

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi Budidaya Udang dan Ikan

Produksi perikanan nasional meningkat sebesar 6,2% per tahun, yaitu dari 11,66 juta ton pada tahun 2010 menjadi 12,38 juta ton pada tahun 2011. Capaian produksi perikanan tersebut didukung oleh kontribusi perikanan budidaya yang terus mengalami kenaikan, yakni mencapai 11,13% per tahun selama periode 2010-2011. Meningkatnya produksi perikanan budidaya didukung oleh pencapaian komoditas ikan dan udang. KKP menargetkan pada tahun 2014 produksi perikanan budidaya mencapai 16,891 juta ton (Renstra Kementerian Kelautan dan Perikanan 2010-2014).

2.2 Penyakit pada Udang

Penurunan produksi udang salah satunya disebabkan oleh penyakit baik itu penyakit virus maupun bakteri. *Vibriosis* merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp, bersifat akut dan dapat mematikan larva udang dalam waktu 1 sampai 3 hari (Rukyani *et al.*, 1992 dalam Maryani, 2002). *Vibriosis* menginfeksi udang di pembenihan maupun di tambak dan yang sering ditemukan di tambak yaitu *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulvificus*, dan *V. fluvialis* (Lightner, 1992; Boer dan Zafran. 1992). Gejala klinis udang yang terserang *vibriosis* yaitu kondisi tubuh lemah, nampak kusam, nampak kotor, berenang lambat, nafsu makan hilang, badan

mempunyai bercak bercak merah (*reddiscoloration*) pada pleopod dan abdominal serta pada malam hari terlihat menyala. Udang windu dewasa yang terkena vibriosis nampak *hypoxic*, menunjukkan badan yang merah dan insang coklat, nafsu makan kurang dan udang berenang lemah di tepi dan permukaan kolam (Anderson *et al.*, 1988). *Postlarvae* yang terkena infeksi juga memperlihatkan pergerakan yang kurang, mengurangi *phototaxis* dan usus kosong, hilangnya otot, jaringan yang tidak jelas, peradangan usus atau hepatopankreas dan atau keracunan darah (Lightner, 1992).

Vibriosis adalah suatu permasalahan umum diseluruh dunia, *Vibrio harveyi* terus berlanjut menyebabkan angka kematian diseluruh dunia diperkirakan diatas 30% pada larva udang windu, postlarva dan dewasa pada kondisi udang yang stres. Suatu strain *Vibrio* yang sangat patogen juga telah muncul dan terus menyebabkan angka kematian dalam budidaya udang (Le Groumellec *et al.*, 1996).

Bakteri *Vibrio* sp memiliki ciri morfologi dan fisiologi sebagai berikut: bentuk koloni bulat, elevasi cembung, berwarna krem dengan diameter 2-3 mm pada media agar SWC. Bersifat gram negatif, sel tunggal berbentuk batang pendek yang bengkok atau lurus, motil, oksidase positif, sensitif terhadap uji vibriostatik O/129, tidak membentuk H₂S, tidak membentuk gas dari fermentasi terhadap D-glukosa, tumbuh pada media dengan penambahan 1-6 % NaCl, dan mempunyai flagella pada salah satu kutub selnya (Suwanto *et al.*, 1998 dalam Tepu, 2006).

Vibriosis dapat menyerang udang dari fase larva hingga dewasa. *Vibrio harveyi* bersifat oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang bersifat saprofitik dan berkembang menjadi

patogenik apabila kondisi lingkungan dan inangnya memburuk. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 30⁰C, salinitas antara 20-30 ppt dengan pH 7,0 dan bersifat anaerobik fakultatif, yaitu dapat hidup dengan oksigen atau tanpa adanya oksigen (Holt dan Krieg, 1984).

2.3 Penyakit pada Ikan

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri pada ikan khususnya yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* mulai dikenal di Indonesia sekitar tahun 1980, dimana bakteri ini menyebabkan wabah penyakit pada ikan karper di wilayah Jawa Barat dan menyebabkan kematian sebanyak 125 ton. Di tahun yang sama kejadian serupa juga terjadi dan menyerang spesies ikan mas, penyakit tersebut dikenal dengan penyakit “*ulcerative disease*” atau penyakit borok atau penyakit merah yang mengakibatkan kematian sekitar kurang lebih 173 ton jenis ikan mas termasuk didalamnya 30% ikan-ikan kecil dan benih mati disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* sp dan *Pseudomonas* sp. Penyakit ini dapat menyebabkan sistemik yang menimbulkan kematian ikan yang tinggi, menyerang ikan-ikan budidaya dan dalam waktu singkat menyebar kedaerah lain (Lukistyowati, 2012).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri gram negatif, dimana mempunyai karakteristik berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil, mempunyai satu flagel, hidup pada kisaran suhu 25–30⁰C. Jika organisme terkena serangan bakteri maka akan mengakibatkan gejala penyakit *hemorhagi septicaemia* yang mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: terdapat luka dipermukaan tubuh, insang, ulser, abses, dan perut gembung.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* sangat mempengaruhi usaha budidaya ikan air tawar dan seringkali menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi (80 – 100%) dalam kurun waktu yang singkat (1–2 minggu).

