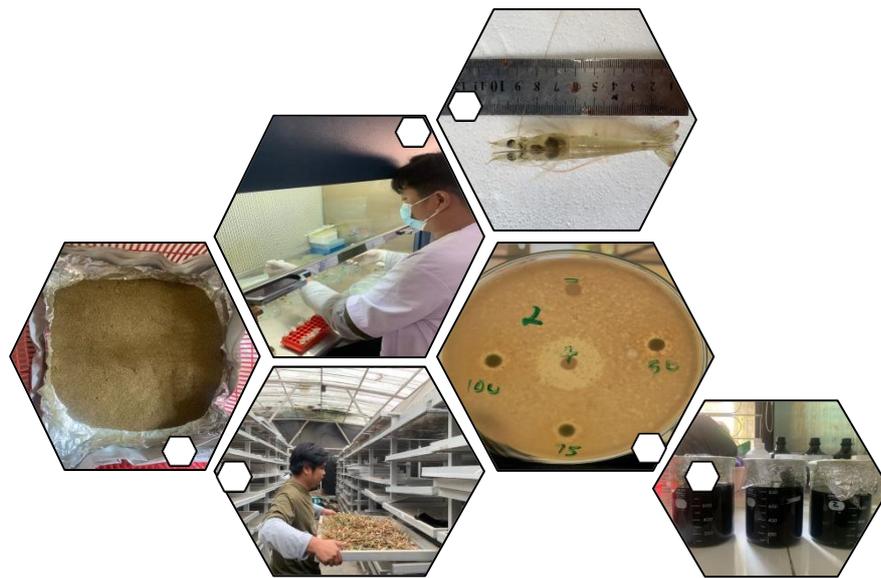


**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A.Juss)
TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* PADA
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)**

**Effectiveness of Giving Mimba Leaf Extract (*Azadirachta indica* A.Juss)
to *Vibrio Parahaemolyticus* Bacteri Infection in
Vaname Shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)**



**JORDI
L012221032**



**PROGRAM MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A.Juss)
TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* PADA
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)**

Jordi

L012221032



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**Effectiveness of Giving Mimba Leaf Extract (*Azadirachta indica* A.Juss)
to *Vibrio Parahaemolyticus* Bacteri Infection in
Vaname Shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)**

Jordi

L012221032



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

PERNYATAAN PENGAJUAN

**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A.Juss)
TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* PADA
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

JORDI
L012221032

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A.Juss)
TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* PADA
UDANG VANAME (*Panaeus vannamei* Boone, 1931)

JORDI
L012221032

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Magister pada tanggal 1 bulan Agustus tahun 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Study Magister Ilmu Perikanan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



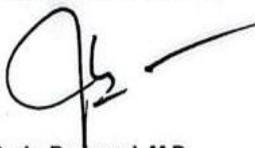
Dr. Gunarto Latama, M.Sc.
NIP. 1962022 4198811 1 001

Pembimbing Pendamping,



Dr. Marlina Achmad, S.Pi, M.Si
NIP. 198304 06200501 2 002

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Perikanan,



Dr. Ir. Badraeni, M.P
NIP. 19651023 199103 2 001

Dekan Fakultas Ilmu Kelautan dan
Perikanan, Universitas Hasanuddin



Prof. Safrudin, S.Pi., MP., Ph.D
NIP. 19750611 200312 1 003

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Efektifitas Pemberian Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A.juss) Terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* Pada Udang vaname (*Panaeus vannamei* Boone, 1931)" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Gunarto Latama, M.Sc. dan Dr. Marlina Achmad, S.Pi, M.Si). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 9 Agustus 2024



JORDI
L012221032

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas berkat rahmat dan Hidayah-Nya Tesis yang berjudul **“Efektifitas Pemberian Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio arahaemolyticus* pada Udang Vaname (*Penaeus vannamei* Boone 1931)”** pada 2024, dapat terselesaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Perikanan pada Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat dirampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan oleh Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc sebagai pembimbing utama dan Dr. Marlina Achmad, S.Pi, M.Si sebagai pembimbing pendamping. Saya juga mengucapkan banyak terimakasih kepada mereka. Ucapan terimakasih juga saya ucapkan kepada Dr. Ir. Sriwulan, M.P, Prof. Dr. Ir. Hilal Anshary, M.Sc, dan Dr. rer.nat. Elmi Hurhaidah Zainuddin, DES, selaku para penasehat yang memberikan pengetahuan dan masukan berupa saran dan kritis yang sangat membangun kepada penulis.

Kepada seluruh staf dan pengajar Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan khususnya para dosen Program Study Magister Ilmu Perikanan yang turut membantu dan memberikan saran pada penyusunan tesis ini saya ucapkan terimakasih.

Akhirnya, kepada orang tua saya tercinta ibu Marwati dan bapak Baharuddin, saudara tercinta Yayang dan Putri, saya mengucapkan terimakasih atas segala doa, motivasi, dan pengorbanan secara moril dan materil selama saya menempuh pendidikan.

Penulis,



JORDI

ABSTRAK

JORDI. Efektifitas pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.juss) terhadap infeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) (yang dibimbing oleh Gunarto Latama dan Marlina Achmad)

Latar Belakang. Udang merupakan salah satu komoditas utama yang saat ini banyak dibudidayakan oleh petambak tradisional dan intensif. Penyakit *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* bakteri ini telah banyak resistensi terhadap antibiotik sintesis. Salah satu alternatif dalam menanganinya adalah penggunaan antibakteri dari bahan alam. Salah satu tanaman yang telah banyak digunakan yaitu mimba. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi senyawa metabolit sekunder dan menganalisis kemampuan ekstrak daun mimba terhadap udang vaname yang terjangkit bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. **Metode.** Penelitian ini menggunakan metode eskperimental dan rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan 100 mg/ml, 75 mg/ml dan 50 mg/ml ekstrak daun mimba. Uji GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun mimba. Uji aktivitas antibakteri dan uji kadar hambat minimum untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun mimba dalam menghambat bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Uji tantang untuk mengetahui *Survival rate*, laju pertumbuhan spesifik, gejala klinis, dan total koloni bakteri udang vaname yang diberikan perlakuan ekstrak daun mimba. **Hasil.** Analisis deskriptif, dan uji statistik Anova menunjukkan ekstrak daun mimba mengandung 12 jenis senyawa metabolit sekunder. Penggunaan konsentrasi ekstrak daun mimba 100 mg/ml, 75 mg/ml dan 50 mg/ml menunjukkan daya hambat kuat dengan kosentrasi minimum sebesar 12,5 mg/ml. Setelah dilakukan uji tantang *Survival rate* udang vaname yang diberi perlakuan ekstrak berjumlah 53,33-80%. Mengurangi jumlah koloni bakteri *Vibrio* sp pada hepatopankreas udang dengan persentase jumlah terkecil $2,9 \times 10^3$ CFU/ml pada perlakuan D (50 mg/ml) dibandingkan perlakuan A (kontrol) yaitu $5,2 \times 10^5$ CFU/ml dimana nilai-niai tersebut berbeda nyata dengan perlakuan kontrol yang tidak diberi ekstrak daun mimba. Sedangkan laju pertumbuhan spesifik berada pada kisaran 20,52-32,04% dan tidak ada perbedaan signifikan terhadap semua perlakuan. Pemberian daun mimba juga mampu mengurangi gejala klinis yang dialami oleh udang vaname dengan pemberian kosentrasi 50 dan 25 mg/ml. **Kesimpulan.** Hasil tersebut mengindikasikan ekstrak daun mimba mempunyai senyawa metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri pada *Vibrio parahaemolyticus* dan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antibakteri pada kegiatan budidaya udang vaname.

