

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AAPTAMINOID DARI *Aptos aptos* DAN POTENSI PEMANFAATANNYA UNTUK PENCEGAHAN INFEKSI BAKTERI *Vibrio harveyi*

Rosmiati[#], Andi Tenriulo, Nurhidayah, Emma Suryati, dan Andi Parenrengi

¹ Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan

(Naskah diterima: 16 September 2019; Revisi final: 19 November 2019; Disetujui publikasi: 22 November 2019)

ABSTRAK

Sponge *Aptos aptos* diketahui mengandung senyawa turunan aaptaminoid yang dapat digunakan sebagai sumber antibakterial alami tanpa efek samping. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari ekstrak butanol *Aptos aptos* yang efektif menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dan mengevaluasi kemampuan senyawa bioaktif dalam pencegahan infeksi *V. harveyi*. Ekstraksi metabolit sekunder menggunakan metode maserasi, sementara isolasi dan identifikasi senyawa aaptaminoid dengan metode kolom kromatografi dan spektroskopi. Uji aktivitas antibakterial menggunakan metode difusi agar dengan *paper disc*. Evaluasi kemampuan senyawa aktif dalam pencegahan vibriosis menggunakan metode eksperimental dengan empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan menggunakan hewan uji *Litopenaeus vannamei* sebanyak 10 ekor/akuarium. Dosis senyawa aktif yang digunakan yaitu; A) 0 µg/g berat badan (bb); B) 0,67 µg/g bb; C) 25 µg/g bb; dan D) 50 µg/g bb. Penyuntikan 100 µL senyawa aktif pada masing-masing dosis tersebut dilakukan pada awal penelitian dan setelah 14 hari pemeliharaan, udang diuji tantang dengan *V. harveyi* pada kepadatan 10⁷ CFU/mL. Pemeliharaan udang dilanjutkan selama tujuh hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan morfologi udang berupa telson, rostrum, tubuh, pereopoda, dan pleopoda memerah sebagai tanda-tanda udang terinfeksi mulai diamati pada 23 jam pasca penginfeksi. Udang pada perlakuan C dan D mulai pulih dari infeksi pada hari keempat yang ditandai oleh telson, rostrum, tubuh, pereopoda, dan pleopoda yang normal. Selain itu, perlakuan D juga menunjukkan nilai sintasan udang tertinggi (50%), sementara perlakuan C memberikan sintasan sebesar 25%. Sebaliknya pada perlakuan B dan A (kontrol) udang sudah mengalami kematian 100% sebelum 24 jam pasca penginfeksi. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa aaptaminoid pada dosis e¹ 25 µg/g bb dapat dikembangkan sebagai sumber alternatif untuk pencegahan vibriosis.

KATA KUNCI: aaptaminoid; *Litopenaeus vannamei*; vibriosis

ABSTRACT: *Isolation and identification of aaptaminoid from Aptos aptos and its potential use for vibriosis prevention. By: Rosmiati, Andi Tenriulo, Nurhidayah, Emma Suryati, and Andi Parenrengi*

Aptos aptos contains aaptaminoid widely known as a natural antibacterial without any side effect. This recent research aimed to extract bioactive compounds from butanol extract of *Aptos aptos* and determined its efficacy to inhibit the growth and prevent the infection of *Vibrio harveyi*. The extraction of secondary metabolites used maceration method, while isolation and identification of aaptaminoid used column chromatography and spectroscopy methods. The antibacterial test against *V. harveyi* used agar diffusion method using *paper disc*. The evaluation of the active compound during the vibrio challenge test used an experimental method with four treatments. Each treatment used whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* of 10 ind./aquarium. Dosages of the active compound used were A) 0 µg/g bb, B) 0.67 µg/g bb, C) 25 µg/g bb, and D) 50 µg/g bb. The injection of 100 µL of each bioactive compound was carried out at the initial experiment and on day 14 after challenged with *V. harveyi* at the density of 10⁷ CFU/mL. The shrimps was reared for an additional seven days. The findings showed that the infection on shrimps started on 23 hours post-injection of *V. harveyi* indicated by the reddish color of rostrum, body, pereopods, pleopods, and telson. The shrimps in treatment C and D were able to recover from the infection started on the day-4 post-infection exhibited by the back to

[#] Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan, Indonesia
Tel. + 62 411 371545
E-mail: emirosmiati@yahoo.com

the normal condition of rostrum, body, pereopods, pleopods, and telson. The highest survival rate post-infection was obtained by shrimp in treatment D (50%) followed by treatment C (25%). In turn, shrimps on treatment A and B had 100% mortality within 24 hours post-infection. This research concludes that aptaminoid can be developed as an antibacterial agent for vibriosis prevention with an optimal dosage of $e^{-25 \mu\text{g/g bb}}$.

KEYWORDS: aptaminoid; *Litopenaeus vannamei*; vibriosis

PENDAHULUAN

Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP), penyakit vibriosis yang disebabkan oleh bakteri dari jenis *Vibrio* sp. adalah salah satu jenis penyakit udang yang bisa meningkatkan kematian pada udang saat masih berada di dalam tambak hingga 100% (Ambari, 2018).

Upaya pencegahan penyakit vibriosis tersebut telah dilakukan melalui penggunaan tandon, biofilter, biokontrol, biosekuriti, imunostimulan, dan *skrining* benur, namun upaya tersebut belum maksimal sehingga dibutuhkan alternatif lain. Pencarian formula untuk menghadang penyakit vibriosis terus digalakkan salah satunya dengan penggunaan bahan alam. Organisme yang bersumber dari lingkungan laut kaya akan senyawa kimia dan aktivitas biologi. Senyawa yang diisolasi dari organisme laut memiliki aktivitas spektrum yang luas melawan berbagai macam penyakit tanpa efek samping yang berbahaya (Mayer & Hamman, 2002).

