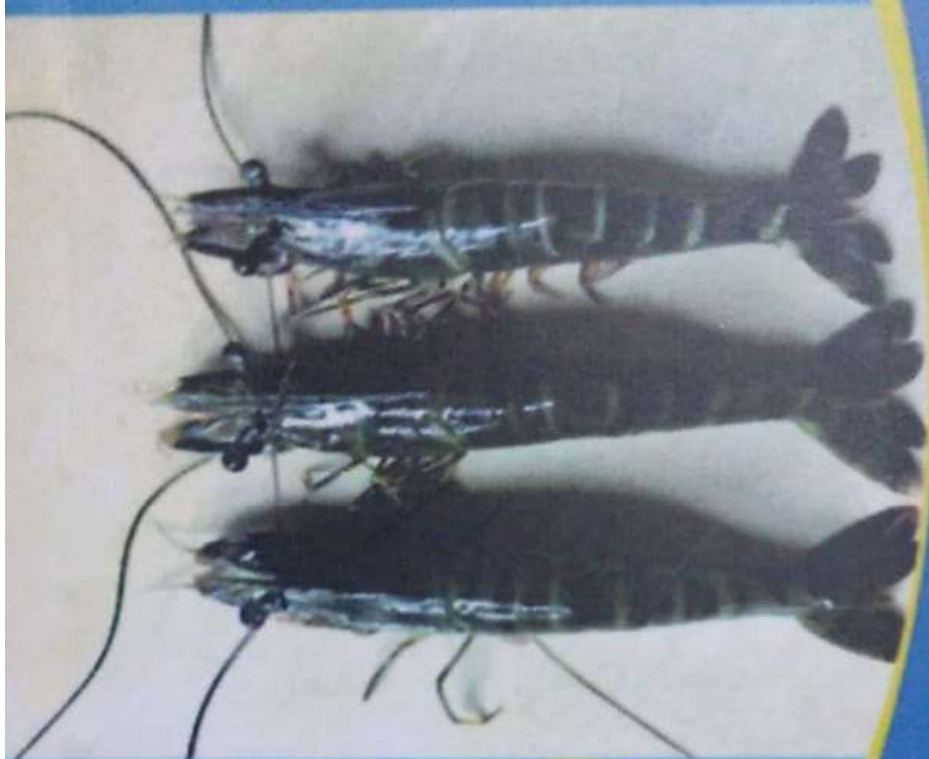


Dr. Ir. Harlina, MP

PENYAKIT BAKTERIAL PADA UDANG WINDU



PUSTAKA
alZikra

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah menganugerahkan kesehatan, kesempatan, ide dan kemampuan serta petunjuk sehingga penulisan buku Penyakit Bakterial pada Udang Windu ini dapat diselesaikan. Penyusunan buku Penyakit Bakterial pada Udang Windu ini dimaksudkan untuk melengkapi literatur yang terkait mata kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Penyusunan buku ini diharapkan agar dapat menambah wawasan para mahasiswa tentang penyakit bakterial pada udang windu dapat lebih memahami benar tentang proses timbulnya penyakit bakterial, jenis-jenis penyakit bakterial, tanda-tanda serangan dan upaya penanggulangannya.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan buku Penyakit Bakterial pada Udang Windu ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon kepada pembaca yang budiman, kiranya bila menjumpai kekeliruan dan kekurangan dalam buku ini, sudilah kiranya memberi saran dan koreksi sehingga buku ini dapat menjadi lebih sempurna, karena sebagaimana pepatah mengatakan tiada gading yang

tidak tak retak. Semoga Allah menjadikannya sebagai amal shalih bagi penulis dan pihak-pihak yang terkait dalam penerbitan buku ini.

Akhirnya kepada semua pihak yang membantu dalam penyusunan buku Penyakit Bakterial pada Udang Windu ini diucapkan terima kasih. Semoga buku ini dapat memberikan manfaat dan sumbangsih yang besar bagi masyarakat akademik disektor perikanan dan kelautan pada khususnya dan masyarakat Indosesia pada umumnya. Segala puji bagi Allah, Tuhan semesta alam dan semoga shalawat dan salam tercurahkan kepada junjungan dan panutan kita Rasulullah Muhammad Sallahu Alaihi Wasallam dan keluarganya, para sahabatnya, dan orang-orang yang mengikutinya sampai hari pembalasan nanti.

Aamiin.

Wassalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Makassar, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	i
DAFTAR ISI	iii
BAB I	
PENDAHULUAN	1
BAB II	
UDANG WINDU (<i>Penaeus monodon</i> Fabricius)	5
2.1 Taksonomi Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i> Fabricius)	5
2.2 Morfologi dan Anatomi.....	6
2.3 Habitat dan Siklus Hidup	8
2.4 Pakan dan Kebiasaan Makan.....	10
2.5 Pertumbuhan Udang	13
BAB III	
PROSES TIMBULNYA PENYAKIT PADA UDANG	15
3.1 Pengertian Penyakit	15
3.2 Faktor Pemicu Timbulnya Penyakit pada Udang	16
3.3 Sistem Transmisi Penyakit Infeksi pada Udang	17

BAB IV

SUMBER-SUMBER PENYAKIT BAKTERIAL PADA UDANG

WINDU	19
4.1 Lingkungan	19
4.2 Kontaminasi Induk Udang Windu	20
4.3 Kontaminasi Pakan	21

BAB V

JENIS-JENIS PENYAKIT BAKTERIAL PADA UDANG WINDU

5.1 Vibriosis	23
5.2 Necrotizing Hepato Pancreatitis Bacterium (NHPB).....	29
5.3 Rickettsial Diseases	29
5.4 Filamentous Bacterial	29

BAB VI

DIAGNOSIS PENYAKIT VIBRIOSIS PADA UDANG WINDU

(<i>P. Monodom</i> Fabricius)	31
6.1 Pengertian Diagnosis Penyakit	31
6.2 Cara Diagnosis Penyakit Bakterial	32
6.3 Identifikasi Bakteri Penyebab Vibriosis	33
6.4 Uji Patogenesitas	35
6.5 Analisis Histopatologis	37

BAB VII

PENGENDALIAN VIBRIOSIS PADA UDANG WINDU.....

41

BAB VIII

SENYAWA BIOAKTIF ALAMI SEBAGAI ZAT ANTI

BAKTERI PADA UDANG WINDU	47
8.1 Sumber-Sumber senyawa Bioaktif alami Sebagai Anti Bakteri	47
8.2 Tanaman Kopasanda (<i>Chromolaena odorata</i> L) sebagai sumber zat Anti Bakteri Alami.....	50
8.3 Aspek Biologi dan Ekologi Tanaman Kopasanda (<i>C.odorata</i>)	51
8.4 Ekstrak Daun Kopasanda (<i>C.odorata</i> L) sebagai Antibakteri.....	57
8.5 Senyawa Flavonoid	58
8.6 Mekanisme Aktivitas Antibakteri Flavonoid	62
8.7 Uji Aktivitas terhadap Bakteri Patogen	64
8.8 Uji MIC (Minimal Inhibitory Concentration) dan MBC (Minimal Bacterial Concentration)	67

BAB IX

EKSTRAKSI DAN IDENTIFIKASI KOMPONEN SENYAWA

BIOAKTIF.....	75
9.1 Pengertian dan Tujuan Ekstraksi	75
9.2 Mekanisme Ekstraksi	79
9.3 Teknik Isolasi Bioaktif	83
9.4 Penentuan Kadar Flavonoid	90
9.5 Identifikasi Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda	91

BAB X

APLIKASI BAHAN ALAMI DALAM PENGENDALIAN

Vibrio harveyi PADA UDANG WINDU

(<i>Penaeus monodon</i> Fabricius).....	101
10.1. Gejala klinis setelah Uji Tantang dengan <i>V. harveyi</i>	102
10.2. Mortalitas Pasca Larva Udang Windu.....	107
10.3. Total Bakteri Pada Media Pemeliharaan Setelah Infeksi dan Pengobatan dengan Ekstrak daun Kopasanda.....	111
10.4. Total Bakteri pada Tubuh Pasca larva Udang Windu setelah Pengobatan dengan Ekstrak daun kopasanda	113
10.5. Pengamatan Parameter Kualitas air Media Pemeliharaan Pasca larva Udang Windu	116

BAB XI

PENUTUP	119
DAFTAR PUSTAKA.....	123
RIWAYAT HIDUP PENULIS	149

BAB I

PENDAHULUAN

Potensi dan keanekaragaman sumberdaya perikanan menyebabkan sektor perikanan di Indonesia menempati peran yang sangat strategis, utamanya dikaitkan dengan upaya peningkatan kualitas sumberdaya manusia karena menjadi sumber protein hewani dalam rangka pemenuhan kebutuhan pangan dan gizi (Suprayitno, 2003). Salah satu sumberdaya perikanan yang memiliki kandungan protein tinggi adalah udang windu. Oleh karena itu udang windu (*Panaeus monodon* Fabricius) hingga saat ini tetap merupakan komoditas andalan di bidang perikanan budidaya, sehingga diperlukan upaya pengembangannya.

Masalah utama dalam pengembangan budidaya udang windu baik pada pembenihan maupun di tambak adalah kematian massal akibat serangan penyakit. Salah satu jenis penyakit yang merupakan masalah serius adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen terutama dari genus vibrio, khususnya *Vibrio harveyi* (Mariyono *et al.*, 2002, Prajitno, 2007).

Bakteri *V. harveyi* ini menyerang salah satu organ penting yaitu hepatopankreas pasca larva udang windu. Hepatopankreas merupakan organ yang berfungsi sebagai penampungan nutrisi, penyimpanan lemak dan produksi enzim pencernaan, menyimpan dan menyusun nutrisi sesuai kebutuhan pasca larva udang windu. Organ hepatopankreas yang terinfeksi *V. harveyi* mengalami kerusakan seperti vakuolisasi, nekrosis dan inflamasi (Anderson *et al.*, 1988; Jivaranichpaisal *et al.*, 1994; Sreeram dan Menon, 2005).

Bakteri *V. harveyi* menginfeksi hampir semua organisme budidaya laut seperti krustasea, moluska dan ikan (Isnansetyo *et al.*, 2009). Hasil penelitian secara *in vivo* menunjukkan bahwa *V. harveyi* bersifat patogen pada pasca larva (PL-14) dengan kepadatan 10^7 CFU/mL (Khodria *et al.*, 2012), sehingga harus ditangani sebaik mungkin.

Cara yang umum dilakukan untuk pengendalian *Vibriosis* ini adalah menggunakan bahan-bahan kimia dan antibiotik, namun penggunaan berakibat resistensi pada bakteri, mencemari lingkungan dan residu di tubuh udang yang sangat berbahaya bagi yang mengkonsumsinya. Berkaitan dengan hal tersebut, sangat diperlukan pencarian metode lain dalam pengobatan *Vibriosis* yang aman bagi udang, manusia dan lingkungan. Alternatif yang dapat dilakukan untuk pengendalian *Vibriosis* dengan aman dan ramah lingkungan adalah dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang mempunyai keaktifan sebagai antibakteri alami yang berasal dari produk alami baik dari hewan maupun tumbuhan.

Salah satu jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif adalah daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L). Tanaman ini digunakan sebagai tanaman obat tradisional untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Daun tanaman ini dapat digunakan mengobati kulit yang luka dan penahan darah. Selain itu akarnya digunakan sebagai antipiretik

dan obat analgesik. Sementara bunga dari tanaman ini dapat digunakan untuk merawat luka dan sebagai racun serangga (Anonim, 2012). Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun kopasanda dilaporkan mengandung tanin, steroid, terpenoid, flavonoid, glikosida dan alkaloid (Akinmoladun *et al.*, 2007). Hasil skrining fitokimia dari ekstrak metanol daun kopasanda juga menunjukkan kehadiran senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin (Harlina *et al.*, 2013).

Senyawa flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri seperti flavonoid dari ekstrak *Capsella* sp. dan *Chromolaena* sp. (El Abyad *et al.*, 1990), *Prunus spinosa* (Sakar *et al.*, 1992), *Hypericum* sp. (Dall' *et al.*, 2003), (Cushnie and Lamb, 2005). Dastidar *et al.*, (2004) meneliti potensi senyawa iso flavonoid sebagai antibakteri terhadap *S. typhimurium*, dan Gattuso *et al.*, (2007) meneliti senyawa flavonoid pada *Citrus juice*. Lebih lanjut Savaranakumar *et al.*, (2009) melaporkan bahwa ekstrak metanol bunga *Thespesia populnea* L. mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Selanjutnya Harlina *et al.*, (2016) melaporkan bahwa hasil isolasi bahan alami daun kopasanda ditemukan senyawa bioaktif yang memiliki aktifitas antibakteri yang teridentifikasi sebagai turunan senyawa flavonoid atau dikenal dengan quercetin yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri *V. harveyi* pada pasca larva udang windu yang lebih aman dan efektif.

BAB II

UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabricius)

2.1. Taksonomi Udang windu

Udang windu merupakan salah satu komoditas andalan di Indonesia yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan sangat digemari oleh konsumen dalam maupun luar negeri. Dalam dunia internasional, udang windu dikenal dengan nama *black tiger*, *tiger shrimp*, atau *tiger prawn*. yang dalam bahasa daerah dikenal dengan nama udang sitto.

Udang windu menurut taksonominya termasuk filum yang terbesar dalam kerajaan hewan artropoda. Kelompok ini dicirikan oleh adanya sepasang appendages dan kutikula atau eksoskeleton yang menutupi seluruh tubuhnya. Klasifikasi udang windu adalah sebagai berikut (Fabricius 1798 *dalam* Brusca dan Brusca,1994):

Filum	: Artropoda
Subfilum	: Crustacea
Klas	: Malacostraca
Ordo	: Decapoda

Superfamili	: Penaeoidea
Famili	: Penaeidae (Rafinesque 1815)
Genus	: Penaeus (Fabricius 1798)
Sub Genus	: Penaeus
Species	: <i>Penaeus. monodon</i> Fabricius.

2.2. Morfologi dan Anatomi

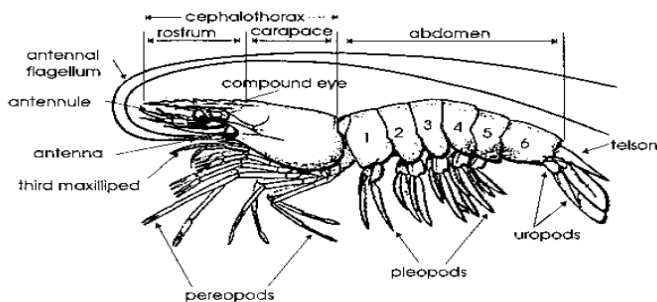
Udang windu memiliki kulit tubuh yang keras dari bahan chitin. Warna sekujur tubuhnya hijau kebiruan dengan motif loreng besar. Tubuh udang windu dibagi menjadi dua bagian besar, yakni bagian *cephalotorax* yang terdiri atas perut dan ekor. *Cephalotorax* ini terdiri atas lima ruas kepala dan delapan ruas dada, sementara bagian abdomennya terdiri atas enam ruas perut dan satu ekor (*telson*). Bagian depan kepala yang menjorok merupakan kelopak kepala yang memanjang dengan bagian pinggir bergerigi atau disebut juga dengan cucuk (*rostrum*). Cucuk di kepala memiliki tujuh buah gerigi di bagian atas dan tiga buah gerigi dibagian bawah, di bawah pangkal kepala terdapat sepasang mata

Bagian tubuh terdiri atas *Cephalothorax* (kepala-dada), *Abdomen* (perut): 6 ruas. Anggota tubuh udang (*appendages*) dibentuk oleh 2 cabang (biramous), *Exopodite*, *Endopodite*. *Appendages*: Pada bagian chephalothorax: 1 pasang mata, 1 pasang antenula, 1 pasang antena, 2 pasang maxillae, 1 pasang mandibula, 3 pasang maxillaped, 5 pasang kaki jalan (*pteriopoda*). Pada abdomen: 5 pasang kaki renang (*pleiopoda*), 1 pasang *uropoda* dan *telson*.

Organ insang, sistem pencernaan dan jantung terletak di *cephalotorax*, sedangkan isi otot di abdomen. Antenula dan antennae berfungsi sebagai panca indra. Mandibula dan sepasang *maxilla* membentuk struktur seperti

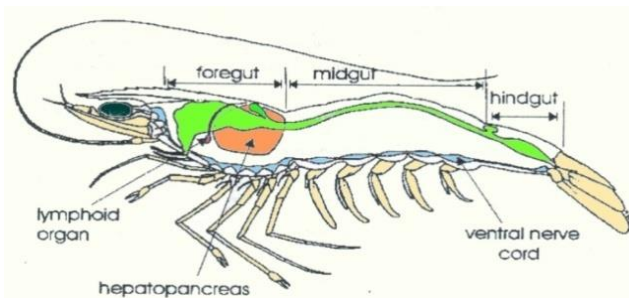
capit yang terlibat dalam pengambilan pakan. Pada bagian toraks terdapat 3 pasang maksilliped untuk memegang pakan, dan lima pasang kaki jalan (*periopoda*) Lima pasang kaki renang (*pleopoda*) terdapat pada bagian *abdomen* (Baily- Brock dan Moss,1992) (Gambar 2.1.1).

Sedangkan anatomi udang windu disajikan pada Gambar 2.1.2



Gambar 2.1.1

Morfologi Udang Windu (*P.monodon*) (Sumber Primavera,1990)



Gambar 2.1.2.

Anatomi Udang Windu (*P.monodon*) (Sumber Primavera,1990)

Pada Gambar 2.2. terlihat bahwa udang windu memiliki sistem peredaran darah terbuka, darah dan sel darah masing-masing disebut hemolim dan hemosit. Otot jantung terletak pada bagian dorsal cephalotorax. Pada cephalothorax terdapat hepatopancreas yang berfungsi

sebagai penampungan nutrient, penyimpanan lemak, dan produksi enzim pencernaan. *Organ limpoid* yang terletak pada bagian ventro-anterior dan hepatopancreas berfungsi sebagai penyaring darah (hemolin). Hemosit diproduksi pada jaringan hematopoitik, organ ini berada di sekitar stomach dan pada permukaan maksiliped.

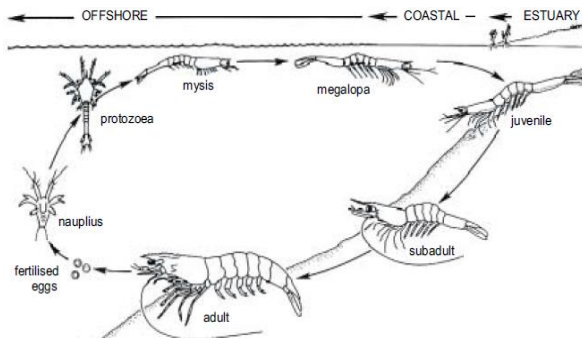
Saluran pencernaan terdiri atas: Mulut – esophagus – stomach (ventriculus) – hepatopancreas – intestine – rectum – anus. Stomach merupakan tempat penghancuran makanan hingga halus sebelum sari-sari makanan diserap oleh usus. Hepatopancreas (midgut gland) menghasilkan enzyme, menyimpan dan menyusun nutrisi sesuai kebutuhan.

2.3. Habitat dan Siklus Hidup

Udang windu secara alami bisa hidup di perairan yang berkadar garam dengan rentangan yang luas, yakni 5-45 ‰, sehingga udang disebut *eury haline* artinya udang windu dapat hidup di laut yang berkadar garam tinggi hingga di perairan payau yang berkadar garam rendah. Kadar garam ideal untuk pertumbuhan udang windu adalah 19-35‰. Udang windu stadia juvenil umumnya memiliki laju pertumbuhan yang baik di perairan berkadar garam tinggi. Sebaliknya semakin dewasa udang windu, pertumbuhan optimalnya justru terjadi di perairan yang berkadar garam rendah. Siklus hidup udang windu dapat dilihat pada Gambar 2.3.1

Udang windu juga menyukai perairan yang relatif jernih dan tidak tahan terhadap cemaran industri maupun cemaran rumah tangga atau pertanian (pestisida). Faktor pembatas pertumbuhan udang windu lainnya adalah suhu dan oksigen terlarut. Kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan udang windu adalah 26-32°C, sementara kandungan oksigen

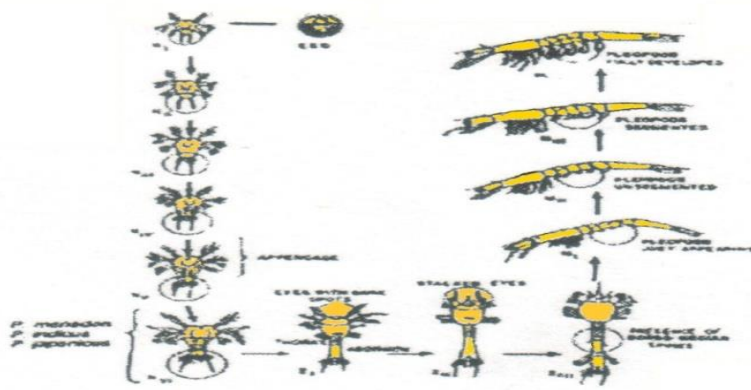
terlarutnya sebanyak 4-6 ppm. Jika dipelihara ditambak dari ukuran benih, udang windu akan mencapai panen dipelihara 4-6 bulan.



Gambar 2.3.1
Siklus Hidup Udang windu (*P.monodon* Fab.)
(Sumber :Vande Braak, 2002)

Di hatchery udang mengalami masa perkembangan dalam 4 stadia, dimulai dari telur, kemudian menetas menjadi nauplius, zoea, mysis dan pascalarva. Udang windu umumnya bertelur pada malam hari, dalam waktu 12-16 jam telur menetas menjadi nauplius. Setelah mengalami 6 kali metamorfosa dalam waktu 48-53 jam berubah menjadi Zoea. Selanjutnya Zoea mengalami 3 kali metamorfosa dalam waktu 6 hari berubah menjadi Mysis.

Pada stadia mysis terjadi 3 kali metamorfosa menjadi pascalarva. Pada stadia pascalarva pergantian kulit terjadi setiap hari (Shigueno, 1975). Sejak dari stadia nauplius sampai mencapai pascalarva udang windu memerlukan waktu kurang lebih 12 hari. Untuk lebih jelasnya fase perkembangan larva udang windu disajikan pada Gambar 2.3.2.



Gambar 2.3.2.
Perkembangan fase larva udang windu
(Sumber: Shigueno, 1975)

2.4 Pakan dan Kebiasaan Makan

Udang windu aktif mencari makan pada malam hari atau kondisi gelap sehingga disebut hewan *nocturnal* dan termasuk hewan “Omnivore scavenger” atau pemakan segala. Kebiasaan mangsa sesama jenis (kanibal) manakala berada pada kondisi kekurangan makanan (Sutaman, 1993).

Udang mengetahui makanan dengan bantuan organ sensor berupa bulu bulu halus yang terdapat pada antenula, antena, mulut, capit, dan maxillaped yang dapat mengetahui sinyal kimiawi. Udang mengambil makanan dengan capitnya yang terdapat pada kaki jalan 1, 2 dan 3 kemudian dimasukkan mulutnya.

Pada stadia nauplius sampai mysis di perairan dalam (kedalaman >7 m), pasca larva di perairan litoral (kedalaman <7 m), juvenile di perairan estuarin, kemudian menjelang dewasa kembali ke perairan litoral sampai perairan dalam. Pada umumnya udang lebih menyukai hidup di dasar perairan, dengan kondisi dasar yang berlumpur atau lumpur berpasir.

Udang windu lebih banyak diam di dasar sepanjang hidupnya. Masing-masing jenis udang memiliki pengaruh (sensitivitas) yang berbeda terhadap sinar. Ada yang sensitif, ada yang tidak terpengaruh.

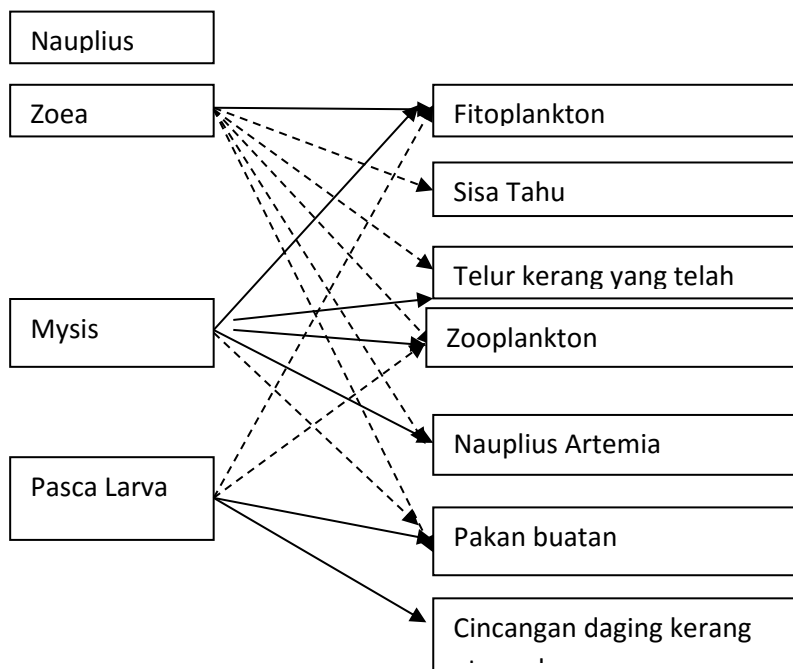
Dalam perkembangan dan pertumbuhannya, larva udang windu (*P. monodon*, Fabr.) mengalami beberapa kali perubahan bentuk dan ganti kulit. Secara umum bergantian bentuk larva udang mulai dari menetas sampai menjadi post larva (PL) ada empat fase yaitu fase nucleus, fase protozoa (Zoea), fase Mysis dan fase megalopa (Sutaman, 1993).