Kata kunci : Antibakteri, Daun mimba, *Vibrio parahaemolyticus*, Udang vaname

ABSTRACT

JORDI. Effectiveness of giving mimba leaf extract (*Azadirachta indica* A.juss) to *Vibrio parahaemolyticus* bacteri infection in vaname shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931). (supervised by Gunarto Latama and Marlina Achmad).

Background. Vannamei shrimp is one of the main commodities currently cultivated by traditional and intensive farmers. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), caused by *Vibrio parahaemolyticus* bacteria, has a lot of resistance to synthetic antibiotics. One alternative to handling it is the use of antibacterials from natural materials. One plant that has been widely used is neem. **Aim.** This research uses an experimental method and a complete randomized design (RAL) with treatments of 100 mg/ml, 75 mg/ml, and 50 mg/ml neem leaf extract. A GC-MS test was conducted to identify secondary metabolite compounds contained in neem leaves. Antibacterial activity test and minimum inhibitory level test to determine the ability of neem leaf extract to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* bacteria. And a challenge test to determine the survival rate, specific growth rate, clinical symptoms, and total bacterial colonies of vaname shrimp treated with neem leaf extract. **Results.** Descriptive analysis and an Anova statistical test showed neem leaf extract contains 12 types of secondary metabolite compounds. The use of neem leaf extract concentrations of 100 mg/ml, 75 mg/ml, and 50 mg/ml showed strong inhibition with a minimum concentration of 12.5 mg/ml. after the challenge test The survival rate of vaname shrimp treated with extracts amounted to 53.33–80%. Reducing the number of *Vibrio* sp. bacterial colonies in the hepatopancreas of shrimp with the smallest percentage of 2.9×10^3 CFU/mml in treatment D (50 mg/mml) compared to treatment A (control), which is 5.2×10^5 CFU/mml where these values are significantly different from the control treatment, which is not given neem leaf extract. While the specific growth rate was in the range of 20.52–32.04%, there was no significant difference between all treatments. Neem leaves are also able to reduce clinical symptoms experienced by vaname shrimp by giving concentrations of 50 and 25 mg/mL. **Conclusion.** These results indicate that neem leaf extract has secondary metabolite compounds that can be utilized as antibacterials on *Vibrio parahaemolyticus* and has the potential to be developed as an antibacterial in vaname shrimp farming activities.

Keywords: Antibacterial, Neem leaves, *Vibrio parahaemolyticus*, Vaname shrimps

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined. iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	Error! Bookmark not defined. v
UCAPAN TERIMAKASIH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	2
1.4 Hipotesis	2
1.5 Teori	2
1.5.1 Daun mimba	2
1.5.2 Udang Vaname	4
1.5.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
1.5.4 Ekstraksi	6
1.6 Kerangka pikir	8
BAB II. METODE PENELITIAN	9
2.1 Waktu dan Tempat	9
2.2 Prosedur Penelitian	9
2.2.1 Pengambilan Sampel	9
2.2.2 Sterilisasi Alat dan Bahan	9
2.2.3 Ekstraksi	9
2.2.4 Kultur Bakteri dan Pembuatan Media Kultur	9
2.2.5 Pemeliharaan Udang	10
2.2.6 Uji Tantang	10
2.2.7 Rancangan Penelitian	10
2.3 Parameter Uji	11
2.3.1 Uji GC-MS	11
2.3.2 Uji Aktivitas Antibakteri	11
2.3.3 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)	11
2.3.4 Survival Rate (SR)	12
2.3.5 Pengamatan Gejala Klinis	12
2.3.6 Spesifik Grow Rate (SGR)	12

2.3.7	Perhitungan Koloni Bakteri.....	12
2.3.8	Kualitas Air	13
2.4	Analisis Data	13
BAB III. HASIL.....		14
3.1	Ekstraksi.....	14
3.2	Analisis Uji GC-MS kandungan Ektrak daun Mimba (<i>Azacirachta indica</i> A. juss).....	14
3.3	Uji Aktivitas Antibakteri.....	16
3.4	Uji Kadar Hambat Minimum (KHM).....	17
3.4	<i>Survival Rate</i> (SR) Udang Vaname	18
3.5	Gejala Klinis Udang Vaname	19
3.6	Laju Pertumbuhan Spesifik (SGR).....	21
3.8	Total Bakteri (TPC)	21
3.9	Kualitas Air	22
BAB IV. PEMBAHASAN.....		23
4.1	Ekstraksi Daun Mimba	23
4.2	Analisis GC-MS Daun Mimba	23
4.3	Uji Aktivitas Antibakteri.....	24
4.4	Uji Kadar Hambat Minimum	24
4.5	<i>Survival Rate</i>	25
4.6	Gejala Klinis	25
4.7	Laju Pertumbuhan Spesifik (SGR).....	25
4.8	Total Koloni Bakteri	26
4.9	Kualitas Air	26
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN		27
5.1	Kesimpulan.....	27
5.2	Saran.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....		28
LAMPIRAN.....		37

DAFTAR TABEL

Table 1. Kekuatan daya hambat menurut Zainuddin <i>et al.</i> , (2019).	11
Table 2. Hasil ekstraksi daun mimba	14
Tabel 3. Hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak daun mimba	15
Table 4. Hasil Uji Antibakteri	16
Tabel 5. Hasil Uji Kadar Hambat Minimum	17
Table 6. Hasil Pengamatan Gejala Klinis	19
Table 7. Hasil Perhitungan Bakteri	21
Table 8. Hasil Pengukuran parameter kualitas air	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun, Biji, Bunga , Pohon Mimba (Saxena, 2015)	xii
Gambar 2. Udang vaname (<i>P. Vannamei</i>) (Dokumentasi pribadi)	5
Gambar 3. Kerangka pikir	8
Gambar 4. Tata Letak Wadah Penelitian	11
Gambar 5. Hasil Klimatogram GC-MS	14
Gambar 6. Hasil Uji Antibakteri	16
Gambar 7. Hasil Uji Kadar Hambat Minimum	18
Gambar 8. Persentase <i>Survival Rate</i>	18
Gambar 9. Persentase SGR	21

