

## ***Avicennia alba* FRUIT EXTRACT AS A NATURAL ANTIBACTERIAL TREATMENT OF *Vibrio parahaemolyticus* INFECTION IN VANAME SHRIMP (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)**

Dwi Arum Mufidah<sup>1</sup> · Wardiyanto<sup>1</sup> · Rara Diantari<sup>2</sup>

**Ringkasan** Vaname shrimp (*L. vannamei*) has high economical value as an export commodity. However, there are obstacles that cause a decline in the level of shrimp exports in the world. One of the obstacle is shrimp disease which is treated using antibiotics. This method might caused pathogenic resistance and become a residue when consumed by humans. *A. alba* fruit extract has benefits as natural antibacterial ingredient that are safe to treat the shrimp which is infected by the *V. parahaemolyticus*. In this study, shrimp is infected with *Vibrio parahaemolyticus* immersed using *A. alba* with a concentration of 300 mg L<sup>-1</sup>, 350 mg L<sup>-1</sup>, and 400 mg L<sup>-1</sup> for 21 days plus the control treatment. The concentration of 400 mg L<sup>-1</sup> showed better results compare to other concentration on all observed parameters; faster recovery time, higher survival rate and relative percent survival (RPS), also mild damage on hepatopancreas test.

**Keywords** *Litopenaeus vannamei*, antibiotics, *Avicennia alba*, fruit extract *Vibrio parahaemolyticus*

Received : 20 September 2018

Accepted : 23 Oktober 2018

### PENDAHULUAN

Udang vaname merupakan udang introduksi yang bernilai ekonomis tinggi sebagai komoditi ekspor karena diminati oleh pasar dunia. Hal tersebut dibuktikan dengan tingginya jumlah ekspor ke beberapa Negara pada periode 2012-2017 yang selalu mengalami kenaikan tiap tahunnya sebesar 10,40% dan volume ekspor udang mencapai 23.620 ton pada tahun 2016. Untuk memenuhi tingginya permintaan tersebut, produksi udang vaname di wilayah Indonesia terus dilakukan. Lampung menjadi penyumbang terbesar produksi udang vaname nasional tahun 2013 yaitu sebesar 72.051 ton (KKP, 2013).

Alasan petambak menggunakan jenis udang vaname ini adalah karena pertumbuhannya cepat, nilai konsumsi pakan atau *Food Consumption Rate* (FCR) yang rendah, mampu beradaptasi terhadap kisaran salinitas yang tinggi dan

<sup>1</sup>)Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung <sup>2</sup>)Program Studi Sumberdaya Akuatik, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

E-mail: arummufidah19@gmail.com

dapat dipelihara pada padat tebar yang tinggi (Nur'aini et al., 2007). Akan tetapi, terdapat beberapa kendala dalam kegiatan budidaya udang vaname, salah satunya adalah penyakit. Penyakit yang mudah timbul umumnya disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp. (Ruangan and Kitao, 1991). Fluktuasi pH, tingkat oksigen terlarut yang rendah, temperatur, salinitas lebih dari 50 ppt, kadar amonia, dan sulfat, serta bahan-bahan organik yang lain dapat menjadi penyebab stress pada udang dan memicu terjadinya penyakit. Namun, peningkatan jumlah bakteri *Vibrio* tetap menjadi penyebab timbulnya penyakit pada pembesaran udang (Lightner, 1996).

Upaya pengobatan penyakit dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik (Sipayung et al., 2015), namun dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan resistensi patogen. Selain itu, beberapa negara maju mulai menerapkan persyaratan mutu yang lebih ketat terhadap udang yang diimpor dari negara berkembang seperti Indonesia. Volume ekspor udang di Indonesia merosot sekitar 64% sejak diberlakukannya *zero tolerance* terhadap residu antibiotik pada tahun 2001 (Putro, 2008).

Pencarian sumber antibakteri alami sangat dibutuhkan sebagai pengganti peran dari antibakteri sintetik. *A. alba* merupakan salah satu tumbuhan yang banyak tersebar di Indonesia serta memberikan berbagai manfaat salah satunya anti bakterial (Subashree et al., 2010). Untuk meminimalisir kerugian yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* dapat dilakukan pengobatan udang yang terserang bakteri dengan memanfaatkan bahan antibakteri alami dari ekstrak buah mangrove jenis *A. alba* dalam membunuh dan menghambat per-

tumbuhan bakteri *Vibrio* sp. (Manilal et al., 2009). Penggunaan bahan antibakteri alami yang berasal dari tumbuhan *A. alba* sangat dibutuhkan dalam kasus ini. Selain murah dan lebih mudah didapat, bahan anti-bakteri alami aman untuk digunakan dan tidak menyebabkan resistensi terhadap bakteri