Ke-empat fase tersebut adalah:

1. Fase Nauplius ini dimulai sejak telur mulai menetas dan berlangsung selama 46 sampai 50 jam atau 2 sampai 3 hari. Dalam fase ini larva belum memerlukan makanan dari luar karena masih dapat disediakan dalam kandung kuning telur itu sendiri. Selama menjadi nauplius, larva mengalami 6 kali ganti bentuk kulit.
2. Fase protozoa (Zoea), larva sudah mulai aktif mengambil makanan sendiri dari luar terutama plankton. Disamping itu larva juga peka terhadap perubahan lingkungan. Fase ini hanya berlangsung sekitar 3 sampai 4 hari. Tingkat perkembangan Zoea terdapat 3 stadia.
3. Setelah fase Zoea berakhir, maka fase berikutnya akan berubah menjadi fase yang bentuknya mirip udang muda, yaitu fase Mysis. Pada fase ini larva bersifat planktonis dan paling menonjol adalah geraknya mundur dengan cara membengkokkan badannya. Pada fase ini larva mengalami 3 kali perubahan bentuk selama 2 sampai 3 hari. Makanan yang paling disukai adalah zooplankton seperti kopepoda dan rotifer.

4. Perubahan bentuk yang paling akhir dan paling sempurna adalah saat larva mencapai fase Megalopa atau Pasca larva (PL). Pada fase ini, larva tidak mengalami perubahan bentuk karena bagian tubuh sudah lengkap dan sempurna seperti udang windu dewasa. Dengan bertambahnya umur, larva hanya mengalami perubahan panjang dan berat.

Untuk lebih jelasnya pemberian pakan sesuai dengan perkembangannya disajikan pada Gambar 2.4.1 Pada stadia zoea sampai mysis, udang bersifat planktonis dan mulai makan jenis plankton bersel satu dengan cara menyaring (plankton feeder). Pada stadia pasca larva sampai dewasa, udang bersifat bentik, sehingga cenderung mencari makan di dasar.



Gambar 2.4.1.
Skema pemberian pakan sesuai dengan Perkembangan larva udang
Penaeid (Sumber: Liao 1984).

Keterangan:

———— pakan utama

----- waktu pakan yang ditambahkan sewaktu waktu

Pakan berfungsi sebagai sumber nutrien dan energi yang digunakan untuk mempertahankan hidup, membangun tubuh, dan untuk proses perkembangbiakan (Sutaman, 1993). Informasi mengenai pakan udang di alam, dapat dipakai sebagai dasar penyusunan ransum pakan buatan. Kemampuan untuk dapat memanfaatkan pakan secara efektif ditentukan oleh perkembangan alat pencernaannya. Larva udang pada stadia nauplius belum memerlukan pakan karena masih mempunyai cadangan pakan dalam tubuhnya dan sistem pencernaannya belum sempurna. Pada stadia zoea, saluran pencernaannya sudah sempurna dan pada stadia ini larva mulai aktif mengambil pakan terutama dari jenis fitoplankton (Liao, 1984). Pada stadia mysis lebih menyukai pakan dari jenis zooplankton. Semakin tinggi tingkatan stadia udang, semakin beragam pakan yang dimakan udang.

2.5 Pertumbuhan Udang

Pertumbuhan dapat dianggap sebagai hasil dari dua proses yaitu, proses yang cenderung untuk menurunkan energy tubuh yang menjadi nyata jika seekor udang dipelihara dalam jangka waktu yang lebih lama tanpa diberi pakan dan suatu proses yang diawali dari pengambilan makanan dan yang diakhiri dengan penyusunan unsur-unsur tubuh.

Pertumbuhan merupakan suatu hasil metabolisme zat tubuh organisme hidup. Pertumbuhan udang akan diikuti dengan proses *moulting*

atau ganti kulit. Hal ini terjadi pada kondisi pakan dan kualitas lingkungan yang baik. Sebaliknya pada kondisi lingkungan yang tidak sesuai, maka akan terjadi ganti kulit yang tidak diikuti dengan pertumbuhan, bahkan dapat terjadi penurunan bobot tubuh (Chittleborough, 1975).

Secara umum pertumbuhan udang dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu: pertumbuhan yang mencakup larva dari nauplius sampai Pasca Larva melalui proses metamorphosis dan pertumbuhan dalam pengertian pertambahan biomas atau ukuran tubuh (Nurdjana, 1986). Lebih lanjut dinyatakan bahwa laju pertumbuhan krustase merupakan fungsi dari frekuensi ganti kulit dan pertambahan bobot badan setiap proses ganti kulit tersebut. Pada saat ganti kulit, sebagian kulit hilang. Kehilangan bobot setiap ganti kulit ini mengakibatkan model pertumbuhan krustase tidak kontinyu

BAB III

PROSES TIMBULNYA PENYAKIT

PADA UDANG WINDU

3.1. Pengertian Penyakit

Penyakit adalah suatu hal yang berada diluar batas normal struktur atau fungsi organisme hidup, yang ditunjukkan melalui gejala-gejala maupun tanda-tanda, baik khusus maupun tidak (Lavilla-Pitogo 1992). Penyakit tidak saja disebabkan oleh infektor, tetapi juga disebabkan oleh faktor kepadatan, lingkungan, nutrisi dan kesalahan dalam manajemen pengelolaan pada usaha pembenihan dan budidaya.

Penyakit pada udang budidaya dapat dibagi menjadi dua yaitu : penyakit infeksius dan penyakit non infeksius. Penyakit infeksius meliputi penyakit viral, bakterial, jamur dan parasit sedangkan penyakit non infeksius adalah penyakit yang disebabkan oleh perubahan lingkungan yang ekstrem dan tiba-tiba, nutrisi yang tidak seimbang, adanya toksikan dan pengaruh genetis (Kautsky *et al.*, 2000).

Penyakit merupakan bagian integral dari suatu ekosistem dan cenderung bersifat oportunistik. Mekanisme berkembangnya penyakit pada umumnya tergantung dari dua hal, yaitu lingkungan dan sistem pertahanan tubuh dari organisme. Penyakit akan berkembang bila lingkungan memberi kesempatan kepada infektor yang bersifat patogen untuk berlipat ganda. Sebagai contoh, banyaknya jumlah bahan organik yang terakumulasi pada media hidup udang akan melipat gandakan jumlah kepadatan bakteri. Salah satu bakteri yang berperan dalam proses penguraian chitin dan selulosa adalah dari jenis bakteri *vibrio* sp. Bakteri jenis ini juga bersifat patogen bagi udang. Peningkatan jumlah kepadatan bakteri pada media pemeliharaan akan berpotensi untuk meningkatkan infeksi bakteri patogen pada udang.

3.2. Faktor Pemicu Timbulnya Penyakit pada Udang

Pada dasarnya, penularan penyakit ini pada udang lebih dahulu disebabkan oleh penurunan mutu lingkungan budidaya. Penurunan ini akan mengakibatkan udang secara fisiologis menjadi stress sehingga menurunkan fungsi sistem kekebalan tubuh (Kadriah). Penurunan sistem kekebalan tubuh tersebut akan memudahkan penyakit baik bakteri maupun virus untuk menginfeksi (Kautsky *et al.*, 2000). Sehingga hal mendasar yang perlu diperhatikan guna menghindari penyakit infeksi adalah melakukan eliminasi stress pada udang. Eliminasi tersebut seharusnya dilakukan pada setiap rantai kegiatan, mulai dari panti benih hingga kawasan budidaya. Titik rawan terhadap stress juga terdapat pada penanganan panen pada panti pembenihan, transportasi benih hingga penebaran di tambak. Peningkatan kualitas lingkungan, pemberian nutrisi, penanganan pasca

panen pada panti pembenihan diharapkan dapat menurunkan tingkat stress hingga penebaran di tambak.

Kejadian serangan vibriosis yang sering mematikan benur pada panti-panti pembenihan secara massal biasanya diawali dengan fenomena air bercahaya. Pancaran cahaya yang terlihat di air dan di benur disebabkan adanya infeksi bakteri *Vibrio* berpendar. Bakteri *Vibrio* berpendar ini biasanya menyerang sistem pembenihan baik telur, larva maupun lingkungan pemeliharaan (Baticados *et al.* 1990). Populasi bakteri *Vibrio* yang sudah mencapai quorum (tahap dimana jumlah populasi bakteri sudah bersifat patogen) bisa berubah sifatnya dari saprofit menjadi patogen dan kemudian bersepakat untuk bersama-sama “menyalakan lampu (*biolumenescence*)” sambil melepaskan toxin yang dapat mematikan hewan budidaya dengan cepat.

Pada pembenihan udang windu, tingginya kepadatan serta penurunan mutu lingkungan terutama disebabkan oleh pengelolaan lingkungan yang kurang baik, merupakan hal yang dapat menurunkan resistensi terhadap serangan patogen. Hal tersebut dapat memudahkan patogen menginfeksi selama masa pemeliharaan. Pada akhirnya, infeksi tersebut akan menyebabkan kematian massal atau setidaknya penurunan kualitas dan kuantitas benih yang menyebabkan kerugian pada usaha pembenihan (Prajitno, 2007).

3.2. Sistem Transmisi penyakit Infeksi pada Udang

Secara umum, terdapat dua cara sistem transmisi penyakit infeksi pada udang, yaitu vertikal dan horizontal. Transmisi vertikal adalah

infeksi pada benih yang diperoleh induk yang telah terinfeksi dan bersifat menurun. Transmisi horizontal dilakukan oleh *carrier* atau inang pembawa penyakit pada media hidup yang menularkan penyakit. Benih udang windu yang telah terinfeksi melalui transmisi vertikal berpotensi menimbulkan wabah penyakit pada kawasan budidaya. Transmisi vertikal tersebut diturunkan melalui gonad yang terinfeksi penyakit dan berpotensi menghasilkan larva yang berpotensi terinfeksi (Chanratchakool *et al.*, 1998)

Benur yang telah terinfeksi juga merupakan *carrier* penyakit yang potensial pada usaha budidaya. Hal tersebut dapat terjadi terutama bila benur telah mengandung penyakit atau resesif dari induk yang telah terinfeksi. Bila mutu lingkungan menurun, benur akan stress sehingga patogen yang dikandungnya akan mampu melakukan replikasi. Untuk itu alternatif yang dapat dilakukan adalah dengan melalui upaya pengobatan.

Beberapa parasit seperti *Epistilis* dan *Zoothamnium sp.* Dalam jumlah relatif banyak akan menyebabkan udang susah bergerak, malas makan, dan terjadi proses moulting. Pada kondisi demikian bakteri oportunistik seperti *vibrio sp* akan berkembang sebagai agen sekunder dalam proses kematian udang windu (Atmomarsono *et al.*, 1993). Kenyataan ini biasanya terjadi di tambak dan panti pembenihan dengan kepadatan tinggi yang pergantian airnya tidak teratur, sebagian pakan yang tidak dimanfaatkan dapat mengakibatkan turunnya kualitas lingkungan tersebut. Apabila hal ini tidak diimbangi dengan proses pergantian air baru secara teratur, maka dapat diperkirakan bahwa populasi bakteri akan berkembang dengan pesat (Zafran dan Boer, 1991).

BAB IV

SUMBER-SUMBER PENYAKIT BAKTERIAL PADA UDANG WINDU

4.1 Lingkungan

Faktor lingkungan dalam hal ini berbagai parameter kualitas air sangat berpengaruh terhadap timbulnya penyakit bakterial pada udang windu. Faktor kualitas air antara lain kandungan bahan organik dan suhu telah terbukti mempunyai korelasi positif terhadap peledakan populasi bakteri. Hasil penelitian baik di laboratorium maupun di lapangan yang telah dilakukan oleh Puslitbang Perikanan, terbukti bahwa bahan organik sangat berpengaruh terhadap peningkatan laju populasi bakteri *Vibrio harveyi* yang dikenal dengan penyakit kunang-kunang baik di media budidaya maupun dalam tubuh udang (Prayitno, 2007). Ruby dan Morin (1995) menemukan bahwa pertumbuhan terbaik bakteri *V. harveyi* pada perairan yang subur dan mempunyai kandungan bahan organik yang tinggi. Sementara menurut Shilo dan Yetinson (1979), bakteri *V. harveyi* berkembang pada perairan yang diperkaya oleh buangan limbah. Lighner (1994) mengatakan bahwa pada umumnya bakteri bersifat fakultatif yaitu

dalam kondisi kualitas air yang buruk dapat menginfeksi dan mengakibatkan kematian larva udang. Kandungan bahan organik yang masih dalam kisaran yang layak untuk meminimumkan tingkat serangan penyakit bakterial adalah kurang dari 50 ppm. Untuk mengatasi masalah ini antara lain melalui praktek menyiponan dan pemberian pakan dilakukan secara cermat dan rasional.

Suhu air sangat berpengaruh dalam proses metabolisme udang. Proses metabolisme berjalan normal bila kondisi suhu diperairan berada dalam kondisi optimum dan kestabilan fluktuasi suhu pada siang dan malam hari. Hasil penelitian terhadap hatchery dengan ruang tertutup versus ruangan berventilasi diperoleh hasil bahwa larva udang yang dipelihara terinfeksi bakteri kunang-kunang dengan tingkat serangan yang hampir sama. Sedangkan pada hatchery dengan sistem terbuka dimana fluktuasi suhu harian yang relatif besar, akan menimbulkan stress serta akan memperburuk kondisi larva udang. Hal ini merupakan peluang bagi bakteri kunang-kunang untuk menginfeksi karena sifatnya yang oportunistik (Prayitno, 2007).

4.2 Kontaminasi Induk Udang windu

Penyakit bakterial pada udang windu di hatchery dapat pula terjadi akibat kontaminasi kotoran induk udang windu di bak-bak pemijahan karena *midgut* udang windu sudah mengandung bakteri *Vibrio luminescent*, sebagaimana Lavilla-Pitogo *et al.*, (1990) menjelaskan bahwa *midgut* induk udang yang ditangkap dari alam mengandung 10^4 sfu/g bakteri *Vibrio* spp, dimana 30% nya adalah *Vibrio harveyi*.

Keberadaan bakteri dalam saluran pencernaan udang sangat berkaitan erat dengan proses pencernaan, dimana sebagian besar bakteri mampu menguraikan 25 polisakarida dan karbohidrat lainnya (Demsey, et al., 1989). Jumlah bakteri *Vibrio* spp lebih besar dalam usus larva udang dibandingkan dengan di dalam air media pemeliharaan (O'Brien dan Sizemore, 1979). Selanjutnya dijelaskan bahwa pH usus dan kandungan nutrisi yang ada dalam usus terutama khitin organisme laut dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan bakteri *Vibrio* spp.

Bauman dan Bauman (1997) menyatakan bahwa bagian tubuh hewan laut merupakan habitat yang sesuai secara fisiologi untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* spp. Induk dari alam ada kemungkinan mengandung bakteri *Vibrio harveyi*, maka besar kemungkinan telur dan nauplius yang dihasilkan akan terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Hal ini terutama bila pencucian telur dan nauplius tersebut kurang bersih sehingga saat kondisi pemeliharaan memburuk, bakteri tersebut tumbuh dan berkembang menjadi patogen (Rukyani, 1999)

Induk yang terinfeksi melepaskan jaringan dan cairan ovarium bersama telur kemudian patogen dalam cairan akan menempel pada telur. Jika telur menetas telur sudah terinfeksi patogen. Apabila nauplius ini dipelihara di hatchery maka akan menyebabkan kelangsungan hidup yang diperoleh rendah karena terserang penyakit.

4.3 Kontaminasi Pakan

Sumber lain yang berpotensi membawa bakteri *Vibrio* spp adalah artemia. Sebagaimana Zafran (1992), dimana pengujian terhadap artemia

yang menggunakan media TCBSA agar, diketahui artemia positif membawa bakteri *Vibrio* spp

BAB V

JENIS-JENIS PENYAKIT BAKTERIAL

PADA UDANG WINDU

1. Vibriosis

Vibriosis adalah suatu penyakit pada udang yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* yang bertanggung jawab pada kematian budidaya udang di seluruh dunia (Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et Al., 1990). Jenis *Vibrio* secara luas terdapat dalam suatu system budidaya diseluruh dunia. Infeksi *Vibrio* sering terjadi di hatchery, tetapi juga biasanya terjadi dalam kolam pembesaran udang. Vibriosis disebabkan oleh bakteri gram-negative dalam keluarga *Vibrionaceae*. Masuknya *vibrio* kemungkinan terjadi ketika faktor lingkungan yang menyebabkan tingkat penambahan bakteri yang sangat cepat, dan ada pada di dalam darah udang. Bagaimanapun juga, *Vibrio Spp* adalah di antara bakteri chitinoclastic yang berhubungan dengan penyakit kerang dan kemungkinan masuk melalui luka ke dalam exoskeleton atau pori-pori. Insang merupakan bagian yang paling mudah kena karena hanya ditutup oleh suatu exoskeleton tipis, tetapi permukaan dibersihkan oleh

setobranchs. *Midgut*, terdiri atas kelenjar pencernaan dan batang midgut (MGT, sering dikenal sebagai usus, tidaklah dilapisi oleh suatu exoskeleton dan oleh karena itu sepertinya menjadi suatu tempat untuk masuknya pathogens yang dibawa air, makanan dan sedimen (Lovett& Felder, 1990).

Di antara kelompok jasad renik yang menyebabkan kerugian serius didalam budidaya udang, adalah bakteri karena menyebabkan kerugian secara ekonomis dan menyebabkan kerusakan pada tambak. Penyakit karena bakteri, sebagian besar berkaitan dengan bakteri jenis *Vibrio*, telah dilaporkan menyerang udang dalam budidaya udang. Sedikitnya berjumlah ada 14 jenis *vibrio* , yaitu *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. logei*.

Vibrio harveyi, merupakan suatu bakteri gram-negative, bakteri bercahaya, adalah salah satu dari agen mikrobial yang penting yang dapat membuat kematian massal larva udang windu dalam suatu sistem pembesaran. Sejumlah besar udang di hatchery yang memproduksi benih udang sering mengalami kemunduran dalam kaitan dengan penyakit bakteri *luminescent* dan menderita kerugian ekonomi yang sangat besar. *Vibriosis* adalah disebabkan oleh sejumlah *Vibrio* Jenis bakteri, termasuk: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* (Lightner et al, 1992;). Telah dilaporkan berkali-kali mengenai *vibriosis* yang disebabkan oleh *V. damsella*, *V. fluviialis* dan *Vibrio* lain yang terdefinisi jenisnya.

Di antara isolate *V. harveyi*, beberapa mematikan dan beberapa lagi tidak mematikan. *Vibriosis* ada diseluruh dunia dan semua binatang laut berkulit keras, termasuk udang, adalah yang paling mudah terkena. Infeksi

vibrio terjadi dalam semua tingkat kehidupannya, tetapi kejadian umum di hatchery. Infeksi vibriosis paling banyak yang telah dilaporkan untuk *P. monodon* dari kawasan Indo-Pacific, *P. japonicus* dari Jepang, dan *P. vannamei* dari Ecuador, Negara Peru, Kolumbia dan Amerika Tengah (Lightner, 1996). Vibriosis dinyatakan melalui sejumlah sindrom. Hal ini meliputi: mulut dan lenteric (demam) vibriosis, anggota badan dan cuticular vibriosis, luka vibriosis yang terlokalisir, penyakit kulit, sistemik vibriosis dan pembusukan hepatopancreatitis (Lightner, 1990)

Jenis bakteri dari golongan *V. harveyi* merupakan bakteri yang paling sering menimbulkan kematian massal dalam waktu yang relatif singkat. Bakteri ini menyerang larva udang di panti-panti pembenihan maupun udang yang dibudidayakan di tambak dan dikenal dengan nama penyakit kunang-kunang atau penyakit udang menyala. Udang yang terinfeksi bakteri ini akan bercahaya dalam keadaan gelap dan biasanya menyerang larva pada stadium zoea, mysis dan post larva. Terjadi lima jenis penyakit vibrio yang menyerang udang : necrosis pada ekor, penyakit kulit, penyakit merah, sindrom lepas kulit (LSS) dan penyakit usus putih (WGD) yang kesemuanya disebabkan oleh *Vibrio* spp. Diantara itu, LSS, WGD, dan penyakit merah menyebabkan angka kematian massal di dalam kolam budidaya udang. Enam jenis *Vibrio* yakni *V. Harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* dan *V. splendidus*-are berhubungan dengan udang yang sakit. Distribusi dan komposisi Jenis bakteri luminens di dalam hatchery udang menunjukkan dengan jelas terhadap kehadiran *V. harveyi* (97.30%) dan *V. orientalis* (2.70%) di dalam usus udang dimana sumber utama bakteri ini didalam hatchery udang adalah bahan kotoran yang berasal dari brood stock yang kemungkinan terjadi sewaktu bertelur.

Angka kematian dalam kaitan dengan vibriosis terjadi ketika udang tertekan oleh faktor seperti: kualitas air yang buruk, kepadatan tinggi, suhu air tinggi, rendahnya oksigen (DO) dan rendahnya pergantian air (Lightner dan, 1975; Brock dan Lightner, 1990). Angka kematian tinggi yang pada umumnya terjadi pada post larva dan juvenil. Larva udang windu mengalami kematian dalam waktu 48 jam sejak terkena *V. harveyi* dan *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo, *et al.*, 1990). Juga ada Laporan kematian udang windu yang sudah siap panen yang disebabkan oleh vibriosis (Anderson *et al.*, 1988). Udang windu dewasa yang terkena *vibriosis* nampak *hypoxic*, menunjukkan badan yang merah ke insang coklat, nafsu makan kurang dan udang berenang lemah di tepi dan permukaan kolam (Anderson *et al.*, 1988). *Vibrio* Spp juga menyebabkan penyakit kaki merah. Enam *Vibrio* Jenis, termasuk *V. harveyi* dan *V. splendidus* menyebabkan luminesensi, yang kelihatan pada malam hari, menyerang udang pada tingkat post larva, muda dan dewasa (Lightner, *et al.*, 1992). Post larva yang terkena infeksi juga memperlihatkan pergerakan kurang, mengurangi phototaxis dan usus kosong.

Udang yang terkena vibriosis terlihat ada luka yang terlokalisir sepanjang kulit jangat ini merupakan tanda khas penyakit yang menyerang kulit oleh bakteri, infeksi terlokalisir dari bocornya luka, hilangnya otot, jaringan yang tidak jelas, peradangan usus atau hepatopancreas dan atau keracunan darah (Lightner, 1993). Luka penyakit kulit hasil bakteri adalah warna coklat atau hitam dan nampak diatas kulit jangat badan, anggota badan atau insang. Post larva yang terkena hepatopancreas menunjukkan seperti berawan. Insang sering nampak warna coklat. Pembusukan Hepatopancreatitis dikenali sebagai berhentinya pertumbuhan

hepatopancreas dengan multifokal necrosis dan radang haemocytic, yang berisi sejumlah besar *Vibrio parahaemolyticus* maupun *V. harveyi* dan melepasnya epitel sel dari dasar lapisan MGT . Lepasnya sel Epithelial tidaklah dilihat sebagai kehadiran bakteri non-pathogenic (probiotics) .

Patogen seperti *Vibrio Spp*, yang menyebabkan lepasnya epitelium di dalam MGT, dapat mempengaruhi angka kematian tinggi di udang dengan menghilangkan 2 lapisan yang melindungi udang dari infeksi: epitelium dan selaput peritrophic yang dikeluarkannya. Sebagai tambahan, hilangnya epitelium mempengaruhi peraturan air dan pengambilan ion ke dalam badan.

Hasil diagnosa infeksi vibrio didasarkan pada tanda klinis dan demonstrasi histological bakteri *Vibrio* di dalam luka, bongkol yang kecil-kecil atau haemolymph. Organ bagian pengeluaran dan Haemolymph di coba pada media *Vibrio*-selective (TCBS) atau media agar laut yang umum. Ketika menyelidiki post larva, keseluruhan contoh dihancurkan dan kemudian ditanam ke suatu media agar. Koloni Luminescent diamati setelah 12 sampai 18 jam setelah diinkubasi pada suhu-kamar atau 25 ke 30°C.

Vibrio diisolasi untuk dikenali dengan sejumlah metoda, termasuk: Gram strain, Motilas, suatu oxidase test, gaya glukosa utilisasi, ditumbuhkan dalam Nacl, Pengurangan Nitrat dan cahaya. Jenis vibrio dikenali dengan cepat dengan menggunakan API-20 NFT yang sistemnya dengan menanan koloni vibrio pada API-NFT dan menghitung angka koloni menurut arah alat tersebut (Lightner, 1996) atau BIOLOG (suatu sistem identifikasi miniatur bakteri yang merupakan suatu alternatif kepada API sistem). Test kepekaan Antimicrobial mungkin digunakan

untuk mengidentifikasi vibriosis dan dapat dijalankan menggunakan metode disk Kirby-Bauer (DIFCO, 1986) atau Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method (Lightner, 1996)

Jenis vibrio hidup di air menggunakan fasilitas budidaya udang (Lavilla-Pitogo, et al., 1990) dan biofilm, yang mana bentuknya berbeda hubungannya antara air di hatchery dan di kolam. Bakteri masuk udang melalui luka atau retakan kulit jangat dan dicernakan dengan makanan (Lavilla-Pitogo et al., 1990). Sumber yang utama *V. harveyi* di hatchery berada dalam *midgut* broodstock udang betina, yang dikeluarkan sewaktu udang bertelur (Lavilla-Pitogo et al., 1992).