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang merupakan salah satu unggulan ekspor perikanan di Indonesia. Ekspor udang memiliki kontribusi yang cukup besar dalam menopang perekonomian nasional sebagai sumber devisa. Udang vannamei (*Panaeus vannamei*) adalah salah satu komoditas perikanan laut yang memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi baik di pasar domestik maupun pasar global, dimana 77% diantaranya diproduksi oleh negara-negara Asia termasuk Indonesia (Dahlan *et al.*, 2019). Menurut data dari BPS, 2022 Produksi perikanan budidaya menurut komoditas utamanya udang merupakan salah satu yang terbesar dengan total produksi 861,336 Ton pada tahun 2019. Udang vaname (*P. vannamei*) adalah salah satu jenis udang produksi yang paling banyak diminati untuk dijadikan organisme budidaya, salah satunya di Indonesia karena memiliki banyak keunggulan diantaranya yakni dapat hidup pada rentan salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), waktu pemeliharaan yang relatif lebih cepat berkisar antara 90-115 hari dalam 1 siklus, serta dapat hidup dengan penebaran yang tinggi hingga lebih dari 150 ekor/m² (Supono *et al.*, 2022). Namun banyak hambatan yang terjadi dalam proses budidaya udang terutama dari faktor lingkungan, yaitu timbulnya zat yang berbahaya pada tambak seperti amoniak, nitrogen, dan hipoksia (Wang *et al.*, 2020). Serta munculnya penyakit akibat adanya bakteri yang merugikan dalam tambak (Supono *et al.*, 2022).

Salah satu penyakit yang banyak menjadi penyebab gagalnya panen yaitu munculnya penyakit sindrom kematian dini atau juga dapat disebut *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND), penyakit ini pertama kali muncul di Cina pada tahun 2009 dan setelah itu dilaporkan juga muncul di Thailand dan Malaysia penyakit ini mempunyai dampak yang sangat merugikan bagi petambak karena dapat mematikan 40-100% udang yang telah ditebar dalam kurun waktu 35 hari setelah penebaran (Kongchum *et al.*, 2022). Identifikasi yang dilakukan menunjukkan bahwa penyebab dari munculnya penyakit *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) merupakan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang mengandung plasmid dengan kode gen toksin biner terkait dengan serangga *photorhabdus* (Pir). Pada *V. parahaemolyticus* protein mirip toksin Pir ini disebut dengan PirA dan PirB. Strain *V. Parahaemolyticus* yang menyebabkan AHPND mengandung plasmid 70 kbp (disebut pVA1) dengan pengkodean urutan untuk PirA dan PirB (Han *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2017). Munculnya penyakit ini ditandai dengan gejala klinis berupa hepatopankreas terlihat pucat pertumbuhan yang terhambat dan tingkah laku yang tidak normal seperti saat udang berenang (Mat *et al.*, 2020) Saat ini, pencegahan penyakit AHPND menggunakan antibiotik sintetik seperti *oxytetracycline* (Yeoh *et al.*, 2021), *Tetracycline* dan *Quinolone* (Yasin., 2021) penggunaannya sering tidak diatur (Thornber *et al.*, 2020). Sehingga menyebabkan efek negatif terhadap lingkungan dan manusia sehingga menimbulkan munculnya bakteri resisten (Yeoh *et al.*, 2021). Kemunculan strain bakteri resisten memberikan dampak negatif selama proses budidaya dilaksanakan karena dapat berpotensi mengakibatkan penyakit infeksi yang ditimbulkan sulit diobati, meningkatnya angka kematian, dan mengakibatkan beban ekonomi (Kurnianto & Syahbanu, 2023).

Daun mimba merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif antibakteri. Mimba berasal dari Myanmar dan juga dari kawasan kering subbenua India dan mulai dibudidayakan dibanyak negara Asia dan juga pada negara subtropis (Saxena, 2015). Daun mimba memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder berupa *senyawa flavonoid, steroid, alkaloid*, dan *saponin* sehingga daun mimba dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibiotik dan antibakteri (Pratiwi, 2022). Pada penelitian yang dilakukan oleh Wari *et al.*, (2020) ekstrak daun mimba dapat meningkatkan system imun ikan nila dari infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilah*, mempercepat pengerutan luka pada ikan Zebra (Novianty, 2021), menghambat perkembangan histamin pada ikan tongkol abu (Witria & Muhammad, 2021), dan mempercepat penyembuhan udang vaname yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (Natasya *et al.*, 2022).

Namun sampai saat ini belum ada pengaplikasian ekstrak daun mimba terhadap udang vaname yang terinfeksi bakteri *V. parahemolyticus*, sehingga penulis tertarik melakukan penelitian tentang efektifitas pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) terhadap infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang vaname (*P. vannamei*).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apa kandungan dari ekstrak daun mimba (*A. indica* A.Juss) yang diekstraksi dengan metanol .
2. Bagaimana kemampuan ekstrak daun mimba terhadap udang vaname yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* dengan metode *In vitro* dan *In vivo*.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1. Mengevaluasi senyawa metabolit sekunder yang berasal dari ekstrak daun mimba.
2. Menganalisis kemampuan ekstrak daun mimba terhadap udang vaname yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* secara *In vitro* dan *In Vivo*.

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif lebih aman sebagai pengganti antibiotik sintetik karena minimnya efek samping yang ditimbulkan oleh antibakteri berbahan dasar bahan alami sehingga dapat dikembangkan pada aplikasi lapangan untuk pencegahan infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang vaname (*P. vannamei*).

1.4 Hipotesis

Adapun hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini yaitu ekstrak dari daun mimba memiliki efek antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus* yang menginfeksi udang vaname (*P. vannamei*).

1.5 Teori

1.5.1 Daun Mimba

Mimba merupakan pohon cemara yang ditemukan di hutan tropis kering musiman seperti India timur laut, sebagian di Asia, bagian utara Negeria, Australia, Afrika, dan Amerika tengah dan selatan. pohon yang dapat tumbuh dengan cepat, dan dapat mencapai tinggi 30 meter, dengan cabang berdaun menyebar, dan bertahan di hampir semua jenis tanah (Kumar *et al.*, 2016). Tanaman mimba merupakan salah satu tumbuhan yang menjadi sumber pestisida alami yang dapat dimanfaatkan karena bersifat insektisida, bakterisida, fungisida, acarisida karena mengandung berbagai senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan (Javandira *et al.*, 2022).

Berdasarkan taksonominya adapun klasifikasi menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2023) dari tanaman Mimba (*A. indica* A.Juss) antara lain sebagai berikut :

Kingdom	:Plantae
Sub kingdom	:Viridiplantae
Infrakingdom	:Streptopyta
Superdivision	:Embryophyta
Division	:Tracheophyta
Subdivision	:Spermatophyna
Class	:Magnoliopsida
Superorder	:Rosanae
Order	:Sapindales
Family	:Meliaceae
Genus	: <i>Azadirachta</i> A. Juss
Spesies	: <i>Azadirachta indica</i> A.Juss

Tanaman mimba tergolong kedalam family Meliaceae dengan tinggi pohon mencapai 20 meter daunnya majemuk berbentuk lonjong bergigi dan menyirip genap memiliki jumlah helai 8-16 kulit pohon yang agak tebal, batang yang kasar agak bengkok dan biasanya lebih pendek buahnya merupakan buah batu dengan panjang 1 cm buah mimba dapat dihasilkan dalam kurun waktu dalam satu sampai dengan 2 kali dalam satu tahun biasanya berbentuk oval, jika dalam keadaan matang maka akan berubah warna menjadi kuning yang pahit, bau biji menyerupai bawang putih, dan biasanya ditutupi dengan kulit keras berwarna coklat biasanya dapat ditemukan di daerah tropis dan subtropis (Ratmawati, 2019).