Pencarian senyawa bioaktif yang bersumber dari lingkungan laut di mulai dengan melakukan *skrining* antibakterial aktiviti dari enam spesies sponge (*Aptos aptos*, *Aptos suberitoides*, *Callyspongia* sp., *Callyspongia pseudoreticulata*, *Haliclona* sp., and *Clathria reinwardti*) terhadap *Vibrio* sp. dan *Vibrio harveyi*. Dari *skrining* antibakterial tersebut diperoleh bahwa ekstrak metanol *Aptos aptos* dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio* sp. dan *V. harveyi* secara kuat dengan diameter zona hambatan $45 \pm 0,5$ mm (*Vibrio* sp.) dan $34 \pm 0,1$ mm (*Vibrio harveyi*) (Rosmiati *et al.*, 2011). Partisi berdasarkan kepolaran senyawa menggunakan pelarut dietil eter, butanol, dan air dilakukan terhadap ekstrak metanol *Aptos aptos* dilanjutkan dengan uji hayati diperoleh bahwa ekstrak butanol mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* dengan zona hambatan $23 \pm 0,1$ mm (Rosmiati & Muliani, 2019). Berdasarkan hasil tersebut, perlu dilakukan kajian lebih lanjut terhadap kandungan senyawa bioaktif ekstrak butanol *Aptos aptos*, serta potensinya dalam penanggulangan penyakit vibriosis. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah; (1) mendapatkan senyawa bioaktif yang efektif menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dan (2) menentukan aktivitas antibakterial senyawa aptaminoid terhadap *V. harveyi*.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi, Isolasi, dan Pemurnian Senyawa Aptaminoid

Sponge *Aptos aptos* dikumpulkan dari Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan. Sponge ditempatkan dalam plastik klip dan dimasukkan dalam sebuah *cool box* yang telah diisi es batu dan dibawa ke laboratorium Bioteknologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan (BRPBAP3), Maros.

Ekstraksi dan isolasi senyawa aptaminoid mengacu pada metode Mohamad *et al.*, 2017. Sekitar 0,5 kg sampel halus kering dimaserasi menggunakan metanol pada suhu ruangan. Partisi ekstrak metanol berdasarkan kepolaran menggunakan pelarut dietil eter, butanol, dan air untuk mendapatkan ekstrak butanol kering setelah dievaporasi (7,0 g). Ekstrak butanol kering difraksionasi dengan kolom kromatografi vakum kering untuk mendapatkan 17 fraksi. Melalui fraksionasi yang diikuti dengan uji bioassay diperoleh bahwa fraksi 11 dan 12 mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi*. Fraksi 11 dan 12 digabung (berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis) dan di kolom kromatografi silika gel secara berulang untuk mendapatkan campuran senyawa aptaminoid. Campuran senyawa tersebut dimurnikan dengan kolom kromatografi LH-20 yang dielusi dengan $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 1:1 sehingga diperoleh senyawa-1 (75 mg), 2 (50 mg), 3 (2 mg), 4 (6 mg), dan 5 (2,7 mg).

Uji Aktivitas Antibakterial *In Vitro*

Uji aktivitas antibakterial menggunakan *Vibrio harveyi* (bakteri patogen koleksi BRPBAP3 tahun 2019). Uji aktivitas ekstrak, fraksi, dan senyawa murni terhadap *Vibrio harveyi* menggunakan metode difusi agar dengan *paper disc* (Rosmiati *et al.*, 2011). Seratus μL bakteri *Vibrio harveyi* dipipet dan diteteskan pada media mueller, diratakan dengan stick. *Paper discs* (6 mm) diletakkan pada permukaan media lalu diteteskan dengan ekstrak butanol, fraksi ekstrak butanol dan senyawa murni dengan 20 μL dari konsentrasi 10 mg/mL (100 $\mu\text{g}/\text{disc}$) untuk ekstrak dan fraksi dan 1 mg/mL (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$) untuk senyawa murni. *Paper discs* dikeringkan dalam laminar air flow dan selanjutnya ditempatkan di atas agar yang sebelumnya telah

diinokulasi dengan bakteri. Cawan petri diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam dan diameter zona hambatan yang diindikasikan oleh zona bening di sekitar *paper disc* diukur dalam mm. Streptomisin dengan konsentrasi 30 µg/disc digunakan sebagai kontrol positif.

Identifikasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Aaptaminoid

Senyawa bioaktif yang berhasil diisolasi dan dimurnikan diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada sebuah pelat dengan Si.gel F₂₅₄ (ketebalan 0,2 mm; Merck, Darmstadt, Germany) sebagai fase diam. Pelat KLT yang telah ditetesi senyawa bioaktif dielusi dengan campuran pelarut (CH₂Cl₂ : MeOH; 9:1, 5:1, v/v), (CH₂Cl₂ : Acetone; 1:1 v/v) dan (CHCl₃ : MeOH; 9:1, 8:2, 7:3, v/v). Deteksi golongan senyawa dilakukan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 344 nm dengan bantuan semprotan larutan pendeteksi Dragendorff. Elusidasi struktur senyawa bioaktif dengan metode spektrometri yaitu *gas chromatography mass spectrometry* (GCMS) dan *electron ion mass spectrometry* (EIMS) untuk penentuan berat molekul dan formula senyawa, ¹H- dan ¹³C-*nuclear magnetic resonance spectroscopy* (NMR) data digunakan untuk menentukan jumlah proton (H) dan karbon (C₁₃). Data *correlation spectroscopy* (COSY) digunakan untuk menentukan pasangan proton-proton, data *heteronuclear multiple quantum coherence* (HMQC) untuk penentuan ikatan proton-carbon, sementara data *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) untuk penentuan hubungan (konektivitas) proton-karbon jarak jauh dan untuk menandai resonansi karbon quartenari. Semua data spektrometer dibandingkan dengan data publikasi.

