

Sensitivitas Larutan Propolis terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sensitivity of Propolis Solutions on *Aeromonas hydrophila* Bacteria

Surandha Bako^{1*}, Iesje Lukistyowati², dan Morina Riau waty²

¹ Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau

² Dosen Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau

*Email : Surandhabako@gmail.com

Abstrak

Diterima
18 Januari 2019

Disetujui
24 Agustus 2019

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2016 – Mei 2017 bertempat di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui dosis dan kemampuan larutan propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* serta dosis yang aman digunakan untuk ikan lele dengan Uji LD₅₀ dengan cara perendaman. Metode yang dilakukan adalah eksperimen dan uji sensitivitas menggunakan metode Kirby Baur Disk Diffusion dari dosis 100% hingga 0,5% dan diulang sebanyak 3 kali. Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dengan dosis 9%, 8%, 7%, 6% dan 5%. Sedangkan uji toksisitas LD₅₀ menggunakan ikan lele (*Clarias sp*) dengan dosis 5%, 6% dan 7% selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan larutan propolis mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis terkecil 0,9% setara dengan 90 ppm, dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,78 mm, dosis MIC yang aman digunakan ada pada dosis 6% setara dengan 600 ppm dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan zona hambatan yang terbentuk selebar 8,15 mm dan kepadatan bakteri sebanyak 278 Sel/mL. Hasil uji toksisitas LD₅₀ menggunakan dosis MIC (5%; 6%; 7%) tidak tercapai.

Kata kunci: Propolis, *Aeromonas hydrophila*, *Clarias sp*, Minimum Inhibitory Concentration, Lethal Dose 50%

Abstract

This research was conducted in November 2016 - May 2017 in Parasites and Fish Disease Laboratory of Marine and Fisheries Faculty University of Riau. The purpose of this research is to know the dosage and the ability of propolis solution in inhibiting the growth of *Aeromonas hydrophila* bacteria and the safe dosage used for common catfish with LD₅₀ tested by immersion. The used method were experiment and sensitivity test using Kirby Baur Disk Diffusion method from dose 100% to 0.5% and repeated 3 times. The used dosage in Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests were 9%, 8%, 7%, 6% and 5%. While LD₅₀ toxicity test using common catfish (*Clarias sp*) with dose 5%, 6% and 7% for 24 hours. The results showed that the propolis solution was able to inhibit the growth of *A. hydrophila* bacteria with the smallest dosage of 0.9% equal to 90 ppm, with the diameter inhibitory average zone of 6.78 mm, the safest dose of MIC was present at 6% doses equivalent to 600 ppm with 8.15 mm inhibition zone width and inhibited bacterial growth *A. hydrophila* with an average number of colonies as much as 278 Cells/mL. LD₅₀ toxicity test using MIC dosage results showed that no fish mortality for 24 hours.

Keyword: Propolis, *Aeromonas hydrophila*, *Clarias sp*, Minimum Inhibitory Concentration, Lethal Dose 50%

1. Pendahuluan

Petani ikan sering mengalami kegagalan dalam mengusahakan budidaya secara intensif, masalah yang sering ditemui antara lain adanya penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu bakteri yang sering menyerang pada ikan air tawar di perairan adalah *Aeromonas hydrophila*. Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* akan menunjukkan septicemia, ulserasi kulit, erosi sirip, exophthalmia, dan sisik yang mengelupas (Ibrahim et al., 2008).

Aeromonas hydrophila menyebabkan penyakit pada ikan disebut sebagai “*Motile Aeromonas Septicemia*” (MAS), “*Hemorrhagic Septicemia*”, “*Ulcer Disease*”, atau “*Red-Sore Disease*”. Adanya lesi yang ditimbulkan, termasuk septicemia dimana bakteri maupun toksin bakteri menyebar ke berbagai organ tubuh ikan dan adanya ulser pada kulit ikan (Swann dan White, 1989). *A. hydrophila* dapat memproduksi enzim hemolisin yang mampu membuka jaringan permukaan kulit sehingga menyebabkan *hemorage*. Toksin hemolisin dengan target memecah sel-sel darah merah, sehingga sel keluar dari pembuluh darah, menimbulkan warna kemerahan pada permukaan kulit (Huys et al., 2002 dalam Mangunwardoyo, 2010). Pemakaian antibakteri telah banyak digunakan dalam perikanan budidaya dan dianggap sebagai solusi yang paling efektif, seperti penggunaan *oxytetracycline*, *sulfonamide*, dan *sulfamerazine* yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Penggunaan antibiotik dalam penanggulangan penyakit menunjukkan hasil yang menggembirakan. Akan tetapi penggunaan antibiotik yang berkepanjangan dapat berdampak, yaitu bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan dapat mencemari lingkungan. Selain itu, penggunaan antibiotik dalam budidaya skala besar kurang efisien, karena harga antibiotik yang mahal, sehingga diperlukan alternatif pengganti antibiotik sebagai pengobatan dan pencegahan penyakit yang efektif tetapi murah, tidak menyebabkan resisten terhadap bakteri dan ramah lingkungan.