Terdapat banyak komposisi kimia yang telah ditemukan pada ekstrak daun mimba (*A. indica* A.Juss) dan dapat berfungsi sebagai antibakteri beberapa diantaranya yang paling dominan yaitu *quercetin*, asam linoleat, β -*sitosterol*, asam miristat dan asam oleat dengan ekstraksi menggunakan pelarut yang mempunyai polaritas tinggi seperti *etanol* dan *methanol* (Khaled *et al.*, 2023).

Mimba juga mengandung senyawa metabolit sekunder yang menyebabkan efek *in vitro* berupa karbohidrat, glikosida cardiac, saponin, flavonoid, tannin, alkaloid dan juga terdapat steroid yang hanya berada pada daun mimba (Binta *et al.*, 2022).

Senyawa metabolit sekunder pada daun mimba (*A. indica* A.Juss) sendiri dapat berfungsi sebagai bentuk pertahanan diri yang terdiri dari molekul kecil dengan senyawa spesifik yang mempunyai peranan dan fungsi yang berbeda seperti misalnya alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid termasuk golongan metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri dan antioksidan melalui identifikasi aktivitasnya (Dewatisari *et al.*, 2018)



Gambar 1. Daun, Biji, Bunga , Pohon Mimba (Saxena, 2015)

Ekstrak daun kulit mimba telah lama digunakan sebagai obat tradisional juga terbukti dapat meningkatkan kesehatan secara umum, ini dikarenakan mimba mempunyai peran penting dalam penyembuhan penyakit melalui aktivasi enzim antioksidatif yang berfungsi menghancurkan dinding sel bakteri atau mikroorganisme (Kana & Kumar, 2021).

Senyawa metabolit sekunder pada daun mimba sendiri dapat berfungsi sebagai bentuk pertahanan diri yang terdiri dari molekul kecil dengan senyawa spesifik yang mempunyai peranan dan fungsi yang berbeda seperti misalnya alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid termasuk golongan metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri dan antioksidan melalui identifikasi aktivitasnya (Dewatisari *et al.*, 2018).

Alkaloid memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri dengan merusak enzim dan menghambat pembentukan dinding sel bakteri, saponin memiliki aktivitas antimalarial karena dapat menghambat

polimerisasi heme (Matthew *et al.*, 2020). Saponin, flavonoid, tanin, juga terindikasi sebagai senyawa yang memiliki potensi sebagai antivibrosis (Devi *et al.*, 2018). Herrera-Calderon *et al.*, (2019) mengungkapkan bahwa tanaman mimba ditemukan sebagai tanaman yang efektif dalam pengobatan penyakit bakteri, jamur, virus dan lainnya, tanaman mimba juga diungkapkan sebagai alternative yang efektif secara klinis dari pada antibiotik sintetik.

Daun mimba (*A. indica* A.juss) memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dapat menghambat serangan bakteri *Aeromonas hidrofila* pada ikan lele (Hammed *et al.*,2017), dapat mengobati penyakit *Dawkinsia filamentosa* atau yang biasa disebut Blackspot duri pada ikan (Kavitha *et al.*,(2017), menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus* (Andhiarto *et al.*, 2019), menghambat kandungan histamine pada ikan tongkol abu (Witria & Muhammad, 2021), dan meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname yang terserang bakteri *Vibrio alginoticus* (Natasya *et al.*, 2022).

1.5.2 Udang Vaname

Udang vaname (*P. vannamei*) merupakan organisme yang termasuk ke dalam Filum Arthropoda dimana ekskeleton atau kutikula yang akan terlepas secara berkala udang vaname menyukai tempat yang biasanya suhu airnya berada dilebih 25°C disepanjang tahun dimana udang betina akan tumbuh lebih cepat dari pada udang jantan dan biasanya mempunyai habitat di laut atau daerah tropis(Dugassa & Gaetan, 2018).

Tubuh udang vaname terdiri dari 2 bagian utama yaitu kepala dada (*Cephalothorax*) dan perut (*abdomen*), cephalothorax ditutup oleh kelopak kepala yang disebut *carapace*, udang vaname mempunyai 5 pasang kaki renang (Pleopod) dan juga ada 5 pasang kaki jalan(pereopod) pada bagian abdomen terdiri dari 6 segmen (Supono, 2019). Enam pasang segmem terakhir ditemukan perut kepala dan toraks menyatu dan membentuk sefalotoraks. Selain itu udang vaname juga memiliki pasangan segmen terakhir yang terdiri dari uropod dan telson yang berfungsi untuk membantu udang mundur dan melompat dengan cepat jika terjadi bahaya (Dugassa & Gaetan, 2018).

Udang vaname sangat populer dikalangan pembudidaya intensif maupun tradisional karena dianggap dapat memberikan keuntungan yang besar dikarenakan sifatnya yang sangat cepat tumbuh hingga dapat mencapai rata-rata 1-1,5 g perminggunya dibandingkan dengan udang windu yang hanya tumbuh 1 g perminggunya (Moh *et al.*, 2021).

Menurut *World Register of Marine Spesies* (WoRMS) (2022) klasifikasi dari udang vaname (*P. vannamei*) adalah sebagai berikut

Kingdom	: Animalia
Sub kingdom	: Bilateria
Infrakingdom	: Protosmia
Superphylum	: Ecdysozoa
Phylum	: Anthropoda
Subphylum	: Crustacea
Class	: Malacostraca
Subclass	: Eumalacostraca
Superorder	: Eucarida
Order	: Decapoda
Suborder	: Dendrobranchiata
Superfamily	: Penaeoidea
Family	: Penaeidae
Genus	: <i>Penaeus</i>
Species	: <i>Penaeus vannamei</i>



Gambar 2. Udang vaname (*P. Vannamei*) (Dokumentasi pribadi)

Faktor lain yang menyebabkan udang vaname diminati dikalangan pembudidaya yaitu responsif terhadap pakan, nafsu makan yang tinggi, tingkat kelangsungan hidup yang tinggi, dapat hidup dalam padat tebar yang tinggi, waktu pemeliharaan yang relatif singkat sekitar 90-100 hari per satu siklus, pertumbuhan tetap cepat walau kondisi lingkungan yang buruk dan tahan terhadap penyakit. (Purnamasari *et al.*, 2017).