Evaluasi Potensi Senyawa Aaptaminoid Sebagai Antibakterial Terhadap *Vibrio harveyi* pada Udang (*L. vannamei*)

Udang yang digunakan untuk ujiantang adalah udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang dikumpulkan dari tambak Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. Sebelum dilakukan ujiantang terlebih dahulu dilakukan penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) *in vitro* sebagai dasar untuk penentuan konsentrasi senyawa-2 (9-demetilaaptamin) yang digunakan. Penentuan KHM dilakukan dengan membuat series larutan senyawa-2 pada konsentrasi 1.000, 500, 250, 100, 10, 1, dan 0 mg/L. Penentuan KHM menggunakan metode difusi agar dengan *paper disc* seperti digambarkan pada metode uji aktivitas antibakterial (Rosmiati *et al.*, 2011).

Dari pengujian konsentrasi yang dilakukan diperoleh bahwa KHM senyawa-2 (9-demetilaaptamin) adalah 100 mg/L sehingga dosis 100, 250, dan 500 mg/L dipilih untuk digunakan sebelum dilakukan ujiantang dengan *V. harveyi*. Sebelum dilakukan ujiantang, udang vaname dengan bobot ± 15 g sebanyak 40 ekor dipelihara dalam empat akuarium dengan mengacu pada Sukenda (2007) yaitu sebanyak 10 ekor/akuarium. Hewan uji diaklimatisasi selama 14 hari sebelum diberikan perlakuan. Metode penelitian menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri atas empat perlakuan dengan ulangan individu. Hewan uji diinjeksi dengan 100 µL senyawa-2 pada segmen kedua pada konsentrasi, A) 0 µg/g bb; B) (0,67 µg/g bb); C) 25 µg/g bb; dan D) 50 µg/g bb (konsentrasi berdasarkan KHM yaitu 100 mg/L (0,67 µg/g bb), 250 mg/L (25 µg/g bb), dan 500 mg/L (50 µg/g bb). Prosedur yang dilakukan dalam uji ini adalah setelah udang diinjeksi senyawa bioaktif selama 14 hari, udang diinfeksi dengan bakteri *V. harveyi* dengan disuntik dengan kepadatan 10⁷ CFU/mL sebanyak 100 µL. Pemeliharaan dilanjutkan sampai tujuh hari pasca penginfeksian. Selama pemeliharaan udang diberi pakan komersial sebanyak 4,5% bobot badan dengan pemberian tiga kali/hari yaitu pada pukul 06:00, 12:00, dan 18:00. Parameter yang diamati meliputi respons pakan, gejala klinis, dan tingkat sintasan.

HASIL DAN BAHASAN

Identifikasi dan Elusidasi Struktur Aaptaminoid

Semua senyawa yang berhasil diisolasi dari ekstrak butanol *Aptos aptos* berasal dari golongan senyawa alkaloid yang diindikasikan oleh kehadiran spot berwarna orange setelah disemprot dengan larutan Dragendorff. Senyawa-1 telah diisolasi sebagai tepung yang berwarna kuning kehijau-hijauan (75 mg). Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan nilai *retention of flow* (R_f) = 0,16 (diklorometan (DCM)/metanol (MeOH; 8:2)). Data spektrum GCMS menunjukkan m/z 228 yang sesuai dengan formula molekul C₁₃H₁₂N₂O₂. Data fisik dan NMR, serta perbandingan dengan data literatur yang dipublikasikan oleh Calcul *et al.* (2003), senyawa-1 diidentifikasi sebagai aaptamin.

Senyawa-2 telah diisolasi sebagai padatan berwarna kuning (11 mg). Hasil KLT menunjukkan nilai R_f = 0,2 (Asetonitril/MeOH; 2:8). Data *electron ion mass spectrum* (EIMS) menunjukkan m/z 214 yang menyarankan formula molekul C₁₂H₁₀N₂O₂. Data fisik dan NMR, serta perbandingan dengan data literatur (Pedpradab, 2005), senyawa-2 identik dengan 9-demetilaaptamine.

Senyawa-3 telah diisolasi sebagai minyak berwarna kuning pucat (6 mg). Hasil KLT menunjukkan nilai $R_f = 0,2$ (DCM/MeOH; 8:2). Data EIMS menunjukkan m/z 242 yang sesuai dengan formula molekul $C_{14}H_{14}N_2O_2$. Data fisik dan NMR, serta perbandingan dengan data literatur (Herlt *et al.*, 2004), senyawa-3 sesuai dengan 4-*N*-metilaaptamin.

Senyawa-4 telah diisolasi seperti getah berwarna coklat (2,7 mg). Hasil KLT menunjukkan nilai $R_f = 0,26$ (DCM/MeOH; 8:2). Data EIMS menunjukkan m/z 258 yang sesuai dengan formula molekul $C_{14}H_{14}N_2O_3$. Data fisik dan NMR, serta perbandingan dengan data literatur (Calcul *et al.*, 2003), senyawa-4 diidentifikasi sebagai 9-metoksiaaptamin.