Salah satu produk alam yang dapat digunakan sebagai bahan anti mikroba yang ramah lingkungan adalah propolis. Propolis berasal dari lebah yang menghasilkan madu dengan cara menyerap nektar yang ada pada tanaman-tanaman, dan produk akhirnya adalah madu. Madu tersebut telah banyak dimanfaatkan baik di Indonesia sendiri maupun negara-negara lain karena khasiatnya yang telah diketahui dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit dan meningkatkan kesehatan tubuh manusia. Selain madu, lebah juga menghasilkan produk lain seperti *Royal Jelly*, *Pollen*, *Venom*, dan juga propolis. Setiap produk lebah tersebut mempunyai fungsi dan manfaat yang berbeda bagi kesehatan manusia.

Secara *In Vitro*, propolis dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) dengan lebar diameter zona hambat bakterinya sebesar 2 mm (Novilla, 2009). Menurut Sabir (2009), propolis dari jenis lebah *Trigona* sp. mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans* secara *In Vitro* dengan konsentrasi minimum 0,1%. Yusuf (2015) menyatakan bahwa, propolis memiliki daya hambat yang baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 1 cm, namun tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang Sensitivitas Larutan Propolis terhadap Bakteri *A. hydrophila*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis dan kemampuan larutan propolis dalam menghambat ataupun membunuh bakteri *A. hydrophila* serta dosis yang aman digunakan untuk ikan lele dengan Uji LD₅₀ dengan cara perendaman. Sedangkan manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah dapat menginformasikan dengan tepat tentang dosis yang aman digunakan untuk ikan, sehingga dosis tersebut mampu mencegah maupun mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*.

2. Bahan dan Metode

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2016 – Mei 2017, bertempat di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dan uji sensitivitas menggunakan metode Kirby Baur *Disk Diffusion* dengan menggunakan *Disk Blank* berdiameter 6 mm, tiap dosis diulang sebanyak 3 kali. Dosis larutan propolis yang digunakan untuk uji sensitivitas adalah sebagai berikut:

- | | | |
|--------------|---|-------------|
| - Dosis 100% | - Dosis 90% | - Dosis 80% |
| - Dosis 70% | - Dosis 60% | - Dosis 50% |
| - Dosis 40% | - Dosis 30% | - Dosis 20% |
| - Dosis 10% | - Kontrol (Antibiotik <i>Oxytetracycline</i> (0,2 µg/mL)) | |

2.2. Pembuatan Larutan Propolis

Larutan propolis yang digunakan dalam penelitian ini adalah propolis “Melia” siap pakai dari lebah jenis *Trigona* sp. Kandungan propolis dalam satu botolnya berisi 6 mL larutan propolis, dimana setiap mililiternya mengandung 900 mg propolis *liquid*. Untuk media pengencer menggunakan Aquades yang terlebih dahulu disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 30 menit.

2.3. Penyediaan Isolat *A. hydrophila*

Aeromonas hydrophila yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi langsung ke dalam media GSP dari ikan lele (*Clarias* sp) yang berasal dari Sungai Bencah Kelubi Kecamatan Kampar. Setelah diisolasi dari ikan lele dan di inkubasi dalam *incubator* selama 24 jam, bakteri *A. hydrophila* yang tumbuh dicirikan media GSP berubah warna dari merah menjadi kuning dan koloni bakteri berwarna kuning. Isolat bakteri tersebut positif bakteri dari golongan *Aeromonas*. Kultur isolat *Aeromonas* yang telah tumbuh diisolasi kembali ke media TSA, agar mendapatkan koloni bakteri yang seragam. Untuk memastikan koloni yang seragam tersebut termasuk bakteri *Aeromonas*, dipindahkan kembali ke dalam GSP. Setelah bakteri *Aeromonas* dalam media GSP tumbuh dan mencirikan positif *Aeromonas*, bakteri tersebut diisolasi kembali ke dalam media TSA Agar miring, maupun kedalam TSB dan siap digunakan untuk penelitian. Untuk mendapatkan kepadatan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^8 CFU/mL larutan bakteri, dibandingkan dengan larutan *Mc farland* 1.

2.4. Uji Sensitivitas Larutan Propolis Terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Pengamatan zona hambat menggunakan metode kepekaan sensitivitas mengacu kepada metode cakram Kirby-Bauer-Disk-Diffusion dengan menggunakan *disc blank* yang berdiameter 6 mm. Tahap awal, diambil sebanyak 50 µL bakteri *A. hydrophila* yang telah tumbuh dalam media TSB selama 24 jam (dengan 10^8 CFU/mL) kemudian disebar secara merata dengan menggunakan *spreader glass* pada media TSA. *Disc blank* untuk uji sensitivitas diberi larutan propolis sebanyak 50 µL sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, didiamkan selama ± 5 menit. Masing – masing *disc blank* yang telah diberi larutan propolis diletakkan dengan menggunakan pinset dalam cawan petri yang berisi media TSA yang telah diberi inokulan *A. hydrophila* dilakukan secara aseptik di dalam *laminar flow*. Selanjutnya diinkubasi dalam *incubator* pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan diameter zona hambat yang terbentuk dengan cara mengukur lebar diameter zona bening dengan menggunakan jangka sorong (Affandi *et al.*, 2008).