Berbagai studi telah dikerjakan mengenai efek membekukan pada vibrios yang mencemari udang yang dipanen. *V. vulnificus* di tiram yang dipanen (*Crassostrea Virginica*) dapat terus hidup pada suhu -20°C selama waktu 70 hari. *V. parahaemolyticus*, diisolasi dari daging daging tiram yang dihomoginasi dan diinaktivasi di dalam 16 hari pada -15°C ketika jumlah kandungan bakteri adalah sangat tinggi (10 cfu/gm; Muntada-Garriga et al., 1995). Ada bukti terbaru untuk menyatakan bahwa *V. harveyi* dapat survive di sedimen kolam genap setelah penjernihan dengan khlor atau perawatan dengan kapur (Karunasagar et al., 1996).

Perkembangan vibriosis menjadi suatu masalah umum diseluruh dunia, *V. harveyi* terus berlanjut menyebabkan angka kematian diseluruh dunia diperkirakan diatas 30% pada *P. monodon* larva, post larva dan dewasa di bawah kondisi-kondisi udang yang stres. Suatu strain *Vibrio* yang sangat pathogenic juga telah muncul dan terus menyebabkan angka kematian dalam budidaya udang (Le Groumellec et al., 1996). Permasalahan

disebabkan oleh vibriosis adalah umum, tetapi dipertimbangkan lebih kecil dibanding wabah karena virus.

5.2. Necrotizing Hepatopancreatitis Bacterium (NHPB)

Necrotizing Hepatopancreatic Bacterium (NHPB) adalah jenis penyakit bakterial yang disebabkan oleh bakteri jenis bakteri alpha-Proteobacterium (tergolong bakteri gram negatif) yang sering didapati menyerang organ hepatopancreas udang windu.

Pada udang yang terserang, memperlihatkan tanda-tanda sebagai berikut: hepatopancreas pucat, susut hingga 50%, kondisi usus udang kosong, udang sangat lemah, biasanya tidak aktif/diam di dasar, kaki renang kelihatan kotor.

Jenis bakteri ini masih perlu dikaji lebih jauh, hingga kini bakteri ini belum bisa dikultur pada media apapun. Serangannya cukup ganas, dalam kurun waktu 1 bulan kematian bisa mencapai 95% (pada skala penelitian)

5.3. Rickettsial Diseases

Rickettsial Diseases juga disebabkan oleh bakteri. Namun Jenis bakteri penyebab penyakit ini belum ditemukan karena tidak dapat dikultur/diisolasi. Ukuran 0,2-0,7x0,8-1,6 mikron. Dilaporkan menginfeksi organ hepatopancreas pada udang di Meksiko.

5.4. Filamentous bacterial

Filamentous bacteria adalah jenis penyakit pada udang yang disebabkan oleh bakteri filamen. Bila terjadi infeksi bakteri ini pada udang maka akan timbul warna kehitaman (melanization) pada kaki renang atau bagian dorsal

BAB VI

DIAGNOSIS PENYAKIT BAKTERIAL PADA UDANG WINDU

6.1 Pengertian Diagnosis Penyakit

Pengertian diagnosis secara umum adalah kepastian suatu penyakit berdasarkan gejala yang tampak, sedangkan diagnosis penyakit pada udang adalah suatu proses untuk mengidentifikasi suatu penyakit pada udang melalui gejala klinis dan tanda tanda penyakit yang khas termasuk faktor-faktor lain yang berhubungan dengan proses penyakit tersebut. Diagnosis penyakit yang benar diperlukan untuk merekomendasikan cara pengendalian yang tepat dan juga diperlukan dalam suatu survey penyakit pada udang. Dalam hal ini diagnosis dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri penyebab penyakit bakterial pada udang. Diagnosis penyakit udang berdasarkan gejala saja belum dapat diandalkan kebenarannya karena tidak memadai atau tidak cukup untuk mengidentifikasi suatu penyakit disebabkan banyak organisme bakteri yang berbeda memperlihatkan gejala yang sama pada inang yang diinfeksi.

Adanya suatu tanda penyakit membantu meyakinkan kebenaran, menambah kepastian suatu diagnosa, tetapi perlu juga diperhatikan kemungkinan adanya penyebab penyakit bakteri yang sifatnya sekunder atau saprofit yang turut serta menginfeksi udang. Jadi mungkin saja organisme yang diperoleh dari udang bergejala penyakit bukan merupakan bakteri primer, tetapi bakteri sekunder/saprofit. Untuk mendiagnosis penyakit udang pertama kali perlu menentukan apakah penyakit tersebut disebabkan oleh bakteri atau faktor lingkungannya. Dalam beberapa kasus apabila terdapat gejala penyakit atau terdapat tanda bakteri yang khas, maka cukup mudah bagi mereka yang telah berpengalaman untuk menentukan penyebabnya dengan membandingkan gejala yang ada dengan yang terdapat dalam berbagai buku pedoman, CD-compendium dan lain-lain. Akan tetapi pada banyak kasus pengujian yang lebih lengkap terhadap gejala dan mengamati tentang ciri-ciri lainnya sangat penting untuk mendapatkan hasil diagnosis yang tepat.

6.2. Cara diagnosis Penyakit Bakterial

Pada studi mengenai infeksi bakteri patogen terhadap hewan budidaya, kegiatan pertama yang biasa dilakukan jika terjadi serangan adalah melakukan analisis gejala klinis hewan budidaya yang terserang penyakit. Setelah itu dilanjutkan dengan analisis patologi anatomi. Analisis ini penting untuk mengetahui jenis bakteri yang menyerang dari ciri-ciri morfologi udang yang terserang maupun ciri-ciri morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari air, sedimen dan udang sakit. Analisis lebih lanjut dapat dilakukan dengan melakukan uji histopatologi terhadap jaringan dari organ udang sakit.

Ciri-ciri udang yang terserang vibriosis antara lain kondisi tubuh lemah, berenang lambat, nafsu makan hilang, badan mempunyai bercak merah-merah (*red discoloration*) pada *pleopoda* dan abdominal (perut) serta pada malam hari terlihat menyala. Udang yang terkena vibriosis akan menunjukkan gejala nekrosis (Karunasagar1994). Bagian kaki renang (*pleopoda*) dan kaki jalan (*pereiopoda*) menunjukkan melanisasi. Bagian mulut yang kehitaman adalah kolonisasi bakteri pada esophagus dan mulut. Pada saat udang telah menampakkan gejala seperti ini usaha pencegahan biasanya sudah sulit untuk dilakukan, oleh karena itu penting sekali untuk dilakukan deteksi awal untuk mencegah berkembangnya bakteri patogen di lingkungan budidaya.

6.3. Identifikasi Bakteri Penyebab Vibriosis

Ketika patogen dijumpai pada udang yang sakit, patogen tersebut diidentifikasi berdasarkan referensi hingga manual khusus identifikasi. Namun dalam beberapa hal, patogen diketahui sebagai penyebab penyakit tetapi tidak ada laporan terbaru yang mendukungnya, maka tahap selanjutnya adalah pembuktian penyebab penyakit melalui Postulat Koch. Postulat ini dilakukan untuk memverifikasi atas hipotesis bahwa isolat patogen yang diuji adalah isolat penyebab penyakit pada udang. Dalam hal ini harus dilakukan serangkaian pengujian untuk membuktikannya dengan menggunakan dasar-dasar yang dikemukakan oleh Robert Koch, seorang ahli bakteriologi bangsa Jerman. Cara pembuktian ini lazim disebut postulat Koch atau kaidah Koch. Postulat Koch telah diterima secara universal sebagai pembuktian penyebab penyakit dalam hal ini untuk membuktikan hipotesa bahwa bakteri yang diisolasi adalah penyebab penyakitnya.

Sebelum dilakukan uji karakterisasi morfologi dan fisiologi bakteri, terlebih dahulu dilakukan isolasi koloni bakteri *Vibrio* berpendar dari kejadian penyakit di tambak udang dan panti pembenihan (Gambar 2). Bakteri *Vibrio* diisolasi dari air laut, air tambak, sedimen tambak dan udang sakit. Sampel air diambil dengan menggunakan botol steril kemudian dibawa ke laboratorium. Sedangkan sampel sedimen diambil menggunakan sudip steril dan dibawa ke laboratorium menggunakan botol steril. Isolasi bakteri *Vibrio* dilakukan dengan cara mengambil 1 ml air sampel dan 1 g sedimen tambak kemudian diencerkan secara bertingkat dalam 9 ml larutan fisiologis (Benson 1985) dan dikultur pada media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar*). Bakteri juga diisolasi dari benur sakit yang digerus kemudian dikultur pada media agar-agar. Koloni bakteri berpendar yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan cara ditanam kembali pada media TCBSA dalam cawan petri serta pada media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dalam tabung reaksi dengan metode gores dan diinkubasi pada suhu 28°C.

Isolat terpilih kemudian diamati karakter morfologinya dengan mengamati bentuk koloni, warna, bau dan kemampuan berpendarnya. Seleksi awal isolat bakteri dilakukan berdasarkan pertumbuhan dan kemampuan pendarannya. Isolat bakteri yang tetap dapat tumbuh dengan baik serta tetap berpendar setelah diremajakan kemudian dipilih untuk uji selanjutnya.

Uji biokimia dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Austin (1991); Austin & Austin (1993); Alsina & Blanch (1994); Baumann *et al.* (1994); Brock *et al.* (1994); Muir (1996a). Untuk menentukan spesies dari bakteri *Vibrio* berpendar, data hasil uji biokimia yang diperoleh diolah dengan menggunakan perangkat lunak Fortran Computer Program (Muir

1996). Karakterisasi secara molekuler dilakukan dengan membandingkan sekuen gen 16S-rRNA isolat bakteri dengan sekuen gen 16S-rRNA yang terdeposit di NCBI. Pada uji karakterisasi dengan teknik molekuler ini dilakukan pengujian untuk tujuan identifikasi spesies.

Isolat bakteri *Vibrio* berpendar yang diperoleh diremajakan secara berkala untuk selanjutnya diuji patogenisitasnya. Isolat bakteri *Vibrio* dapat disimpan selama dua tahun menggunakan media skim milk 10% yang ditambahkan NaCl 1.5% pada suhu penyimpanan -80°C atau pada media *Nutrient Broth* (NB) ditambah gliserol 20% pada suhu penyimpanan -20°C .

6.4. Uji Patogenisitas

Sebelum dilakukan uji patogenisitas, terlebih dahulu dilakukan uji pengamatan kurva pertumbuhan bakteri. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kepadatan bakteri yang akan diinfeksi. Koloni bakteri *Vibrio* ditumbuhkan pada media TCBSA dalam cawan petri selama 36 jam pada suhu 28°C , kemudian diambil sebanyak 15 jarum ose dan ditumbuhkan kembali dalam media *nutrient broth* (kaldu nutrien) volume 100 ml. Sampling dilakukan setiap dua jam dengan cara mengambil cairan (NB) sebanyak 1 ml kemudian diencerkan secara bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan seterusnya) dalam 9 ml larutan fisiologis (Benson 1985). Kemudian dari masing-masing pengenceran diambil 100 μL dan ditumbuhkan pada media TCBSA dengan metode sebar selama 48 jam pada suhu 28°C . Setelah diketahui populasi bakteri dalam NB, maka volume suspensi bakteri dalam NB yang akan diinfeksi ke dalam media pemeliharaan udang uji dapat dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

keterangan :

- N_1 : Kepadatan populasi bakteri *Vibrio* dalam NB (CFU/ml)
- V_1 : Kepadatan populasi bakteri *Vibrio* dalam NB (CFU/ml)
- N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (CFU/ml)
- V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan udang uji (ml)

Selanjutnya dilakukan infeksi buatan (*experimental infection*) dengan cara perendaman (Hameed 1995) ke dalam wadah pemeliharaan udang uji. Pada tahap ini digunakan udang ukuran *post larva* (PL) 15 – 20. Sebelumnya telah dilakukan uji LD 50 untuk mengetahui konsentrasi bakteri yang akan diinfeksi. Pada uji LD 50 diinfeksi berbagai tingkat konsentrasi bakteri yaitu 10^5 , 10^6 , dan 10^7 CFU/ml. Dari hasil uji LD 50 diperoleh hasil konsentrasi bakteri $10^{6.52ax}$ CFU/ ml yang akan digunakan pada uji patogenisitas.

Pengujian patogenisitas ini dilakukan dengan udang ukuran *post larva* digunakan wadah berkapasitas 3 L sebanyak 15 buah. Setiap wadah diisi air laut dengan salinitas 28 ppt yang telah disterilkan dengan kaporit 150 mg/L selama satu malam dan kemudian dinetralisir dengan Natrium Thiosulfat 75 mg/L. Volume air laut yang diisikan ke dalam wadah sebanyak 2 L. Pada setiap wadah ditebarkan udang windu PL 15 sebanyak 20 ekor. Uji infeksi buatan dimaksudkan untuk melihat patogenisitas dari isolat terpilih.

Perkembangan populasi bakteri *Vibrio* berpondar dalam air media pemeliharaan udang pada setiap perlakuan diamati setiap 6 jam sampai 90 jam masa perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan mengambil sampel air pemeliharaan dan kemudian ditanam pada media TCBSA dengan pengenceran bertingkat yaitu 1 ml air sampel diencerkan dalam 9 ml larutan fisiologis. Sedangkan mortalitas udang windu diamati setiap 12 jam sejak diinfeksi sampai 96 jam perlakuan. Data mortalitas udang dianalisis ragam dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Rangkaian kegiatan ini akan dilaksanakan berdasarkan pada “Postulat Koch”, yaitu :

- a. Mikroorganisme tertentu selalu dapat dijumpai berasosiasi dengan penyakit tertentu.
- b. Mikroorganisme itu dapat diisolasi dan ditumbuhkan menjadi biakan murni.
- c. Biakan murni mikroorganisme tersebut akan menimbulkan penyakit bila disuntikkan pada hewan yang rentan (*susceptible*).
- d. Penggunaan prosedur laboratorium memungkinkan diperolehnya kembali mikroorganisme yang disuntikkan itu dari hewan yang dengan sengaja diinfeksi dalam percobaan (Pelczar & Chan 1986).

6.5. Analisis Histopatologi

Salah satu cara untuk mengetahui sejauh mana kerusakan suatu organ atau jaringan dan perubahan-perubahan yang terjadi akibat suatu serangan penyakit tertentu pada organisme adalah dengan pengamatan patologi anatomi. Patologi adalah ilmu yang mempelajari sebab, sifat dari perjalanan penyakit, baik perubahan anatomi maupun perubahan fungsional dari suatu

penyakit (Djojopranoto, 1963). Sedangkan anatomi adalah suatu ilmu yang mempelajari struktur tubuh dan hubungan bagian-bagiannya satu sama lain. Menurut Panigoro *et al* (2007), histology sangat diperlukan dalam mempelajari struktur jaringan normal suatu organ atau alat tubuh lain baik struktur anatomi maupun fisiologi. Hal ini sangat penting dalam mengenali suatu kondisi patologi yang merupakan akibat suatu penyakit dan perubahan-perubahan seluler. Jadi Histopatologi adalah cabang ilmu yang dapat digunakan untuk mempelajari kelainan patologi (abnormal) suatu jaringan akibat patogenitas suatu penyakit. Pengamatan histopatologi (patologi anatomi) pada udang yang telah diberi paparan *vibrio harveyi* dan bahan bioaktif daun kopasanda, untuk melihat seberapa besar kerusakan yang ditimbulkan. Pengamatan dilakukan pada organ hepatopankreas, insang dan kulit. Struktur jaringan normal maupun abnormal dapat dipelajari dengan mikroskop dan preparat jaringan. Preparat ini dibuat melalui suatu proses pengolahan jaringan sampai didapatkan preparat yang telah diwarnai. Dengan demikian struktur jaringan (histology) dapat terlihat dengan jelas sehingga memudahkan pembacaan jaringan (Panigoro *et al.*, 2007)

Uji histopatologi dapat dilakukan dengan menggunakan metode Lightner (1995) yang meliputi fiksasi, dehidrasi, parafinasi, *embedding* dan pewarnaan (*staining*). Lebih lanjut Munford (2007) menyajikan prosedur pembuatan preparat histology adalah sebagai berikut:

1. Fiksasi. Fiksasi dapat dilakukan sebelum atau sesudah penyayatan jaringan dan dilakukan dengan tujuan pemeriksaan. Tujuan fiksasi antara lain adalah untuk mempertahankan struktur sel seperti semula.. mencegah terjadinya proses autolisis oleh enzim dan mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. Bahan fiksasi yang

dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan adalah Bouin yang terdiri dari asam pikrat penuh, formaldehyde dan asam cuka glacial. Baffer formalin dapat juga digunakan sebagai bahan fiksasi jaringan.

2. Dehidrasi. Proses ini bertujuan untuk melakukan penarikan air dari dalam jaringan secara perlahan sehingga jaringan tidak menyempit. Bahan yang digunakan untuk menarik air tersebut harus mulai dengan prosentase atau konsentrasi yang rendah kemudian dinaikkan secara bertahap sampai prosentase absolute. Umumnya bahan yang digunakan untuk menarik pada jaringan adalah alkohol.
3. Penjernihan (clearing). Penjernihan merupakan tahap transisi, bahan yang digunakan pada tahap ini mempunyai 2 sifat yaitu dapat melarutkan atau dilarutkan oleh bahan yang digunakan untuk menarik air dari dalam jaringan, dapat melarutkan oleh bahan yang digunakan untuk menanam jaringan (embedding)
4. Embedding (pencetakan Jaringan). Suhu antara paraffin dengan jaringan harus mendekati sama. Jika terjadi suatu perbedaan yang mencolok antara paraffin dengan jaringan yang akan ditanam maka akan nampak seperti terdapat gelembung udara di sekitar jaringan. Jaringan yang ada dalam paraffin akan kurang menyatu sehingga tidak dapat memperoleh hasil sayatan yang tipis.
5. Penyayatan jaringan. Penyayatan yang digunakan untuk menyayat jaringan adalah mikrotom. Kualitas sayatan jaringan ditentukan oleh ketajaman pisau, sudut potong, kualitas pemrosesan jaringan, kualitas pengeblokan jaringan, pemindahan jaringan ke water bath dan suhu water bath berkisar 45-50°C.

Pewarnaan jaringan. Secara fungsional zat warna dikenal ada yang digunakan untuk mewarnai sel (Hematoxilin-Eusin = HE), dan ada pula yang digunakan untuk mewarnai sitoplasma sel (eosin dan safranin).

BAB VII

PENGENDALIAN VIBRIOSIS

PADA UDANG WINDU

Upaya penanggulangan penyakit kunang-kunang ini telah dilakukan dengan pemberian berbagai macam antara lain Penggunaan antibiotik, Penggunaan bahan-bahan kimia, Penggunaan Vitamin C dan Astaxanthin, Penggunaan Vaksin dan Immunostimulan, Penggunaan Probiotik. Cara yang umum dilakukan untuk pengendalian *Vibriosis* ini adalah menggunakan bahan-bahan kimia dan antibiotik, namun penggunaan berakibat resistensi pada bakteri, mencemari lingkungan dan residu pada tubuh udang yang sangat berbahaya bagi yang meng konsumsinya. Berkaitan dengan hal tersebut, sangat diperlukan pencarian metode lain dalam pengobatan *Vibriosis* yang aman bagi udang, manusia dan lingkungan.

Pemberian antibiotik secara terus menerus memberikan dampak negatif pada larva udang karena akan meninggalkan residu dalam tubuh dan menyebabkan resistensi terhadap *V. harveyi*. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan suatu metode pencegahan dan

penanggulangan penyakit vibriosis pada udang windu antara lain penggunaan obat-obatan dan antibiotik. Namun penggunaan antibiotik dan bahan-bahan kimia tidak efektif lagi karena tidak memberikan hasil yang memuaskan, yaitu pada dosis tertentu justru berdampak negatif pada ikan/udang itu sendiri, bahkan dapat menimbulkan resistensi bagi bakteri *Vibrio* spp. Oleh karena itu perlu dicari alternatif lain dalam upaya penanggulangan penyakit pada usaha budidaya udang windu yang lebih efektif, murah dan ramah lingkungan.

Vibriosis dikendalikan oleh terjaganya kesehatan dan manajemen air yang ketat untuk mencegah masukan vibrios di air (Baticados, *et al.*, 1990) dan untuk mengurangi tekanan pada udang (Lightner, 1993). Pemilihan Lokasi baik, Disain Kolam Dan Kolam Persiapan adalah juga penting (Nash *et al.*, 1992). Pergantian air setiap hari dan suatu pengurangan biomass di kolam dengan pemanenan parsial direkomendasikan untuk mengurangi angka kematian disebabkan oleh *vibriosis*. Pengairan, mengeringkan dan mengatur lime/dolomite ke kolam panen juga direkomendasikan (Anderson *et al.*, 1988).

Luminescent vibriosis dapat dikendalikan di hatchery dengan mencuci telur dengan yodium (Sparkdin) dan formaldehida dan menghindari pencemaran oleh kotoran bertelur. *V. harveyi* di kolam air dapat inactivated oleh Dioksida Klor (Klosant). Probiotics (Ultrazyme-P-Fs dan Bioremid-Aqua) diatur secara langsung ke dalam air atau dengan cara dicampur pakan. Immunostimulants (Immunomax-Fs) juga telah sukses dapat mengurangi angka kematian udang yang diakibatkan oleh vibriosis. Penggunaan *Lactobacillus* sp. sebagai bakteri probiotik di dalam budidaya udang windu (P.Monodon) juga terbukti dapat menekan vibrio.

Jiravanichpaisal dan Chuaychuwong *et al.*, (1997) telah menyelidiki suatu perawatan efektif dengan *Lactobacillus* sp. terhadap vibriosis dan penyakit bercak putih pada *P. monodon*. Mereka menyelidiki pertumbuhan beberapa bakteri probiotik, dan survival mereka di air laut yang salinitasnya 20 ppt kurang lebih selama 7 hari. Aktivitas dua *Lactobacillus* sp. dalam menghambat terhadap *Vibrio* sp., *E. coli*, *Staphylococcus* sp. ternyata mempunyai pengaruh yang efektif.

Efek konsentrasi tembaga pada luminesensi dan racun *V. harveyi* telah diselidiki oleh Nakayama *et al.*, (2007). Mereka menemukan konsentrasi tembaga (unsur tidak zat pembunuh kuman) kurang dari 40 ppm tidak punya efek pada pertumbuhan udang. Sedang *V. harveyi* yang diberi dengan 40 ppm konsentrasi tembaga menunjukkan terjadinya pengurangan cahayanya (luminesensi). Oleh karena itu, kombinasi prebiotics, probiotics, immuno-stimulants dan unsur non-antibiotic (LBEENEX) mempunyai kekuatan besar melawan vibriosis dan Luminescent Bakteri (LB) dikombinasikan dengan cara budidaya tambak yang baik (BAP), merupakan suatu alat manajemen yang efektif untuk mengendalikan bakteri luminesensi beracun yang ada dikolam budidaya.

Bakteri probiotik yang bersifat non patogen dan memiliki kemampuan mengurangi, menghambat ataupun, membunuh bakteri patogen, serta memungkinkan sebagai makanan di dalam perairan merupakan alternatif lain yang dapat digunakan untuk pencegahan penyakit. Beberapa sumber bakteri probiotik yang telah diteliti antara lain air laut, air tambak, sedimen laut, dan karang.

Selain itu teknik lain yang perlu dikaji dan dievaluasi untuk menanggulangi penyakit pada budidaya udang windu adalah merangsang

kekebalan non-spesifik udang melalui penggunaan vaksin dan immunostimulan. Teknik tersebut telah banyak dilakukan baik di dalam negeri maupun dari manca negara, namun optimalisasi penggunaan suatu jenis immunostimulan masih perlu dilakukan.

Alternatif yang dapat dilakukan untuk pengendalian *Vibriosis* dengan aman dan ramah lingkungan adalah dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang mempunyai keaktifan sebagai antibakteri alami yang berasal dari produk alami baik dari hewan maupun tumbuhan.

Penggunaan bahan aktif dari sponge dan mangrove sebagai antibakteri juga telah mulai dirintis, namun sampai saat ini optimalisasi penggunaannya masih perlu dikaji lebih lanjut sehingga diperoleh hasil yang memuaskan dan bisa diterapkan dalam skala lapangan.

Salah satu jenis tanaman darat yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif adalah daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L). Tanaman ini digunakan sebagai tanaman obat tradisional untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Daun tanaman ini dapat digunakan mengobati kulit yang luka dan penahan darah. Selain itu akarnya digunakan sebagai antipiretik dan obat analgesik. Sementara bunga dari tanaman ini dapat digunakan untuk merawat luka dan sebagai racun serangga (Anonim, 2012). Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun kopasanda dilaporkan mengandung tanin, steroid, terpenoid, flavonoid, glikosida dan alkaloid (Akinmoladun *et al.*, 2007). Hasil skrining fitokimia dari ekstrak metanol daun kopasanda juga menunjukkan kehadiran senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin (Harlina *et al.*, 2013).