## MATERI DAN METODE

### *Uji Pendahuluan*

Terdapat beberapa tahap dalam melakukan uji pendahuluan antara lain preparasi sampel buah *A. alba*. yang didapatkan dari Pulau Pasaran, Kota Karang, Teluk Betung Timur, Kota Bandar Lampung, Lampung. Buah *A. alba* dimaserasi menggunakan pelarut metanol yang selanjutnya dilakukan evaporasi pada filtrat yang didapatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 37 °C (Handayani and Nurjanah, 2013). Ekstrak cair yang didapatkan kemudian diuji kualitatif fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam buah *A. alba*. Dilakukan uji aktivitas antibakteri pada ekstrak yang telah didapat terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400 mg/l serta kontrol positif yang mengandung 50 mg/l kloramfenikol dan kontrol negatif yang mengandung pelarut metanol.

### *Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethal Toxicity (BSLT)*

Uji BSLT ini dilakukan dengan menggunakan larva *Artemia salina* sebanyak 10 ekor yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 3 ml air laut dan telah diberi larutan ekstrak buah mangrove dengan konsentrasi 0 (kontrol), 300

mg/l, 350 mg/l, dan 400 mg/l sebanyak 2 kali ulangan.

#### *Persiapan Media Pemeliharaan dan Hewan Uji*

Wadah yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 12 akuarium yang berwarna gelap. Sebelum digunakan, akuarium disterilisasi secara kimiawi dengan cara dicuci dan didesinfeksi menggunakan klorin 30 mg/l, kemudian dinetralkan dengan natrium thiosulfat 15 mg/l (Widanarni et al., 2014).

#### *Pemeliharaan Hewan Uji*

Udang vaname diberi pakan komersil dengan frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari yaitu pukul 07.00, 11.00, 15.00 dan 19.00 WIB secara *ad libitum*. Pengelolaan kualitas air dilakukan dengan penyiponan dan pergantian air setiap pagi hari sebanyak 10% serta dilakukan pengukuran kualitas air seperti suhu, DO, pH, dan salinitas pada awal dan akhir penelitian.

#### *Uji Kohabitasi*

Bakteri *V. parahaemolyticus* dikultur pada media cair NB dan diinkubasi pada orbital shaker hingga mencapai kepadatan  $10^7$  CFU/ml. Udang diinjeksi bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml dan dilakukan pengamatan setelah udang menunjukkan gejala abnormal. Infeksi vibriosis diisolasi dengan mengambil bagian abnormal pada udang menggunakan jarum ose dan ditanam pada media TCBS (Hardiyani et al., 2016). Bakteri yang telah tumbuh pada media TCBS diambil koloni tunggal untuk dilakukan re-injeksi *V. parahaemolyticus* dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml pada udang baru dengan masa pemeliharaan lebih cepat dari injeksi sebelumnya. Pemeliharaan dilakukan hingga udang memperlihatkan gejala klinis

abnormal yang berarti bakteri *V. parahaemolyticus* telah aktif. Kemudian dilakukan isolasi kembali pada bagian abnormal udang yang ditanam pada media TCBS. Bakteri yang tumbuh pada media TCBS ini digunakan sebagai ujiantang.

#### *Uji Tantang*

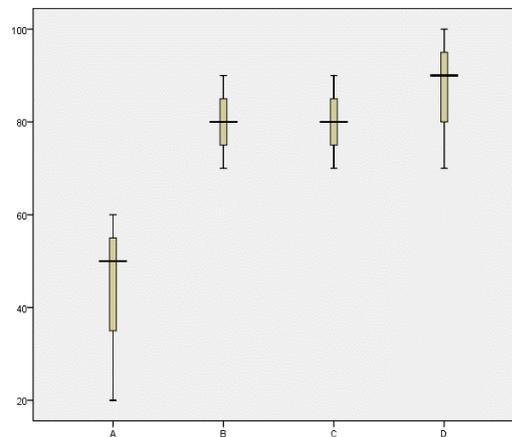
Uji tantang dilakukan menggunakan bakteri *V. parahaemolyticus* dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml sebanyak 0,1 ml/ekor. Injeksi dilakukan pada bagian dekat insang dengan menggunakan alat suntik. Gejala klinis udang pasca uji tantang diamati selama 3 hari dan dilakukan perendaman menggunakan ekstrak buah *A. alba* dengan konsentrasi 300 mg/l, 350 mg/l dan 400 mg/l dan dilakukan pengamatan gejala klinis kembali selama 21 hari.

