

TREATMENT OF VIBRIOSIS DISEASE (*Vibrio harveyi*) IN VANAME SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) USING *Avicennia alba* LEAVES EXTRACT

Dian Rusadi*¹, Wardiyanto, dan Rara Diantari²

ABSTRACT

Avicennia alba is a mangrove plant that often used by coastal society as a traditional medicine, it is potential to be developed as the sources of pharmaceutical. The aim of the research is to examine the effect of *Avicennia alba* leaves extract various concentrations to *Vibrio harveyi* infection on vaname shrimp. The addition of the extract is thought to be used as an antibacterial so that it can give effect to the attack of *V. harveyi* in vaname shrimp. Vaname shrimps (total of 120 shrimps) with a weight of 10 ± 2 g/ind were injected intramuscularly with *V. harveyi* bacteria in 107 CFU/ml density. After the occurrences of clinical symptoms, the shrimps were immersed into *A. alba* leaves extract with concentration 0 ppm, 150 ppm, 250 ppm, and 350 ppm for 21 days. The results showed that the addition leaves extract can increase shrimp's survival rate as much as 46.67% and increase the shrimp's ability to prevent (RPS) *V. harveyi* infection until of $70 \pm 15\%$. The mean time of death (MTD) was 106 ± 18.33 hours, it caused there are active compounds contained such as saponin, tannin, and steroid be suspected antibacterial so that they can protect shrimp from the effect of *Vibrio* infection damage. Giving a concentration of 250 ppm *Avicennia alba* leaves extract can treat vaname shrimp which was attacked by *V. harveyi* better than other treatments.

Keyword: *Avicennia alba* leaf, *Litopenaeus vannamei*, antibacteri, *Vibrio harveyi*

Pendahuluan

Infeksi bersama umumnya ditemukan pada budidaya udang dan mengakibatkan masalah serius dibanding dengan infeksi tunggal (Phouc *et al.*, 2009; Martorelli *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Infeksi bersama pada udang umumnya disebabkan oleh penyakit virus dan bakteri. Menurut Rangkuti (2017)

udang yang terinfeksi WSSV mampu melemahkan imunitas dan menyebabkan udang mudah terinfeksi patogen oportunistik seperti *Vibrio* yang dapat mengakibatkan kematian lebih tinggi dibanding dengan infeksi tunggal WSSV. Salah satu bakteri yang dominan ditemukan ketika adanya infeksi WSSV adalah *Vibrio harveyi* (Jithendran *et al.*, 2010).

¹ E-mail: rusadidian47@yahoo.com

² Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung
Jl. Prof. S. Brodjonegoro No.1 Gedong Meneng Bandar Lampung, 35145

Vibrio harveyi merupakan bakteri penyebab penyakit vibriosis yang meresahkan pembudidaya udang sebab dapat menyebabkan kematian udang hingga 80% dalam beberapa hari (Isarangkura & Sae-Hee, 2002). Penyakit ini juga dapat menyebabkan kematian massal baik pada pembenihan maupun pembesaran udang vaname didunia karena sifatnya yang virulen (Soonthornchai *et al.*, 2010). Gejala klinis udang yang terinfeksi penyakit vibriosis menunjukkan berwarna hitam kemerahan, dan beberapa organ luar tampak merah, terutama pada insang dan anggota badan (Septiani *et al.*, 2012).

Berbagai usaha dalam pengobatan penyakit vibriosis telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini kematian udang masih terjadi. Pengobatan yang umum dilakukan adalah dengan aplikasi antibiotik. Penggunaan antibiotik atau bahan kimia dengan konsentrasi yang kurang tepat dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan perairan, menyebabkan resistensi, dan membahayakan kesehatan konsumen karena residu dari bahan kimia yang digunakan akan terakumulasi secara berkala pada tubuh udang (Defoirdt *et al.*, 2007).