Senyawa flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri seperti flavonoid dari ekstrak *Capsella* sp. dan *Chromolaena* sp. (El Abyad *et al.*,

1990), *Prunus spinosa* (Sakar *et al.*, 1992), *Hyperium* sp. (Dall' *et al.*, 2003), (Cushnie and Lamb, 2005). Dastidar *et al.*, (2004) meneliti potensi senyawa iso flavonoid sebagai antibakteri terhadap *S.typhimurium*, dan Gattuso *et al.*, (2007) meneliti senyawa flavonoid pada *Citrus juice*. Lebih lanjut Savaranakumar *et al.*, (2009) melaporkan bahwa ekstrak metanol bunga *Thespesia populnea* L. Mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Selanjutnya Harlina *et al.*, (2016) melaporkan bahwa hasil isolasi bahan alami daun kopasanda ditemukan senyawa bioaktif yang memiliki aktifitas antibakteri yang teridentifikasi sebagai turunan senyawa flavonoid atau dikenal dengan quercetin yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri *V. harveyi* pada pasca larva udang windu yang lebih aman dan efektif.

BAB VIII

SENYAWA BIOAKTIF ALAMI

SEBAGAI ZAT ANTI BAKTERI

PADA UDANG WINDU

8.1 Sumber-Sumber senyawa Bioaktif alami Sebagai Anti Bakteri

Penggunaan bahan kimia dan antibiotik memiliki efek samping resisten dan residu pada tubuh ikan, maka pencarian alternatif lain dalam pengendalian penyakit berkembang pesat. Salah satu upaya pengendalian penyakit bacterial yang cukup aman adalah menggunakan antibiotik alami. Antibiotik alami merupakan bahan antibiotik yang berasal dari produk alami, seperti tanaman, umbi-umbian hewan, mikroorganisme baik darat maupun laut.

Beberapa penelitian farmokologis yang telah dilakukan untuk mengetahui manfaat tanaman ini. Dilaporkan bahwa tanaman ini digunakan sebagai antibakteri, antiplasmodik, antiprotozoal, antijamur, antihipertensi, antiinflamasi, (Phan *et al.* (2001) dalam Akinmoladun *et al.*, 2007.). Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Fitriyani *et al.*, (2007),

fitokimia daun kirinyuh (*Eupatorium pallescens* sinonim *C.odorata*) dimana hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tanin, dan steroid pada ekstrak daun kirinyuh. Vital *et al.*, (2009) juga melakukan skrining fitokimia daun *C.odorata* L.dengan menggunakan pelarut etanol dan etil asetat hasil penelitian yang diperoleh mengungkapkan bahwa ekstrak *C. odorata* L. mengandung komponen senyawa kimia yaitu flavonoid, saponin, tanin dan steroid, sehingga memungkinkan digunakan sebagai antimikroba. Studi pendahuluan yang telah dilaksanakan adalah uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kopasanda terhadap *V.harveyi* yang telah dilakukan menunjukkan bahwa daun kopasanda mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *in-vitro*. Penelitian mengenai produk alami dari tanaman antibakteri dapat dilihat pada Tabel 8.1.1

Dengan adanya senyawa bioaktif yang dikandung oleh tumbuhan ini yang terbukti memiliki daya hambat terhadap berbagai macam mikroorganisme patogen maka terbuka peluang pemanfaatan tumbuhan *C. odorata* L., untuk digunakan sebagai antimikroba dalam pengendalian mikroorganisme patogen penyebab penyakit dalam budidaya perairan.

Studi tentang penggunaan bioaktif senyawa sudah dilakukan terhadap beberapa tumbuhan seperti, penggunaan biji bengkoang, racun buah, umbi gladiol yang telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonassp.* and *Pseudomonassp.* terhadap ikan (Suryati dan Hala, 1993). Penggunaan bahan alam sebagai sumber bakterisida mempunyai beberapa keuntungan seperti aman terhadap lingkungan perairan karena mudah terurai sehingga tidak menimbulkan akumulasi yang bisa menyebabkan memburuk nya kualitas air.

Tabel 8.1.1

Hasil Penelitian Pemanfaatan Produk Alami dari Tanaman sebagai Anti Bakteri

No	Nama Peneliti	Bakteri Uji	Jenis Tanaman	Hasil Penelitian
1	Maryani <i>et al.</i> , 2002	<i>V.harveyi</i>	<i>Sonneratia caseolaria</i>	Ekstrak mangrove mampu menghambat dan mem bunuh <i>V. harveyi</i>
2	Prajitno 2006	<i>V.harveyi</i>	<i>Hamelida opuntia</i>	<i>H.opuntia</i> berfungsi sebagai antibakteri yang bersifat bakteriostatik dan bakterisidal terhadap <i>V. harveyi</i>
3	Zubia <i>et al.</i> , 2007	<i>S.aureus</i> <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i>	<i>S.mangrove</i> , <i>Turbinaria</i> sp.	Kedua jenis macro algae mampu menghambat bakteri <i>S.auratus</i> .
4	Salosso 2007	<i>V.harveyi</i>	<i>P.australis</i>	<i>P. australis</i> mampu menghambat bakteri uji dengan 10,5 mm.
5	Kusumawarda <i>et al.</i> , 2008	<i>A. hydrophila</i>	<i>Jahe merah</i>	Ekstrak jahe merah mampu menghambat bakteri <i>A. hydrozophila</i> dengan MIC 7,97 %.
6	Wefky S. dan Ghobrial 2008	<i>V.anguillarum</i> , <i>V.tandara</i> ,	Makroalga laut <i>L pinnatifida</i>	Menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap bakteri.
7	Vital <i>et al</i> 2009	<i>B.subtilis</i> , <i>stapilococcus</i> , <i>s</i> ,	<i>Chromolaena odorata</i>	<i>C.odorata</i> menunjukkan aktivitas anti bakterinya pada <i>B.subtilis</i> ,
8	Isnansetyo <i>et al.</i> , 2009	<i>V. harveyi</i>	<i>Geodia</i> sp.	<i>Geodia</i> sp mampu menghambat bakter <i>V. harveyi</i> MIC 31,25 μL^{-1}

9	Utami 2011	<i>A.hydrophil a</i>	<i>L. laefolia</i>	Ekstrak <i>L.laefolia</i> dalam pakan 4g/100 ml. meningkat kan kekebalan tubuh ikan lele dumbo
10	Salosso, 2012	<i>V.alginoliti cus</i>	<i>Padina australis</i>	<i>P. austrials</i> mampu menghambat <i>V. alginolitycus</i> dengan zona bening 0,95 cm MIC 25 %
11	Harlina	<i>Vibrio harveyi</i>		Ekstrak daun kopasanda mampu menghambat <i>V. harveyi</i> dengan zona bening 1,9 cm dengan MIC pada konsentrasi 0,625 ppm

8.2 Tanaman Kopasanda (*Chromolaena odorata* L) sebagai sumber zat Anti Bakteri Alami

Salah satu jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif adalah daun kopasanda (*Chromolaena odorata* L.). Tanaman kopasanda telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat tradisional di Indonesia untuk keperluan penyembuhan berbagai penyakit. Daun yang muda hancur dan cairan yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengobati luka kulit. Tumbuhan ini juga dapat dioleskan sebagai penangkal terhadap menyengat dari tulang ikan lele laut. Rebusan air dari akar tanaman ini digunakan sebagai antipiretik dan obat analgesik, serta ekstrak daun dengan garam digunakan sebagai obat kumur kumur. Daun dan bunga digunakan untuk merawat luka serta sebagai racun serangga. Dari segi pengobatan

tradisional tanaman kopasanda dapat dijadikan obat penahan darah. Daunnya dihancurkan bersama sedikit kapur makan dan ditempel di tempat luka (Anonim, 2012).

Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun kopasanda dilaporkan mengandung tanin, steroid, terpenoid, flavonoid, glikosida dan alkaloid (Akinmoladun *et al.*, 2007). Hasil skrining fitokimia dari ekstrak metanol daun kopasanda juga menunjukkan kehadiran senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin (Harlina *et al.*, 2013).

Senyawa flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri seperti flavonoid dari ekstrak *Capsella* sp. dan *Chromolaena* sp. (El Abyad *et al.*, 1990), *Prunus spinosa* (Sakar *et al.*, 1992), *Hypericum* sp. (Dall' *et al.*, 2003), (Cushnie and Lamb, 2005). Dastidar *et al.*, (2004) meneliti potensi senyawa iso flavonoid sebagai antibakteri terhadap *S. typhimurium*, dan Gattuso *et al.*, (2007) meneliti senyawa flavonoid pada *Citrus juice*. Lebih lanjut Savarana kumar *et al.*, (2009) melaporkan bahwa ekstrak metanol bunga *Thespesia populnea* L. mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri.

Kandungan senyawa bioaktif daun kopasanda, diyakini dapat dijadikan sebagai sumber antibakteri dalam pengendalian *Vibriosis*, khususnya dalam budidaya perairan. Keberadaan kandungan flavonoid dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988).

8.3 Aspek Biologi dan Ekologi Tanaman Kopasanda (*C. odorata*)

Tanaman kopasanda *C. odorata* (L.) R.M. King and H. Robinson (syn. *Eupatorium odoratum*) dalam bahasa Inggris disebut *siam weed* *C. odorata* adalah spesies semak berbunga dalam family Asteraceae. Nama

umum meliputi Gulma Siam, Natal Bush, dan FlowerFloss. Di Malaysia, *C. odorata* dikenal sebagai "Pokok Kapal Terbang", atau "Rumput Siam", Beberapa daerah di Indonesia menyebut tanaman ini dengan nama tekelan atau ki Rinyuh.(Sunda), dan di Makassar Sulawesi Selatan dikenal dengan nama Kopasanda. Morfologi tumbuhan kopasanda disajikan pada Gambar 8.3.1.



Gambar 8.3.1.
Tanaman Kopasanda (*Chromolaena odorata* L)

Tanaman kopasanda (*C. odorata* L.) bersinonim dengan *Eupatorium odoratum* L. dan *E. Conyzoides* Vahl. *Chromolaena*. Klasifikasi tanaman ini selengkapnya disajikan sebagai berikut :

Super divisio	: Spermatophyta
Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Asteridae

Ordo	: Asterale
Famili	: Asteraceae
Genus	: <i>Chromolaena</i>
Species	: <i>Chromolaena odorata</i> L.

Daunnya berbentuk oval, bagian bawah lebih lebar, makin ke ujung makin runcing. Panjang daun 6-10 cm dan lebarnya 3-6 cm. Tepi daun bergerigi, menghadap ke pangkal. Letak daun juga berhadap-hadapan. Karangan bunga terletak di ujung cabang (terminal). Setiap karangan bunga terdiri atas 20-35 bunga, warna bunga pada saat muda kebiru-biruan, semakin tua menjadi coklat.

Perkembangbiakan tanaman ini sangat mudah dan cepat, baik secara generatif maupun vegetatif. Secara generatif, biji gulma yang halus, ringan dan berjumlah banyak dapat disebarkan oleh angin, air, hewan maupun manusia. Perkembangbiakan secara vegetatif terjadi karena bagian batang yang ada di dalam tanah akan membentuk tunas-tunas baru dan muncul ke permukaan tanah menjadi perdu (Barus, 2007). Morfologi daun dan bunga daun kopasanda disajikan pada Gambar 8.3.2.

Menurut Vanderwoude *et al.* (2005), *C. odorata* berasal dari Amerika Tengah dan Selatan, Tanaman iniasli Amerika Utara, dari Floridadan Texaske Meksikodan Karibia, dan telahdiperkenalkanke Asiatropis,Afrika Barat, danbagian Australia. dan kini telah tersebar di daerah-daerah tropis dan subtropics termasuk Indonesia. Tanaman kopasanda tidak hanya ditemukan di Pulau Jawa, tetapi juga ditemukan di seluruh Indonesia seperti di Sumatera, Sulawesi dan Irian (Sipayung *et al.*, 1991), di Kalimantan (De

Chenon *et al.*, 2003), di Lombok, Sumbawa, Flores, Timor (Wilson dan Widayanto, 2004).



Gambar 8.3.2.
Bagian daun dan Bunga *C.odorata L.*
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Pengkajian terhadap pemanfaatan bahan alami dalam usaha pengendalian Vibriosis beberapa tahun terakhir ini semakin diminati dan telah banyak dilakukan. Hal ini disebabkan karena adanya kesadaran tentang efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan bahan kimia dan antibiotik pada pengendalian penyakit vibriosis pada udang windu.

Penggunaan antibiotik menyebabkan perkembangan resistensi pada species *Vibrio* termasuk *V. harveyi*. Selain itu antibiotik ini dapat terakumulasi dalam air dan menurunkan kualitas lingkungan air, sehingga penanggulangan ini telah menjadi kurang efektif. Selain itu penggunaan antibiotik yang tidak bijaksana telah meningkatkan kekhawatiran terhadap keamanan pangan dan kesehatan masyarakat. Sebagaimana Defoirdt *et. al.*, (2007) mengemukakan bahwa penggunaan antibiotik untuk mengendalikan

infeksi vibrio telah menghasilkan strain resisten dan residu antibiotik dalam produk perikanan merupakan ancaman bagi kesehatan masyarakat.

Sejak penggunaan bahan kimia dan antibiotik ini memberi efek samping, maka pencarian alternatif lain dalam pengendalian penyakit berkembang pesat. Salah satu upaya pengendalian penyakit bacterial yang cukup aman adalah menggunakan antibiotik alami. Antibiotik alami merupakan bahan antibiotik yang berasal dari produk alami, seperti tanaman, umbi-umbian hewan, mikroorganisme baik darat maupun laut.

Tanaman kopasanda telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat tradisional di Indonesia untuk keperluan penyembuhan berbagai penyakit. Daun yang muda hancur, dan cairan yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengobati luka kulit. Tumbuhan ini juga dapat dioleskan sebagai penangkal terhadap menyengat dari tulang ikan lele laut. Rebusan air dari akar tanaman ini digunakan sebagai antipiretik dan obat analgesik, dan ekstrak daun dengan garam digunakan sebagai obat kumur-kumur. Daun dan bunga digunakan untuk merawat luka dan sebagai racun serangga. Dari segi pengobatan tradisional tanaman kopasanda dapat dijadikan obat penahan darah. Daunnya dihancurkan bersama sedikit kapur makan dan ditempel di tempat luka (Anonim, 2012).

Beberapa penelitian farmakologis yang telah dilakukan untuk mengetahui manfaat tanaman ini. Dilaporkan bahwa tanaman ini digunakan sebagai antibakteri, antiparasit, antiprotozoal, antijamur, antihipertensi, antiinflamasi, (Phan *et al*, 2001, Akinmoladun *et al*, 2007.). Selanjutnya Fitriyani *et al*, (2004), telah meneliti fitokimia daun kirinyuh (*Eupatorium pallescens* sinonim *Chromolaena odorata*). Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tanin, dan steroid pada

ekstrak daun kirinyuh. Dari fraksi etil asetat diisolasi satu senyawa flavonoid yang berdasarkan data kromatografi lapis tipis dan spektrum ultraviolet diduga sebagai senyawa flavonol yang memiliki gugus 3-hidroksil tersubstitusi, gugus 4'-hidroksil pada cincin B, dan gugus 7-hidroksil pada cincin S. dari daun kirinyuh telah diperoleh isolat dengan hasil 0,03%.

Lebih jauh Akinmoladun *et al* (2007) telah mencoba mengekstrak daun *C. odorata* untuk mengetahui dan evaluasi potensi senyawa fitokimia *C. odorata* dengan menggunakan dua jenis pelarut yaitu methanol dan pelarut air menunjukkan hasil bahwa Ekstrak air dan metanol *C. odorata* positif mengandung tanin, steroid, terpenoid, flavonoid dan glikosida baik dalam ekstrak metanol maupun dalam ekstrak air. Sedangkan alkaloid terdeteksi hanya dalam ekstrak metanol.

Selanjutnya Vital *et al.*, (2009) juga melakukan skrining fitokimia daun *C.odorata* L.dengan menggunakan pelarut etanol dan etil asetat hasil penelitian yang diperoleh mengungkapkan bahwa ekstrak *C. odorata* L. mengandung komponen senyawa kimia yaitu flavonoid, saponin, tanin dan steroid, sehingga memungkinkan digunakan sebagai antimikroba. Studi pendahuluan yang telah dilaksanakan adalah uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kopasanda terhadap *V.harveyi* yang telah dilakukan menunjukkan bahwa daun kopasanda mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*,

Dengan adanya senyawa bioaktif yang dikandung oleh tumbuhan ini yang terbukti memiliki daya hambat terhadap berbagai macam mikroorganisme patogen maka terbuka peluang pemanfaatan tumbuhan

C.odorata L., untuk digunakan sebagai antimikroba dalam pengendalian mikroorganisme patogen penyebab penyakit dalam budidaya perairan.

8.4 Ekstrak Daun Kopasanda (*C.odorata* L) sebagai Antibakteri

Antibakteri adalah substansi yang mampu menghambat/membunuh bakteri. Antimikrobal terdiri dari dua jenis yaitu; fungisida dan bakterisida. Fungisida dan bakterisida dari alam yang dikenal dengan fungisida dan bakterisida alami adalah bahan aktif fungisida dan bakterisida yang diambil atau dikembangkan dari alam, dan bukan merupakan hasil sintesa di laboratorium (Djojosumarto, 2012). Berdasarkan aktivitasnya zat antibakteri dibedakan menjadi dua jenis, yaitu bakteriostatik dan bakteriosida. Bakteriostatik adalah zat antibakteri yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri (menghambat perbanyakan populasi bakteri), namun tidak mematikan. Sedangkan bakterisida adalah zat antibakteri yang memiliki aktifitas membunuh bakteri. Namun ada beberapa zat antibakteri yang bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisida pada konsentrasi tinggi.

Berbagai macam antibakteri yang dipergunakan akhir-akhir ini sebagai bakterisida pada industri budidaya, khususnya budidaya udang windu. Antibiotika adalah senyawa kimia khas yang dihasilkan atau diturunkan oleh organisme hidup termasuk struktur analognya yang dibuat secara sintetik, yang dalam kadar rendah mampu menghambat proses penting dalam kehidupan satu spesies atau lebih mikroorganisme. Jenis antibiotik yang umum digunakan untuk penanggulangan penyakit udang windu seperti kloramfenikol, oksitetrasiklin, prefuran, dan sebagainya (Brown, 1989). Namun penggunaan antibiotik sebagai zat antibakteri

mempunyai efek negatif seperti timbulnya resistensi bakteri terhadap aktivitas kerja obat. Penggunaan bahan alam juga sudah mulai digunakan, namun masih terbatas pada penggunaan saponin, rotenon dan nistatin. Studi tentang penggunaan bioaktif senyawa sudah dilakukan terhadap beberapa tumbuhan seperti, penggunaan biji bengkoang, racun buah, umbi gladiol yang telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonassp* and *Pseudomonas sp* terhadap ikan (Suryati, 1993 dan Suryati dan Hala, 1993). Penggunaan bahan alam sebagai sumber bakterisida mempunyai beberapa keuntungan seperti aman terhadap lingkungan perairan karena mudah terurai sehingga tidak menimbulkan akumulasi yang bisa menyebabkan memburuk nya kualitas air.

8.5 Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu tanaman, yang biasa dijumpai pada bagian daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga dan biji. Flavonoid terlibat dalam fotosintesis sel tanaman karena itu senyawa flavonoid ditemukan mendominasi di kerajaan tumbuhan (Havsteen, 1983), yang ditemukan pada buah, sayuran, kacang-kacangan, biji, batang dan bunga serta teh, anggur, propolis dan madu (Grange dan Davey 1990), Menurut Cowan (1999) Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah ungu, dan biru dan sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan.

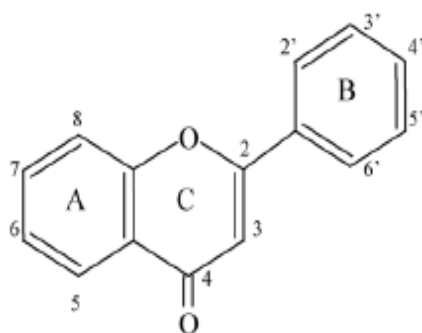
Fungsi flavonoid dalam bunga adalah untuk memberikan warna menarik bagi penyerbuk tanaman (Harbone dan Williams, 1992). Sedangkan

pada daun, senyawa ini berfungsi secara fisiologis mempertahankan kelangsungan hidup tanaman, melindungi tanaman dari serangan patogen, misalnya jamur dan radiasi UV-B (Harborne, 2000). Selain itu, flavonoid terlibat dalam transfer energi, berfungsi sebagai hormon pertumbuhan tanaman dan pengatur pertumbuhan, kontrol respirasi dan fotosintesis, morfogenesis dan penentuan seks (Harborne dan Baxter, 1999). Lebih lanjut ditambahkan oleh Cowan (1999) bahwa sintesa berbagai jenis senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) melalui metabolit sekunder ditujukan sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap serangan mikroba, insekta, herbivor.

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988).

Secara kimia, senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung cincin aromatik tersusun dari 15 atom dengan inti dasar tersusun dalam konjugasi C6-C3-C6 (dua inti aromatik terhubung dengan 3 atom karbon) Sriningsih *et al.*, (2012). tiap bagian C6 merupakan cincin benzena yang terdistribusi dan dihubungkan oleh atom C3 yang merupakan rantai alifatik. Golongan flavonoid memiliki kerangka karbon yang terdiri atas dua cincin benzene tersubstitusi yang disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon Brown (1980) mengemukakan bahwa struktur dasar senyawa flavonoid adalah 2-fenil-benzo [α] pyrane atau inti flavane, yang terdiri dari dua cincin benzena (A dan B) yang terhubung melalui sebuah heterosiklik cincin pyrane (C). Untuk lebih jelasnya struktur dasar dari flavonoid disajikan pada Gambar 8.5.1.

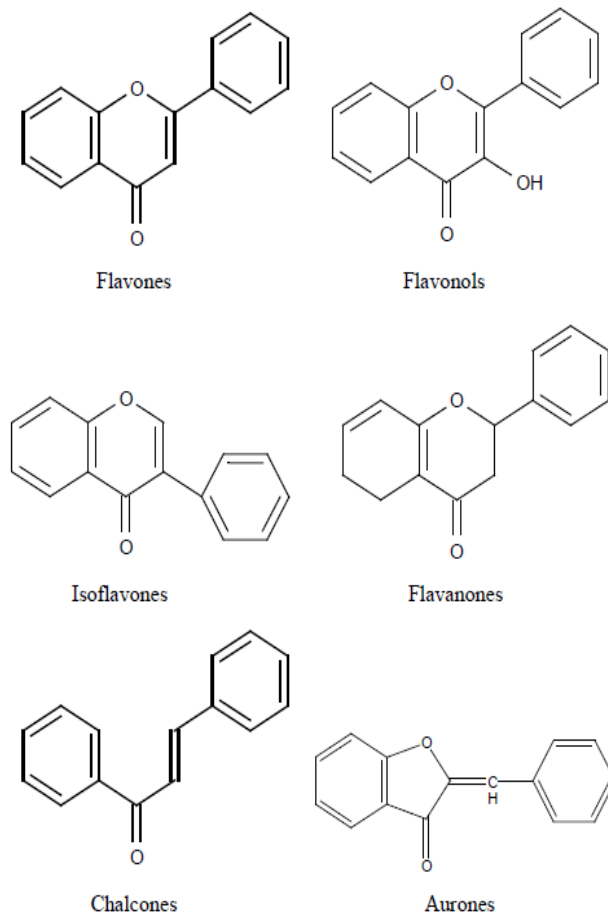
Dalam tumbuhan flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida (Harbone, 1987). Aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur (Markham, 1988). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzena) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kelas-kelas yang berlainan dalam golongan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).



Gambar 8.5.1
Struktur dasar Flavonoid dengan Nama dan
Nomor Posisi Cincin (Sumber: Harborne *et al.*, 1999)

Pengelompokan flavonoid berdasarkan pada cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson 1995). Golongan terbesar flavonoid memiliki cincin piran yang menghubungkan rantai tiga -karbon dengan salah satu cincin benzena. Penggolongan flavonoid berdasarkan penambahan rantai

oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil seperti ditunjukkan pada Gambar 8.5.2



Gambar 8.5.2.
Jenis-Jenis Flavonoid (Sumber: Harborne *et al.*, 1999)

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid

bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1995).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam (Harbone, 1987). Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil sulfoksida, dimetil formamida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavan, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988). Analisis flavonoid lebih baik dengan memeriksa aglikon yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis sebelum memperhatikan kerumitan glikosida yang ada dalam ekstrak asal (Harbone, 1987).

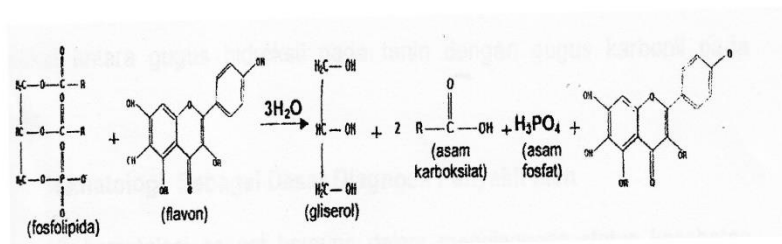
8.6 Mekanisme Aktivitas Antibakteri Flavonoid

Mekanisme kerja antibakteri flavonoid menurut Volk dan wheeler (1993), adalah Flavonoid merupakan salah satu antibakteri yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Adanya senyawa ini menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma. Pada konsentrasi rendah dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan

bocornya metabolit penting yang menginaktifkan system enzim bakteri, sedangkan pada konsentrasi tinggi mampu merusak membran sel sitoplasma dan mengendapkan protein sel. Senyawa ini dapat berinteraksi dengan komponen dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan dapat pula berdifusi ke dalam sel sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati, selain itu senyawa ini juga dapat menembus membran dan terinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi (Pelczar dan Chan, 2005).

