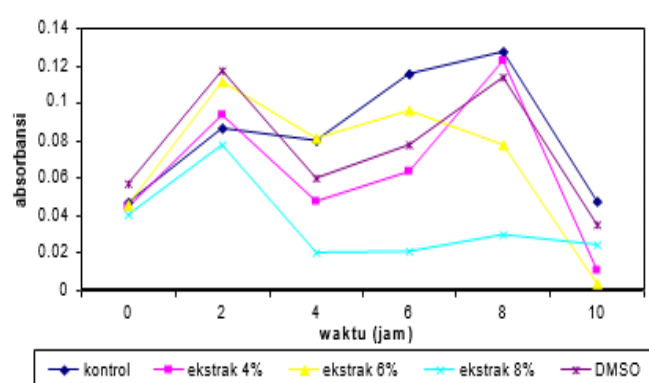
Pada metode ini kasein digunakan sebagai substrat untuk mengetahui tingkat aktivitas enzim eksoprotease. Kasein akan dihidrolisis oleh enzim eksoprotease dengan memutuskan ikatan peptida kemudian akan menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas eksoprotease ditentukan berdasarkan jumlah asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein (Naiola dan Widhiastuti 2002).

Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan bahwa produksi enzim eksoprotease sudah terdeteksi sejak jam ke-0 yaitu pada waktu bakteri memasuki fase eksponensial. Hal ini terjadi karena dari inokulum berumur 24 jam sudah ada produksi enzim eksoprotease sehingga pada pengukuran menggunakan spektrofotometer pada jam ke-0 sudah terdeteksi adanya enzim eksoprotease. Menurut Marokhazi (2004), aktivitas proteolitik *A. hydrophila* terdeteksi pada fase eksponensial.

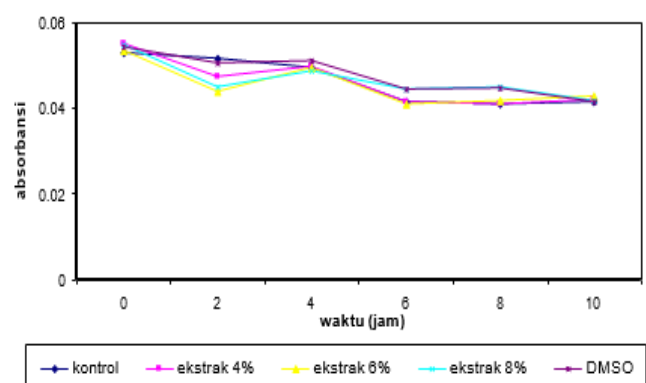
Kondisi optimum untuk produksi enzim perlu dicari untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi dari mikroorganisme penghasilnya. Keadaan lingkungan yang baik bagi sintesis enzim, biasanya juga baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Mencari kondisi optimum bagi sintesis enzim dapat berarti pula mencari kondisi optimum bagi pertumbuhan mikroba dan mencari hubungan antara sintesis enzim spesifik dengan kecepatan pertumbuhan. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain pH, suhu, aerasi dan jenis media (Anggarani 2003).



**Gambar 4.** Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*



**Gambar 5.** Kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*



**Gambar 6.** Kurva pengukuran protein setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Berdasarkan kurva pertumbuhan *A. hydrophila*, diketahui bahwa produksi enzim eksoprotease optimum terjadi setelah masa pertumbuhan sel eksponensial. Pada isolat *A. hydrophila* aktivitas enzim eksoprotease tertinggi dicapai pada jam kedelapan ketika pertumbuhannya mencapai fase stasioner, diduga terkait dengan penyediaan nutrisi bagi *A. hydrophila*. Hal ini didukung oleh Anggarani (2003) yang menyatakan umumnya *Bacillus sp.*

menghasilkan protease ekstraseluler setelah pertumbuhannya mencapai fase eksponensial. Weichart (2003) menyebutkan bahwa sintesis protease ekstraseluler optimum biasanya terjadi pada fase stasioner. Hal ini berkaitan dengan adanya glukosa dalam media yang berlebih pada saat bakteri memasuki fase eksponensial. Saat memasuki fase eksponensial, ketersediaan nutrisi bagi bakteri masih banyak dan glukosa yang terdapat pada media juga masih banyak sehingga sintesis enzim terhambat. Memasuki fase stasioner, ketersediaan nutrisi mulai berkurang dan glukosa juga menurun sehingga biosintesis enzim aktif kembali. Berdasarkan kurva pada Gambar 5 menunjukkan apabila dibandingkan dengan kontrol, maka konsentrasi 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar tidak dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease mulai terjadi pada jam ke-4 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stasioner. Pemberian 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar juga tidak dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease ini mulai terjadi pada jam ke-6 atau pada saat *A. hydrophila* juga memasuki fase stasioner. Namun pemberian 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease yang ditandai dengan menurunnya produksi enzim eksoprotease dan mulai terjadi dari jam ke-0 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase eksponensial. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil analisis statistik pada Tabel 3. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar berbeda nyata dengan kontrol.