2.5. Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

Uji MIC dilakukan dari dosis yang terkecil yang masih terbentuk zona hambatannya hingga dosis yang tidak terbentuk zona hambatannya. Larutan propolis (sesuai dosis) dimasukkan ke dalam media cair TSB steril menggunakan Mikropipet, kemudian di vortex selama ± 2 menit agar homogen. Larutan propolis dan media TSB tersebut diambil (dibuang) sebanyak 100 µL, kemudian ditambahkan pula 100 µL TSB yang berisi bakteri *A. hydrophila* (yang telah diinkubasi sebelumnya selama 24 jam) dan kemudian di vortex selama ± 2 menit. Setelah homogen diambil larutan (campuran propolis, TSB dan bakteri *A. hydrophila*) tersebut sebanyak 100 µL menggunakan mikropipet dan ditumbuhkan ke dalam media TSA, diratakan menggunakan *spreader glass* agar pertumbuhan koloni menyebar rata atau tidak menumpuk, sehingga memudahkan dalam perhitungan koloni bakteri yang tumbuh.

Selanjutnya cawan tersebut diinkubasi selama 24 jam menggunakan *incubator*, dan diamati pertumbuhan koloni bakteri kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh menggunakan *colony counter* (Soleha, 2015). Cawan penghitungan koloni bakteri sesuai Waluyo (2008), yaitu dengan cara menghitung koloni bakteri yang tumbuh di dalam cawan petri berkisar antara 30 – 300 koloni.

2.6. Uji Toksisitas LD₅₀ Larutan Propolis terhadap Ikan Lele (*Clarias sp*).

Uji LD₅₀ (*Lethal Dose 50% of Responses*) dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang berapa batas dosis bahan alami atau bahan antibakteri yang kita gunakan aman untuk ikan dan tidak menyebabkan kematian. Informasi tersebut nantinya dapat digunakan untuk menilai bahaya atau tidaknya zat tersebut terhadap ikan. Selain itu juga dapat bermanfaat untuk melakukan tindakan pencegahan maupun pengobatan bila tidak ada efek toksik atau keracunan (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

Uji toksisitas dilakukandengan mempersiapkan ikan uji, yaitu ikan Lele berukuran 5 – 6 cm sebanyak 10 ekor per wadah. Ukuran wadah Uji Toksisitas LD₅₀ adalah menggunakan toples plastik dengan kapasitas 5 Liter dan di isi dengan air bersih sebanyak 1 Liter, kemudian dimasukkan larutan propolis sesuai dengan dosis MIC di homogenkan menggunakan *aerasi*, kemudian ikan uji dimasukkan kedalamnya untuk dipelihara dan diamati selama 24 jam. Data LD₅₀ yang diperoleh ditabulasikan dan dilakukan perhitungan menurut metode *Reed* dan *Muench* (1983) dalam Ibrahim et al., (2012).

2.7. Analisis Data

Analisis data uji zona hambat dan data hasil uji MIC dideskripsikan secara langsung. Sedangkan uji LD₅₀ (*Lethal Dose 50%*) dianalisis menggunakan metode *Reed* dan *Muench* (1983) dalam Ibrahim et al., (2012).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Uji Biokimia Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Bakteri *Aeromonas* yang ditumbuhkan pada media selektif GSP setelah di inkubasi selama 24 jam menunjukkan bakteri yang tumbuh adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* dicirikan media GSP yang berwarna merah berubah menjadi kuning dan koloni bakteri juga berwarna kuning, Merk (1994). Setelah dilakukan uji Biokimia pada isolat TSA bakteri *A. hydrophila* menunjukkan hasil uji Gram negatif, bentuk batang pendek, uji oksidase positif, uji motility positif, uji O/F fermentative, menghasilkan gas H₂S. Hal ini sesuai dengan pendapat Austin dan Austin (1983) yang menyatakan bahwa ciri-ciri bakteri tersebut adalah spesies *Aeromonas hydrophila*. Untuk lebih jelasnya, koloni bakteri *A. hydrophila* yang tumbuh pada media GSP dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni bakteri *A. hydrophila* pada media GSP

3.2. Sensitivitas Larutan Propolis terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Hasil uji sensitivitas menunjukkan bahwa penggunaan *Oxytetracyclin* (Kontrol Positif) dan larutan propolis dosis 100% hingga 10% memiliki zona hambat yang berbeda. Pada dosis 10% masih terdapat adanya zona hambat, maka uji sensitivitas dilanjutkan dengan melakukan penurunan dosis dari 10%, 8%, 6%, 4%, 2%, 0,9%, 0,7%, dan dosis 0,5%. Pada dosis 0,7% dan 0,5% sudah tidak terbentuk zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, hal ini menunjukkan bahwa propolis dosis 0,7% sudah tidak mampu menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel. 1 Diameter Zona Hambat Larutan Propolis terhadap Bakteri *A. hydrophila*.