#### *Analisis Data*

Data kelangsungan hidup dan kerusakan jaringan pada hewan uji dianalisis secara statistik kemudian diuji normalitas serta homogenitas. Apabila data telah homogen, diolah dengan analisis sidik ragam (ANNOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah *A. alba* dengan konsentrasi berbeda sebagai pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang vaname. Apabila berbeda nyata antar perlakuan, maka diuji lanjut menggunakan uji Duncan pada tingkat kepercayaan 95%. Sedangkan data RPS (*Relative Percent Survival*) dianalisis menggunakan uji T dan data kualitas air serta gejala klinis dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

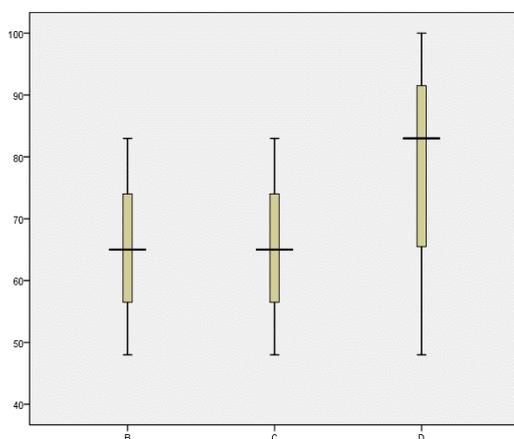
Hasil pengamatan gejala klinis menunjukkan perubahan morfologi udang vaname terjadi pada hari ke-2 pasca injeksi *V. parahaemolyticus* yaitu warna tubuh, ekor, dan pleopod memerah serta hepatopankreas berwarna cokelat. Pada hari ke-3 udang mengalami nekrosis pada karapas dan ekor geripis. Pengamatan gejala klinis pasca perendaman ekstrak buah *A. alba* menunjukkan bahwa semua perlakuan belum mengalami adanya pemulihan hingga hari ke-5. Perlakuan D (400 mg/l) yang merupakan dosis tertinggi membutuhkan waktu pemulihan lebih cepat dibandingkan perlakuan A, B, dan C. Udang vaname pada perlakuan A (0 mg/l) tidak mengalami pemulihan tubuh hingga hari ke-21, hal tersebut dikarenakan tidak terdapat kandungan bahan aktif pada perlakuan A yang membantu tubuh udang dalam menghambat infeksi bakteri. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Rosidah and Afizia (2012) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka kemampuan anti-bakterinya juga semakin besar. Pemulihan kondisi morfologi udang pasca perendaman ekstrak buah *A. alba* dikarenakan adanya kandungan senyawa aktif pada buah *A. alba* seperti flavonoid dan tanin yang berfungsi sebagai antibakteri. Pemulihan morfologi udang vaname ditandai dengan mudarnya warna merah pada kaki dan ekor serta hilangnya nekrosis pada karapas udang. Terjadinya pemulihan morfologi udang membuktikan bahwa senyawa aktif pada buah *A. alba* berperan sebagai antibakteri pada udang vaname pasca injeksi *V. parahaemolyticus*.



Gambar 1 Kelangsungan hidup udang vaname

Hasil analisis ragam (ANNOVA) menunjukkan perendaman udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* menggunakan ekstrak buah *A. alba* berpengaruh terhadap kelangsungan hidup udang vaname. Hasil analisis diuji lanjut menggunakan uji Duncan yang menunjukkan bahwa perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan B, C, dan D ( $P < 0,05$ ) (Gambar 1).

Kelangsungan hidup udang vaname berkaitan dengan kandungan bahan aktif dalam buah *A. alba* yang terdiri dari flavonoid dan tanin. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Mekanisme kerja flavonoid yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel sehingga tidak dapat diperbaiki lagi. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang dapat mengerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan mati. Nilai kelangsungan hidup udang vaname juga berkaitan dengan patoge-



**Gambar 2** *Relative percent survival*

nisitas *V. parahaemolyticus* yang berhubungan dengan kondisi udang. Kondisi air selama pemeliharaan udang vaname berada dalam kisaran optimum yang mempengaruhi udang tetap dalam kondisi yang baik, dimana *V. parahaemolyticus* bersifat oportunistik yaitu dapat menjadi lebih patogen apabila kondisi inang kurang optimal (Nasi et al., 2012).

Hasil analisis uji t menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak buah *A. alba* sebagai pengobatan udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* tidak berpengaruh terhadap *relative percent survival* (RPS) udang vaname ( $P > 0,05$ ) Gambar 2.