Flavonoid bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Adanya ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid pada dinding sel bakteri akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Dalam keadaan demikian, fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan mengalami kematian. Untuk lebih jelasnya reaksi penguraian pada membran sitoplasma bakteri dapat dilihat pada Gambar 8.6.1.

Protein dan fosfolipid merupakan senyawa penting yang menyusun membran sel bakteri, yang mana protein disini berfungsi sebagai pengatur keluar masuknya material dari dan ke dalam sel. Antimikroba Flavonoid sifat daya hambat terhadap bakteri disebabkan adanya gugus hidroksil yang dimiliki senyawa flavonoid yang dapat berinteraksi dengan gugus karbonil pada protein membran sel bakteri melalui ikatan hydrogen sehingga protein kehilangan fungsinya



Gambar 8.6.1
Reaksi Penguraian pada Membran Sitoplasma
Bakteri oleh Flavonoid (Gilman *et al.*, 1991)

Selain itu flavonoid juga memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat pada mikroba. Sebagaimana Mori *et al.*, (1987) melaporkan dalam suatu hasil penelitian yang menggunakan precursor radioaktif yang menunjukkan bahwa flavonoid menghambat sintesis DNA pada *Proteus vulgaris*, dan juga mempengaruhi sintesis RNA pada *S. aureus*. Flavonoid yang menunjukkan aktivitasnya adalah robinetin, myricetin dan epigallocatechin. Penulis menduga bahwa cincin B dari flavonoid yang memainkan peran dalam ikatan interkalasi atau hidrogen pada susunan asam nukleat sehingga dapat menghambat aktivitas sintesis DNA dan RNA.

8.7 Uji Aktivitas Antimikroba terhadap Bakteri patogen

Kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat diketahui dengan melakukan uji Aktivitas Anti-mikroba in vitro. Uji untuk aktivitas antimikroba menggunakan metode Kibry-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Penentuan kepekaan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu atau dua dari metode pokok yakni metode difusi dan metode dilusi. Hal ini

penting untuk menggunakan metode standar untuk mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba (Jawatz *et al*, 2005).

a. Metode Difusi

Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bahan antimikroba bersifat menghambat apabila digunakan dalam konsentrasi kecil, namun bila digunakan dalam konsentrasi tinggi dapat mematikan mikroorganisme. Salah satu cara untuk menguji bahan antimikroba dapat dilakukan dengan uji cakram. Uji cakram diperkenalkan oleh Willian Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Konsentrasi obat yang digunakan sangat menentukan diameter zona hambatan suatu anti mikroba. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

Metode difusi agar merupakan metode yang paling sering digunakan. Kertas cakram saring diisi dengan sejumlah antimikroba tertentu ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram yang dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji. Beberapa faktor fisik dan kimia selain faktor antara

obat dan organisme yang berpengaruh pada metode ini juga sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekuler, juga stabilitas antimikroba. Meskipun demikian standarisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Jawetz *et al*, 2005).

Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bahan antimikroba bersifat menghambat apabila digunakan dalam konsentrasi kecil, namun bila digunakan dalam konsentrasi tinggi dapat mematikan mikroorganisme. Salah satu cara untuk menguji bahan antimikroba dapat dilakukan dengan uji cakram. Uji cakram dengan metode Kibry- Baur . Kertas cakram dengan yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempangan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Pelczar dan Chan, 2005). Jika zona hambat yang terbentuk jernih atau keruh. Jika zona hambat yang terbentuk jernih maka zat tersebut bersifat bakterisidal dan jika zona hambat yang terbentuk keruh maka zat tersebut bersifat bakteriostatik. Bakterisidal terbentuk karena zat uji mampu membunuh bakteri secara langsung sedangkan bakteriostatik karena zat uji memiliki kemampuan untuk mencegah pembelahan sel. Hasil uji metode difusi dapat diinterpretasikan berdasarkan pada perbandingan terhadap metode dilusi. Beberapa data perbandingan bias digunakan sebagai standar referensi. Grafik regresi linier dapat menunjukkan hubungan antara log KHM (kadar hambat minimum) pada cara dilusi dan diameter zona hambatan pada cara difusi cakram (Jawatz, 2005).

b. Metode Dilusi

Metode dilusi yang dapat digunakan dalam pengujian antimikroba dengan menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, kemudian media diinokulasi bakteri dan dieramkan. Tahap akhir antimikroba dilarutkan dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai, namun kini ada cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yakni menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini member hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al*, 2005)

8.8 Uji MIC (Minimal Inhibitory Concentration) Dan MBC (Minimal Bacterial Concentration)

Ada dua metode dasar yang dapat digunakan dalam penentuan potensi suatu zat antibakteri yaitu metode difusi dan metode dilusi (Pelczar dan Chan, 1988). Metode dilusi merupakan metode standar yang digunakan untuk mengetahui tingkat resistensi dari antibiotik. Serial pengenceran dari antibiotik dibuat dalam media cair yang diinokulasi dengan sejumlah organisme standar dan diinkubasi dalam waktu tertentu. Konsentrasi dan sifat zat uji merupakan faktor penentu dari tingkat kekeruhan yang terbentuk pada reaksi pengujian. Konsentrasi yang paling kecil (pengenceran tertinggi) dari antibiotik yang menghambat timbulnya kekeruhan dianggap sebagai nilai MIC (*minimal Inhibitory Concentration*) dan zat tersebut dikatakan bersifat bakteriostatik.

Menurut Benson (1990), metode dilusi ini dilakukan pada tabung reaksi dengan menggunakan konsentrasi mulai dari 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, hingga 100 ppm, dengan 3 kali ulangan, pada media TSB atau NB yang telah diinokulasi bakteri dengan dosis tertentu. Pengujian ini harus dilakukan di laboratorium, karena serial pengenceran antibiotiknya harus dibuat dan hanya satu isolat bakteri yang bisa diujikan pada setiap seri pengenceran.

Salah satu bahan alami yang efektif dalam penanggulangan penyakit bakterial adalah daun kopasanda (Harlina, 2013). Untuk mengetahui aktifitas antibakteri senyawa bioaktif aktif daun kopasanda dilakukan uji antibakteri pada berbagai konsentrasi secara *in vitro* dengan menggunakan metode Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dasar percobaan ini adalah dengan membiarkan ekstrak berdifusi ke dalam biakan padat (Nwinyi Obinna *et al.*, 2008; Isnansetyo *et al.*, 2009; Sukarni, 2011). Kadar ekstrak tertinggi tercapai pada daerah di dekat pemberian ekstrak dan makin jauh makin berkurang. Prinsip uji ini menggunakan kertas cakram (paper disk) diameter 6 mm dengan cara: (1) kertas cakram diletakkan diatas Mueller Hinton Agar yang telah diinokulasi dengan 100 μL *V. harveyi*, dengan kepadatan 10^7 sel/mL. Dua puluh μL dari masing-masing konsentrasi (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 mg/mL dan K- (tanpa ekstrak daun kopasanda), dipipet ke paper disk, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . (2) setelah 24 jam, zona hambatan yang diindikasikan oleh zona bening di sekitar paper disk diukur dengan menggunakan mistar

geser. (3) Inkubasi dilakukan sampai dengan 48 jam untuk mengetahui sifat ekstrak daun kopasanda.

Jika daerah hambatan tetap bening selama 24 jam dan bakteri tumbuh disekitar daerah hambatan setelah 48 jam maka antibiotika tersebut bersifat bakteristatik, dan jika bakteri tidak tumbuh di daerah hambatan setelah 48 jam maka antibakteri tersebut bersifat bakterisida. Konsentrasi minimum hasil pengujian MIC adalah konsentrasi yang akan dijadikan dasar sebagai konsentrasi terendah pada uji MBC

Pada uji MBC merupakan uji lanjutan dari uji MIC untuk mengetahui kematian bakteri dalam uji *in vitro*. Tahapan pengujian ini adalah sebagai berikut:

- Menentukan nilai MBC dengan konsentrasi 0 MIC (kontrol), 0.5 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC, 8 MIC, dan 16 MIC
- Diinokulasi 1,0 ml dan disebar pada media agar TCBSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam.

Uji MIC pada bahan aktif daun kopasanda telah dilakukan oleh Harlina (2015), Hasil uji MIC disajikan pada Tabel 8.2. Berdasarkan hasil Uji MIC pada Tabel 8.8.1 terlihat bahwa konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi 0,625 mg/mL. Pada konsentrasi 5,000 mg/mL sampai 0,625 mg/mL tidak terjadi pertumbuhan bakteri di sekitar kertas cakram sedangkan pada konsentrasi 0,313 mg/mL ke bawah masih terjadi pertumbuhan bakteri.

Tabel 8.8.1
Hasil Uji MIC Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

Konsentrasi (mg/mL)	Pertumbuhan Bakteri 24 jam	Keterangan
5,000	-	
2,500	-	(+) Tidak ada pertumbuhan Bakteri <i>V. harveyi</i>
1,250	-	
0,625	-	
0,313	+	
0,165	+	(-) Ada Pertumbuhan Bakteri <i>V. harveyi</i>
NB + Bakteri	+	

Penghambatan aktivitas mikroba oleh komponen bioaktif tanaman dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: (1) gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, (2) peningkatan permeabilitas membran sel yang menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, (3) menginaktivasi enzim metabolik, dan (4) destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Terjadinya proses tersebut diatas karena pelekatan senyawa antimikroba pada permukaan sel mikroba atau senyawa tersebut berdifusi ke dalam sel (Pelczar dan Chan, 2005).

Kerusakan bakteri merupakan hasil interaksi senyawa antibakteri dengan bagian tertentu pada sel bakteri (Angka, 2005). Interaksi senyawa antibakteri tersebut dapat menyebabkan sejumlah perubahan atau kerusakan pada sel bakteri yang berpengaruh pada pola inaktivasi bakteri.

Pada dosis yang tidak mematikan, bakteri akan mengalami luka (*injury*), terjadi sejumlah perubahan dan kerusakan struktur sel bakteri yang akhirnya dapat mempengaruhi fungsi metabolisme sel, pada kerusakan yang parah akan menyebabkan kematian. Bentuk dan besarnya perubahan atau kerusakan struktur sel dipengaruhi oleh jenis senyawa antibakteri, jenis bakteri dan besarnya konsentrasi yang digunakan. Perubahan dan kerusakan struktur sel oleh senyawa antibakteri dapat berupa perubahan morfologi sel, perubahan ultrastruktur sel, ukuran sel, kebocoran dinding dan membran sel, ketebalan dinding dan penampakan sitoplasma (Carraschi *et al.*, 2012). Adanya zona hambatan yang dihasilkan menunjukkan adanya kemampuan senyawa bioaktif daun kopasanda melawan *V. harveyi*. Menurut Pelczar dan Chan, (2005), mekanisme kematian mikroorganisme akibat suatu senyawa kimia disebabkan oleh beberapa hal yaitu kerusakan dinding sel, kebocoran membran sitoplasma, penghambatan sintesa protein, penghambatan terhadap pembentukan dan pertumbuhan sel.

Rendahnya nilai minimum inhibitory concentration (MIC) dari Senyawa Bioaktif daun kopasanda mengindikasikan bahwa ekstrak tersebut memiliki kemampuan yang kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Seperti dilaporkan oleh Aligiannis *et al.*, (2001), ekstrak aktif dengan nilai MIC kurang dari 1,6 mg/mL adalah dipertimbangkan untuk menjadi ekstrak aktif secara kuat, kemudian ekstrak-ekstrak tersebut mempunyai potensi sebagai agen antibakteri di dalam perlakuan penanggulangan vibriosis. Oleh karena itu tanaman kopasanda adalah kandidat yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai sumber senyawa

aktif yang bersifat alami untuk penanggulangan vibriosis pada udang windu.

Uji MBC adalah uji lanjutan dari uji MIC, hal ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal ekstrak daun kopasanda yang mampu mematikan *V. harveyi* dalam uji *in vitro*. Konsentrasi yang dicobakan adalah 0,5 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 4 MC, 8 MIC, 16 MIC dengan 2 kali ulangan pengamatan dilakukan hingga 48 jam. . Hasil uji MBC disajikan pada Tabel 8.8.2.

Tabel 8.8.2.
Nilai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda (*C. odorata* L)

Perlakuan	Konsentrasi Senyawa Bioaktif (mg/mL)	Pertumbuhan Bakteri <i>V. harvery</i> 48 jam	Ket.
8 MIC	5,000	-	
4 MIC	2,500	-	
2 MIC	1,250	-	
1 MIC	0,625	+	
0,5 MIC	0,313	+	
Kontrol	0	+	

Keterangan : + = *V.harveyi* tumbuh
- = *V.harveyi* tidak tumbuh

Untuk mengetahui populasi bakteri pada Uji MBC senyawa bioaktif daun kopasanda (*C.odorata*) terhadap *V. harveyi* maka pada masing-masing tabung yang sudah diinkubasi 24 jam, ditanam lagi di media padat TCBSA sebanyak 20 ul, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Apabila tidak ada pertumbuhan koloni bakteri berarti bersifat baktericidal. Konsentrasi terendah yang tidak terjadi pertumbuhan bakteri dicatat sebagai MBC Hasil pengamatan jumlah populasi *V.harveyi* disajikan pada Tabel 8.8.3.

Tabel 8.8.3.
Populasi *V. harveyi* pada Media TCBSA pada Uji MBC

Perlakuan	Konsentrasi (mg/ mL)	Populasi <i>V. harveyi</i> (CFU/mL)
A (8 MIC)	5,000	-
B (4 MIC)	2,500	-
C (2 MIC)	1,250	-
D (1 MIC)	0,625	$1,7 \times 10^3$
E (0,5 MIC)	0,313	$2,8 \times 10^5$
K	0,000	TT

Keterangan: - : Tidak ada *V. harveyi* yang tumbuh

Pada Tabel 8.8.3 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,625 (1 MIC) nampak adanya pertumbuhan *V. harveyi* meskipun dengan populasi yang sangat rendah. Sedangkan pada konsentrasi 1,25 mg/mL (2 MIC) sudah dapat mematikan bakteri dengan baik, ini terindikasi dengan tidak adanya

sama sekali pertumbuhan bakteri pada media agar. Hal ini menunjukkan bahwa nilai MBC dari ekstrak daun kopasanda pada konsentrasi 1,25 mg/mL, konsentrasi ini menunjukkan sifat bakterisidal.

Menurut Brock dan Madigan, (1994), Mekanisme kerja bakterisidal adalah mencegah pertumbuhan sel dan menyebabkan kematian sel bakteri. Flavonoid sebagai bakterisidal bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Adanya ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid pada dinding sel bakteri akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Dalam keadaan demikian, fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan mengalami kematian (Volk and Wheller, 1984).

BAB IX

EKSTRAKSI DAN IDENTIFIKASI KOMPONEN SENYAWA BIOAKTIF

9.1. Pengertian dan Tujuan Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan komponen atau zat aktif suatu simplia dengan menggunakan pelarut tertentu (Harborne, 1987). Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut terdapat dalam sel, namun sel tanaman dan sel hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Tobo, 2001).

Proses ekstraksi adalah proses pengeluaran sesuatu zat dari campuran zat, dengan jalan menambahkan bahan ekstraksi tepat pada waktunya. Hanya zat yang diekstrak yang dapat larut dalam bahan ekstraksi. Pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian - bagian campuran dari suatu campuran zat pada bahan pelarut. Dalam proses

ekstraksi terjadi peralihan dari fase yang satu ke fase yang lain, yang diperoleh dengan jalan penambahan bahan pelarut yang disebut *solvent* (Rahayu, 2009).

Ekstraksi juga diartikan sebagai proses pemisahan zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Berdasarkan bentuk campuran yang diekstrak, ekstraksi dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi padat-cair; campuran yang diekstrak berbentuk padat, dan ekstraksi cair-cair; cairan yang diekstrak berbentuk cair. Ekstraksi bentuk padat-cair paling sering digunakan untuk mengisolasi zat yang terkandung dalam bahan alami. Sifat-sifat seperti kepolaran, kelarutan bahan alami yang diisolasi berperan penting terhadap sempurnanya proses ekstraksi. Disamping pemilihan pelarut dan pengaturan suhu (Vogel, 1987).

Ragam ekstraksi yang tepat tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organik. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar, dan senyawa non polar dalam pelarut non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan), lalu pelarut dengan kepolarannya menengah (diklor metan atau etilasetat) kemudian pelarut bersifat polar (metanol atau etanol (Harborne, 1987)

Proses ekstraksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi, melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau merusakkan dengan operasi penghalusan, langsung kontak dengan bahan pelarut.

Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci, sedangkan yang dimaksud dengan fase ekstraksi, peristiwanya lebih kompleks, yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya. Zat tersebut pindah sejauh mereka terlarut molekuler, mengikuti difusi melalui ruang antarmiselar (Voigt.1995),.

Faktor-faktor yang berpengaruh dalam ekstraksi antara lain ukuran bahan, waktu kontak antara bahan dengan pelarut dan suhu ekstraksi, ditambahkan Voight (1995), faktor lain yang menentukan hasil ekstraksi adalah perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi) dan jangka waktu dimana sampel kontak dengan cairan pengestraksi (waktu ekstraksi). Ukuran bahan yang akan diekstraksi sebaiknya memiliki luas permukaan yang kecil untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung baik, sedangkan suhu ekstraksi merupakan faktor lain yang dapat mempengaruhinya karena kecepatan reaksi kimia tergantung dari jenis zat pereaksi, suhu ekstraksi dan konsentrasi zat pereaksi. Karena hal ini menyangkut proses bercampurnya antara zat terlarut dengan pelarut (Harborne, 1987); dan lama ekstraksi mengindikasikan bahwa, semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan untuk bersentuhan makin besar sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan (Suryandari, 1981). Waktu ekstraksi yang relatif lama, ditujukan untuk mendapatkan rendemen dan total pigmen yang tinggi, jika dilakukan dengan ekstraksi yang tidak mengalami pengadukan.

Faktor lain yang mempengaruhi hasil ekstraksi yaitu perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi). Jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal Susanto (1999). Ditambahkan Komara (1991), banyaknya pelarut yang akan digunakan mempengaruhi konsentrasi jenuh larutan selama ekstraksi, makin banyak pelarut yang digunakan makin banyak solut yang terekstrak.

Komponen kimia yang terdapat pada tanaman, hewan, dan beberapa jenis ikan pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik.. Hasil ekstrak yang telah diuapkan semua pelarutnya dan berbentuk kental disebut ekstrak. Jadi Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi standar baku yang ditetapkan.

Berdasarkan proses ekstraksi maka ekstraksi dibedakan atas dua yaitu: 1) ekstraksi dingin, umumnya dilakukan untuk menarik komponen zat aktif dari bahan yang akan disari yang tidak tahan akan pemanasan, misalnya glikosida dan flavonoid tertentu. Selain itu konsistensi bahan yang akan diekstraksi tidak memungkinkan digunakan cara panas, misalnya daun dan bunga. Metode yang dilakukan dengan ekstraksi dingin adalah maserasi dan perkolasi. Ekstraksi panas, proses ekstraksi secara panas meliputi refluks, dan destilasi. Infundasi (Infus dan dekokta) tergolong dalam proses ekstraksi dengan pemanasan, namun dalam proses produksi

skala besar cara ini banyak ditinggalkan karena tidak efektif, dan tidak tahan lama.

9.2. Mekanisme Ekstraksi

Pada dasarnya prinsip ekstraksi adalah dengan mekanisme difusi dan osmosis antara cairan penyari dan zat aktif (komponen kimia) yang terdapat yang terdapat dalam bahan yang diekstraksi. Bahan baku simplia kering terlebih dahulu diserbukkan dengan derajat halus tertentu, dan direndam atau dialiri cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang ada dalam dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang terpekat terdesak keluar (osmosis). Umumnya zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Dimana proses tersarinya zat aktif dalam sel tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel dan pelarut organik diluar sel. Maka larutan pekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam sel dan diluar sel (Tobo, *et al.* 2001). Pelarut organik yang paling umum digunakan untuk mengekstraksi adalah methanol, etanol, kloroform, heksan, eter, aseton, benzene dan etil asetat Lebih lanjut dijelaskan bahwa proses ekstraksi akan bertambah baik jika permukaan bahan bersentuhan langsung dengan pelarut semakin luas maka kecepatan difusi zat aktif melewati membran semakin besar maka semakin mudah zat aktif melewati membran sel.

9.2.1. Pelarut

Menurut Guenther (1987), Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan. Dalam pemilihan pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar. Sedangkan larutan adalah campuran homogen antara dua komponen zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan.

Proses melarutkan suatu zat ke dalam pelarut memperlihatkan adanya zat yang sangat mudah larut dalam pelarut tanpa dipaksakan. Hal ini disebabkan adanya sifat "*likedissolve like*". Adanya faktor kecocokan antara zat terlarut dan pelarut, yang menyebabkan keduanya dapat bercampur menjadi satu, misalnya pelarut dan zat terlarut sama-sama bersifat polar (Day and Underwood, 1999). Seperti juga yang dinyatakan oleh Vogel (1987), bahwa pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar.

. Dalam setiap larutan, pelarut memainkan peranan yang sangat penting. Molekul-molekul pelarut saling mempengaruhi dengan molekul-molekul bukan air. Saling pengaruh ini disebut pengaruh pelarutan atau *solvation effect*. Kadang-kadang pengaruh ini sangat lemah, tetapi dalam hal lain pelarutan dapat menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks yang terikat secara kimia (Day and Underwood, 1999).

9.2.2. Berbagai Metode Ekstraksi

Ekstraksi digolongkan kedalam dua bagian besar berdasarkan bentuk fase yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi dan ekstraksi sinambung (Harborne, 1987). Metode-metode ekstraksi dijelaskan sebagai berikut :

a. Maserasi

Metode ekstraksi umum digunakan dalam mengisolasi senyawa metabolit sekunder adalah maserasi (penggunaan pelarut organik). Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengestraksi. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolute. Semakin besar perbandingan cairan pengestraksi terhadap simplisia, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigt, 1995).

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan dalam temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan karena dengan perendaman sampel tanaman akan mengakibatkan pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

Pemilihan pelarut dalam proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dalam memperhatikan kelarutan senyawa bahan dalam pelarut tersebut. Secara umum, pelarut methanol merupakan pelarut

yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan golongan metabolit sekunder.

b. Perkolasi

Perkolasi dilakukan dalam wadah berbentuk silindris atau kerucut (perkolator), yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Bahan pengestraksi yang dialirkan secara terus-menerus dari atas, akan mengalir turun secara lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar. Melalui penyegaran bahan pelarut secara terus-menerus, akan terjadi proses maserasi bertahap banyak. Jika pada maserasi sederhana, tidak terjadi ekstraksi yang sempurna dari simplisia karena akan terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan disekelilingnya, maka pada perkolasi melalui suplai bahan pelarut segar, perbedaan konsentrasi tadi selalu dipertahankan. Dengan demikian ekstraksi total secara teoritis dimungkinkan (praktis jumlah bahan yang dapat diekstraksi mencapai 95%) (Voigt, 1995).

c. Eksrtaksi sinambung (Soxhletasi)

ekstraksi sinambung dilakukan dengan menggunakan sebuah alat yang disebut soxhlet. Pelarut penyari ditempatkan di dalam labu akan menguap bila dipanaskan, serbuk simplisia diisikan pada tabung dari kertas saring, atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas, baja tahan karat, atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap cairan penyari naik ke atas melalui pipa samping alat soxhlet, kemudian diembunkan kembali saat melewati kondensor. Pelarut yang telah berkondensasi tersebut akan jatuh pada bagian dalam alat soxhlet melalui tabung yang berisi serbuk simplisiayang dibungkus dengan kertas saring dan menyisiknya hingga mencapai bagian atas tabung sifon.. Cairan penyari

sambil turun melarutkan zat aktif serbuk simplisia. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, Seluruh bagian yang larut tersebut akan tertarik dan ditampung pada labu tempat pelarut awal. Proses ini berlangsung terus menerus sampai diperoleh hasil ekstraksi yang dikehendaki (Harborne, 1987)

Keuntungan ekstraksi sinambung ini adalah pelarut yang digunakan lebih sedikit dan pelarut murni sehingga dapat menyaring senyawa dalam simplia lebih banyak dalam waktu lebih singkat dibandingkan dengan maserose atau perkolasi. Kerugian cara ini adalah tidak dapat digunakan untuk senyawa-senyawa termolabil (Harborne, 1987).

Perkolasi merupakan proses melewati pelarut organik pada bahan sehingga pelarut akan membawa senyawa aktif secara bersamaan. Efektifitas proses ini, hasilnya akan lebih besar untuk senyawa aktif yang mudah larut terhadap pelarut yang digunakan. Perkolasi dilakukan dengan cara penyarian dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplia yang telah dibasahi, simplia tersebut ditempatkan dalam suatu bejana silinder (percolator) yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk simplia, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilaluinya sampai mencapai keadaan jenuh. Cara ini lebih baik dibandingkan dengan maserose karena dapat meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi melalui pergantian pelarut, daya kapiler dan daya friksi (geser) pada ruang antar serbuk simplia

9.3. Teknik Isolasi Bioaktif

Isolasi senyawa aktif dapat dilakukan dengan metode kromatografi. Kromatografi adalah cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada

dalam sediaan dengan jalan penyarian berfraksi, penyerapan atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk uji identifikasi atau penetapan kadar. Sementara menurut Gritter *et al* (1985), Kromatografi merupakan suatu cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara fase gerak dan fase diam. Pemisahan terjadi karena sampel tertahan oleh fase diam atau dibawa oleh fase gerak dan tergantung kepada afinitas senyawa terhadap kedua fase.