Dosis (%)	Rata – rata Zona Hambat (mm)
KP (Antibiotik)	27,83
100	17,46
90	16,05
80	15,36
70	14,78
60	13,98
50	12,55
40	11,45
30	11,38
20	10,23
10	9,33
8	8,76
6	8,15
4	7,83
2	7,30
0,9	6,78
0,7	0
0,5	0

Berdasarkan Tabel 1. diketahui bahwa larutan propolis dosis 100% hingga 0,9% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, hal ini dapat dilihat dari rata-rata zona hambat yang terbentuk pada masing-masing dosis. Zona hambat yang terbentuk pada dosis 100% adalah sebesar 17,46 mm dan termasuk zona hambat yang luas. Hal ini sesuai dengan pendapat Susanto *et al.*, (2012) dalam Lubis (2017), bahwa zona hambat terbentuk atau nilai sensitivitas bakteri ≥ 10 -15 mm merupakan zona hambat yang luas. Cara kerja senyawa antibakteri dipengaruhi oleh sifat-sifat senyawa antara lain propolis, keadaan molekul senyawa antibakteri (dalam hal ini adalah senyawa yang terkandung dalam larutan propolis) dapat menghancurkan atau membatasi pertumbuhan bakteri. Terbentuknya zona hambat yang berbeda dapat dipengaruhi oleh zat antibakteri flavonoid, senyawa ester (CAPE) dan asam fenolat yang terkandung dalam larutan propolis. Hal ini sesuai dengan pendapat Sofia *et al.*, 2010 yang menyatakan bahwa larutan propolis merupakan antibakteri yang bersifat membunuh atau yang dikenal sebagai aktivitas bakterisidal.

Menurut Corn dan Stumpf (1976), mekanisme senyawa *flavonoid* dan Asam Fenolat (CAPE) sebagai antibakteri yaitu dapat meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel bakteri serta mengendapkannya, menginaktifkan enzim esensial di dalam sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktifkan enzim dan menyebabkan kebocoran sel sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Zona hambat yang terbentuk pada larutan propolis dosis 100% bila dibandingkan dengan bahan fitofarmaka lainnya seperti Larutan Daun Inai (*Lawsonia inermis*) dengan dosis 100% terhadap Bakteri *A. hydrophila*, memiliki rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 11,95 mm, Lubis (2017). Kemudian bila dibandingkan dengan hasil penelitian Lukistyowati dan Kurniasih (2012) yang menggunakan ekstrak bawang putih dengan dosis 100% menghasilkan luas zona hambatan sebesar 15,6 mm. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa larutan propolis dengan dosis 100% zona hambat yang terbentuk lebih luas, bila dibandingkan dengan larutan daun inai dan ekstrak bawang putih. Senyawa *flavonoid* dapat berinteraksi dengan struktur protein yang ada didalam dinding sitoplasma bakteri sehingga menyebabkan rusaknya permeabilitas dinding sel bakteri (Dewi, 2010 dalam Lubis, 2017).

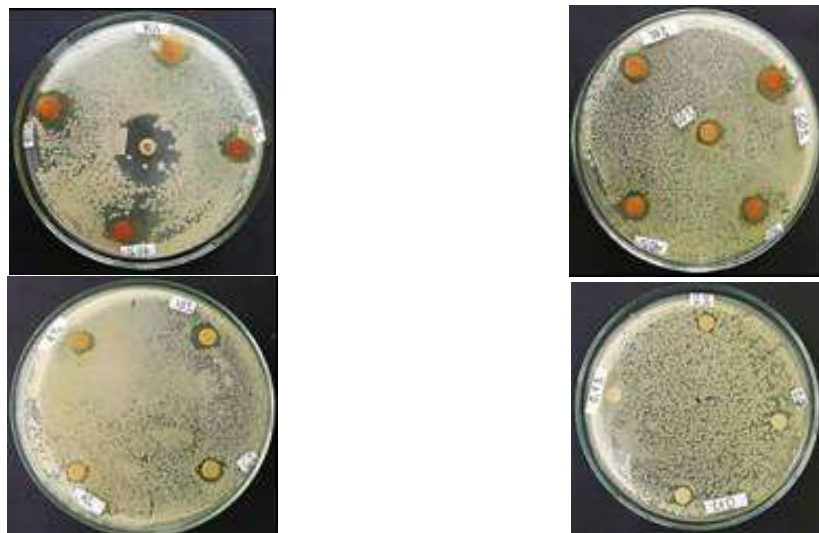
Nuraina (2015) dalam Kurniawan (2017) menambahkan, mekanisme kerja senyawa *flavonoid* sebagai antibakteri dibagi menjadi tiga, yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membrane sel, dan menghambat sistem metabolisme. Menurut Erywiatno *et al.* (2012), mekanisme kerja fenol sebagai desinfektan, yaitu dalam kadar 0,01% - 1% dan fenol tersebut bersifat bakteristatik. Larutan 1,6% bersifat bakterisidal yang dapat mengadakan koagulasi protein. Ikatan protein dengan fenol mudah lepas, sehingga fenol dapat berpenetrasi ke dalam kulit utuh. Senyawa turunan fenol tersebut kemudian berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hydrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami penguraian, diikuti penetrasi fenol kedalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Sedangkan pada kadar tinggi, fenol menyebabkan koagulasi protein sel dan membrane sitoplasma mengalami lisis sehingga menyebabkan bakteri mengalami kematian dan tidak dapat berkembang (Erywiatno *et al.*, 2012).