Senyawa-5 telah diisolasi sebagai kristal berwarna kuning (2,0 mg). Hasil KLT menunjukkan nilai $R_f = 0,5$ (Klorofom/Aseton; 1:1). Data EIMS menunjukkan m/z 212 yang menyarankan formula molekul $C_{12}H_8N_2O_2$. Data fisik dan NMR, serta perbandingan dengan data literatur (Calcul *et al.*, 2003), senyawa-5 diidentifikasi sebagai 9-demetiloksiaaptamin. Struktur kimia dan data NMR dari senyawa 1-5 disimpulkan dalam Gambar 1 dan Tabel 1, 2, dan 3.

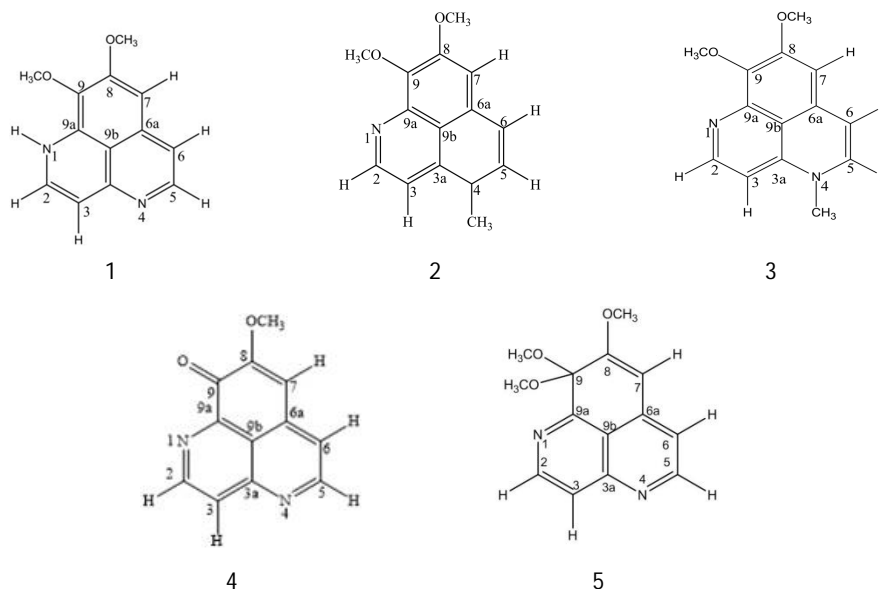
Aktivitas Antibakterial Senyawa 1-5 Terhadap *V. harveyi* In Vitro

Hasil uji aktivitas antibakterial menunjukkan bahwa senyawa-1-5 mampu menghambat pertumbuhan

V. harveyi dengan diameter zona hambatan yang berbeda-beda seperti ditunjukkan dalam Tabel 4.

Dari Tabel 4 terlihat bahwa senyawa-2, 3, dan 4 menunjukkan diameter zona hambatan e" 20 mm yang mengindikasikan bahwa senyawa tersebut mempunyai daya hambat yang sangat kuat terhadap *V. harveyi* berdasarkan uji antibiotikmikrobiologi dengan *displate method* yang dilaporkan oleh Davis & Stout (1971) bahwa senyawa murni dengan diameter zona hambat 20-30 mm tergolong dalam kategori zona hambat sangat kuat, diameter zona hambat 10-20 mm tergolong dalam kategori zona hambat kuat. Bila dibandingkan dengan diameter zona hambatan yang ditunjukkan oleh streptomisin, diameter zona hambatan yang ditunjukkan oleh senyawa-2 dan senyawa-4 lebih kecil. Ini karena adanya perbedaan konsentrasi antibiotik streptomisin yang digunakan yaitu lebih besar 35 $\mu\text{g}/\text{disc}$. Mekanisme kerja senyawa-1-5 yang merupakan turunan senyawa alkaoid sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu peptidoglikan yang mengakibatkan terjadinya lisis pada lapisan dinding sel bakteri (Septiana & Simanjuntak, 2015). Berbeda dengan bakteri Gram positif, *V. harveyi* yang merupakan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis menyebabkan dinding selnya lebih rentan mengalami kerusakan ketika diberikan antibakteri (Radji, 2011).

Kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan mikroba tergantung konsentrasi dari



Gambar 1. Struktur senyawa aaptamin (1), 9-demetylaaptamin (2), 4-*N*-metilaaptamin (3), 9-demetiloksiaaptamin (4), dan 9-metoksiaaptamin (5).

Figure 1. Chemical structure aaptamine (1), 9-demetylaaptamine (2), 4-*N*-metylaaptamine (3), 9-demetyloxyaaptamine (4), and 9-metoxyaaptamine (5).

Tabel 1. Data spektrum NMR aaptamin (1) dan 9-demetilaaptamin (2)
 Table 1. NMR spectrum data of aaptamine(1) and 9-demetylaaptamine(2)

Posisi (Position) C/H	-1			-2		
	$\delta^1\text{H}$ (m,J in 400 MHz) in CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta^1\text{H}$ (m,J in 400 MHz) in CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
1 NH						
2	7.78 (d, 7.2)	141.1	3, 9a,3a	7.71 (d, 6.8)	141.3	2,3,9a,3a
3	6.35 (d, 7.2)	97.7	9b, 2	6.23 (d, 6.8)	96.8	3,2,9b
3a	-	150.4			150.6	
5	7.27 (d, 7.6)	129.1	6, 6a, 3a	7.11 (d, 7.2)	126.9	5,6,3a,6a
6	6.88 (d, 7.6)	113.0	7,9b,5	6.82 (d, 7.2)	113.3	6,5,7,9b
6a	-	132.9			130.4	
7	7.07 (s)	100.8	6, 9b, 9, 8	7.06 (s)	100.3	7,8,6a,6,9b,9
8	-	157.5			128.7	
9	-	132.0			152.3	
9a	-	133.9			128.5	
9b	-	116.7			117.0	
8-OCH ₃	4.06 (s)	55.6	8	4.06 (s)	55.7	9
9-OH	3.95 (s)	59.7	9			