Adanya perbedaan nilai aktivitas enzim eksoprotease secara kualitatif dan secara kuantitatif kemungkinan disebabkan karena perbedaan suhu alami pertumbuhan bakteri dengan perlakuan di laboratorium sehingga aktivitas bakteri tidak optimum. Pertumbuhan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti faktor fisika-kimia (suhu, pH, aerasi, agitasi, dan komposisi media tumbuh). Oleh karena itu tidak selalu terdapat korelasi yang baik antara zona jernih protein di sekitar zona jernih koloni pada media padat dengan kemampuan organisme tersebut. Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab tidak terkorelasinya nilai aktivitas hidrolisis secara kualitatif dengan nilai enzim secara kuantitatif adalah kecepatan pertumbuhan bakteri pada medium padat dan cair serta jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium (Pakpahan 2009).

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing* dengan molekul sinyal C4-HSL. Penghambatan sistem *quorum sensing* dilakukan untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease, yaitu dengan menggunakan ekstrak metanol rimpang lengkuas segar. Ekstrak ini diharapkan dapat mengurangi sekresi molekul C4-HSL supaya tidak terjadi pengaktifan gen penyandi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Selain uji pertumbuhan dan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*, juga dilakukan uji protein. Uji protein dilakukan bersamaan dengan pengukuran absorbansi pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan Gambar 6 terlihat bahwa protein yang terdeteksi dalam pengukuran selama 10 jam setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, dan 8% menunjukkan bahwa kadar protein tidak berbeda jika dibandingkan dengan kontrol. Kurva tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadi penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa pengukuran kekeruhan tidak dapat membedakan antara bakteri yang hidup dengan yang mati sehingga bakteri yang mati tetap terukur. Oleh karena itu dilakukan pengukuran protein yang bertujuan untuk mengetahui bahwa bakteri yang diuji hanya bakteri yang masih hidup karena jika bakteri telah mati, maka tidak mensintesis protein dan hanya bakteri yang hidup saja yang mampu mensintesis protein.

Berdasarkan hal di atas dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dapat menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Penghambatan *quorum sensing* ditunjukkan dengan adanya penurunan aktivitas enzim eksoprotease yang disebabkan oleh senyawa kimia dari ekstrak rimpang lengkuas segar tanpa disertai dengan penghambatan pertumbuhan bakteri sehingga penghambatan sistem *quorum sensing* ini dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan di bidang sektor perikanan yaitu sebagai bentuk pengobatan pada penyakit ikan terutama penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila*.