Penggunaan antibiotik *Oxytetracyclin* sebagai kontrol memiliki rata-rata zona hambat rata-rata sebesar 27,83 mm, hal ini menunjukkan antibiotik sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, sehingga antibiotik *Oxytetracyclin* sangat cocok menghambat pertumbuhan antibakteri apabila dibandingkan dengan antibiotik *Novobiocin* yang hanya memiliki zona hambat sebesar 10,00 mm pada daun Inai (Lubis, 2017). Sistem kerja *Oxytetracyclin* mengganggu sintesa protein bakteri merupakan antibiotik berspektrum luas yang dapat membunuh bakteri Gram (+) maupun Gram (-) (Syawal et al., 2017).

Menurut Davis dan Stout (1971) ketentuan kekuatan antibiotik atau antibakteri yaitu sangat kuat untuk zona hambat ≥ 20 mm. Akan tetapi penggunaan antibiotik untuk mencegah maupun mengobati, tidak dianjurkan lagi. Hal tersebut disebabkan bila residu antibiotik tertinggal pada ikan, maka akan membahayakan bila dikonsumsi oleh manusia. Untuk itu penggunaan antibiotik tidak disarankan apabila ada bahan fitofarmaka yang memiliki zat antibakteri dan ramah lingkungan serta tidak berbahaya bagi ikan dan manusia yang mengkonsumsinya.

Propolis pada dosis 10% masih menunjukkan rata-rata zona hambatan sebesar 9,33 mm. Untuk itu dilakukan penurunan dosis hingga 0,5%. Hasil sensitivitas pada dosis 8% menunjukkan zona hambatan sebesar 8,76 mm, dosis 6% sebesar 8,18 mm, dosis 4% sebesar 7,83 mm, dosis 2% sebesar 7,30 mm dan dosis 0,9% sebesar 6,78 mm. Sedangkan pada dosis 0,7% dan 0,5% tidak terbentuk zona hambatan, walau pada Gambar 2 terlihat sedikit zona bening yang terhambat. Menurut Harmita dan Radji (2004) Hal ini disebabkan karena zona hambatan yang terbentuk dipengaruhi oleh kepadatan atau viskositas dari media biakan, kecepatan difusi antibiotika atau bahan antimikroba, konsentrasi antibiotika/antimikroba pada cakram filter, sensitivitas organisme terhadap antibiotika/antimikroba dan interaksi antibiotika/ antimikroba dengan media, sehingga pada zona hambatan yang terbentuk pada dosis 0,7% dan 0,5% bahan larutan propolis tadi dinilai tidak efektif dalam menekan atau membunuh bakteri *A. hydrophila*.

Zona hambat yang terbentuk disekitar disk cakram tergantung dari dosis bahan obat yang digunakan, bila bahan obat mengandung antibiotik atau antimikroba maka pertumbuhan bakteri akan terhenti dan disekitar disk cakram akan terlihat zona bening (Dwijoseputro 2010). Terhambatnya pertumbuhan bakteri dapat disebabkan oleh kerusakan dinding sel, perubahan permeabilitas sel, perubahan molekul protein, asam nukleat, penghambatan kerja enzim dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Sari et al., 2014). Pemberian larutan propolis pada dosis tertentu mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Menurut Pelczar dan Reid (1972) dalam Fitria (2015), menyatakan bahwa banyak faktor yang dapat mempengaruhi terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme salah satunya dosis zat antimikrobia. Zona hambat yang dihasilkan dari larutan propolis diduga karena kandungan senyawa asam fenolat (CAPE) yang memiliki sifat merusak dinding sel protein pada bakteri (sebagai antibakteri). Zona hambat berbagai dosis propolis yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Zona Hambat Larutan Propolis terhadap Bakteri *A. hydrophila*.

Keterangan: Kontrol (KP - *Oxytetracyclin*), Dosis 100%, Dosis 90%, Dosis 80%, Dosis 70%, Dosis 60%, Dosis 50%, Dosis 40%, Dosis 30%, Dosis 20%, Dosis 10%, Dosis 8%, Dosis 6%, Dosis 4%, Dosis 2%, Dosis 0,9%, Dosis 0,7%, Dosis 0,5%.

3.3. Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

Hasil uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilakukan berdasarkan hasil uji sensitivitas larutan propolis, sesuai dengan dosis yang menghasilkan zona hambat paling kecil atau minimum. Dosis minimum (MIC) larutan propolis terdapat pada dosis 0,9%, namun pada dosis tersebut setelah dilakukan uji MIC pertumbuhan dan perhitungan jumlah koloni bakterinya lebih dari 300 koloni (∞). Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dalam larutan propolis berdasarkan uji MIC dapat dilihat pada Tabel 2.