Terlepas dari keunggulan dari udang vaname juga dapat terjadi hal-hal yang tidak diinginkan seperti misalnya gagal panen, yang biasanya disebabkan oleh munculnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus akibat pengelolaan lingkungan yang tidak baik. Berbeda dengan hewan darat hewan akuakultur seperti udang vaname akan bersentuhan langsung dengan lingkungan perairan sehingga akan lebih mudah terserang penyakit jika keadaan lingkungannya tidak memadai (Yu *et al.*, 2022).

Udang vaname menjadi host dari beberapa jenis penyakit virus seperti *Infection Myonecrosis Virus* (IMNV), *Infekction Hypodermal And Hematopoietic Necrosis* (IHHN) dan *White Spot Syndrome virus* (WSSV) (Sumino *et al.*, 2020). Penyakit IMNV mampu membunuh hingga 70% populasi udang (Zaujatz *et al.*, 2016). Virus penyebab penyakit tersebut biasanya mengganggu pertumbuhan meliputi bentuk tubuh yang tidak normal, ukuran yang tidak seragam, pertumbuhan lambat hingga menyebabkan kematian (Aulia *et al.*, 2019).

White Feces Disease (WFD) adalah penyakit akibat serangan bakteri *Vibrio Spp* gejala klinis yang ditimbulkan berupa nafsu makan udang yang menurun, perubahan warna pada usus yang menjadi putih bahkan terlihat kosong dikarenakan kurangnya asupan makanan, terdapat kotoran berwarna putih mengambang dipermukaan perairan dan pertumbuhan udang yang menjadi tidak normal (Jayadi *et al.*, 2016), penyakit ini dapat diakibatkan perlakuan budidaya yang tidak baik, benih yang tidak sehat, dan kualitas air yang buruk (Marbun *et al.*, 2019).

Pada tahun 2019 AHPND juga terdeteksi pada sampel impor yang berasal dari negara Asia termasuk Indonesia di Korea (Han *et al.*, 2020). Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* dimana udang diserang pada organ yang ada pada perut hepatopankreas, dan usus udang yang mengakibatkan disfungsi sel dan kematian massal hingga 100% yang terjadi pada kisaran 30-35 hari setelah penebaran (Kumar *et al.*, 2020) selain itu gejala eksternal yang dapat dilihat berupa cangkang lepas, nafsu makan yang menurun, terhambatnya pertumbuhan pada udang di kolam pembesaran sehingga mengakibatkan kerugian besar yang dialami petambak (Chaweepack *et al.*, 2015).

1.5.3 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio merupakan pathogen bawaan yang bertanggung jawab atas terjadinya kasus *gastroenteritis* atau salah satu penyebab utama infeksi umum bawaan makanan pada manusia akibat konsumsi makanan yang terkontaminasi terutama pada makanan laut, selain itu infeksi ini juga bertanggung jawab pada kerugian dalam industri ternak terutama pada industri akuakultur dimana salah satunya adalah infeksi oleh bakteri *V. parahaemolyticus* (Heng *et al.*, 2017).

Umumnya *Vibrio spp* menyerang udang pada stadia zoea, mudid dan awal post larva sehingga menghambat penyediaan benih udang sehat sampai dengan jumlah besar dimana gejala awal akan diliat pada 1-3 hari, jika udang sudah terinfeksi akan sulit diselamatkan sehingga sebaiknya udang segera dimusnakan untuk menghindari terjadinya kontaminasi pada media air pada kolam lain (Siregar *et al.*, 2021)

Vibrio sendiri merupakan bakteri konstituen alami pada lingkungan muara dan laut dimana memiliki distribusi yang tergantung oleh musim yang nyata sebagian besar terjadi selama musim panas dan awal musim gugur sesuai periode suhu yang lebih hangat (Baker-Austin *et al.*, 2017). *V. parahaemolyticus* sebagai bakteri penyebab vibriosis banyak ditemukan pada udang sehingga berpotensi menyebabkan penyakit bawaan makanan (Letchumanan *et al.*, 2015). Meningkatnya suhu pada laut dan perubahan iklim telah menyebabkan munculnya *Vibrio sp* termasuk *V. parahaemolyticus* dan telah menjadi pusat perhatian karena meningkatkan kasus vibriosis. *V. parahaemolyticus* pertama kali dideteksi pada tahun 1951 oleh Tsunetsugu Fujino yang berasal dari *Research Institute of Microbial Disease (RIMD)*, Osaka University dari wabah gastroenteritis akut (Letchumanan *et al.*, 2019).

V. parahemolyticus merupakan salah satu bakteri patogen utama yang menyerang udang vaname (Chunguang *et al.*, 2023). Bakteri ini memiliki flagel tunggal dan berbentuk batang melengkung (Yeoh *et al.*, 2021) dan menjadi patogen bagi hewan laut dan manusia (Fu *et al.*, 2023). Sesuatu yang mencolok dari *V. parahaemolyticus* ialah menjadi penyebab dari penyakit sindrom kematian dini pada udang atau sekarang yang disebut nekrosis hepatopankreas akut (AHPND) dimana penyakit ini menjadi salah satu penyakit paling serius dalam industri budidaya udang karena dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri budidaya udang diseluruh dunia (Kalatzis *et al.*, 2018). Strain bakteri *V. parahaemolyticus* yang menyebabkan AHPND merupakan jenis yang mengandung gen toksin biner PirA dan PirB sehingga menjadi salah satu agen etiologi yang mana strain yang mengandung toksin biner PirA dan PirB ini telah dipastikan sebagai faktor virulensi penyakit AHPND, gen PirA dan PirB terletak di plasmid besar (69-70 kb) dalam fragmen 3,5 kb yang diapit oleh transpos yang dapat terlibat dalam peristiwa penyisipan dan penghapusan yang menyebabkan mutasi pada wilayah pirAB yang mungkin mempengaruhi patogenesis strain AHPND vibrio (Caro *et al.*, 2020)

V. parahemolyticus termasuk kedalam bakteri halofilik negative, yang biasanya ditemukan di habitat diseluruh dunia. *V. parahaemolyticus* menyebabkan kerusakan pada organ hepatopankreas yang terinfeksi (Thammatinna *et al.*, 2020). *V. parahaemolyticus* menginfeksi udang dengan cara transmisi oral dan kolonisasi pada usus dan hepatopankreas udang (Lee *et al.*, 2015). *V. parahemolyticus* termasuk kedalam bakteri yang memiliki resistensi tinggi terhadap obat antibiotik yang saat ini banyak digunakan dalam kegiatan budidaya (You *et al.*, 2021). ini dikarenakan kemampuan adaptasinya yang tinggi pada lingkungan hiperosmotik dan basa tinggi dengan memanfaatkan berbagai sumber karbon, asam amino dan substrat (Zhang *et al.*, 2021).

1.5.4 Ekstraksi

Ekstraksi atau penyaringan merupakan proses pemisahan suatu zat atau senyawa aktif dalam tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan prosedur standar dengan tujuan untuk memisahkan metabolit terlarut dalam tanaman dengan residunya proses ekstraksi dihentikan apabila telah mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhtarini, 2014).