Salah satu pendekatan yang dapat diterapkan adalah penggunaan senyawa bioaktif alami dengan spektrum yang luas tanpa efek samping yang berbahaya. Beberapa spesies mangrove juga digunakan untuk menghambat vibriosis seperti *Avicennia marina* dan *Sonneratia caseolaris* (Maryani *et al.*, 2002; Zulham, 2004). Prabhu *et al.* (2012) menyebutkan daun *Avicennia alba* mengandung senyawa bioaktif yang

dapat digunakan sebagai antioksidan, *anti inflammatory*, dan *anti cholinergic*. Kemampuan ekstrak daun *Avicennia alba* dalam menghambat dan membunuh *V. harveyi* disebabkan memiliki tiga senyawa metabolit sekunder yaitu saponin, flavonoid, dan tanin yang dapat bekerja merusak membran sitoplasma (Fitri *et al.*, 2018). Namun penelitian mengenai konsentrasi ekstrak daun *Avicennia alba* yang tepat dalam menghambat serangan bakteri *V. harveyi* pada udang vaname perlu diteliti lebih lanjut. Pemberian ekstrak diduga dapat dijadikan sebagai antibakteri sehingga dapat memberikan pengaruh terhadap serangan *V. harveyi* pada udang vaname.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh ekstrak daun *Avicennia alba* dengan berbagai konsentrasi terhadap serangan *Vibrio harveyi* pada udang vaname.

Metode

Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Daun mangrovediangambil dari kawasan Pulau Pasaran, Bandar Lampung. Bagian mangrove yang diambil dipilih secara acak dengan tidak mempertimbangkan umur dan letak daun. Kemudian dibersihkan dari kotoran dengan akuades dan dikeringanginkan. Sampel mangrove dicacah halus dan dimasukkan kedalam erlenmeyer. Sebanyak 100 g ekstrak kasar diekstraksi selama 24 jam dengan pelarut metanol 70%, kemudian disaring dengan kertas saring. Selanjutnya residu diekstraksi berulang kali pada suhu ruang sampai tidak berwarna lagi kembali

Selanjutnya filtrat diultrasonifikasi dan dipekatkan menggunakan *Vacuum Rotary Evaporator* (IKA RV 10 Auto V-C, No. 0010003475 Germany) pada suhu 37 °C, sehingga didapatkan berat ekstrak sebanyak 15,36 g.

Persiapan Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Vibrio harveyi* yang berasal dari koleksi Balai Besar Perikanan Budiaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Isolat kemudian dikultur pada media *Nutrient Broth* (Merck No. 12000000-KIM-000061548), lalu di inkubasi pada *orbital shaker* selama 24 jam. Lalu, diukur menggunakan Spektrofotometer (Thermo scientific Genesys 20) (625-650 nm) hingga kepadatan 106 CFU/ml.

Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas anti bakteri ekstrak metanol daun *Avicennia alba* diuji dengan metode Difusi Agar menurut Kirby-Bauer. Bahan ekstrak daun dilakukan uji daya hambat terhadap *V. harveyi*. 20µl isolat bakteri dengan kepadatan 106 cfu/ml ditanam pada media *Nutrient Agar* (Merck No. 12000000-KIM-000061548) kemudian diberikan perlakuan masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 0, 150, 200, 250, 300, 350 ppm yang mengacu pada penelitian Suciati *et al.* (2012) dengan menggunakan ekstrak daun *Rhizophora mucronata* dan kontrol positif digunakan larutan antibiotik Choloramphenicol 250 mg (SANBE-Bandung) sebanyak 50 ppm dengan cara meneteskan larutan ekstrak pada *paper disc for antibiotic assay* dengan ukuran 8 mm (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan). Setiap perlakuan

dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, selanjutnya diinkubasi pada suhu 33 °C. Pengamatan dan pemeriksaan dilakukan terhadap ukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekitar *paper disc*, pada jam ke-24 dan 48 setelah inkubasi.

Pembuatan Konsentrasi Uji

Pembuatan konsentrasi uji dilakukan dengan membuat larutan stok. Ekstrak daun *Avicennia alba* ditimbang 1.450 µg, kemudian dilarutkan kedalam air laut sebanyak 1 ml, sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 1.450 ppm. Dari larutan stok, dilanjutkan pada tahap pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0 ppm, 150 ppm, 250 ppm, dan 350 ppm.