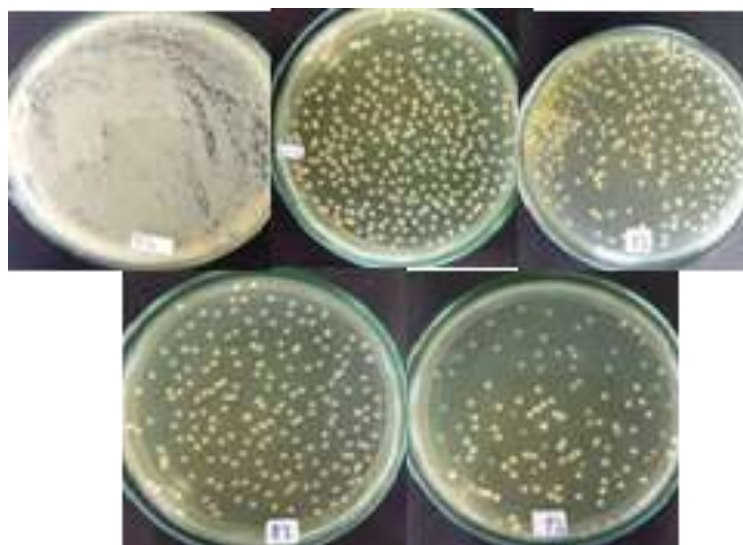
Tabel 2. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *A. hydrophila* dengan berbagai dosis larutan propolis

Dosis (%)	Jumlah Koloni (100 μ L)			Jumlah Bakteri (Sel/mL)
	I	II	III	
5%	≥ 300	≥ 300	≥ 300	∞
6%	289	268	277	278
7%	201	224	226	217
8%	186	190	178	184
9%	121	114	113	116

Setelah dilakukan uji MIC dengan dosis diatas 5% masih juga menunjukkan jumlah koloni bakteri lebih besar dari 300 koloni (∞), maka dilakukan peningkatan dosis dari 5%, 6%, 7%, 8% dan 9%, agar mendapatkan dosis MIC propolis yang tepat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada dosis 5% rata-rata jumlah bakteri tidak dapat dihitung (∞), pada dosis 6% menghasilkan rata-rata jumlah bakteri sebanyak 278 koloni ($2,78 \times 10^3$ Sel/mL), pada dosis 7% menghasilkan rata-rata jumlah bakteri sebanyak 217 koloni ($2,17 \times 10^3$ Sel/mL), pada dosis 8% jumlah rata-rata bakteri yang mampu tumbuh sebanyak 184 koloni ($1,84 \times 10^3$ Sel/mL), dan pada 9% kepadatan rata-rata bakteri yang dihasilkan adalah sebanyak 116 koloni ($1,16 \times 10^3$ Sel/mL). Hal ini menunjukkan bahwa larutan propolis dapat membunuh pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hasil perhitungan jumlah koloni *A. hydrophila* dengan berbagai dosis larutan propolis disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 3.

Tabel 3. Pertumbuhan Koloni Bakteri *A. hydrophila* Pada Uji MIC Larutan Propolis

Dosis	ppm	Mati	Hidup	% Kematian	LD ₅₀ (ppm)
0%	0	0	30	0%	-
5%	500	0	30	0%	-
6%	600	0	30	0%	-
7%	700	0	30	0%	-



Gambar 3. Pertumbuhan Koloni Bakteri *A. hydrophila* Pada Uji MIC Larutan Propolis dengan Dosis 5%, 6%, 7%, 8%, dan 9%.

Hal ini sesuai dengan pendapat Dwijoseputro (2010) pertumbuhan koloni bakteri yang terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah 30 – 300 Koloni. Dewi (2010) menambahkan, kemampuan suatu antibakteri sangat tergantung pada dosis bahan antibakteri tersebut, dengan peningkatan dosis maka zat aktifnya akan semakin bagus dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Hasil uji MIC yang dilakukan menggunakan larutan propolis terhadap bakteri *A. hydrophila* dari dosis 5% hingga 9%, didapatkan rentang pertumbuhan koloni bakteri *A. hydrophila* yang berbeda-beda. Pada dosis 9% rata-rata koloni bakteri yang mampu tumbuh adalah 116 koloni ($1,16 \times 10^3$ Sel/mL) dan pada dosis tersebut dapat dikatakan sebagai perlakuan terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Menurut Soleha (2015), semakin tinggi dosis antibakteri yang digunakan, maka akan semakin cepat bakteri mati. Sedangkan dosis minimum yang mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri *A. hydrophila* pada penelitian ini ada pada dosis 6% dengan jumlah koloni yang mampu tumbuh sebanyak 278 koloni ($2,78 \times 10^3$ Sel/mL).

Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* terhambat pertumbuhannya dengan pemberian larutan propolis pada dosis 4%, sedangkan dengan dosis $\geq 6\%$, larutan propolis mampu membunuh pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

3.4. Pengamatan LD₅₀ (Lethal Dose 50% of Responses) Larutan Propolis terhadap Ikan Lele (*Clarias sp.*)

Hasil pengamatan LD₅₀ dari berbagai dosis propolis menunjukkan bahwa tidak terjadi kematian pada ikan uji, hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian propolis dari dosis 5% hingga 7% aman digunakan untuk ikan. Pada pengamatan uji LD₅₀ dosis 7% larutan propolis setara dengan 700 ppm, dosis 6% setara dengan 600 ppm dan dosis 5% setara dengan 500 ppm. Bila dibandingkan dengan uji LD₅₀ penelitian Lubis (2017) menggunakan daun inai pada ikan jambal siam dengan dosis 5727 ppm dan penelitian Lukistyowati dan Kurniasih., (2012) menggunakan ekstrak bawang putih dengan dosis 3438 ppm dapat disimpulkan bahwa larutan propolis dengan dosis 700 ppm, 600 ppm dan 500 ppm sangat efisien digunakan dalam mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*, karena dosis yang digunakan rendah dan tidak bersifat *toxic* bagi ikan namun dapat mencegah invasi oleh bakteri tersebut.

Berdasarkan hasil perhitungan LD₅₀ menurut Reed dan Muench, tidak dapat ditentukan pada dosis berapakah ikan mencapai kematian 50% dalam kurun waktu 24 jam, hal ini dikarenakan ikan uji tetap hidup pada tiap dosisnya dan tidak ada ikan yang mengalami kematian. Adapun tingkah laku ikan lele yang direndam dengan larutan propolis selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Tingkah Laku Ikan Lele yang Direndam dengan Larutan Propolis Selama 24 jam

Aktifitas Ikan	Dosis											
	0%			5%			6%			7%		
	1-8 Jam	8-16 jam	16-24 jam	1-8 Jam	8-16 jam	16-24 jam	1-8 Jam	8-16 jam	16-24 jam	1-8 Jam	8-16 jam	16-24 jam
Normal	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mulai Gelisah	–	–	–	✓	–	–	✓	–	–	✓	–	–
Mengitari Aerasi	–	–	–	✓	✓	–	✓	✓	–	✓	✓	–

Hasil pengamatan tingkah laku ikan lele (*Clarias sp*) menunjukkan bahwa pada tiap dosis ikan mengalami stress beberapa jam setelah bahan uji larutan propolis dimasukkan, namun setelah 8 jam berikutnya terdapat tingkah laku ikan kembali normal karena ikan telah beradaptasi terhadap dosis larutan propolis yang telah menyatu atau larut di dalam air wadah yang digunakan seiring dengan penyerapan oksigen yang dilakukannya. Irianto (2007) menambahkan, respons ikan terhadap stres dapat dibagi atas tiga fase yaitu primer, sekunder, dan tersier. Pada fase primer terjadi respon umum kromafin dan sel internal. Tingginya hormon katekolamin dan kortisol dalam sirkulasi oksigen akan memicu respon sekunder yang melibatkan metabolisme fisiologi. Kedua fase tersebut bersifat adaptif yaitu ikan mampu menyesuaikan dirinya terhadap stressor (pemicu stress) dan mampu mempertahankan homeostasis. Sebaliknya, respon tersier melibatkan perubahan sistemik yang menyebabkan ikan tidak dapat beradaptasi terhadap stressor, bahkan menyebabkan beberapa gangguan kesehatan seperti gangguan pertumbuhan, perubahan tampilan, gangguan reproduksi, dan perubahan perilaku (Barton, 2002 dalam Fitria, 2015).

4. Kesimpulan

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa larutan propolis ‘sensitif’ terhadap bakteri *A. hydrophila* dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada perlakuan dosis 0,9% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,78 mm, akan tetapi jumlah koloni bakteri yang ditumbuhkan pada uji MIC menunjukkan pertumbuhan yang tidak terhingga, sehingga dosis minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*) larutan propolis yang aman digunakan ada pada dosis 7% setara dengan 700 ppm dan dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri dengan rata-rata jumlah koloni yang tumbuh yaitu sebanyak $2,78 \times 10^3$ Sel/mL. Hasil uji toksisitas LD₅₀ larutan propolis terhadap ikan lele (*Clarias* sp) dengan cara perendaman selama 24 jam menunjukkan tidak ada ikan uji yang mengalami kematian. Larutan propolis ini sangat aman digunakan untuk mencegah dan menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* tanpa membunuh ikan budidaya.

5. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, penggunaan larutan propolis untuk mencegah pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan cara perendaman aman untuk dilakukan dengan dosis dibawah 700 ppm, adapun saran yaitu adanya penelitian lanjutan dengan mencoba menggunakan dosis tersebut untuk pencegahan maupun pengobatan baik lewat perendaman, penyemprotan kedalam pakan, maupun penyuntikan baik skala labor maupun skala lapangan dalam menanggulangi penyerangan bakteri *A. hydrophila*.