Secara Umum ekstraksi dibedakan berdasarkan ada tidaknya proses pemanasan. Pemanasan ini sangat berpengaruh pada efektifitas dalam proses ekstraksi selain itu juga bergantung pada senyawa target yang diharapkan setelah proses ekstraksi. Berikut jenis ekstraksi bahan alam yang biasanya dilakukan yaitu ekstraksi dengan cara dingin dan ekstraksi secara panas :

1. Ekstraksi Dengan Cara Dingin

Metode dingin dilakukan dengan tidak adanya proses pemanasan dengan tujuan untuk menghindari rusaknya senyawa yang diinginkan akibat proses pemanasan (Sudarwati & Fernanda, 2019). Ekstraksi dingin dibedakan menjadi 2 yaitu Maserasi dan perkolasi.

- a. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dimana dalam maserasi, bubuk kasar sampel tumbuhan disimpan dan dibiarkan mengalami kontak dengan pelarut dalam wadah tertutup untuk jangka waktu tertentu yang disertai dengan pengadukan hingga komponen sampel tumbuhan ada yang larut. Metode ini paling cocok untuk digunakan dalam kasus senyawa kimia tumbuhan yang tidak tahan panas (*termolabil*) (Yulianto & Savitri, 2019).

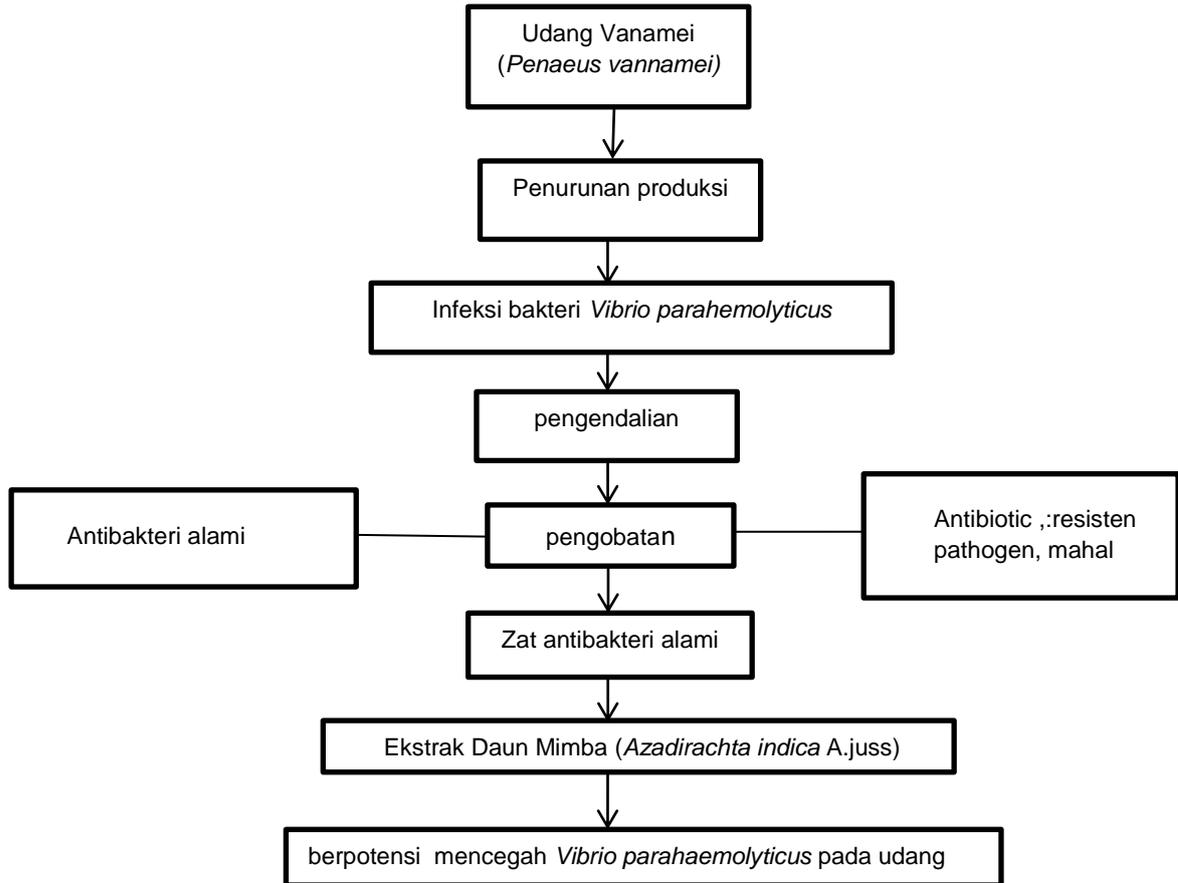
- b. Perkolasi adalah proses penyaringan simplisia dengan cara melewatkan pelarut yang sesuai dengan lambat pada simplisia dalam suatu percolator, ini bertujuan supaya zat berkhasiat tertarik seluruhnya dan biasanya digunakan untuk zat berkhasiat yang tahan ataupun tidak dengan pemanasan. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari bekerja melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh, gerakan kebawah di sebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan cairan yang ada diatasnya, dikurangi dengan daya kapiler yang cenderung berfungsi sebagai penahan (Sudarwati & Fernanda, 2019).

2. Ekstraksi Dengan Cara Panas

Metode ini melibatkan panas dalam prosesnya, dengan adanya panas akan secara otomatis mempercepat proses penyaringan jika dibandingkan dengan cara dingin. Ekstraksi dengan cara panas metodenya ialah refluks, ekstraksi dengan alat soxhlet dan infusa :

- a. Reflux adalah metode sintesis senyawa anorganik, metode ini digunakan dengan pelarut volatile. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasan biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi berhalan sampai selesai. Prinsip dari metode ini adalah pelarut volatile yang digunakan akan menguap pada suhu yang tinggi, namun didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya berbentuk uap akan mengembun pada kondensor dan akan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung. Sedangkan aliran gas N₂ diberikan agar tidak ada uap air atau gas oksigen yang masuk terutama pada senyawa organologam untuk sintesis senyawa anorganik karena sifatnya reaktif (Sudarwati & Fernanda, 2019).
- b. Soxhlet atau Sokhletasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang hanya diperlukan apabila senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut, dan pengotor tidak larut dalam pelarut itu. Jika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan yang tinggi dalam suatu pelarut maka suatu penyaringan sederhana dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dari zat yang tidak larut. Keuntungan dari sistem ini adalah proses ekstraksi cukup dilakukan dalam satu wadah dimana secara kontinyu pelarut yang terkondensasi akan menetes dan merendam sampel tumbuhan dan membawa senyawa terlarut ke labu penampung. Metode ini tidak dapat digunakan untuk senyawa termolabile karena pemanasan yang berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi senyawa (Yulianto & Savitri, 2019).
- c. Infusa atau infudasi merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut berupa air. pada proses infudasi berlangsung temperatur air harus mencapai suhu 90°C selama 15 menit. Rasio berat bahan dan air adalah 1:10, artinya jika berat bahan 100 g maka volume air sebagai pelarut adalah 1000 ml (Sudarwati & Fernanda, 2019).