Di dalam tubuh bakteri *Aeromonas hydrophila* terdapat *gen aero* dan *hlya* yang bertanggung jawab dalam memproduksi racun *aerolysin* dan *hemolysin* dimana *aerolysin* merupakan protein ekstraseluler yang diproduksi oleh beberapa strain *A. hydrophila* yang bisa larut, bersifat hidrofilik dan mempunyai sifat hemolitik serta sitolitik. Mekanisme racun *aerolysin* pada bakteri *Aeromonas hydrophila* dalam menyerang dan menginfeksi racun pada ikan yaitu dengan mengikat reseptor glikoprotein spesifik pada permukaan sel eukariot sebelum masuk ke dalam lapisan lemak dan membentuk lubang. Racun *aerolysin* yang membentuk lubang melintas masuk ke dalam membran bakteri sebagai suatu preprotoksin yang mengandung peptida. Racun tersebut dapat menyerang sel-sel epithelia dan menyebabkan gastroenteritis (Lukistyowati, 2012).

Proses invasi bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* kedalam tubuh *host* adalah diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit dengan memanfaatkan pili, flagela dan kait untuk bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Selama proses berlangsung bakteri *Aeromonas hydrophila* memproduksi enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi lapisan kitin sehingga bakteri dapat dengan mudah masuk kedalam *host*. Selain memanfaatkan kitinase bakteri *Aeromonas hydrophila* juga mengeluarkan enzim lainnya seperti lesitinase dalam upaya masuk kedalam aliran darah (Mangunwardoyo *et al.*, 2010).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk patogen oportunistik yang hampir selalu terdapat di air dan seringkali menimbulkan penyakit apabila ikan dalam kondisi yang kurang baik. Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* ditandai dengan adanya bercak merah pada ikan dan menimbulkan kerusakan pada kulit, insang dan organ dalam. Penyebaran penyakit bakterial pada ikan umumnya sangat cepat serta dapat menyebabkan kematian yang sangat tinggi pada ikan-ikan yang diserangnya. Gejala klinis yang timbul pada ikan yang terserang infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah gerakan ikan menjadi lamban, ikan cenderung diam di dasar, luka/borok pada daerah yang terinfeksi, perdarahan pada bagian pangkal sirip ekor dan sirip punggung, dan pada perut bagian bawah terlihat buncit dan terjadi pembengkakan. Ikan sebelum mati naik ke permukaan air dengan sikap berenang yang labil (Rahmaningsih, 2012).

2.4 Senyawa Antimikroba

Senyawa antibakteri yaitu senyawa biologis atau kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri (Pelczar *et al.*, 2005). Senyawa antibakteri harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, antimikroba dapat bersifat bakterisidal yaitu membunuh bakteri, bakteristatik yaitu menghambat pertumbuhan bakteri, dan bakterilitik yaitu merusak germinasi spora bakteri (Jawet, 1998). Aktivitas antimikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain pH, lingkungan, stabilitas senyawa antibakteri, suhu, lingkungan, takaran inokulum mikroorganisme, waktu inkubasi, dan aktivitas metabolisme mikroorganisme (Irianto, 2007).

Kekuatan pada antibiotik-antibakteri yaitu pada daerah yang memiliki hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm memiliki daya hambat kuat, daerah hambatan 5-10 mm yaitu sedang, dan daerah hambatan 5 mm atau kurang memiliki daya hambat lemah (David dan Strout, 1971). Faktor-faktor yang mempengaruhi ukuran daerah hambatan yaitu sensitivitas organisme, medium kultur, kondisi inkubasi, dan kecepatan difusi agar. Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan difusi agar, yaitu konsentrasi mikroorganisme, komposisi media, suhu inkubasi, media, dan waktu inkubasi (Schegel *et al.*, 1994).