Pemberian ekstrak buah *A. alba* sebagai pengobatan udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* memberikan perlindungan yang cukup baik meskipun tidak berpengaruh nyata terhadap *relative percent survival* udang. Hal ini sesuai dengan pernyataan Alifuddin (2007) secara umum efektivitas vaksin dianggap baik apabila nilai RPS  $\geq 50\%$ . Ketahanan udang pada masing-masing perlakuan dapat dilihat dari pengamatan langsung berupa perubahan tingkah

laku udang selama masa pemeliharaan pasca perendaman.

Kualitas air merupakan faktor penting yang sangat mempengaruhi kehidupan organisme akuatik seperti reproduksi, pertumbuhan, dan kelangsungan hidup. Parameter kualitas air yang diamati dalam penelitian ini seperti suhu, DO, salinitas, dan pH berada dalam kisaran optimal.

Hepatopankreas merupakan organ target infeksi bakteri dan merupakan organ terpenting pada udang karena memiliki beberapa fungsi seperti detoksifikasi, memproduksi enzim-enzim pencernaan, menyimpan hasil-hasil pencernaan termasuk mineral dan bahan organik, ekskresi, metabolisme lemak dan karbohidrat sebagai energi, dan juga menyebarkan nutrisi ke berbagai bagian tubuh untuk fungsi fisiologis, khususnya saat pembentukan kembali kulit udang saat periode *moulting* (Musallamah and Abdulgani, 2010). Apabila hepatopankreas mengalami kerusakan, maka akan berpengaruh terhadap sistem metabolisme dalam tubuh udang.

Uji histopatologi dilakukan pada hepatopankreas udang sehat, udang terinfeksi *V. parahaemolyticus*, dan udang pasca perendaman ekstrak buah *A. alba* untuk melihat perbedaan organ hepatopankreas udang vaname. Dari hasil uji didapatkan semua sampel mengalami kerusakan jaringan berupa nekrosis (N), vakuolasi (V), dan degenerasi (D) dengan nilai kerusakan rata-rata  $< 25\%$  yang menyebabkan hepatopankreas mengalami kerusakan ringan akibat infeksi bakteri *V. parahaemolyticus*.

Tingkat kerusakan yang terjadi pada tiap perlakuan mendapatkan persentase

**Tabel 1** Rata-rata tingkat kerusakan hepatopankreas udang vaname

Tingkat kerusakan	Kerusakan jaringan		
	Nekrosis	Degenerasi	Vakuolasi
A (0 mg/l)	++	+	++
B (300 mg/l)	+	+	+
C (350 mg/l)	+	+	+
D (400 mg/l)	+	+	+

Keterangan: + = Kerusakan ringan ++ = Kerusakan sedang

yang berbeda. Perbedaan tingkat kerusakan yang terjadi disajikan pada (Tabel 1).

Tingkat kerusakan jaringan pada perlakuan A (0 mg/l) mengalami kerusakan lebih parah dibandingkan dengan perlakuan B (300 mg/l), C (350 mg/l), dan D (400 mg/l). Hal tersebut dikarenakan perlakuan A tidak dilakukan perendaman dengan ekstrak buah *A. alba*. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Riddo and Pramesti (2012) bahwa immunostimulan bergantung pada tinggi rendahnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Konsentrasi dibawah nilai minimal untuk terjadinya respon imun tidak akan memberikan pengaruh pada peningkatan imun, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi juga tidak dapat memberikan efek sebagai inhibitor.

Kerusakan hepatopankreas seperti nekrosis, degenerasi, dan vakuolasi pernah dilaporkan oleh Pratama et al. (2014) bahwa adanya kerusakan pada hepatopankreas berupa nekrosis, lesi, bolitas parah pada udang yang terinfeksi vibriosis. Vakuolasi merupakan pembentukan ruang di dalam sel yang berisi lemak akibat dari degenerasi sel yang ditandai dengan munculnya vakuola pada tubulus hepatopankreas (Zhahrah et al., 2016). Kerusakan jaringan yang lain terlihat adanya bolitas dan nekrosis serta sel epitel yang bengkak dan menunjukkan sitoplasma menjadi padat.

Ambipillai et al. (2003) menyatakan bahwa hepatopankreas udang yang terinfeksi vibriosis menunjukkan adanya nekrosis parah, kehilangan struktur jaringan, atrofi sel epitel tubulus serta pembulatan vakuola dan pegelupasan sel-sel ke dalam lumen. Nekrosis merupakan kematian sel atau jaringan yang mengakibatkan jaringan tidak utuh lagi atau tidak normal. Nekrosis disebabkan oleh agen-agen biologis seperti bakteri sehingga terjadi perubahan sel (Austin and Zhang, 2006). Karunasagar et al. (1994) melaporkan terjadinya penyakit bolitas dapat menyebabkan degenerasi hepatopankreas serta diperkuat oleh Austin and Zhang (2006) yang menyatakan bahwa bolitas menyebabkan terhalangnya kelenjar pencernaan akibat pembengkakan jaringan yang berbentuk seperti bola.