1.6 Kerangka pikir



Gambar 3. Kerangka pikir

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Juli sampai dengan September 2023 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan (FIKP) Universitas Hasanuddin.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel daun mimba (*A. indica* A.juss) dikumpulkan dari pekarangan Masjid Al-Markaz Al-Islami Makassar. Sedangkan strain bakteri *V. parahaemolyticus* diperoleh dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Kabupaten Takalar. Daun mimba yang terkumpul selanjutnya akan ditreatment dengan air sampai bersih kemudian dikering anginkan pada suhu ruang sampai benar-benar kering. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk dan selanjutnya ditimbang (Vicencio, 2020).

2.2.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda (alat ataupun bahan). Tujuan sterilisasi adalah mematikan, menghambat pertumbuhan dan menyingkirkan semua mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan yang akan digunakan dalam suatu pekerjaan guna menciptakan suasana aseptis. Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu akan dicuci bersih menggunakan deterjen dan dikeringkan dengan posisi terbalik diudara terbuka, setelah kering dilakukan sterilisasi dengan cara memasukkan alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer, kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven selama 30 menit.

2.2.3 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan berdasarkan metode dari Zainuddin *et al.*, (2019) yaitu maserasi dengan sedikit penyesuaian, pemilihan maserasi sebagai metode ekstrak dikarenakan metode ini adalah metode yang paling umum digunakan, prosedur yang lebih mudah dilakukan dan biaya yang digunakan terbilang lebih murah. Serbuk halus daun mimba direndam dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1:3 dan didiamkan selama 24 jam di dalam shaker inkubator. Larutan kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatmand no.1 untuk memisahkan filtrat dan debris, prosedur yang sama dilakukan sebanyak 3 kali sampai mendapatkan filtrat yang kurang berwarna. filtrat kemudian dipekatkan secara terpisah dengan bantuan *rotary evaporator* pada 90 rpm dibawah vakum agar pelarut dapat menguap dengan sempurna. Hasil ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut (Dhanani *et al.*, 2017).

$$\%Rendamen = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100$$

2.2.4 Kultur Bakteri dan Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media dilakukan dengan cara mempersiapkan aquadest sebanyak 60 mL lalu menimbang media TSA sebanyak 2,4 g setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer, dipanaskan dengan menggunakan hot plate sambil diaduk rata dengan menggunakan magnetic stiter yang dimasukkan kedalam erlenmeyer. Setelah mendidih dan tercampur rata media TSA disterilkan dengan menggunakan *autoclave* selama 20 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atmosfer. Media agar didinginkan hingga suhu sekitar 50°C, lalu dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 20 mL untuk setiap cawan petri.

Pembuatan TSB dimulai dengan menimbang media TSB sebanyak 0,16 g lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 20 mL aquadest selanjutnya dipanaskan larut dan mendidih menggunakan hot

plate, Setelah itu dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL untuk satu tabung. Selanjutnya media TSB disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atmosfer selama 20 menit.

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 1,28 g ditambahkan aquadest sebanyak 32 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampe media membeku.

Pemeliharaan stok kultur bakteri *Vibrio parahaemolyticus* mengikuti metode (Sieberi *et al.*, 2020) yaitu stok murni bakteri *V. parahaemolyticus* diambil sebanyak satu ose kemudian diisolasi pada media TSA secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk mendapatkan koloni segar yang tumbuh. Kemudian koloni di pindahkan kembali pada media TSB cair steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan suspensi uji bakteri yang segar dan dipertahankan pada suhu 4°C.

2.2.5 Pemeliharaan Udang

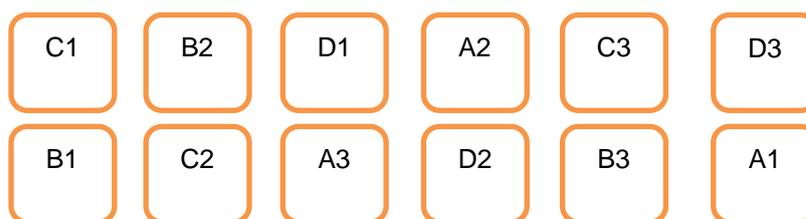
Udang yang akan digunakan sebagai hewan uji akan dipelihara pada wadah berupa aquarium berukuran 40 cm x 30 cm x 28 cm dengan volume air 20 L menggunakan air laut steril, lengkap dengan aerasi. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 10 ekor/wadah dengan umur 30-35 hari pasca penebaran. Sebelum diberikan perlakuan udang diaklimatisasi pada suhu ruang (26-28 °C) selama 2 hari dan diberikan pakan komersial dengan tetap memperhatikan kualitas air, selama belum diinjeksi dengan bakteri *V. parahaemolyticus* air pada wadah diganti sebanyak 10-20% setiap hari.

2.2.6 Uji Tantang

Uji tantang ekstrak daun mimba akan dilakukan menggunakan metode yang mengacu pada Rudi *et al.*, (2019) dengan tujuan pengobatan. Udang vaname yang telah diaklimatisasi kemudian diinjeksikan secara intramuscular sebanyak 0,2 ml larutan bakteri *V. parahaemolyticus* konsentrasi 10^7 CFU/mL diinjeksikan menggunakan *syringe* pada segmen ketiga abdomen udang.penggunaan kosentrasi 10^7 CFU/ml karena pada kosentrasi tersebut diindikasikan bakteri telah dapat menginfeksi pada udang yang diuji. Setelah penyuntikan dan udang menunjukkan gejala klinis morfologi selanjutnya udang vanamei dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan. Udang diamati tingkah lakunya berupa pergerakan udang dan juga pada respon pemberian pakan. Udang yang telah diindikasikan terinfeksi bakteri *V. parahemolyticus* ,lalu dipindahkan kedalam wadah yang yang berisikan larutan ekstrak daun mimba hijau dengan masing-masing konsentrasi 50 mg/ml, 25 mg/ml dan 12,5 mg/ml direndam selama 20 menit (Witria & Muhammad, 2021). Perlakuan yang sama diberikan kepada kontrol berupa tanpa perendaman ekstrak. Udang selanjutnya dipelihara selama 14 hari, udang diberikan pakan berupa pakan komersial sebanyak 4 kali sehari. Kualitas air dipertahankan agar tetap sesuai dengan batas toleransi udang.