Burgess *et al.* (1999), menyatakan bahwa interaksi kimiawi antara spesies bakteri yang berbeda dapat menyebabkan produksi dan sekresi metabolit sekunder berupa senyawa antimikroba. Produksi senyawa antimikroba oleh bakteri akan meningkat bila bakteri tersebut tumbuh bersama dengan strain bakteri yang berbeda sebagai akibat adanya kompetisi untuk mendapatkan ruang. Selain itu bakteri yang pada awalnya tidak memproduksi senyawa aktif apapun akan memproduksi saat bakteri tersebut terpapar oleh produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri lain (Amstrong *et al.*, 2001).

2.5 Ekstraksi Senyawa Antimikroba

Ekstraksi yaitu sebuah proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi yaitu lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Hal

yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut yang digunakan yaitu daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Khopkar, 2003).

Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka akan semakin besar polaritas pelarut tersebut (Sudarmadji *et al.*, 2007).

Heksana memiliki konstanta dielektrik sebesar 1,89 Db, indeks polaritas 0, titik didih 69⁰C dan titik beku -94⁰C (Sudarmadji *et al.* 2007). Nilai konstanta dielektrik pelarut heksana merupakan konstanta paling rendah apabila dibandingkan dengan konstanta dielektrik pelarut yang lain, sehingga pelarut heksana termasuk dalam pelarut non polar.

Etil asetat merupakan pelarut polar menengah (semi polar) yang volatil, tidak beracun dan tidak higroskopis. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3% dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya akan meningkat di suhu yang lebih tinggi. Etil asetat adalah senyawa organik yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat diproduksi dalam skala besar dan digunakan sebagai pelarut (Fessenden, 1997 dalam Daluningrum *et al.*, 2009). Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mampu mengekstrak fenol, terpenoid, alkaloid, aglikon dan aglisida dari suatu bahan (Harborne, 1987 dalam Daluningrum *et al.*, 2009).

Metanol merupakan salah satu pelarut alkohol yang penting dan paling sederhana. Metanol juga dikenal sebagai alkohol kayu atau spiritus dan

merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Metanol digunakan sebagai bahan pendingin anti beku karena titik bekunya yang rendah yaitu -98°C , pelarut bahan bakar dan sebagai bahan aditif pada industri etanol. Penggunaan metanol terbanyak saat ini adalah sebagai bahan pembuat bahan kimia lainnya. Sekitar 40% metanol diubah menjadi formaldehid yang kemudian diaplikasikan dalam berbagai macam produk seperti plastik, kayu lapis, cat, peledak dan tekstil (Fessenden, 1997 dalam Daluningrum *et al.*, 2009). Yuharmen *et al.* (2002), melaporkan metanol digunakan sebagai pelarut dalam uji antimikroba dari lengkuas. Dari penelitian tersebut diperoleh informasi bahwa ekstrak metanol mengandung flavonoid, fenol dan terpenoid.

2.6 Potensi Senyawa Antimikroba

Kebutuhan antibiotik baru masih tinggi terutama yang dapat melawan bakteri patogen khususnya pada udang. Memodifikasi antibiotik yang sudah ada untuk mendapatkan senyawa turunan antibiotik baru telah dilakukan tetapi kenyataannya mikroorganisme memiliki kemampuan untuk bermutasi sehingga memiliki mekanisme resistensi terhadap antibiotik tersebut (Suwandi, 1993 dalam Hermawan *et al.*, 2013).

Penelitian tentang potensi senyawa antimikroba terus meningkat, Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol melakukan penelitian tentang pengendalian *Vibrio harveyi* pada larva udang windu dan diperoleh dua isolat bakteri penghambat yaitu GSB-95030 dan GSB-95033 (Roza *et al.*, 1998 dalam AlRozi, 2008). Berdasarkan uji biokimia dan karakteristik biologis isolat GSB-95030 diidentifikasi sebagai *Vibrio alginolyticus* sedangkan isolat

GSB-95033 diidentifikasi sebagai *Flavobacterium meningosepticum*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diketahui bahwa kedua isolat bakteri penghambat GSB-95030 dan GSB-95033 mempunyai aktivitas dalam menghambat perkembangan *Vibrio harveyi*. Bakteri yang bersimbiosis dengan gastropoda *Olivia vidua* yaitu isolat TOV 12.16 yang diidentifikasi sebagai *Vibrio ordali* yang diekstraksi dengan tiga pelarut yang berbeda yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol tetapi hanya bakteri yang dilarutkan pada pelarut polar dan semi polar yang mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Hermawan *et al.*, 2012). Isolat BL542 yang diidentifikasikan sebagai *Pseudoalteromonas sp.* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* MR5339 secara *in vitro* maupun *in vivo* pada larva udang windu dari senyawa antimikroba yang dihasilkannya (Muliani *et al.* 2002).