Keuntungan-keuntungan dari teknik kromatografi antara lain merupakan metode pemisahan yang cepat dan mudah, menggunakan peralatan yang murah dan sederhana (kecuali untuk kromatografi gas) hingga campuran yang kompleks dapat dipisahkan, hanya membutuhkan campuran cuplikan yang sngat sedikit dan pekerjaan dapat diulang (Sastroamidjojo, 1985)

Teknik kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi kertas, dan kromatografi gas (Ditjen POM, 2000).

9.3.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Fase diamnya berupa lapisan yang seragam (Uniform) pada bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastic (Ganjar, 2007)

Beberapa keuntungan kromatografi lapis tipis adalah:

1. Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis

2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet
3. Dapat dilakukan elusi secara menaik (ascending), menurun (descending) atau dengan cara elusi 2 dimensi.
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (ascending), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (descending) (Gandjar, 2007)

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silica dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorbs (Gandjar, 2007.)

. Teknik kromatografi lapis tipis merupakan salah satu metode identifikasi awal untuk menentukan kemurnian senyawa yang diisolasi. Cara ini sangat sederhana dan murah dalam pendeteksian awal hasil isolasi (Gritter *et al*, 1985). Fase gerak pada kromatografi lapis tipis silika gel dikelompokkan ke dalam deret eluotropik berdasarkan efek elusinya. Efek elusi naik seiring dengan naiknya kepolaran pelarut pada fase normal dengan silica gel sebagai fase diam.

Pelarut organik tunggal maupun campuran pelarut organik yang digunakan untuk mengatur polaritas dapat digunakan sebagai fase gerak.

Campuran yang baik menjadikan fase gerak memiliki kekuatan yang sedang tetapi sebaliknya tidak mencampurkan lebih dari dua pelarut karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan fase-fase.

Silika gel adalah fase diam (penyerap) yang paling banyak digunakan karena mempunyai daya pemisahan baik. Pengikat berupa kalsium sulfat biasanya dicampur dengan silica gel untuk memberikan kekuatan pada lapisan. Alumina, kieselguhr, bubuk selulosa, pati dan sephadex adalah fase diam lain yang sering juga digunakan. Komponen yang terlarut akan terbawa oleh fase diam (penyerap) dengan kecepatan perpindahan yang berbeda-beda. Bergeraknya komponen terlarut dalam fase gerak (pelarut) adalah dasar untuk mengidentifikasi komponen yang terpisahkan, perbandingan kecepatan ini dinyatakan dengan Rf (Retardation Factor) atau faktor retensi dengan persamaan (Gritter, 1991)

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Kisaran angka Rf adalah 0,00 sampai 1,00. Angka Rf ini dipengaruhi oleh struktur kimia senyawa yang dipisahkan, sifat dari fase diam dan derajat afinitasnya, tebal dan kerataan dari lapisan fase diam, fase gerak, derajat kejenuhan bejana dan jumlah sampel yang digunakan.

Bercak-bercak hasil pemisahan kadang kadang tidak berwarna sehingga diperlukan suatu deteksi dengan menggunakan penampak bercak baik secara fisika maupun kimia. Sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm (gelombang pendek) dan 366 (gelombang panjang) merupakan penampak bercak secara kimia. Penampak bercak secara kimia adalah dengan memberikan zat kimia baik secara penyemprotan, pencelupan

maupun dengan memberikan uap zat kimia tersebut. Cerium (IV) sulfat digunakan untuk mendeteksi senyawa organik umum, FeCl₃, atau uap ammonia digunakan untuk mendeteksi fenol dan Dragendroff digunakan untuk mendeteksi alkaloid. Selain itu, untuk memurnikan senyawa pada tahap akhir digunakan kromatografi lapis tipis preparative karena dapat memisahkan senyawa hanya pada kisaran 1 mg hingga 1g (Gitter *et al*, 1991).

Manfaat dilakukan kromatografi pada hakikatnya adalah dengan tujuan untuk mengetahui senyawa apa yang ada (kualitatif), berapa kadarnya (kuantitatif) dan bagaimana memperoleh komponen yang murni (preparatif) (Gitter *et al*, 1991)

Teknik dasar dalam melaksanakan pemisahan kromatografi lapis tipis adalah lapisan tipis adsorben dibuat pada permukaan plat kaca atau plat lain, misalnya berukuran 5 x 20 cm atau 20 x 20 cm. Tebal lapisan adsorben tersebut dapat bervariasi, tergantung dari penggunaannya. Umumnya ketebalan yang digunakan adalah 0,2 mm. Larutan campuran senyawa yang akan dipisahkan diteteskan pada kira-kira 1,5 cm dari bawah plat tersebut dengan menggunakan pipet mikro atau pipet kapiler. Pelarut yang terdapat pada sampel yang telah ditotol diuapkan terlebih dahulu. Dengan pengembangan tersebut masing-masing komponen senyawa dalam sampel akan bergerak keatas dengan kecepatan yang berbeda. Perbedaan kecepatan gerakan ini merupakan akibat dari terjadinya pengaruh proses KLT, yang kemudian diamati pada lampu UV 254 nm dan UV 366 nm serta penampakan bercak H₂SO₄ 10% (Adnan, 1997).

9.3.2. KLT Bioautografi

Biautografi berasal dari kata bio = makhluk hidup, autografi = melakukan aktivitas sendiri. KLT-bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menentukan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisasi aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan kromatografi lapis tipis (KLT). Pada bioautografi didasarkan pada efek biologi berupa antibakteri, antiprotozo, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti (Djide, 2006).

Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling dari spot pada KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji (Djide, 2006)

Bioautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisasi aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif (Djide, 2006)

Bioautografi dibagi dalam tiga kelompok yaitu:

1. Bioautografi langsung, yaitu dimana mikroorganisme tumbuh secara langsung diatas lempeng kromatografi lapis tipis (KLT)
2. Bioautografi kontak, dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasi bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung.

3. Bioautografi pencelupan, dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang diatas lempeng kromatografi lapis tipis (KLT).

9.3.3. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah merupakan suatu metode yang digunakan untuk memurnikan senyawa tunggal dari campuran senyawa. Kromatografi kolom berupa pipa gelas yang dilengkapi dengan kran penyaring. Ukuran kolom yang akan digunakan tergantung atas banyak sampel yang akan digunakan tergantung atas banyak sampel yang akan dipisahkan dan untuk menahan penyerapan digunakan penyaring berupa gelas wool atau kapas. Kromatografi kolom merupakan kromatografi cair-padat yang juga dikenal sebagai kromatografi adsorpsi dan partisi. Didalam kromatografi kolom, fase diam berupa bahan serap silica gel atau alumina yang ditempelkan pada tabung kaca selinder, logam atau plastic yang bagian bawahnya tertutup kran atau katup. Sedangkan fase geraknya dibiarkan mengalir berdasarkan gaya berat, gravitasi, tekanan atau hisapan pompa vakum sehingga masing masing zat dapat bergerak turun dengan kecepatan tertentu dan terjadi pemisahan sehingga diperoleh kromatogram.

Kromatogram kolom akan menghasilkan fraksi-fraksi senyawa yang dipisahkan berdasarkan sifat kepolaran dari pelarut (pengelusi). Komposisi pengelusi dapat terdiri dari pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut. Pada dasarnya, lebih lambat jalannya fase gerak dalam kolom akan diperoleh partisi atau pemisahan yang lebih baik.

Menurut Giffter (1985), kromatografi kolom memiliki kelemahan antara lain membutuhkan banyak pelarut, terjadi pengenceran komponen,

keterulangan rendah dan faktor waktu. Kecepatan Bergeraknya zat ini sendiri dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti daya serap penyerap, sifat pelarut dan suhu dari system kromatografi.

9.4. Penentuan Kadar Flavonoid

Kadar flavonoid dalam sampel tanaman dapat ditentukan dengan berbagai metode. Metode yang diakui oleh Departemen Kesehatan RI adalah spektrofotometri UV yang berdasar pada prinsip kolorimetri, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Merken & Beecher 2000), dan Elektroforesis Kapiler (Marchart *et al.* 2003). Pada metode ini, reaksi antara $AlCl_3$ dan gugus keto C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol akan menghasilkan senyawa kompleks (Chang *et al.* 2002). Absorbans dari warna yang terbentuk diukur dengan spektrometer UV. Kadar kuersetin dihitung sebagai kadar flavonoid total dalam sampel (Depkes 2000). Perhitungan ini berdasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menunjukkan hubungan lurus antara absorbans dan kadar analat.

Sebanyak 10 g serbuk daun kopasanda kering dimaserasi menggunakan 60 ml etanol selama 6 jam di atas alat kocok kemudian disaring. Filtrat disimpan, sedangkan residu direfluks dalam 40 ml etanol selama 3 jam. Hasil refluks disaring dan filtratnya dipindahkan ke labu lain. Residu direfluks kembali dengan etanol. Filtrat hasil maserasi dan refluks digabungkan dan dipekatkan dengan evaporator putar sampai terbentuk ekstrak kental. Ekstrak kental dimasukkan ke dalam oven untuk menghilangkan sisa etanol. Ekstrak kering lalu ditimbang setara dengan 200 mg simplisia lalu dihidrolisis dengan 1.0 ml larutan 0.5% (b/v) heksa

metilena tetramina, 20.0 ml aseton, dan 2.0 ml larutan 25% HCl dalam air. Hidrolisis dilakukan dengan pemanasan sampai mendidih selama 30 menit.

Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu takar 100 ml, kemudian residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton untuk dididihkan kembali sebentar. Penambahan aseton dan pendidihan ini dilakukan sebanyak 2 kali. Filtrat lalu dikumpulkan ke dalam labu takar. Setelah labu ukur dingin, volume ditepatkan sampai tepat 100,0 ml dan dikocok sampai tercampur sempurna. Sebanyak 20 ml filtrate hasil hidrolisis dipindahkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 20 ml akuades.

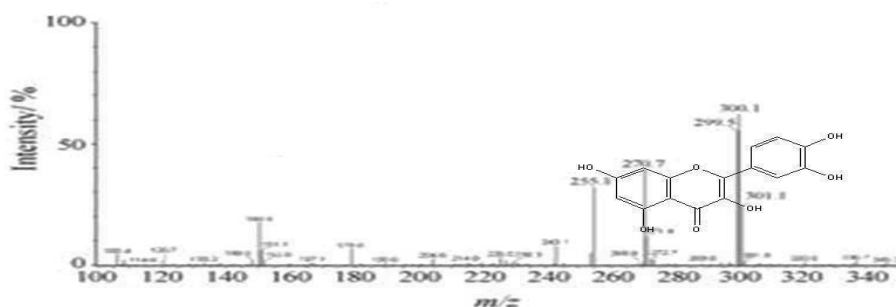
Ekstraksi kocok dilakukan dengan 15 ml etil asetat (satu kali) dan 10 ml etil asetat (dua kali). Fraksi etil asetat dikumpulkan ke dalam labu ukur 50.00 ml dan 25.00 ml, lalu ditera dengan etil asetat. Untuk replikasi spektrofotometri prosedur dilakukan 3 kali. Analisis spektrofotometri diawali dengan memindahkan 10 ml larutan fraksi etil asetat ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian ditambahkan 1 ml larutan 2 g AlCl_3 dalam 100 ml larutan asam asetat glasial 5% (dalam metanol). Larutan asam asetat glasial 5% v/v ditambahkan sampai tepat 25,00 ml. Sebagai standar digunakan larutan kuersetin murni dalam etil asetat dengan konsentrasi 3, 6, 12, 15, dan 24 ppm, lalu diukur pada λ_{max} 370.8 nm.

9.5. Identifikasi Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

9.5.1. Hasil Spektrum Infra Merah (IR) senyawa bioaktif

FTIR (Fourier Transform Infra Red) merupakan alat yang sangat berguna untuk mempelajari gugus fungsi dalam satu senyawa (Yu *et al.*, 2006). Identifikasi gugus fungsi tertentu ditunjukkan oleh serapan khas

pada bilangan gelombang tertentu, yang merupakan hasil transisi antara tingkat energi (getaran) dari setiap interaksi atom-atom dalam suatu molekul, baik berupa bending ataupun stretching. Spektrum infra merah (IR) dari fraksi aktif (fraksi IV) dari senyawa bioaktif daun kopasanda ditunjukkan pada Gambar 9.5.1.1 dan Tabel 9.5.1.1



Gambar 9.5.1.1. Spektrum IR Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

Pada Gambar 9.5.1.1 dan Tabel 9.1 menunjukkan kehadiran dari gugus hidroksil (OH) yang ditandai dengan adanya serapan lebar kuat pada daerah 3383 cm^{-1} . Serapan yang muncul pada daerah 2929 dan 2855 cm^{-1} merupakan serapan dari rentangan CH dan alifatik di dalam senyawa molekul. Sementara serapan yang diobservasi pada daerah 1643 dan 1602 cm^{-1} adalah bukti bahwa senyawa yang terdapat pada fraksi IV memiliki gugus karbonil (C=O) dan ikatan rangkap C=C. Lebih jauh lagi keberadaan C-C didalam senyawa dapat dilihat pada serapan yang muncul pada daerah 1020 cm^{-1} . Kelima gugus fungsional yang terdapat pada spektrum IR dari fraksi IV adalah karakteristik untuk senyawa dari golongan flavonoid.

Tabel 9.5.1.1.

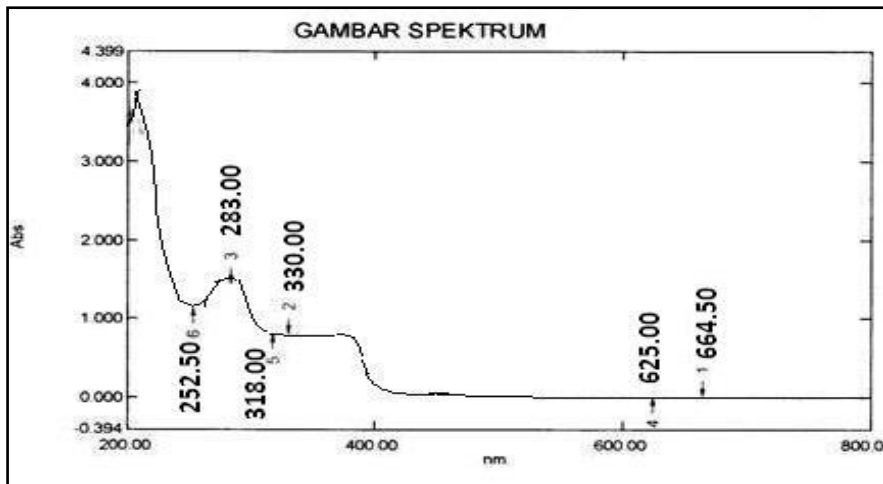
Data Serapan Spektrum IR Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda (*C.odorata* L.)

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range (cm ⁻¹)	Intensitas	Vibrasi Referensi (Silverstaein <i>et al.</i> , 2005)
3383	3200-4000	Kuat	Rentangan O-H
2929	2850-3300	Lemah	Rentangan C-H alkana
2855	2850-3300	Lemah	Rentangan C-H alkana
1643	1450-1700	Kuat	C=O Aromatik
1602	1450-1700	Kuat	C=C Aromatik
1020	1020-1080	Sedang	Uluran C-O Aromatik

9.5.2. Spektrofotometer Ultraviolet

Pada Gambar 9.5.1.2 menunjukkan enam spektrum panjang gelombang maksimum yang karakteristik untuk golongan senyawa flavonoid. Secara kualitatif absorbansi senyawa fraksi IV memperlihatkan adanya serapan yang kuat pada panjang gelombang 252,50; 283; 318; dan 330 nm. Spektrum ultraviolet senyawa fraksi IV juga memperlihatkan adanya serapan yang lemah pada panjang gelombang 625 dan 664,50 nm. Terjadinya serapan yang kuat pada spectrum ultraviolet menunjukkan kehadiran dari banyaknya ikatan rangkap C=C di dalam senyawa aromatik fraksi IV. Menurut Harbone (1987), senyawa fenol beserta turunannya memberikan serapan yang kuat di daerah spectrum UV.

Spektrum ultraviolet dari fraksi aktif (fraksi IV) disajikan pada Gambar 9.5.2.1.



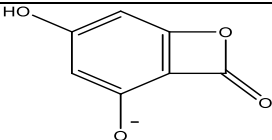
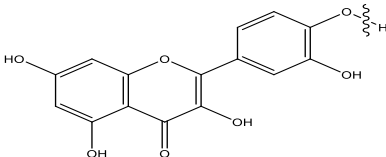
Gambar 9.5.2.1
Spektrum Ultraviolet Senyawa Fraksi IV dari Senyawa bioaktif Daun Kopasanda

9.5.3. Spektrum Massa Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda *C. Odorata*

Berdasarkan data hasil pengukuran spektra massa sampel aktif dengan GC-MS menunjukkan bahwa di dalam isolat daun kopasanda terdapat senyawa kimia dengan karakteristik sebagai berikut: terdapat paling tidak 7 pecahan ion molekul dengan kelimpahan terbanyak (base peak) dari fragmen-fragmen tersebut adalah pada ion molekul m/z 255. Pemecahan ion molekul dari senyawa ini secara lengkap disajikan pada Tabel 9.5.3.1 dan Spektrum massa senyawa bioaktif daun kopasanda disajikan pada Gambar 9.5.3.1.

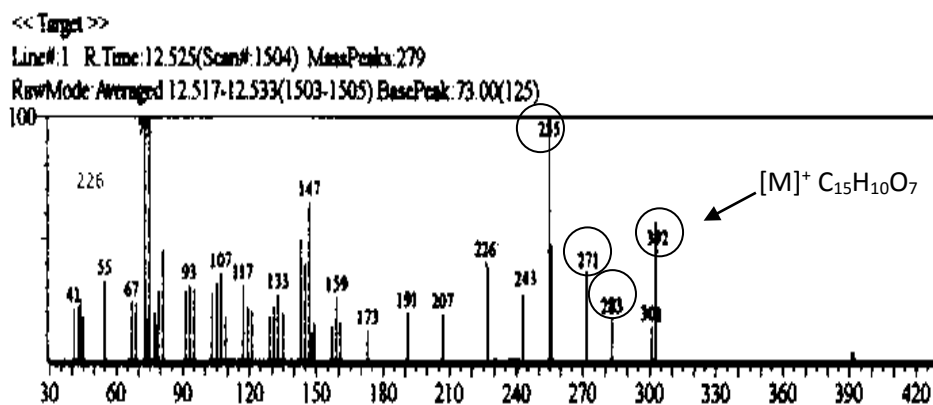
Tabel 9.5.3.1.

Pecahan Ion Molekul Senyawa Flavonoid Yang Terkandung dalam Daun Kopasanda (*C. Odorata*)

Massa Ion (M/Z)	Pecahan Ion Molekul
151	 <chem>-C8H7O3</chem>
226	<chem>-CHO</chem>
243	<chem>-CO</chem>
255	<chem>-C2H2O</chem>
271	<chem>-CH2O</chem>
301	 <chem>-H</chem>
302	M+

Pada Gambar 9.5.3.1 menunjukkan enam spektrum panjang gelombang maksimum yang karakteristik untuk golongan senyawa

flavonoid. Secara kualitatif absorbansi senyawa fraksi IV memperlihatkan adanya serapan yang kuat pada panjang gelombang 252,50; 283; 318; dan 330 nm. Spektrum ultraviolet senyawa fraksi IV juga memperlihatkan adanya serapan yang lemah pada panjang gelombang 625 dan 664,50 nm. Terjadinya serapan yang kuat pada spectrum ultraviolet menunjukkan kehadiran dari banyaknya ikatan rangkap C=C di dalam senyawa aromatik fraksi IV. Menurut Harbone (1987), senyawa fenol beserta turunannya memberikan serapan yang kuat di daerah spectrum UV.



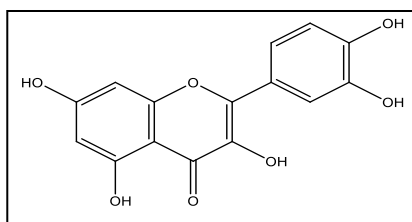
Gambar 9.5.3.1.

Spektrum Massa Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda (*C. Odorata* (Atas) Spektrum Massa Pembanding (Bawah) (Sumber: Xiao-qin, *et al.*, 2009)

Spektrum EIMS juga telah menunjukkan kehadiran dari ion molekul pada m/z 302 yang menyarankan formula molekul $C_{15}H_{10}O_7$ (Gambar 9.3). Pemecahan ion molekul yang muncul pada m/z 271, 255, 243, 226, dan 151 adalah karena kehilangan CH_2O , C_2H_2O , CO , CHO , dan $C_8H_7O_3$.

Hasil analisis GC-MS yang didukung dengan spektra ultraviolet (UV) dan spektra infra merah (IR) maka diduga bahwa senyawa yang diisolasi

dari ekstrak aktif daun kopasanda adalah merupakan turunan senyawa flavonoid yang dikenal dengan quercetin (Xiao-qim *et al.*, 2009), dengan struktur kimia sebagaimana Gambar 9.5.3.2 berikut ini.



Gambar 9.5.3.2.
Quercetin (Sumber: Xiao-qim *et al.*, 2009)

Senyawa bioaktif yang ditemukan pada daun kopasanda adalah senyawa flavonoid. Kemampuan senyawa flavonoid sebagai antibakteri *V. harveyi* sangat dipengaruhi oleh keaktifan biologis senyawa tersebut. Lebih jauh dijelaskan bahwa senyawa bioaktif apabila mengalami kontak dengan bakteri *V. harveyi* akan bereaksi dengan senyawa-senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan juga DNA bakteri yang merupakan penyusun utama inti sel yang merupakan pusat pengaturan segala kegiatan sel. Reaksi ini terjadi karena secara kimia suatu senyawa yang bersifat basa akan bereaksi dengan senyawa asam dalam hal ini adalah asam amino.

Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino karena sebagian besar asam amino telah bereaksi dengan gugus basa dari senyawa alkaloid. Perubahan susunan asam amino ini jelas akan merubah susunan rantai DNA pada inti sel yang semula memiliki susunan asam dan basa yang saling berpasangan. Perubahan susunan rantai asam amino pada DNA akan menimbulkan

perubahan keseimbangan genetik pada asam DNA sehingga DNA bakteri V. harveyi akan mengalami kerusakan. Dengan adanya kerusakan pada DNA tersebut inti sel bakteri V. harveyi akan mengalami kerusakan. Hal ini karena DNA merupakan komponen utama penyusun inti sel. Kerusakan DNA pada inti sel bakteri ini juga akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel bakteri V. harveyi. Lisisnya inti sel bakteri V. harveyi akan menyebabkan juga kerusakan sel pada bakteri V. harveyi karena inti sel merupakan pusat kegiatan sel. Kerusakan sel pada bakteri ini lama kelamaan akan membuat sel-sel bakteri V. harveyi tidak mampu melakukan metabolisme sehingga juga akan mengalami lisis. Dengan demikian bakteri V. harveyi akan menjadi inaktif dan hancur (I Wayan, 2009).

Seperti disebutkan sebelumnya bahwa ekstrak metanol daun kopasanda mengandung senyawa flavonoid dan beberapa ekstrak dari tumbuhan obat yang mengandung flavonoid menunjukkan aktifitas antimikroba (Waage & Hedin, 1985; Aktivitas anti bakteri flavonoid terhadap *Staphylococcus epidermidis* (Nishino *et al.*, 1987, Vaughn, 1995; Shutz, Wright, Rali & Stucher 1995; Rhoca *et al.*, 1995; Colombo & Bosisio, 1996); Senyawa flavonoid daun *Tagetes minuta* menunjukkan aktifitas antibakterinya terhadap bakteri Gram Positif dan Gram negatif (Tereschuk, *et al.*, 1997). Menurut Cowan (1999), flavonoid adalah grup senyawa turunan dari senyawa fenol yang berfungsi untuk mempertahankan diri dari serangan mikroba, insekta dan herbivore.

Lebih jauh lagi, Cody *et al.*, (1988) melaporkan bahwa flavonoid menunjukkan aktifitas biologi yang penting yang digunakan didalam bakteriologi, farmakologi dan pengobatan karena sifat bakterisidal mereka. Kehadiran gugus hidroksil (OH) didalam senyawa flavonoid akan meningkatkan aktifitas antibakterinya (Alcaraz *et al.*, 2000). Selain itu

kehadiran karbonil grup ($C=O$) didalam senyawa flavonoid juga berpengaruh terhadap aktifitas antibakteri senyawa tersebut melalui interaksi langsung dengan beberapa enzim biasanya melalui ikatan hydrogen (Cotelle *et al.*, 1996).