Keterangan (Note): C (karbon/carbon), H (proton), N (nitrogen), OCH₃ (metoksi/metoxy), OH (hidroksi/hydroxy)

Tabel 2. Data spektrum NMR 4-N-metilaaptamin (3) dan 9-demetiloksiaaptamin (4)
 Table 2. NMR spectrum data of 4-N-metylaaptamine (3) and 9-demetyloxyaaptamine (4)

Posisi (Position) C/H	3			4		
	$\delta^1\text{H}$ (m,J in 400 MHz) in CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta^1\text{H}$ (m,J in 400 MHz) in CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
1 NH						
2	7.79 (d, 7.2)	141.1	3, 9a,3a	9.09 (d, 5.4)	150.4	3,9a,3a,2
3	6.36 (d, 7.2)	97.7	9b, 2	8.26 (d, 5.4)	128.4	9b,3,2
3a		150.3			150.6	
5	7.26 (d, 7.2)	128.9	6, 6a, 3a	9.12 (d, 4.2)	159.3	9b,6,6a,3a,5
6	6.90 (d, 7.2)	113.0	7,9b,5	7.79 (d, 4.2)	124.7	7,9b,6,5
6a		132.8			139.5	
7	7.07 (s)	100.9	6, 9b, 9, 8	7.11 (s)	110.9	7,9b,6,8,9
8		157.5			157.9	
9		132.0			180.0	
9a		133.8			148.8	
9b		116.7			119.9	
8-OCH ₃	3.95 (s)	55.6	8	4.02 (s)	57.6	8
9-OH	4.06 (s)	59.7	9			
4-NCH ₃	2.68 (s)	39.0				

Keterangan (Note): C (karbon/carbon), H (proton), N (nitrogen), OCH₃ (metoksi/metoxy), OH (hidroksi/hydroxy), CH₃ (metil/mety)

Tabel 3. Data spektrum NMR 9-metoksiaaptamin (5)
 Tabel 3. NMR spectrum data of 9-metoxyaaptamine (5)

Posisi (Position) C/H	5		
	$\delta^1\text{H}$ (m,J in 400 MHz) in CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
2	7.78 (d, 7.2)	141.1	3, 9a,3a
3	6.36 (d, 7.2)	97.6	9b, 2
3a		150.2	
5	7.25 (d, 7.2)	128.8	6, 6a, 3a
6	6.87 (d, 7.2)	113.0	7,9b,5
6a		132.8	
7	7.04 (s)	100.9	6, 9b, 9,8
8		157.4	
9		131.9	
9a		133.7	
9b		116.6	
8-OCH ₃	4.05 (s)	55.6	8
9-OH	3.95 (s)*	59.7	9

senyawa tersebut (Widanarni *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil uji pada (Tabel 5) didapatkan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) senyawa-2 adalah 100 mg/L atau setara dengan 2 $\mu\text{g}/\text{disc}$. Daya hambat yang ditunjukkan oleh senyawa-2 pada konsentrasi 1.000 mg/L (20 $\mu\text{g}/\text{disc}$) lebih besar dibandingkan pada konsentrasi 750 mg/L (15 $\mu\text{g}/\text{disc}$), 500 mg/L (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$), dan 250 mg/L (5 $\mu\text{g}/\text{disc}$). Hal ini membuktikan bahwa pemberian konsentrasi senyawa yang semakin tinggi akan memberikan zona hambat yang semakin besar. Selain pengaruh konsentrasi, kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga ditentukan oleh golongan senyawa tersebut (Ajizah,

2004). Dalam golongan senyawa aaptaminoid daya hambat dipengaruhi oleh hubungan aktivitas struktur turunan aaptaminoid ke aktivitas antibakterial dijumpai pada oksidasi gugus fungsi hidroksil (OH) pada C-9 memberikan gugus fungsional karbonil (C=O) yang menghasilkan peningkatan pada aktivitas antibakterial (Pettit *et al.*, 2004).

Potensi Senyawa Aaptaminoid Sebagai Antibakterial Terhadap *Vibrio harveyi* pada Udang (*L. vannamei*)

Udang vaname yang diinjeksi dengan senyawa-2 tidak menunjukkan adanya kematian sampai hari ke-

Tabel 4. Aktivitas antibakterial senyawa (1-5) terhadap *Vibrio harveyi*
 Table 4. Antibacterial activity of compound (1-5) against *Vibrio harveyi*

Senyawa (kode) Compounds (code)	Zona hambatan Inhibition zone (mm)
	<i>Vibrio harveyi</i>
Aaptamin (1)	12 ± 0.3
9- demetilaaptamin (2)	25 ± 0.1
4- <i>N</i> -metilaaptamin (3)	20 ± 0.1
9-demetiloksiaaptamin (4)	24 ± 0.3
9-metoksiaaptamin (5)	13 ± 0.1
Streptomycine (kontrol positif/positive control)	30 ± 0.1
Metanol (kontrol negatif/negative control)	-

Keterangan (Note): (-) tidak ada hambatan (no inhibition)

Tabel 5. Konsentrasi hambat minimum (KHM) senyawa-2 terhadap *Vibrio harveyi*

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of compound-2 against *Vibrio harveyi*