## KESIMPULAN

Terjadi penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering. Ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar lebih optimal untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* daripada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Berdasarkan hasil analisis statistik, konsentrasi 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk penghambatan enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Jyothi B, Ellaiah P. 2005. Production of Alkaline Protease with Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. *AAPS PharmSciTech* 6 (03): 391-397.
- Aini N, Setyawan AD. 2006. Senyawa Bioaktif Penghambat Sistem Quorum Sensing pada Bakteri Gram Negatif. *Biofarmasi* 4 (1): 35-42.
- Aini N. 2006. Penurunan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak Buah Tomat. Skripsi. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.
- Anggarani M. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Protease Alkalin dan Karakterisasi Enzim. [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arifin H, Anggraini N, Handayani D, Rasyid R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr. *J Sains Tek Far* 11 (2): 88-93.
- Octyaningrum A. 2009. Karakteristik Pengeringan Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Roxb) Menggunakan Metode Pengeringan Oven Dengan Pra-Proses Perendaman Osmotik. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, Jember.
- Baehaki A, Nurhayati T, Suhartono MT. 2005. Karakteristik protease dari bakteri patogen *staphylococcus epidermidis*. *J Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 8 (2): 25-35.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilization. The principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Depkes RI. 2000. Parameter Umum Standar Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama. Direktorat jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Irawan GDE, Winarno K, Susilowati A. 2003. Pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap penurunan mortalitas lele dumbo (*Clarias gariepinus*) akibat infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Enviro* 3 (1): 28-35.
- Khajanchi BK, Sha J, Kozlova EV, Erova TE, Suarez G, Sierra JC, Popov VL, Horneman AJ, Chopra AK. 2009. N-Acylhomoserine Lactones Involved in quorum sensing control the Type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *J Microbiology* 155: 3518-3531.
- Kievit TR, Iglewski BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *J Infect Immunol* 68 (9): 4839-4849.
- Lestari U. 2006. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb)). [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4): 999-1007.
- Magdalena S, Lay BW. 2007. Isolasi *Vibrio cholerae* dan Penapisan Senyawa Bioaktif Asal Ekstrak Tanaman Penghambat Pembentukan Biofilm. Unika Atma Jaya, Jakarta.
- Mariyono, Sundana A. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian* 7 (1):-.
- Marokhazi J, Lengyel K, Pekár S, Felföldi G, Patthy A, Gráf L, Fodor A, Venekei I. 2004. Comparison of Proteolytic Activities Produced by Entomopathogenic Photobacterium Bacteria: Strain-and Phase-Dependent Heterogeneity in Composition and Activity of Four Enzymes. *J Environ Microbiol* 70 (12): 7311-7320.
- Maulina I, Haetami K, Junianto. 2006. Pengaruh Meniran Dalam Pakan Untuk Mencegah Infeksi Bakteri *Aeromonas* sp. pada Benih Ikan Mas (*C. carpio*). UNPAD, Bandung.
- Menkes RI. 1994. Persyaratan Obat Tradisional. Direktorat jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Naiola E, Widhyastuti N. 2002. Isolasi seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa iaolat bakteri. *Berita Biologi* 6 (3): 467-473.
- Noor SM, Paeloengan M, Yulianti T. 2006. Analisis Senyawa Kimia Sekunder dan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L) terhadap *Salmonella typhi* dan *Shigella boydii*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006.
- Nur M. 2009. Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Metanol Bunga Pepaya Jantan (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten Antibiotik. [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Nurhayati T, Fachriyah E., Kusri D. 2010. Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Ekstrak Etil Asetat Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galanga* L. Wild). Seminar Tugas Akhir S1 Jurusan Kimia FMIPA UNDIP, Jurusan Kimia UNDIP, Semarang.
- Oka I.M, Fanny P. 2008. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dari Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L.). *J Kimia* 2 (2): 100-104.
- Pakpahan R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipholon Tapanuli Utara Sumatra Utara. [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana. Program Studi Biologi Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Persson T, Hansen T.H., Rasmussen T.B., Skindersoe S.E., Givskov M., Nielsen J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactone and natural product from garlic. *J Royal Soc* 3 (2): 253-262.
- Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann KS, Larsen JL, Johansen C, Riedel K, Eberl L, Givskov M, Gram L. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortality caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss wal-baum*). *J Syst Appl Microbiol* 27 (3): 350-359.

- Reco B, Yustina SH. 2003. Pengaruh Metode Pengeringan dengan Oven dan Pengeringan di bawah Sinar Matahari terhadap Cemaran *Staphylococcus aureus* pada Simplisia Dlingo. JFSK 1 (2): 89-96.
- Samsundari S. 2006. Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan mas (*Ciprinus carpio*). Gamma 2 (1): 71-83.
- Sembiring BB. 2007. Teknologi Penyiapan Simplisia Terstandar Tanaman Obat. Warta Puslitbangbun 13 (2).
- Solehudin H. 2001. Ekstraksi Minyak dan Oleoresin dari Kulit Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* Blume). [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Swift S, Lynch MJ, Fish L, Leink DF, Thomas JM, Stewart CJAB, Williams P. 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blokade of Eksoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity 4: 18-28.
- Tan E, Low KW, Wong WSF, Leung KY. 1998. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. J Microbiol 144: 299-307.
- Thomas TD, Pritchard GG. 1987. Proteolytic enzymes from dairy starter cultures. Fed Eur Microbiol Soc Microbiol 46: 245.
- Weichart D1, Querfurth N, Dreger M, Hengge-Aronis R. 2003. Global Role for ClpP-Containing Proteases in Stationary-Phase Adaptation of *Escherichia coli*. J Bacteriol 185 (1): 115-125.
- Widhyastuti N, Dewi RM. 2001. Isolasi Bakteri Proteolitik dan Optimasi Produksi Protease. Laporan Teknik. Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat Penelitian Biologi. LIPI, Bogor.
- Ye Y, Li B. 2006. 19S-19-Acetoxychavicol acetate isolated from alpinia galanga inhibits human immunodeficiency virus Type 1 Replication by Blocking Rev Transport. J General Virol 87: 2047-2053.