BAB X

APLIKASI BAHAN ALAMI DALAM PENGENDALIAN VIBRIOSIS PADA UDANG WINDU

Penelitian aplikasi bahan alami daun dalam pengendalian Vibriosis telah dilakukan. Salah satu bahan alami yang telah diujicobakan adalah daun kopasanda. Dalam penelitian ini menggunakan senyawa bioaktif daun kopasanda *C. odorata* L. sebagai antibakteri *V. harveyi* yang menginfeksi pasca larva udang windu dengan kepadatan awal 10^7 CFU/mL (Kadriah *et al.*, 2012). Konsentrasi Senyawa Bioaktif yang digunakan berdasarkan kisaran konsentrasi nilai MIC dan MBC pada uji aktivitas antibakteri Senyawa Bioaktif secara *in vitro*.

Pada penelitian ini metode pengobatan yang dilakukan adalah dengan cara perendaman. Sebagaimana Kabata (1985) menyatakan bahwa obat yang larut dalam air dapat diserap dengan baik oleh insang, kulit dan organ lainnya. Hal ini sangat efektif dalam pengobatan melalui perendaman

karena insang dan sistem organ yang terinfeksi dapat menyerap dengan baik.

10.1 Gejala klinis setelah Uji Tantang dengan *V. harveyi*

Pasca larva Udang yang telah diadaptasikan dalam media pemeliharaan diuji tantang dengan *V. harveyi* selama 6 jam hingga populasi *V. harveyi* mencapai kepadatan 10^7 sel/mL. Pasca larva udang menunjukkan gejala terinfeksi *V. harveyi* setelah 3 jam infeksi dengan ditandai adanya perubahan perilaku berenang dan perubahan warna pada tubuh dan pada waktu 6 jam setelah infeksi sebagian besar udang menunjukkan adanya gejala telah terinfeksi. Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan Kamiso (2004) bahwa infeksi bakteri terjadi pada 3 jam sampai beberapa hari, tergantung ukuran dan tingkat kekebalan tubuh udang windu setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*.

Tingkat patogenitas *V. harveyi* terhadap pasca larva udang windu (PL 13) menunjukkan kerusakan pada organ kulit, insang, otot, saluran pencernaan dan hepatopankreas (Prajitno, 2006). Gejala eksternal pada bagian perut terjadi pembengkakan (inflamasi), morfologi udang menjadi pucat, terjadi perubahan warna kemerahan pada bagian perut dan kaki renang, warna tubuh menjadi gelap, keseimbangan berenang terganggu sangat lemah dan berputar (whirling) lebih banyak diam, nafsu makan berkurang, tubuh banyak mengeluarkan lendir (mucosa), sungut (barbel) dan kaki renang mengalami perubahan warna kemerahan serta mulai terpotong.

Pengamatan gejala klinis pasca larva udang windu selama uji tantang dengan *V. harveyi* menunjukkan perubahan perilaku dan morfologi.

Perubahan perilaku pascalarva udang windu yang duji tantang dengan *V. harveyi* yang sebelum dan sesudah dilakukan pengobatan disajikan pada Tabel 10.1.1

Tabel 10.1.1

Gejala Klinis Pasca Larva Udang Windu yang diUji Tantang dengan *V. harveyi* dan Pengobatan dengan Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda pada berbagai konsentrasi

Waktu Pengamatan	Gerakan	Nafsu makan	Warna	Morfologi
30 menit	Gerakan udang normal	Nafsu makan baik	Warna tubuh masih cerah dan bening	Permukaan tubuh masih utuh
1 jam	Gerakan udang mulai tidak normal	Nafsu makan berkurang	Warna tubuh mulai keruh	Permukaan tubuh masih utuh
3 jam	Keseimbangan berenang mulai terganggu	Udang mulai tidak mau makan	Terjadi perubahan warna ke arah gelap	Sebagian sungut dan ekor agak kemerahan
6 jam	Berenang tidak beraturan	Udang tidak mau makan	Warna tubuh menjadi gelap	Terlihat kemerahan pada hepatopankreas

	Kadang loncat-loncat			
12 jam	Berenang tidak beraturan Kadang loncat-loncat	Udang tidak mau makan	Warna tubuh menjadi gelap	Terlihat kemerahan pada hepatopankreas
1 hari	Lamban, tidak beraturan	Nafsu makan berkurang	Gelap, berlendir hepatopankreas agak kemerahan	Ekor agak mengembang, sungut terpotong
2 hari	Lamban, tidak beraturan	Tidak mau makan	Gelap, hepatopankreas agak kemerahan	Sebagian sungut terpotong,
3 hari	Mulai aktif bergerak	Tidak mau makan	Pinggiran ekor berwarna merah	Sebagian sungut terpotong,
4 hari	Mulai aktif bergerak	Mulai makan	Mulai cerah,	Mulai kembali normal, warna kemerahan mulai hilang
5 hari	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Hepatopankreas mulai normal kembali

6 hari	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Normal kembali
7 hari	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Normal kembali

Pada Tabel 10.1.2 dapat dijelaskan bahwa setelah 6 jam ujiantang *V. harveyi* telah nampak gejala infeksi, sehingga setelah 6 jam infeksi dilakukan pengobatan dengan menggunakan senyawa bioaktif daun kopasanda. Gejala klinis yang ditimbulkan pada pasca larva udang yang terinfeksi *V. harveyi* setelah dilakukan pengobatan disajikan pada Tabel 10.2

Tabel 10.1.2
Gejala Klinis Pasca Larva Udang Windu yang terinfeksi *V. harveyi* Setelah Pengobatan dengan Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

Hari ke-	Gerakan	Nafsu Makan	Warna	Morfologi
1.	Lamban, tidak beraturan	Nafsu makan berkurang	Gelap, berlendir hepatopankreas agak kemerahan	Ekor agak mengembang, sungut terpotong
2	Lamban, tidak beraturan	Tidak mau makan	Gelap, hepatopankreas agak kemerahan	Sebagian sungut terpotong,

3	Mulai aktif bergerak	Tidak mau makan	Pinggiran ekor berwarna merah	Sebagian sungut terpotong,
4	Mulai aktif bergerak	Mulai makan	Mulai cerah,	Mulai kembali normal, warna kemerahan mulai hilang
5	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Hepatopankreas mulai normal kembali
6	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Normal kembali
7	Aktif bergerak	Mulai makan	Warna cerah	Normal kembali

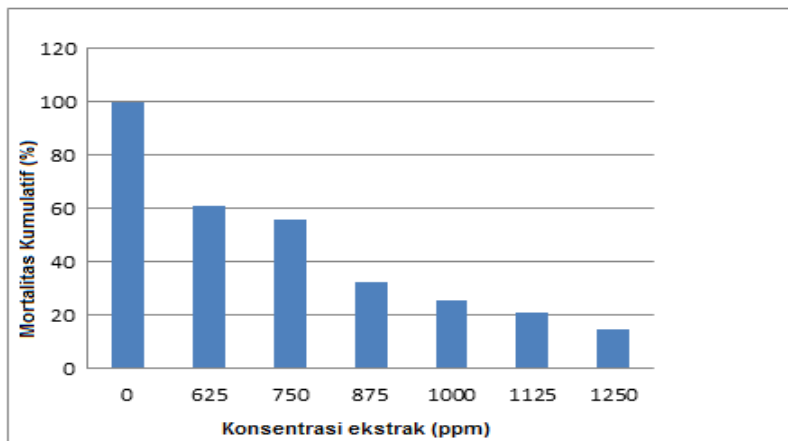
Warna tubuh juga merupakan salah satu tanda-tanda dari pengaruh pemberian senyawa bioaktif daun kopasanda pada pasca larva yang ditantang dengan *V. harveyi*. Pasca larva yang ditantang dengan *V. harveyi* dan diberi perlakuan senyawa bioaktif pada konsentrasi 625, 750 dan 875 ppm memperlihatkan warna tubuh kemerah-merahan yang mengindikasikan bahwa pasca larva berada pada kondisi yang tidak sehat (terinfeksi vibriosis). Hal yang sama juga diamati terhadap kontrol positif (diuji tantang dengan *V. harveyi* tanpa pemberian senyawa bioaktif). Berbeda

dengan pasca larva yang ditantang *V. harveyi* dan diberi perlakuan senyawa bioaktif daun kopasanda pada konsentrasi 1000, 1125 dan 1250 ppm dimana pasca larva memperlihatkan warna tubuh yang jernih yang berarti pasca larva berada pada kondisi yang sehat dibandingkan kontrol (+). Seperti dilaporkan oleh Nash *et al.* (1992) bahwa permukaan tubuh yang kemerah-merahan selain insang yang memperlihatkan warna merah sampai coklat adalah salah satu tanda dari udang yang terkena *vibriosis*. Lebih lanjut Prajitno (2006) menemukan adanya bercak-bercak kemerahan pada tubuh udang yang terinfeksi dengan *V. harveyi*, susunan kaki jalan dan kaki renang tidak lengkap yaitu terdapat beberapa kaki yang patah, dan pada ekornya terlihat mengalami kerusakan, warna karapaksnya menjadi keruh atau tidak jernih.

Selain ciri-ciri tersebut diatas, udang yang terinfeksi *V. harveyi* terlihat lambat dalam memberikan respon terhadap rangsangan, lebih banyak berdiam di dasar dan berenang tidak beraturan.

10.2 Mortalitas Pasca Larva Udang Windu

Hasil Pengamatan mortalitas pasca larva udang windu setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* 10^7 sel/ml yang kemudian dilakukan pengobatan dengan metode perendaman pada berbagai konsentrasi senyawa bioaktif daun kopasanda disajikan pada Gambar 10.2.1



Gambar 10.2.1.

Rata-Rata Mortalitas Larva Udang Windu (%) Yang Diuji Tantang Dengan *V. Harveyi* dan Diberi Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda pada Konsentrasi Berbeda

Pada Gambar 10.2.1 terlihat bahwa perlakuan dengan pemberian senyawa bioaktif daun kopasanda dengan konsentrasi yang berbeda, kemampuan menekan kematian udang windu berbeda pula. Semakin tinggi konsentrasi senyawa bioaktif daun kopasanda yang diberikan dalam pengobatan semakin besar kemampuan menekan kematian pasca larva udang windu *P. monodon* sehingga nilai sintasan pasca larva udang windu meningkat. Nilai mortalitas terendah diperoleh pada konsentrasi 1250 ppm yakni 14,44 %, disusul perlakuan dengan konsentrasi 1125, 1000, 875, 750 dan 625 ppm masing-masing nilai mortalitas berturut turut 21,11%, 25,55%, 32,22%, 55,55% dan 61,11%, hal ini jauh berbeda dengan kontrol yang nilai mortalitasnya pada akhir penelitian yakni 100,00 %.

Tingginya kematian pasca larva udang windu pada konsentrasi 625-875 ppm, menunjukkan bahwa aplikasi senyawa bioaktif pada konsentrasi

625, 750 dan 875 ppm secara *in vivo* belum efektif dalam pengendalian *Vibriosis* pada pasca larva udang windu. Meskipun senyawa bioaktif daun kopasanda pada konsentrasi 625, 750 dan 875 ppm juga menurunkan populasi *V. harveyi* tetapi pada konsentrasi tersebut senyawa bioaktif tidak mampu mencegah infeksi bakteri pada pasca larva. Ini disebabkan oleh pada konsentrsi tersebut, senyawa bioaktif menghambat pertumbuhan bakteri jauh lebih rendah dibandingkan pada pemberian senyawa bioaktif pada konsentrasi 1000, 1125 dan 1250 ppm. Aktivitas antibakteri lemah yang ditunjukkan oleh senyawa bioaktif pada konsentrsi 625, 750 dan 875 ppm telah menyebabkan tingginya kematian pada pasca larva.

Mekanisme penyerangan bakteri ke dalam tubuh host diawali dengan melekatnya *V. harveyi* pada permukaan tubuh dengan menggunakan flagella dan fimbrie. Melakukan multipikasi dalam jaringan inang, pada proses ini bakteri memerlukan zat besi atau yang biasa disebut siderophora membran protein. Protein yang digunakan bakteri adalah protein heme, transferin, laktoferin atau feritin. Setelah kebutuhan zat besi terpenuhi dan semakin patogenik, bakteri akan resisten terhadap pertahanan host melalui sistem pertahanan yang terdapat pada kapsul yang merupakan polisakarida ekstraseluler. Setelah resisten, bakteri akan merusak jaringan dengan memproduksi enzim exotoxin (hemolysin, protease dan phospolipase), enzim endotoxin (LPS) dan ekstraseluler toxin kompleks hingga pada akhirnya pasca larva udang windu mengalami kematian.

Berdasarkan hasil analisis anova mortalitas pasca larva udang windu menunjukkan bahwa keenam konsentrasi senyawa bioaktif yang diberikan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap sintasan pasca larva udang

windu setelah diberi perlakuan pengobatan. Sedang Hasil Uji statistik disajikan Pada Tabel 10.2.1

Tabel 10.2.1.

Hasil Analisis Statistik Mortalitas (%) Pasca Larva Udang Windu yang diuji Tantang dengan *V.harveyi* diobati dengan Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

Konsentrasi Senyawa Bioaktif	Kumulatif Mortalitas (%)
0 ppm	100,00 ^a
625 ppm	61,11 ^b
750 ppm	55,55 ^b
875 ppm	32,22 ^c
1000 ppm	25,55 ^{cd}
1125 ppm	21,11 ^{de}
1250 ppm	14,44 ^e

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

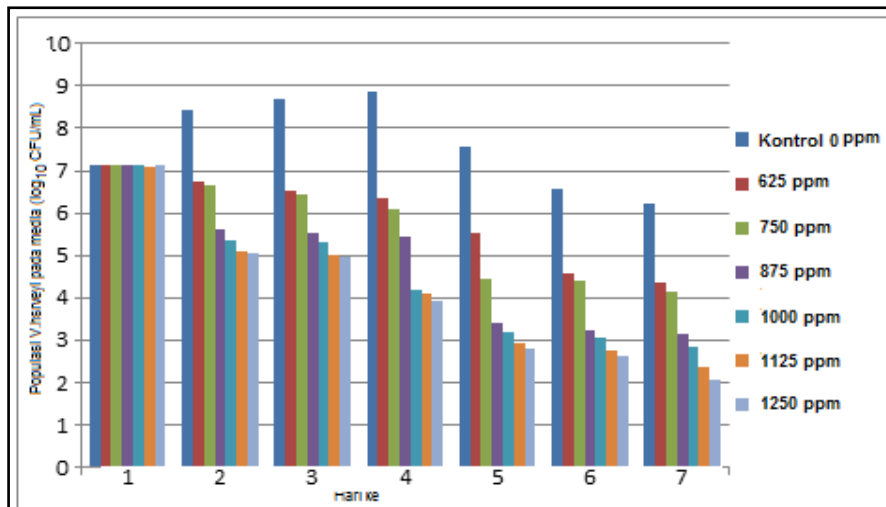
Peningkatan nilai kelangsungan hidup pasca larva udang windu karena daun kopasanda mengandung senyawa aktif flavonoid yang berfungsi sebagai bahan anti bakteri yang mampu menghambat dan mematikan bakteri. Mekanisme kerja bahan aktif dalam mematikan bakteri dilakukan dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel bakteri dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan terhambatnya

aktivitas dan biosintesa enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme dan kondisi ini pada akhirnya menyebabkan kematian sel.

10.3. Total Bakteri Pada Media Pemeliharaan Setelah Infeksi dan Pengobatan dengan Ekstrak daun Kopasanda

Hasil perhitungan total bakteri pada media pemeliharaan setelah diinfeksi *V. harveyi* selama 6 jam kemudian dilakukan pengobatan dengan senyawa bioaktif daun kopasanda ditunjukkan pada Gambar 10.3.1.

Gambar 10.2. memperlihatkan bahwa populasi *V. harveyi* menurun di dalam air pemeliharaan pasca larva yang diberi perlakuan senyawa bioaktif daun kopasanda pada semua konsentrasi selama periode pemeliharaan. Populasi *V. harveyi* di dalam air pemeliharaan yang diberi perlakuan senyawa bioaktif pada konsentrasi 625 dan 750 ppm setelah 2 hari infeksi menunjukkan pertumbuhan yang maksimum yaitu $5,26 \times 10^6$ dan $4,57 \times 10^6$ CFU/mL, secara berturut-turut. Sementara kontrol tanpa perlakuan senyawa bioaktif memberikan peningkatan populasi *V. harveyi* yang mencapai $7,46 \times 10^8$ CFU/mL pada 4 hari pasca infeksi. Sebaliknya, penurunan populasi *V. harveyi* yang drastis terjadi pada pemberian senyawa bioaktif pada konsentrasi 1125 dan 1250 ppm yaitu $1,23 \times 10^5$ dan $1,16 \times 10^5$ CFU/mL pada hari kedua setelah infeksi. Pada umumnya, populasi *V. harveyi* di dalam air pemeliharaan menurun secara drastis setelah 2 hari pasca infeksi sampai akhir penelitian pada semua pasca larva yang diinfeksi.



Gambar 10.3.1.

Populasi Bakteri (Log₁₀ CFU/mL) pada Media Pemeliharaan Larva Udang Windu Setelah Uji Tantang Dengan *V. harveyi* dengan Pemberian senyawa bioaktif Daun Kopasanda (*C. Odorata* L.)

Menurunnya populasi *V. harveyi* yang diberi perlakuan perendaman senyawa bioaktif daun kopasanda .menunjukkan bahwa senyawa bioaktif daun kopasanda mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* Kemampuan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh kestabilan terhadap protein, lipid, garam dan tingkat keasaman (pH) dalam media pertumbuhan (Nychas and Tassou, 2004).

Antibakteri bekerja dengan cara mengganggu bagian-bagian yang peka di dalam sel, yaitu sintesis dinding sel, fungsi membran sitoplasma, sintesis protein dan metabolisme asam nukleat. Senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak daun kopasanda *C. odorata* L. ini dapat merusak membran sel, yaitu dapat mengganggu senyawa transport senyawa yang keluar masuk sel.

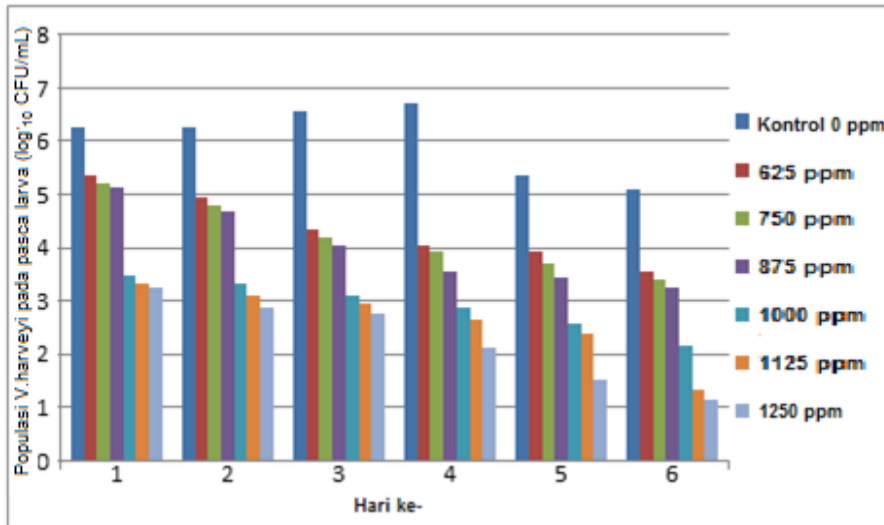
Menurut Fadjar *et al.*, (2004), pada umumnya senyawa antibakteri berupa fenol maupun turunannya (flavonoid) mampu menembus dinding sel dan merusak sistem yang ada dalam sel. Membran sitoplasma yang berperan pada keutuhan sel juga dapat diganggu permeabilitasnya oleh beberapa senyawa antibakteri yang terdapat dalam daun kopasanda *C. odorata* L. yang dapat menyebabkan kebocoran isi sel. Senyawa penyebab kebocoran membran sitoplasma adalah senyawa yang bersifat antiseptik dan desinfektan.

10.4. Total Bakteri pada Tubuh Pasca larva Udang Windu setelah Pengobatan dengan Ekstrak daun kopasanda

Hasil pengamatan populasi *V. harveyi* pada pasca larva udang windu setelah dilakukan uji tantang dengan *V. harveyi* dengan pengobatan senyawa bioaktif daun kopasanda disajikan pada Tabel lampiran, sementara rekapitulasi rata-rata populasi bakteri pada pasca larva udang windu pada setiap waktu pengamatan disajikan pada Gambar 10.4.1.

Pada Gambar 10.3 terlihat Populasi *V. harveyi* di dalam tubuh pasca larva setelah pemberian senyawa bioaktif juga mengalami penurunan dan lebih rendah daripada kontrol positif. Pertumbuhan maksimum *V. harveyi* pada semua perlakuan yang diberi senyawa bioaktif ditemukan pada 2 hari pasca infeksi dan berangsur-angsur menurun sampai pada akhir penelitian.

Populasi *V. harveyi* paling rendah dijumpai pada perlakuan yang diberi senyawa bioaktif pada konsentrasi 1250 ppm ($1,74 \times 10^3$ CFU/mL) diikuti oleh perlakuan pada konsentrasi 1125 ppm ($2,19 \times 10^3$ CFU/mL) dan 1000 ppm ($3,12 \times 10^3$ CFU/mL). Sebaliknya, populasi *V. harveyi* paling tinggi ditunjukkan oleh kontrol positif yaitu, $1,82 \times 10^6$ CFU/mL.



Gambar 10.4.1.

Populasi Bakteri (Log_{10} CFU/mL) pada Pasca Larva Udang Windu Setelah Uji Tantang dengan *V. harveyi* dengan Pemberian Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda (*C. odorata* L.)

Hasil uji statistik Populasi *V. harveyi* pada Tubuh Larva Udang Windu Setelah Pengobatan Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda disajikan pada Tabel 10.4.1

Tabel 10.4.1

Tabel Hasil Analisis Statistik Populasi *V. harveyi* pada Tubuh Larva Udang Windu Setelah Pengobatan Senyawa Bioaktif Daun Kopasanda

Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Populasi <i>V.harveyi</i> (CFU/mL)
0	1,23.10 ^{5.a}
625	3,70.10 ^{3 b}
750	2,60.10 ^{3 c}
875	1,73.10 ^{3 d}
1000	1,43.10 ^{2 e}
1125	2,20.10 ^{1 f}
1250	1,40.10 ^{1 g}

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Penurunan populasi *V. harveyi* di dalam pasca larva dan air pemeliharaan telah menunjukkan bahwa senyawa bioaktif daun kopasanda mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi*. Senyawa bioaktif daun kopasanda pada konsentrasi 625, 750 dan 875 ppm juga menurunkan populasi *V. harveyi* tetapi pada konsentrasi tersebut senyawa bioaktif tidak mampu mencegah infeksi bakteri pada pasca larva. Ini disebabkan oleh pada konsentrsi tersebut, senyawa bioaktif menghambat pertumbuhan bakteri jauh lebih rendah dibandingkan pada pemberian senyawa bioaktif pada konsentrasi 1000, 1125 dan 1250 ppm. Aktivitas antibakteri lemah yang ditunjukkan oleh senyawa bioaktif pada konsentrsi 625, 750 dan 875 ppm

telah menyebabkan tingginya kematian pada pasca larva. Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh senyawa bioaktif pada konsentrasi 1000, 1125 dan 1250 ppm. Diduga disebabkan oleh kehadiran dari senyawa flavonoid pada konsentrasi tinggi. Sabir (2005) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa senyawa flavonoid memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan beberapa mekanisme yang berbeda, antara lain flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri, Mekanisme yang berbeda dikemukakan oleh Di Carlo *et al.*, (1999) dan Estrela *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

10.5 Pengamatan Parameter Kualitas air Media Pemeliharaan Pasca larva Udang Windu

Air sebagai media tempat hidup udang yang dibudidayakan harus memenuhi berbagai persyaratan dari segi fisika , kimia maupun biolog. Dari segi fisika, air merupakan tempat yang menyediakan ruang gerak bagi udang yang dipelihara. Sedangkan dari segi kimia, air sebagai pembawa *unsur-unsur* hara, *mineral*. *vitamin*. dan gas-gas terlarut. Dari segi biologi, air merupakan media untuk kegiatan biologis dalam pembentukan dan penguraian bahan-bahan organik (Buwono, 1993).

Hasil pengamatan kualitas air selama penelitian yang dilakukan 2 kali pada jam 08.00 dan jam 16.00 disajikan pada Tabel 10.5.1

Pada Tabel 10.5.1 terlihat bahwa secara keseluruhan nilai parameter kualitas air selama penelitian masih berada pada kisaran yang layak untuk kelangsungan hidup pasca larva udang windu, sehingga kematian yang diperoleh selama penelitian bukan disebabkan oleh parameter kualitas air.

Salinitas hasil pengukuran berada pada kisaran 27,49 sampai 29,05. Salinitas hasil pengukuran ini masih berada dalam kisaran yang diperkenankan untuk budidaya udang berdasarkan nilai yang direkomendasikan yaitu 5 - 35 ‰ dan untuk pertumbuhan optimum diperlukan salinitas 15-25 ‰ (Boyd 1990; Poernomo, 1992; Widigdo, 2002; dan Soewardi, 2002).