Konsentrasi Concentration (mg/L)	Zona hambatan Inhibition zone (mm)
	<i>Vibrio harveyi</i>
1,000	25 ± 0.3
750	21 ± 0.1
500	16 ± 0.1
250	15 ± 0.3
100	14 ± 0.1
10	-
1	-

Keterangan (Note): (-) tidak ada hambatan (no inhibition)

14 pada semua perlakuan. Pada semua perlakuan senyawa aktif rata-rata udang telah *moulting* seperti ditunjukkan oleh kontrol. Selama 14 hari pemeliharaan sebelum ujiantang, udang terlihat bergerak aktif, pola renang aktif, permukaan badan, dan kulit bersih, dan sangat responsif terhadap stimulis. Selain itu, juga tidak didapatkan adanya sisa pakan baik pada kontrol maupun pada perlakuan. Ini menunjukkan bahwa senyawa-2 tidak menunjukkan efek toksik terhadap udang bahkan udang tumbuh dengan normal.

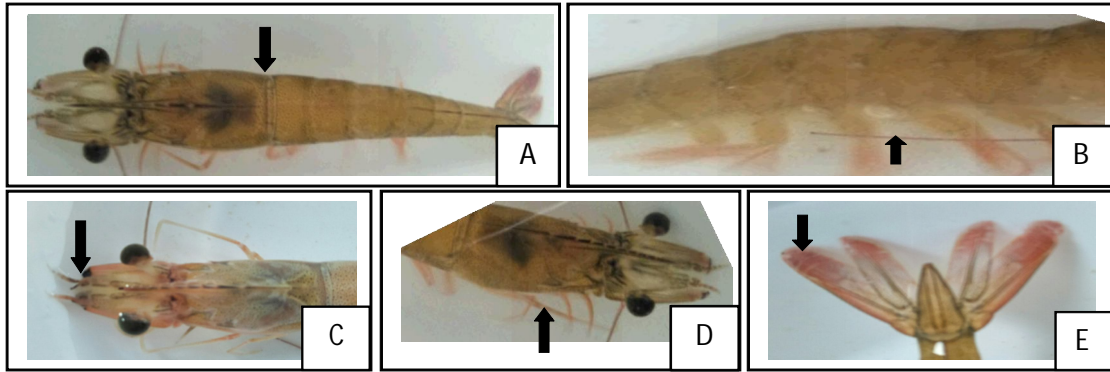
Sebaliknya setelah diujiantang dengan *V. harveyi*, udang terlihat mengalami perubahan tingkah laku dan morfologi. Perubahan tingkah laku udang terlihat berenang dengan badan miring dan tidak lurus, kurang responsif terhadap stimulis, kehilangan nafsu makan yang diindikasikan oleh adanya sisa pakan dan usus yang kosong. Perubahan morfologi udang mulai terjadi pada 1,5 jam pasca ujiantang yaitu pereopoda dan *antennal scale* mulai memerah. Setelah 23 jam pascainfeksi pada perlakuan A dan B, seluruh permukaan badan, pleopoda, pereopoda, rostrum, dan telson udang memerah, sementara pada perlakuan C dan D perubahan warna tubuh tidak terlihat, perubahan terjadi pada rostrum, plopoda, pereopoda, dan telson namun tidak separah dengan perlakuan A dan B. Berbeda dengan Manopo *et al.* (2011) dan Sari *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa gejala klinis pada udang vaname yang diinfeksi *V. harveyi* muncul pada 48 jam. Ini menunjukkan bahwa *V. harveyi* yang digunakan sangat patogen terhadap udang vaname. Perubahan morfologi udang yang terinfeksi pada semua perlakuan selama penelitian ditunjukkan pada Gambar 2.

Pengamatan sintasan udang setelah 144 jam pasca penginfeksi menunjukkan bahwa rata-rata sintasan tertinggi pada perlakuan D sebesar 50%. Perlakuan C

rata-rata sintasan sebesar 25%. Sebaliknya perlakuan A dan B semua udang sudah mengalami kematian sebelum 48 jam pasca penginfeksi. Rata-rata sintasan udang pasca penginfeksi ditunjukkan dalam Gambar 3.

Sintasan udang berkaitan dengan aktivitas senyawa-2 sebagai antibakterial yang sangat kuat. Hal ini terlihat pada perubahan warna yang terjadi pada udang. Menurut Ulna *et al.* (2016), perubahan warna merupakan adanya penurunan imunitas tubuh udang, serta hal ini menunjukkan mulai bekerjanya imunitas tubuh untuk melawan benda asing dalam tubuh udang.