2.2.7 Rancangan Penelitian

Rancangan peneltian yang telah dilakukan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap adalah rancangan lapangan pada suatu kondisi yang terkontrol. Rancangan ini dikatakan acak karena setiap satuan percobaan mempunyai peluang yang sama untuk, mendapatkan perlakuan sedangkan dikatakan lengkap karena seluruh perlakuan yang dirancang dalam percobaan tersebut digunakan (Lentner & Bishop, 1986 *dalam* Sunandi *et al.*, 2009). Penelitian ini dilaksanakan dengan 4 perlakuan dengan 3 ulangan individu tiap perlakuan, penempatan unit percobaan dilakukan mengikuti pola rancangan acak lengkap , adapun tataletak percobaan yang disajikan sebagai berikut :



Keterangan : A = Kontrol, B= 12,5 mg/ml, C=25 mg/ml, D=50 mg/ml

Gambar 4. Tata Letak Wadah Penelitian

2.3 Parameter Uji

2.3.1 Analisis GC-MS

Analisis GC-MS pada ekstrak daun mimba menggunakan alat GCMS-QP2010 ultra (Shimadzu). menggunakan protokol standar untuk mendapatkan mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Khayyat & Roselin., 2018). Setelah hasil analisis diperoleh, senyawa kemudian dikelompokkan sebagai senyawa metabolit sekunder menggunakan website dari *National Institute of Health* (NIH) dan *National Institutes of Standards and Technology* (NIST) untuk mengetahui golongan senyawa, rumus molekul, dan nama lain dari senyawa metabolit sekunder yang diidentifikasi.

2.3.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktifitas antibakteri dilakukan dengan metode Zainuddin *et al.*, (2019) yaitu dengan menggunakan difusi cakram dengan sedikit modifikasi ekstrak padat yang telah jadi dilarutkan dengan menggunakan metanol dan dihomogenkan dengan vortex, ekstrak daun mimba yang telah diencerkan dengan konsentrasi 100 mg/ml, 75 mg/ml, dan 50 mg/ml kemudian diteteskan pada paper disk diameter 6 mm sebanyak 20 μ L/disk dan diinkubasi untuk menguapkan pelarutnya pada suhu 30°C prosedur yang sama diberikan pada kontrol positif berupa oksitetrasiklin (OTC) dan pada kontrol negatif berupa metanol.

Stok kultur bakteri *V. parahaemolyticus* diambil sebanyak 10^7 sel/mL, lalu dicampurkan secara homogen ke dalam media TSA setelah itu dituang secara perlahan di atas medium cawan petri (Basir *et al.*, 2020), lalu dibiarkan memadat selanjutnya kertas cakram yang telah diinkubasi diletakkan pada cawan petri yang telah diinokulasi dengan kultur bakteri selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat disekitar kertas cakram akan diukur menggunakan jangka sorong, setiap pengukuran ditulis dalam satuan mm dari tepi cakram dan aktivitas antibakteri ditentukan ketika zona hambat ≥ 1 mm. Penentuan kekuatan zona hambat mengikuti Zainuddin *et al.*, (2019)

Table 1. Kekuatan daya hambat menurut Zainuddin *et al.*, (2019).

Diameter zona bening (mm)	Kekuatan zona hambat
<6	Tidak ada aktivitas
6-10	Lemah
10-15	Sedang
15- 20	Kuat

2.3.3 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

Penentuan konsentrasi kadar hambat minimum (KHM) yang dapat menghambat bakteri menggunakan prosedur yang dijelaskan oleh Zainuddin *et al.*, (2019) dengan disesuaikan menggunakan difusi agar dengan kertas cakram. Sebanyak 20 μ L/disk dari 8 konsentrasi hasil pengenceran ekstrak

daun mimba (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390 mg/mL), diteteskan ke *paper disc*, lalu dikeringkan di dalam inkubator pada suhu 30°C sebelum diletakan di atas media TSA dan diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi terendah ekstrak aktif yang masih menunjukkan zona hambat merupakan nilai KHM, pengujian kadar hambat minimum hanya dilakukan terhadap ekstrak yang ditemukan potensi menghambat bakteri patogen uji.

Uji daya hambat merupakan konsentrasi antibiotik terendah yang mana tidak ada pertumbuhan bakteri yang terlihat (Singha *et al.*, 2023). Konsentrasi terendah dari setiap ekstrak yang tidak menunjukkan pertumbuhan yang terlihat dicatat sebagai konsentrasi hambat minimum.

2.3.4 Survival Rate (SR)

Survival rate (SR) adalah persentase kelangsungan hidup udang dibandingkan dengan jumlah tebar dan dinyatakan dalam persen. Persen kelangsungan hidup udang vaname (*P. vannamei*) diperoleh dengan cara menghitung secara manual jumlah udang yang masih hidup pada setiap satuan percobaan pada awal dan akhir penelitian. Tingkat kelangsungan hidup dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Effendie, 1997 *dalam* Asni *et al.*, 2020):

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

SR = kelangsungan hidup (%)

N_t = jumlah udang uji yang hidup pada akhir pengamatan (individu)

N_0 = jumlah udang uji yang ditebar pada awal pengamatan (individu)

2.3.5 Pengamatan Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan dengan mengamati perubahan atau kelainan makroanatomi dan kelangsungan hidup udang uji setelah dilakukan uji tantang terhadap *V. parahaemolyticus* pada masing-masing perlakuan. Gejala klinis udang diamati pada hari ke-0, ke-4, ke-8 dan hari ke-12

2.3.6 Specific Grow Rate (SGR)

Laju pertumbuhan harian adalah presentase bobot udang setiap hari. Perhitungan laju pertumbuhan harian digunakan rumus yang dikemukakan oleh Efendi (1986), sebagai berikut :

$$\frac{W_t - W_0}{t} \times 100\%$$

Keterangan :

SGR = laju pertumbuhan harian (%)

W_t = Bobot rata-rata udang diakhir pemeliharaan (ekor)

W_0 = Bobot rata-rata udang diawal pemeliharaan (ekor)

t = Lama waktu pemeliharaan (hari)

2.3.7 Perhitungan Koloni Bakteri

Perhitungan jumlah koloni bakteri *V. parahaemolyticus* yang ada pada hepatopankreas udang dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri yaitu dengan teknik Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) atau *Total Plate Count* (TPC) pada sampel hepatopankreas udang tiap perlakuan. Koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media TCBS yang terdapat dicawan petri dihitung dengan menggunakan *hand counter*. Jumlah koloni bakteri yang dihitung pada cawan petri adalah 25-250 koloni. Koloni total dihitung dengan menggunakan metode harigan berdasarkan (BSN, 2015) dengan menggunakan rumus.

$$N = \frac{\sum c}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2)] \times d}$$

Keterangan :

N = Jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml
 $\sum c$ = Jumlah koloni pada semua cawan petri yang dihitung
n1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung
n2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung
d = pengenceran pertama yang dihitung

2.3.8 Kulitas Air

Parameter kualitas air yang diukur selama pemeliharaan berupa: suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut dan amoniak. Suhu diukur dengan menggunakan termometer, salinitas dengan *refraktometer*, pH dengan pH meter, oksigen terlarut diukur dengan DO meter dan amoniak diukur menggunakan spektrofotometer.

2.4 Analisis Data

Data uji kadar hambat minimum, pengamatan gejala klinis, hasil analisis GC-MS dan kualitas air dianalisis secara deskriptif dengan bantuan gambar dan tabel. Sedangkan data aktivitas antibakteri, *Survival rate* (SR), laju pertumbuhan (SGR) dan jumlah koloni bakteri dilakukan analisis dengan sidik ragam *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* jika terdapat perbedaan yang signifikan.