## SIMPULAN

Ekstrak buah *A. alba* berpengaruh terhadap tingkat kelangsungan hidup dan kondisi hepatopankreas udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* dengan nilai tertinggi pada konsentrasi 400 mg/l. Penggunaan ekstrak buah *A. alba* tidak berpengaruh terhadap nilai *relative percent survival* udang vaname.

## Pustaka

- Alifuddin, M. (2007). Immunostimulan on aquatic organisms. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 1(2):87–92.
- Ambipillai, L., Sobhana, K., George, K., and Sanil, N. (2003). Histopathological survey of cultured shrimps in cochin, kerala. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 45(2):178–185.

- Austin, B. and Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43(2):119–124.
- Handayani, S. and Nurjanah, S. R. (2013). Kandungan flavonoid kulit batang dan daun pohon api-api (*avicennia marina* (forks.) vierh.) sebagai senyawa aktif antioksidan. *Bogor. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Skripsi*, pages 35–37.
- Hardiyani, S., Harpeni, E., Setyawan, A., and Supono, S. (2016). Pathogenicity and in vivo study of local isolate bacillus sp. d2. 2 at the vannamei culture (*litopenaeus vannamei*). *AQUASAINS*, 5(1):441–446.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G., and Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3-4):203–209.
- KKP (2013). Kelautan dan perikanan dalam angka 2013.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., Selvin, J., and Shakir, C. (2009). Biopotentials of mangroves collected from the southwest coast of india. *Global J Biotechnol Biochem*, 4(1):59–65.
- Musallamah, A. and Abdulgani, N. (2010). Pengaruh paparan timbal (pb) terhadap perubahan histopatologi hepatopankreas udang galah (*macrobrachium rosenbegii* de mann).[skripsi]. *ITS. Surabaya*.
- Nasi, L., Prayitno, S. B., and Sarjito (2012). Kajian bakteri penyebab vibriosis pada udang secara biomolekuler. Master's thesis, Magister Manajemen Sumberdaya Pantai. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nur'aini, Y., Bambang, H., Subyakto, S., and Gemi, T. (2007). Active surveillance of infectious myonecrosis virus (imnv) in pond-cultured white shrimp (*litopenaeus vannamei*) in east java and bali. *Jurnal Perikanan UGM. IX (1)*, pages 25–31.
- Pratama, P. N., Prayitno, S. B., et al. (2014). Pemanfaatan ekstrak daun binahong (*anredera cordifolia*) untuk penanggulangan penyakit bakteri (*vibrio harveyi*) pada udang windu. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(4):281–288.
- Putro, S. (2008). Peran mutu dalam menunjang ekspor udang nasional. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 3(1):1–6.
- Ridlo, A. and Pramesti, R. (2012). Aplikasi ekstrak rumput laut sebagai agen imunostimulan sistem pertahanan non spesifik pada udang (*litopenaeus vannamei*). *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 14(3):133–137.
- Rosidah and Afizia, W. M. (2012). Potensi ekstrak daun jambu biji sebagai antibakterial untuk menanggulangi serangan bakteri *aeromonas hydrophila* pada ikan gurame (*osphronemus gouramy lacepede*). *Jurnal Akuatika*, 3(1):19–27.
- Sipayung, B. S., Ma'ruf, W. F., and Dewi, E. N. (2015). Pengaruh senyawa bioaktif buah mangrove *avicennia marina* terhadap tingkat oksidasi fillet ikan nila merah *o. niloticus* selama penyimpanan dingin. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 4(2):115–123.

- Subashree, M., Mala, P., Umanrnahasewari, M., Jayakumari, M., Maheswari, K., Sevanthi, T., and Manikandan, T. (2010). Screening of the antibacterial properties of *avicennia marina* from pichavaram mangrove. *Asian Journal of Science and Technology*, 1:16–19.
- Widanarni, Noermala, J. I., and Sukenda (2014). Pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik untuk pengendalian ko-infeksi *vibrio harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* pada udang vaname *litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 13(1):11–20.
- Zahrah, Z., Nur, I., and Sabilu, K. (2016). Kerusakan jaringan hepatopankreas pada udang vaname (*litopenaeus vannamei*) akibat paparan logam berat nikel (ni) secara buatan. *Jurnal Media Akuatika*, 1(2).