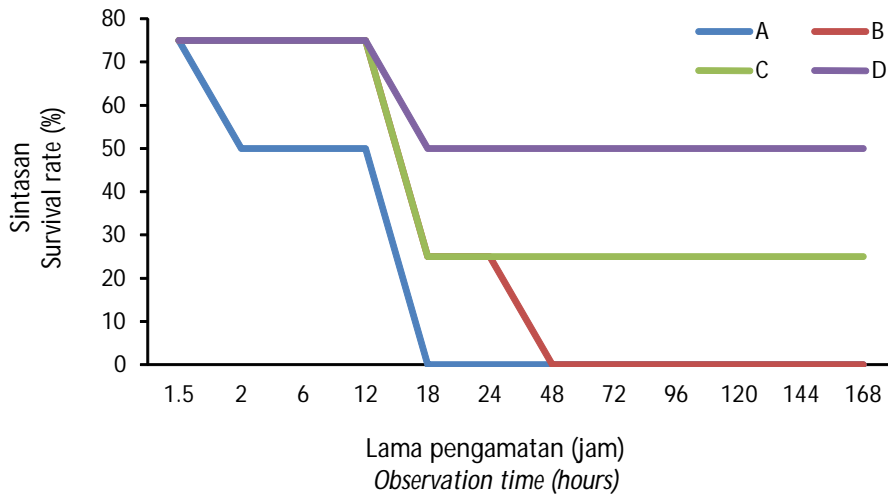
Pada penelitian ini perubahan warna udang (badan, telson, pereopoda, plopoda, dan rostrum memerah) pada perlakuan A dan B yang terjadi pada 1,5 jam pasca penginfeksi tidak berkurang dan ketahanan tubuh udang semakin lemah sehingga menyebabkan kematian dan setelah 23 jam pasca penginfeksi, semua udang tidak ada yang bertahan hidup. Kematian udang disebabkan oleh patogen yang dibuktikan oleh keberadaan bakteri *V. harveyi* yang diisolasi dari udang yang maribut sebelum akhirnya mati. Senyawa-2 pada konsentrasi 0,67 µg/g bb belum mampu meningkatkan pertahanan udang terhadap patogen. Berbeda dengan perlakuan C dan D, udang yang sebelumnya terinfeksi berangsur-angsur pulih yang ditandai dengan perubahan warna rostrum, pereopoda, dan telson (Gambar 4) yang terjadi mulai pada hari keempat. Sejak hari keempat pasca penginfeksi, udang mulai terlihat ada nafsu makan yang ditandai dengan usus mulai berisi pakan, sudah responsif terhadap stimulis dan mulai aktif bergerak sehingga sejak hari ke-4 sampai hari ke-7 pasca penginfeksi sudah tidak didapatkan udang yang mati. Ini menunjukkan bahwa senyawa-2 pada dosis tersebut berhasil menghambat perkembangan



Keterangan: Badan memerah (A), pleopoda memerah (B), rostrum memerah (C), pereopoda memerah (D), dan telson memerah (E)

Note: Reddish on body (A), pleopoda (b), rostrum (c), pereopoda (d), and telson (E)

Gambar 2. Perubahan morfologi udang (*L. vannamei*) 23 jam pasca penginfeksi *V. harveyi*.
Figure 2. Morphology change of *L. vannamei* at 23 hourspost *V. harveyi* infection.



Keterangan: A) 0 µg/g bb; B) 0,67 µg/g bb; C) 25 µg/g bb; dan D) 50 µg/g bb

Note: A) 0 µg/g bb; B) 0.67 µg/g bb; C) 25 µg/g bb; and D) 50 µg/g bb

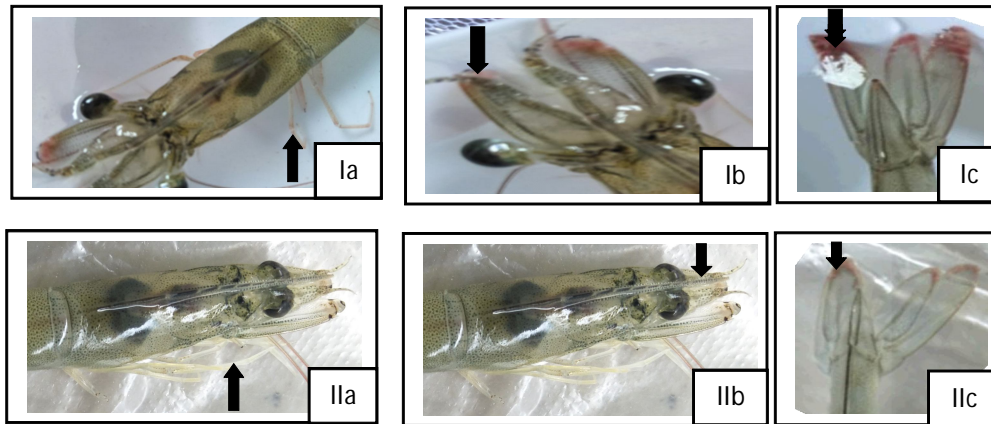
Gambar 3. Sintasan udang vaname (*L. vannamei*) pada jam ke-1,5; 2, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144 jam pasca penginfeksi *V. harveyi*.

Figure 3. Survival rate of *L. vannamei* at 1,5, 2, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 hours after *V. harveyi* infection.

V. harveyi sehingga perkembangan dan patogenitas dalam tubuh udang menurun. Menurut Saptiani *et al.* (2013), perlakuan vaksin ataupun adanya uji tantang dapat menstimulir peningkatan pembentukan sel-sel imunitas. Adanya bahan asing atau infeksi yang masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan respons kekebalan atau peradangan yang nantinya akan diikuti pembentukan zat kebal yang dihasilkan oleh sel-sel radang, yang selanjutnya merangsang proliferasi dan diferensiasi sel imunitas yang satu di antaranya berfungsi membentuk bahan spesifik yang disebut antibodi.

KESIMPULAN

Dari ekstrak butanol aktif *Aptos aptos* telah diisolasi lima senyawa turunan aaptaminoid yang diidentifikasi sebagai aaptamin (1), 9-demetilaaptamin (2), 4-N-metilaaptamin (3), 9-demetiloksiaaptami (4), dan 9-metoksiaaptamin (5). Kelima senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi in vitro*. Uji lanjut terhadap *V. harveyi* pada udang menunjukkan bahwa 9-demetilaaptamin dapat dikembangkan sebagai antibakterial alami pada udang vaname (*L. vannamei*) dalam menanggulangi vibriosis.