2.7 Isolat Bakteri Biokontrol D2.2

Isolat bakteri kandidat biokontrol didapat dari tambak udang windu tradisional di Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung. Isolat bakteri laut yang didapat mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* sebanyak 0,34% dari 293 isolat, ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri agen biokontrol. Dari 293 isolat bakteri yang berhasil dikoleksi, hanya terdapat satu isolat (D2.2) yang potensial menghambat *V. harveyi*, yaitu dengan adanya zona hambat terhadap *V. harveyi* pada uji antagonisme dengan media agar *double layer* (Mariska *et al.*, 2013).

2.8 Analisis Sekuen 16S rDNA

Salah satu metode terbaik dalam mengidentifikasi spesies bakteri yaitu dengan mengetahui struktur DNA atau dengan teknik sekuen 16S rDNA. RNA merupakan polimer yang tersusun dari sejumlah nukleotida. Setiap nukleotida memiliki satu gugus fosfat, satu gugus pentosa, dan satu gugus basa nitrogen. RNA memiliki tiga tipe yaitu messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA). Ribosomal RNA (rRNA) sisandikan oleh sebagian DNA sehingga bagian tersebut disebut DNA ribosom (rDNA). Pada bakteri ternyata bagian ini memperlihatkan tidak banyak perubahan selama evolusi, sehingga analisis sekuen rDNA merupakan cara yang paling akurat untuk menentukan kekerabatan bakteri (Boye *et al.*, 1999).

RNA ribosom pada prokariot memiliki sub unit besar dan kecil, sub unit besar disebut 5S dengan ukuran nukleotida 120 dan 23S dengan ukuran nukleotida 2900, sedangkan sub unit kecil disebut 16S dengan ukuran nukleotida 1500. Pada bagian sub unit kecil atau 16S rDNA inilah urutan basa nukleotida tidak berubah selama evolusi, sehingga untuk mengetahui kekerabatan antar bakteri dilakukan analisis sekuen 16S rDNA (Boye *et al.*, 1999).

DNA memiliki struktur utas ganda yang antiparalel dengan komponen-komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincin-ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal. Ketika guanin berikatan dengan sitosin, maka akan terbentuk tiga ikatan hidrogen, sedangkan ketika Adenin berikatan dengan

Timin maka hanya akan terbentuk dua ikatan hidrogen. Satu komponen pembangun DNA terdiri atas satu gula pentosa, satu gugus fosfat dan satu pasang basa yang disebut nukleotida (Alberts *et al.*, 2002).

Secara umum analisis 16S rDNA yang dikembangkan oleh Frederick Sanger yang banyak digunakan yaitu melibatkan terminasi atau penghentian reaksi sintesis DNA *in vitro* yang spesifik untuk sekuens tertentu menggunakan substrat nukleotida yang telah dimodifikasi.

Sekuens DNA menyandikan informasi yang diperlukan bagi makhluk hidup untuk melangsungkan hidup dan berkembang biak. Dengan demikian, penentuan sekuens DNA berguna untuk mengetahui mengapa dan bagaimana makhluk hidup dapat hidup, selain berguna dalam penerapan praktis. Karena DNA merupakan ciri kunci makhluk hidup, pengetahuan akan sekuens DNA dapat berguna dalam penelitian biologi manapun.

RNA dibentuk dengan transkripsi dari DNA, informasi yang dikandung RNA juga terdapat di dalam DNA cetakannya sehingga sekuensing DNA cetakan tersebut sudah cukup untuk membaca informasi pada RNA. Perpanjangan atau ekstensi rantai DNA dimulai pada situs spesifik pada DNA cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut primer yang komplementer terhadap DNA pada daerah situs tersebut. Primer tersebut diperpanjang menggunakan DNA polimerase, enzim yang mereplikasi DNA. Bersama dengan primer dan DNA polimerase, diikutsertakan pula empat jenis basa deoksinukleotida (satuan pembentuk DNA), juga nukleotida pemutus atau penghenti rantai (terminator rantai) dalam konsentrasi rendah (biasanya di-deoksinukleotida). Penggabungan nukleotida pemutus rantai tersebut secara

terbatas kepada rantai DNA oleh polimerase DNA menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang berhenti bertumbuh hanya pada posisi pada DNA tempat nukleotida tertentu tersebut tergabungkan. Fragmen-fragmen DNA tersebut lalu dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Alberts *et al.*, 2002). Seiring dengan perkembangannya, kini terdapat beberapa macam metode sekuensing terminasi rantai yang berbeda satu sama lain terutama dalam hal pendeteksian fragmen DNA hasil reaksi sekuensing.