6. Referensi

- Affandi, A., A. Fauzia, dan L. Dwi. 2008. *Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal dan Konsentrasi Bunuh Minimal Larutan Povidon Iodium 10% Terhadap Staphylococcus aureus Resisten Metisilini (MRSA) dan Staphylococcus aureus Sensitif Metisilin (MSSA)*. Fakultas Kedokteran Bagian Mikrobiologi Universitas Riau. 6 hlm.
- Austin, B., and D.A. Austin. 1987. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, 1st edition. John Wiley and Son Publisher. Ontario, Canada.
- Corn, J.K., and L. Stumpf. 1976. *Senyawa Fenol*. Melbourne, Report.
- Davis, S. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal of Microbiology*. 22 (4).
- Dewi, A. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavanoid dari Daun Sirih Merah (*Piper betle* L. *varrebrum*). [Skripsi]. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. 37 hlm.
- Dwidjoseputro. 2010. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djembatan. Jakarta.
- Erywiyatno, L., S.S.B.U. Djoko, dan D. Krihariyani. 2012. Pengaruh Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes*. *Analisis Kesehatan Sains* 1(1):1-9
- Fitria, D. 2015. Sensitivitas Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*. [Skripsi] Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Harmita dan M. Radji,. 2004. *Analisis Hayati*. Jakarta: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. 62 hlm
- Ibrahim, M., M. Mostafa, R.M.H. Arab, and M.A. Rezk. 2008. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* Infection in Wild Cultured *Tilapia nilotica* (*O. niloticus*) in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008. 1257-1271.
- Ibrahim, M., A. Akhyar, dan Y.N. Ihsani. 2012. Uji Lethal Dose (LD₅₀) POLIHERBAL (*Curcuma xanthorrhiza*, *Kleinhovia hospital*, *Nigella sativa*, *Arcangelisia flava* dan *Ophiocephalus striatus*) pada Heparin terhadap Mancit (*Mus musculus*). Research and Development of PT. Royal Medicalink Pharma lab. 6 hlm.
- Irianto, K. 2007. *Mikrobiologi: Mengukir Dunia Mikroorganisme*. Bandung: CV Yrama Widya.
- Krell, R. 1996. *Propolis. Value Added Products from Beekeeping*. FAO Agricultural Service Bulletin. Food and Agricultural Organization of The United Nation. 124. P 157-194.
- Kurniawan, R. 2017. Sensitivitas Daun *Rhizophora* sp Terhadap Bakteri *Edwardsiella tarda*. [Skripsi]. Pekanbaru: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. 59 hlm.
- Lofty, M. 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asia Pac J Cancer Prev*, (7): 22-31.
- Lubis, M. 2017. Sensitivitas Daun Inai (*Lawsonia inermis* L.) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*. [Skripsi]. Pekanbaru: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. 49 hlm.

- Lukistyowati, I., dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. Pekanbaru: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. 8 hlm.
- Mangunwardoyo, W., I. Ratih, dan R. Etty. 2010. Uji Patogenitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stainer pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Melalui Postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur*. 5(2). 1-10
- Merk, K. 1994. *Microbiology Manual* 2000. Berlin.
- Novilla, A. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis *Apis mellifera* Terhadap Pertumbuhan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara In Vitro. *Kesehatan Kartika Stikes Jendral Ahmad Yani*. 4 (1): 10-18.
- Sabir, A. 2009. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigon asp* Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (In Vitro). Bagian Konservasi Gigi. Makassar. Fakultas Kedokteran Universitas Hassanudin. 38(3) : 1-7.
- Salatino, A., E.W. Teixeira, G. Negri, and Dejair. 2005. *Origin and Chemical Variaton of Brazilian Propolis*. Department of Botany. Brazil: Institute of Biosciences University of São Paulo Brazil. Published by Oxford University Press. Page 33-38.
- Sari, D.R., S.B. Prayitno., dan Sarjito. 2014. Pengaruh Perendaman Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Kelulushidupan dan Histologi Ginjal Ikan Lele (*Clarias gariepinus*) yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 3(4): 126-133.
- Sofia, C., Supartik., I. Wahyuningsih., dan U. Komaruddin. 2010. Alternatif Antibakterial Alami dari Sumberdaya Lokal: Uji Laboratorium terhadap Cuka Aren (*Arenga pinnata*), Daun Pacar Inai (*Lawsonia inermis*) dan Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica*). Balai Budidaya Air Payau (BBAP), Ujung Batee, Nanggore Aceh Darussalam. 5 hlm.
- Soleha, T.U. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *Jurnal kesehatan UniLa* 5(9): 119-123.
- Swann and White. 1989. *Diagnosis and Treatments of Aeromonas hydrophila Infection of Fish. A Guide to Approved Chemicals in Fish Production and Fishery Resource Management*. University of Arkansas Cooperative Extension Service, USA. NA
- Waluyo, L. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi: Teknik Pengenceran dan Perhitungan Bakteri*. Malang: UMM Press.
- Yusuf, B.A. 2015. Perbedaan Daya Hambat Bakteri Propolis Cair yang Ada di Pasaran terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. [Skripsi]. Padang: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. 64 hlm.