Gambar 4. Perubahan morfologi udang yang bertahan hidup sampai 144 jam pasca penginfeksi *V. harveyi* pada perlakuan C dan D. Keterangan: Pereopoda (Ia), rostrum (Ib) dan telson (Ic) yang memerah 23 jam pasca penginfeksi, pereopoda (IIa), rostrum (IIb) dan telson (IIc) yang kembali normal pada 144 jam pasca penginfeksi.

Figure 4. Morphological changes of survived shrimp during 144 hours post *V. harveyi* infection in treatment C and D. Note: Reddish of pereopoda (Ia), rostrum (Ib) and telson (Ic) at 23 hours post infection, pereopoda (IIa), rostrum (IIb) and telson (IIc) back to normal at 144 hours post infection.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian yang dibiayai oleh Pemerintah Provinsi Sulawesi Selatan dan Kemenristekdikti melalui program INSINAS Tahun 2015; untuk itu, diucapkan terima kasih atas pembiayaannya. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Ridwan, S.Pi. (staf Marine Station Unhas) untuk koleksi sampel sponge dan Dr. Ince Ayu Khairana Kodriah, S.Pi., M.Sc. atas koleksi *Vibrio harveyi*.

DAFTAR ACUAN

- Ajizah, A. (2004). Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*, 1(1), 8-31.
- Ambari, M. (2018). Upaya mencari obat penyakit udang dari tanaman bakau, seperti apa?. <https://www.mongabay.co.id/2018/08/10/upaya-mencari-obat-penyakit-udang-dari-tanaman-bakau-seperti-apa/>. Diakses Tanggal 4 Juli 2019.
- Calcul, L., Longeon, A., Mourabit, A.A., Guyot, M., & Bourguet-Kondracki, M.L. (2003). Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marine sponge of the genus *Xetospongia*. *Tetrahedron*, 59, 6539-6544.
- Davis, W.W. & Stout, T.R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Appl. Microbiol.*, 22(4), 659-665.
- Herlt, A., Mander, L., Rombang, W., Rumampuk, R., Soemitro, S., Steglich, W., Tarigan, P., & Nussbaum, F.V. (2004). Alkaloids from marine organisms. Part 8: Isolation of bisdemethylaaptamine and bisdemethylaaptamine-9-O-sulfate from an Indonesian *Aptos* sp. marine sponge. *Tetrahedron*, 60, 6101-6104.
- Manopo, H. (2011). *Peran nukleotidase sebagai immunostimulan terhadap respons imun nonspesifik dan resistensi udang vaname (L. vannamei)*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Mohamad, H., Rosmiati, Muhammad, T.S.T., Andriani, Y., Bakar, K., Ismail, N., Saidin, J., Latip, J., Musa, N., & Parenrengi, A. (2017). Potential secondary metabolites from marine sponge *Aptos aptos* for atherosclerosis and vibriosis treatments. *Natural Product Communications*, 12(8), 1227-1230.
- Mayer, A.M. & Hamman, M.T. (2002). Review marine pharmacology in 1999: Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anticardiovascular, endocrine, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132, 315-339.
- Pedpradab, S. (2005). *Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from marine sponges and a marine-derived fungus*. Ph.D. Thesis. Universität Düsseldorf, Germany.

- Pettit, G.R., Hoffmann, H., Herald, D.L., Blumberg, P.M., Hamel, E., Schmidt, J.M., Chang, Y.,, & Pearce, L.V. (2004). Antineoplastic agents. 499. Synthesis of hystatin 2 and related 1H-benzo[de][1,6]-naphthyridinium salts from aaptamine. *J. Med. Chem.*, 47, 1775-1782.
- Radji, M. (2011). Mikrobiologi. Jakarta: ECG Press, 50 hlm.
- Rosmiati, Mohamad, H., Muhammad, T.S.T., Musa, N., Ahmad, A., Ismail, N., & Mohamad, F. (2011). In vitro antagonist activities of Indonesian marine sponges *Aptos aptos* and *Callyspongia pseudoreticulata* extracts and their toxicity against *Vibrio* spp. *Indonesian Aquaculture Journal*, 6(1), 173-182.
- Rosmiati & Muliani. (2019). Study on the potential of *Aptos aptos* aqueous extract as an antibacterial agent against *Vibrio harveyi* in tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) post larvae. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 253, 1-7.
- Saptiani, G., Prayitno, S.B., & Anggoro, S. (2013). Potensi antibakteri ekstrak daun jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap *Vibrio harveyi* secara *in-vitro*. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1), 17-20.
- Sari, R.R.B., Sarjito, & Haditomo, A.H.C. (2015). Pengaruh penambahan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan histopatologi hepatopankreas udang vaname (*L. vannamei*) yang diinfeksi bakteri (*Vibrio harveyi*). *J. of Aquaculture Management and Technology*, 4(1), 26-32.
- Septiana, E. & Simanjuntak, P. (2015). Aktifitas antimikroba dan antioksidan ekstrak beberapa bagian tanaman kunyit (*Curcuma longa*). *Fitofarmaka*, 5(1), 2087-9164.
- Sukenda. (2007). Penggunaan kitosan untuk pengendalian infeksi *Vibrio harveyi* pada udang putih (*L. vannamei*). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6(2), 205-209.
- Ulina, Saptiani, G., & Hardi, E.H. (2016). Aktivitas antibakterial ekstrak daun *Sonneratia alba* terhadap *Vibrio harveyi* pada benur udang windu (*Penaeus monodon*). *J. Aquawarman*, 2(2), 35-44.
- Widanarni, Meha, D., Nuryati, S., Sukenda, & Suwanto, A. (2004). Uji patogenisitas *Vibrio harveyi* pada larva udang windu menggunakan resisten rifampisin sebagai penanda molekuler. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 3(3), 23-27.