Tabel 10.5.1

Kisaran Kualitas Air Media Pemeliharaan Pasca Larva Udang Windu yang di Uji Tantang *V. Harveyi*

Konsent rasi (ppm)	Salinitas (ppt)	pH	Temperatur (°C)	O ₂ Terlarut (mg/L)	Amoniak (NH ₃)
K ⁺ (0)	28,68±0,21	7,14±0,06	26,76±0,32	5,87±0,10	0,061±0,028
A. 625	28,65±0,29	7,12±0,06	26,74±0,39	5,87±0,26	0,049±0,003
B. 750	28,72±0,19	7,18±0,12	26,77±0,33	5,83±0,16	0,044±0,026
C. 875	28,68±0,25	7,16±0,13	26,76±0,31	5,84±0,12	0,054±0,027
D. 1000	28,69±0,19	7,11±0,05	26,71±0,19	5,83±0,28	0,054±0,029
E. 1125	28,71±0,30	7,14±0,06	26,82±0,38	5,92±0,23	0,051±0,028
F. 1250	28,59±0,29	7,13±0,06	26,73±0,32	5,84±0,30	0,044±0,034

Suhu air sebagai salah satu faktor pembatas utama adalah memegang peranan penting bagi kehidupan dan pertumbuhan udang. Kisaran hasil pengukuran suhu air untuk semua perlakuan selama penelitian adalah berkisar $26,71 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$. Menurut Cholik (1988) kisaran suhu yang terbaik untuk pertumbuhan dan kehidupan udang terletak pada suhu $28 - 30^{\circ}\text{C}$, namun masih dapat hidup pada suhu $18 - 36^{\circ}\text{C}$. dimana pada tingkat suhu air 36°C udang sudah tidak aktif. Setiap spesies udang mempunyai kisaran suhu optimal, untuk udang windu adalah $26 - 28^{\circ}\text{C}$, suhu di atas 32°C akan menyebabkan stres pada udang dan suhu 35°C merupakan suhu kritis bagi *P. monodon* dan *P. merguensis* (Mintardjo dkk, 1984).

Chiang dan Liao (1984) mengemukakan bahwa pada suhu $26,5^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$ udang masih dapat hidup, suhu $37,5^{\circ}\text{C}$ jaminan kehidupan tinggal 61 % dan pada suhu di atas $37,5^{\circ}\text{C}$ udang tidak dapat hidup lagi. Suhu yang baik untuk pertumbuhan udang windu adalah $29^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ (Poernomo, 1978). Oksigen terlarut untuk semua perlakuan berkisar antara 5,54– 7,50 ppm kisaran ini layak untuk kehidupan udang sebagaimana Cheng and Kuo (2003) melaporkan bahwa nilai DO lebih tinggi dari 5 mg/l sering direkomendasikan untuk praktek budidaya udang windu intensif.

Salinitas selama penelitian berkisar 27,49-29,05 ppt, pH berkisar 7,02-7,86; suhu air berkisar $27,49 - 29,05^{\circ}\text{C}$, oksigen berkisar 5,54-7,50 dan amoniak 0,06-0,71. Bila dibandingkan dengan kisaran optimal pemeliharaan pasca larva udang windu, parameter kualitas air penelitian masih menunjukkan nilai optimal bagi kehidupan pasca larva udang windu

BAB XI

PENUTUP

Salah satu kendala yang dihadapi dalam pengembangan budidaya udang adalah masalah penyakit. Serangan penyakit timbul karena penurunan mutu kualitas air yang diikuti oleh keadaan kesehatan udang yang memburuk karena lingkungan tidak mendukung kehidupannya. Kondisi lingkungan yang seperti ini tercipta karena diterapkannya sistem budidaya secara intensif, yang melibatkan pemberian input yang telah melebihi daya dukung lingkungan. Dampak dari aktifitas ini menyebabkan gangguan pada keseimbangan dinamika alami populasi mikro organisme dan perubahan lingkungan pemeliharaan udang. Hal ini menyebabkan organisme patogen berkembang dengan pesat, sehingga dapat menyerang udang yang kondisinya semakin memburuk, sehingga timbullah penyakit.

Di antara agen penyebab *Vibriosis* adalah *V. harveyi* (bakteri bercahaya) yang sering menjadi penyebab kematian massal *Penaeus monodon* pada sistem pemeliharaan larva, bahkan telah menyebabkan kematian hampir 100 %, tidak hanya pada tahap larva, tetapi juga pada tahap post larva,

remaja dan dewasa. Udang windu sangat rentan terhadap bakteri patogen oportunistik ini (Prajitno, 2006).

Usaha yang telah dilakukan untuk mengontrol penyakit bakterial pada pembenihan maupun pemeliharaan udang di tambak, masih terus mengandalkan penggunaan obat-obatan atau bahan kimia seperti formalin dan malachite green serta antibiotic, seperti khloramfenikol, oxytetracyclin dan prefuran (Brown, 1989 dan Sunarya *et al.*, 1996). Namun penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan tidak terkendali telah mengakibatkan resistensi antibiotik yang telah menjadi masalah utama di seluruh dunia (Goldmann dan Huskins, 1997). Oxytetracycline yang efektif terhadap berbagai bakteri baik gram positif maupun gram negatif biasanya digunakan sebagai aditif pakan untuk pengendalian infeksi alami dalam budidaya. Penggunaan antibiotik ini memang manjur dan berkhasiat mematikan jenis bakteri ini, namun karena bahaya residu dan terjadinya resistensi terhadap antibiotik tertentu, maka penggunaannya mulai dilarang dan dibatasi terutama terhadap jenis antibiotik tertentu misalnya Cloramphenicol, Penicillin, Furazolidon dan turunannya. Muliani *et al*, 2003 telah melakukan uji resistensi sedikitnya 691 isolat bakteri *Vibrio* terhadap beberapa jenis antibiotik dengan tingkat resistensi mencapai 94,6 %, bahkan sebelumnya Taslim menyatakan bahwa lebih dari 250 strain *Vibrio* telah resisten terhadap antibiotik.

Alternatif lain yang dapat dilakukan untuk mengendalikan *V. harveyi* dengan aman dan ramah lingkungan adalah dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman. Tanaman kopasanda adalah tanaman yang merupakan vegetasi murni daerah pertambakan. Tanaman kopasanda (*C.odorata*) ini adalah tanaman dari Genus *Euphatorium*, family

Astericeae yang dilaporkan mengandung flavonoid yang bersifat antibakteri (Mulyadi, 2011). Selain itu tanaman ini secara empiris dilaporkan telah digunakan oleh masyarakat Sulawesi Selatan dan hasilnya didapatkan bahwa udang yang dipelihara di tambak tetap sehat dan diyakini akibat penggunaan tanaman kopasanda tersebut.

Senyawa bioaktif daun kopasanda dapat digunakan sebagai antibakteri alami dalam penanggulangan penyakit *Vibriosis* karena : Senyawa bioaktif daun kopasanda (*C.odorata* L.) menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap *V. harveyi* dengan nilai MIC 0,625 mg/mL dan MBC 1,250 mg/mL, Senyawa bioaktif daun kopasanda pada konsentrasi 313, 625 dan 1250 ppm aman digunakan bagi pasca larva udang windu dan tidak ditemukan adanya perubahan jaringan dan sel dari hepatopankreas, Konsentrasi senyawa bioaktif daun kopasanda (*C.odorata* L.) 1250 ppm yang diberikan secara perendaman efektif menurunkan populasi *V. harveyi* sehingga menormalkan jaringan dan sel hepatopankreas pada pasca larva udang windu dengan kelangsungan hidup 85,56 %.. Pemberian senyawa bioaktif dengan konsentrasi 1000, 1125 dan 1250 ppm terjadi perubahan terhadap jaringan dan sel hepatopankreas pasca larva kearah penyembuhan. Sebaliknya pasca larva yang diberi perlakuan daun kopasanda pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu 625, 750 dan 875 ppm dan kontrol terjadi kerusakan pada hepatopankreas seperti haemorrhagic, kerusakan sel dan vakuolisasi.

Dari daun kopasanda telah berhasil diisolasi senyawa bioaktif yang memiliki aktifitas antibakteri yang teridentifikasi sebagai turunan senyawa flavonoid atau dikenal dengan quercetin yang bertanggung jawab terhadap

PENUTUP

aktivitas antibakteri *V. harveyi* pada pasca larva udang windu yang lebih aman dan efektif

DAFTAR PUSTAKA

- Akinmoladun, A.C., E.O. Ibokun and I.A. Dan-Ologe. 2007. Phytochemical Constituents and Antioxidant Properties of Extracts From the Leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific Research and Essay*, 2 (6): 191-194
- Alcaradz, L.E., S.E., Blanco, O.N., Puig, F.Tomad and F.H., and Feretti, 2000. Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. theor. Biology* 205,231-240 doi:10.1006/jtbi.2000.2062, available online at <http://www.idealibrary.com> on
- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fis.Sci.* 2: 93-108.
- Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9: 133-139.
- Chang, C.C., M.H.Yang, H.M., Wen, and J.C., Chern, 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal* ; 10: 178-182.
- Colombo, M. L., and E. Bosisio. 1996. Pharmacological Activities of *Chelidonium majus* L.(Papaveraceae). *Pharmacological Research*, 33, 127 - 134.

- Cotelle, N., J. L., Bemier, J. P., Catteau, J., Pommery, J.C., Wallet, and E. M. Caydou, 1996 Antioxidant properties of hydroxylflavones. *Free Radi. Biol. Med.*, 20 (1), 35-43.
- Cody .1988. Crystal and molecular structure of flavonoid. In *Plant Flavonoid in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R.Liss.New York. NY USA.29-44
- Cowan, M. M., 1985. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge 243 p.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Modern Menganalisa Tumbuhan Terbitan ke-2 Diterjemahkan oleh Padmawinata K. dan Soediro L. Penerbit ITB Bandung. Terjemahan dari Phitochrnical Methods*.
- Harbone,J. B, and C.A., Williams 2000. Advances in Flavonoids Reseach Since 1992. *Fitochemistry*, 55:481-504
- Havstoon B. 1983. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochem Pharmacol* 32;1141-1148
- Harlina, A. Prajitno, E.Suprayitno, and H. Nursyam, 2013a. The Idenrification of Chemical Compaund and Antibacrerial Activity Test of Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) Leaf Extract Again Vibriosis-causing *Vibrio harveyi* (MR 275 Rif) on Tiger shrimp. *Aquatic Science and Tecnology*, 1(2),15-29.<http://dx.doi.org/10.5296/ast.plii.3558>.
- Harlina, Hasnidar dan Rusli, 2013b. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L) Terhadap Bakteri *V. harveyi* Penyebab Vibriosis pada Pasca Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Prosiding. Disampaikan pada Seminar Nasional Kelautan dan Perikanan 1, Kupang 12 Oktober 2013.
- Harlina, A. Prajitno, E.Suprayitno, and H. Nursyam, 2013c. Uji toksisitas Ekstrak Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) terhadap Pasca Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Prosiding Seminar nasional. Strategi dan Prospek Pembangunan Akuakultur dalam Rangka menyongsong Asean Economic Community 2015 Disampaikan pada seminar Nasional Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung Mangkurat. Banjarbaru Indonesia
- Harlina, H., A. Prajitno, E. Suprayitno, H. Nursyam and Rosmiati 2015. Potential Study of Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) Leaves as

- Antibacterial Against *Vibrio harveyi*, Disease Causative Agent of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Post Larvae. Journal Aquatic Research and Development, 6:10 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000372>
- Herawati, E. 1996. *Karakterisasi Fisiologi dan Genetik Vibrio Berpendar sebagai Penyebab Penyakit Udang Windu*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Isnansetyo, A. T., E. P, Setyowati, and H. H., Anshory, 2009. *In vitro* Antibacterial Activity of Methanol Extract of a Sponge, *Geodia* sp. Against oxytetracyclin-resistant *Vibrio harveyi* and its toxicity. J. Biol. Sci 9: 224-230.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Yogyakarta: Gadjahmada University Press.
- Prajitno. A., 2006. *Vibrio harveyi* Disease Control with Sea weeds Extract (*Halimeda opuntia*) on Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fab. Post Larvae 13. Dissertation. Graduate Program. Brawijaya University. Malang. Indonesian.
- Rosmiati, M. Habsah and T. Sifzizul, T. Muhammad, N. Musa, A. Ahmad, N. Ismail, F. Mohamad, and Nurhidayah. 2011a. *In vitro* antagonistic activities of Indonesian marine sponge *Aaptos aaptos* and *Callyspongia pseudoreticulata* extracts and their toxicity against *Vibrio* spp. *Indonesian Aquaculture Journal* 6 (2): 173-182.
- , M. Habsah and T. Sifzizul and T. Muhammad. 2011b. Biological activities of methanolic extracts of several sponge species. Proceeding of Universiti Malaysia Terengganu 10th *International Annual Symposium, UMTAS 2011 on July 11-13*.
- Salosso., Y., 2011. Senyawa Bioaktif Makro Alga Coklat Padina Austrialis Sebagai Antibakteri Alami Dalam Pengendalian Vibriosis pada Budidaya Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptus altivelis*). Disertasi. Program. Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Salosso, Y. and Jasmanindar, Y. 2014. Potential of patikan kerbau (*Euphorbia hirta*) as antibacterial on *Aeromonas hydrophilla* and *Vibrio alginolitycus* in fish culture. *Aquatic Science and Technology* 2(1):63-72. <http://dx.doi.org/10.5296/st.v2i1.4916>
- Shutz, B. A., A. D., Wright, T., Rali, & O. Stucher, 1995. Prenylated Avanones from Leaves of *Macaranga pleiostemona*. *Phytochemistry*, 40, 1273-1277.

- Tereschuk, M.L., M.V.Q., Riera, G.R., Castro, and L.R., Abdala, 1997. Antibacterial Activity of Flavonoids From Leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 227-232
- Tripathi, N., S. Kumar, R. Singh, C.J.Singh, P. Singh and V.K.Varshney. 2013. Isolation and Identification of β - Sitosterol by GC-MS from the Leaves of *Girardinia heterophylla* (Decne). *The Open Bioactive Compounds Journal*, 4, 25-27
- Vital P. G., and W. L. Rivera. 2009. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L.f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(7):511-518.
- Vaughn, S. F. 1995. Phytotoxic and Antimicrobial Activity of 5,7-dihydroxychromone from Peanut Shells. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 107-115.
- Waage, S.K. and P.A., Hedin 1985. Quercetin 3-Ogalactosyl (1 6)-glucoside with antibacterial activity. *Phytochemistry*, 24 (2), 243-245.
- Wibowo, M. A., Aulanni'am,., & F.Rahman, (2008). Phytochemical Screening of Methanol Fraction Diethyl n- Hexane Etern Kesum Leaf Extract (*Polygonum minus*). *Proceedings of National Seminar on Research of Biological Sciences*, UB, July 24, 2008.
- Xiao-qin, L , S. Xiao-hong, C. Shuang, Y. Xi-xiang, L. Fa-mei 2009. Investigation on the Chemical Constituents and Variation of Buds of the Flower *Lonicera* Species by UPLC-ESI-MS/MS and Principle Component Analysis. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44: 895-904
- Yu,H.B., S.S. Rao, H.C. Lee, S. Vilches, S. Merino, J.M. Tomas, and K.Y. Leung. 2006. A Tipe III Secretion System is Required For *Aeromonas hydrophila* AH-1 Pathogenesis. *Infection and Immunity*.72
- Zulham, R., 2004. Potensi extract mangrove *Sonneratia caseolaris* dan *Avicennia marina* untuk Pengendalian Bakteri *Vibrio harveyi* pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.), Master Thesis, Institute Pertanian Bogor, Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Akinmoladun, A.C., E.O. Ibokun and I.A. Dan-Ologe. 2007. Phytochemical Constituents and Antioxidant Properties of Extracts From the Leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific Research and Essay*, 2 (6): 191-194
- Alcaradz, L.E., S.E., Blanco, O.N., Puig, F.Tomad and F.H., and Feretti, 2000. Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. theor. Biology* 205,231-240 doi:10.1006/jtbi.2000.2062, available online at <http://www.idealibrary.com> on
- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fis.Sci.* 2: 93-108.
- Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9: 133-139.
- Chang, C.C., M.H.Yang, H.M., Wen, and J.C., Chern, 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal* ; 10: 178-182.
- Colombo, M. L., and E. Bosisio. 1996. Pharmacological Activities of *Chelidonium majus* L.(Papaveraceae). *Pharmacological Research*, 33, 127 - 134.

- Cotelle, N., J. L., Bemier, J. P., Catteau, J., Pommery, J.C., Wallet, and E. M. Caydou, 1996 Antioxidant properties of hydroxylflavones. *Free Radi. Biol. Med.*, 20 (1), 35-43.
- Cody .1988. Crystal and molecular structure of flavonoid. In *Plant Flavonoid in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R.Liss.New York. NY USA.29-44
- Cowan, M. M., 1985. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge 243 p.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Modern Menganalisa Tumbuhan Terbitan ke-2 Diterjemahkan oleh Padmawinata K. dan Soediro L. Penerbit ITB Bandung. Terjemahan dari Phitochrnical Methods*.
- Harbone,J. B, and C.A., Williams 2000. Advances in Flavonoids Reseach Since 1992. *Fitochemistry*, 55:481-504
- Havstoon B. 1983. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochem Pharmacol* 32;1141-1148
- Harlina, A. Prajitno, E.Suprayitno, and H. Nursyam, 2013a. The Idenrification of Chemical Compaund and Antibacrerial Activity Test of Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) Leaf Extract Again Vibriosis-causing *Vibrio harveyi* (MR 275 Rif) on Tiger shrimp. *Aquatic Science and Tecnology*, 1(2),15-29.<http://dx.doi.org/10.5296/ast.plii.3558>.
- Harlina, Hasnidar dan Rusli, 2013b. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L) Terhadap Bakteri *V. harveyi* Penyebab Vibriosis pada Pasca Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Prosiding. Disampaikan pada Seminar Nasional Kelautan dan Perikanan 1, Kupang 12 Oktober 2013.
- Harlina, A. Prajitno, E.Suprayitno, and H. Nursyam, 2013c. Uji toksisitas Ekstrak Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) terhadap Pasca Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Prosiding Seminar nasional. Strategi dan Prospek Pembangunan Akuakultur dalam Rangka menyongsong Asean Economic Community 2015 Disampaikan pada seminar Nasional Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung Mangkurat. Banjarbaru Indonesia
- Harlina, H., A. Prajitno, E. Suprayitno, H. Nursyam and Rosmiati 2015. Potential Study of Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) Leaves as

- Antibacterial Against *Vibrio harveyi*, Disease Causative Agent of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Post Larvae. Journal Aquatic Research and Development, 6:10 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000372>
- Herawati, E. 1996. *Karakterisasi Fisiologi dan Genetik Vibrio Berpendar sebagai Penyebab Penyakit Udang Windu*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Isnansetyo, A. T., E. P, Setyowati, and H. H., Anshory, 2009. *In vitro* Antibacterial Activity of Methanol Extract of a Sponge, Geodia sp. Against oxytetracyclin-resistant *Vibrio harveyi* and its toxicity. J. Biol. Sci 9: 224-230.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Yogyakarta: Gadjahmada University Press.
- Prajitno. A., 2006. *Vibrio harveyi* Disease Control with Sea weeds Extract (*Halimeda opuntia*) on Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fab.Post Larvae 13. Dissertation. Graduate Program. Brawijaya University. Malang. Indonesian.
- Rosmiati, M. Habsah and T. Sifzizul, T. Muhammad, N. Musa, A. Ahmad, N. Ismail, F. Mohamad, and Nurhidayah. 2011a. *In vitro* antagonistic activities of Indonesian marine sponge *Aaptos aaptos* and *Callyspongia pseudoreticulata* extracts and their toxicity against *Vibrio* spp. *Indonesian Aquaculture Journal* 6 (2): 173-182.
- , M. Habsah and T. Sifzizul and T. Muhammad. 2011b. Biological activities of methanolic extracts of several sponge species. Proceeding of Universiti Malaysia Terengganu 10th *International Annual Symposium, UMTAS 2011 on July 11-13*.
- Salosso., Y., 2011. Senyawa Bioaktif Makro Alga Coklat Padina Austrialis Sebagai Antibakteri Alami Dalam Pengendalian Vibriosis pada Budidaya Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptus altivelis*). Disertasi. Program. Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Salosso, Y. and Jasmanindar, Y. 2014. Potential of patikan kerbau (*Euphorbia hirta*) as antibacterial on *Aeromonas hydrophilla* and *Vibrio alginolitycus* in fish culture. *Aquatic Science and Technology*2(1):63-72.<http://dx.doi.org/10.5296/st.v2i1.4916>
- Shutz, B. A., A. D.,Wright, T., Rali, & O. Stucher, 1995. Prenylated Avanones from Leaves of *Macaranga pleiostemona*. *Phytochemistry*, 40, 1273-1277.

- Tereschuk, M.L., M.V.Q., Riera, G.R., Castro, and L.R., Abdala, 1997. Antibacterial Activity of Flavonoids From Leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 227-232
- Tripathi, N., S. Kumar, R. Singh, C.J.Singh, P. Singh and V.K.Varshney. 2013. Isolation and Identification of β - Sitosterol by GC-MS from the Leaves of *Girardinia heterophylla* (Decne). *The Open Bioactive Compounds Journal*, 4, 25-27
- Vital P. G., and W. L. Rivera. 2009. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L.f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(7):511-518.
- Vaughn, S. F. 1995. Phytotoxic and Antimicrobial Activity of 5,7-dihydroxychromone from Peanut Shells. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 107-115.
- Waage, S.K. and P.A., Hedin 1985. Quercetin 3-Ogalactosyl (1 6)-glucoside with antibacterial activity. *Phytochemistry*, 24 (2), 243-245.
- Wibowo, M. A., Aulanni'am,., & F.Rahman, (2008). Phytochemical Screening of Methanol Fraction Diethyl n- Hexane Etern Kesum Leaf Extract (*Polygonum minus*). *Proceedings of National Seminar on Research of Biological Sciences*, UB, July 24, 2008.
- Xiao-qin, L , S. Xiao-hong, C. Shuang, Y. Xi-xiang, L. Fa-mei 2009. Investigation on the Chemical Constituents and Variation of Buds of the Flower *Lonicera* Species by UPLC-ESI-MS/MS and Principle Component Analysis. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44: 895-904
- Yu,H.B., S.S. Rao, H.C. Lee, S. Vilches, S. Merino, J.M. Tomas, and K.Y. Leung. 2006. A Tipe III Secretion System is Required For *Aeromonas hydrophila* AH-1 Pathogenesis. *Infection and Immunity*.72
- Zulham, R., 2004. Potensi extract mangrove *Sonneratia caseolaris* dan *Avicenia marina* untuk Pengendalian Bakteri *Vibrio harveyi* pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.), Master Thesis, Institute Pertanian Bogor, Indonesia.



Dr. Ir. Harlina, MP, dilahirkan di Mare, Kabupaten Bone Sulawesi Selatan pada tanggal 1 Maret 1965, putri kedua dari pasangan Ayah H. Andi Usman, BA (Almarhum) dan Ibu Hj. Hafsa A. Tawa. Menikah dengan H. Andi Muhammad Asra, SH dan dikaruniai tiga orang anak yaitu Andi Nur Auliyah Asra, SH., MH, dr. Andi Nur Fadhilah Asra dan Andi Muhammad Aliffar Affan dengan dikaruniai 3 orang cucu Nabil, Azka dan Syafiq.

Menempuh pendidikan Sekolah Dasar di SDN Inpres 10 Pattiro Bajo, Kecamatan SibuluE Kabupaten Bone Sulawesi Selatan pada tahun 1976, Pendidikan Menengah Pertama di SMP Negeri SibuluE Kab Bone tahun 1980 dan pendidikan Menengah Atas di SMPP Negeri Watampone pada tahun 1983. Gelar Sarjana S1 diperoleh pada tahun 1987 pada Fakultas Peternakan Jurusan Perikanan Universitas Hasanuddin. Melanjutkan pendidikan Strata 2 (S2) pada Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin pada program studi Sistem-Sistem Pertanian jurusan Perikanan tahun 1994 dan memperoleh Gelar Magister Perikanan pada tahun 1996 dengan predikat "Cum Laude". Pada tahun 2011 melanjutkan pendidikan Strata 3 (S3) pada Program Doktor Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang minat Budidaya Perairan Tropis, dan memperoleh Gelar Doktor 2014 dengan predikat "Pujian" pada bidang keahlian pengendalian penyakit pada ikan dan udang. Memperoleh penghargaan sebagai wisudawan terbaik pada Program Doktor dalam acara Wisuda Sarjana Periode III tahun 2014 Universitas Brawijaya Malang.

Pengalaman bekerja diawali sebagai Asisten Dosen di Fakultas Perikanan Universitas Muslim Indonesia pada tahun 1987. Pada tahun 1988 diterima sebagai Dosen Tetap pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Muslim Indonesia Makassar Sulawesi Selatan sampai sekarang. Penulis pernah diamanahkan sebagai Kepala Laboratorium Biologi Universitas Muslim Indonesia pada Tahun 1991-1994. Pada tahun 2001-2004 diamanahkan sebagai Sekertaris Jurusan Budidaya Perairan dan pada tahun 2009-2011 sebagai Ketua Jurusan Budidaya Perairan. Pada tahun 2014-2018 sebagai kepala Laboratorium Biologi Terpadu dan tahun 2018 sampai sekarang diamanahkan sebagai Ketua Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Muslim Indonesia, Makassar.

Penulis aktif sebagai peneliti dan pengabdian kepada masyarakat, mengikuti berbagai pelatihan, lokakarya, dan juga aktif ikut serta dalam pertemuan ilmiah serta menulis berbagai artikel ilmiah baik pada jurnal nasional maupun jurnal internasional.

alZikra

Aroepala Celebes Garden
Jl. Abdul Kadir Dg. Suro Unit 1
Samata - Gowa - Sulawesi Selatan
Telp. (0411) 4675359 - 082315444789

ISBN 978-602-5555-09-6



9 786025 555046