Persiapan Wadah dan Hewan Uji

Udang vaname (total 120 ekor) dengan bobot 10±2 g/ekor yang berasal dari tambak di desa Hanura, Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran. Terdapat 4 perlakuan konsentrasi ekstrak daun *Avicennia alba* yaitu A (0 ppm), B (150 ppm), C (250 ppm), dan D (350 ppm) dengan 3 ulangan. Wadah perlakuan berupa kontainer plastik ukuran 63x41x32 cm³ dengan volume air yang digunakan 45 L sebanyak total 12 wadah. Udang vaname sebanyak 10 ekor/wadah diberi pakan tenggelam dengan bentuk *crumble* dengan protein 30%. Jumlah pakan yang diberikan pada pemeliharaan udang vaname sebesar 3% dari total biomassa udang. Selama penelitian berlangsung kualitas air meliputi DO, pH, salinitas, dan suhu dikelola sesuai baku mutu untuk kehidupan normal udang vaname (Badan Standar Nasional, 2006).

Uji Tantang Udang Vaname

Udang diinjeksikan dengan *V. harveyi* 106 CFU/ml sebanyak 0,1 ml/ekor. Injeksi dilakukan dibawah karapas. Selama 1 – 96 jam (Huang *et al.*, 2013) udang diamati gejala abnormalitas yang menunjukkan udang terinfeksi penyakit vibriosis. Jika gejala abnormal pada injeksi udang telah terlihat, udang direndam menggunakan ekstrak daun *Avicennia alba* sesuai konsentrasi perlakuan selama 15 menit. Setelah itu udang dikembalikan kedalam wadah pemeliharaan. Kemudian dilakukan pengamatan gejala klinis dan kematian yang dialami udang vaname setiap 6 jam selama 21 hari pemeliharaan setelah perendaman.

Parameter Pengamatan

Parameter penelitian di antaranya kelangsungan hidup (*Survival Rate*) (Effendie, 1997), *Relative Percent Survival* (RPS) (Ellis, 1988), dan MTD (*Mean Time to Death*).

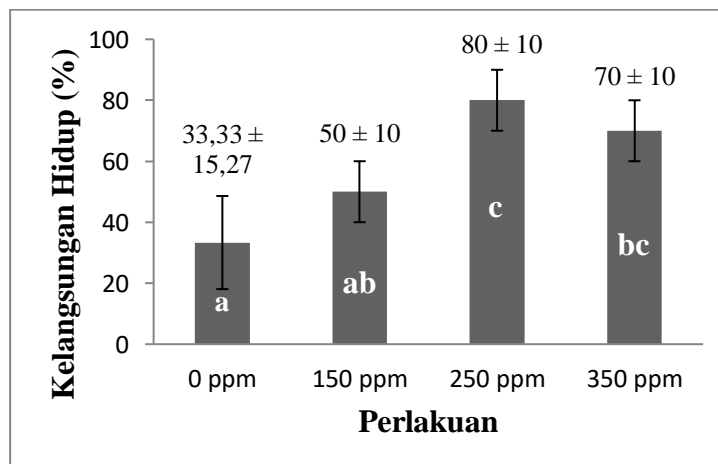
Analisis Data

Parameter kelangsungan hidup dan MTD diolah melalui *One-way Analysis of Varians* (ANOVA) dan jika terdapat pebedaan nyata, dilakukan uji lanjut DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) menggunakan alat bantu SPSS 22.0. Sedangkan, RPS dianalisis dengan *Independent T- Test*.

Hasil dan Pembahasan

Survival Rate (SR)

Pengaruh pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* terhadap kelangsungan hidup udang yang diuji tantang *V. harveyi* dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi *Vibrio*. Pada konsentrasi 250 ppm dapat memberikan 46,67% kelangsungan hidup secara signifikan lebih tinggi (80 ± 10) ($P < 0,05$) dibanding dengan perlakuan kontrol ($33,33 \pm 15,27$) (Gambar 1). Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan pengaruh pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* dengan konsentrasi 250 ppm tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 350 ppm, namun berbeda nyata dengan konsentrasi 0 ppm dan 150 ppm.



Keterangan : huruf yang berbeda menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$)

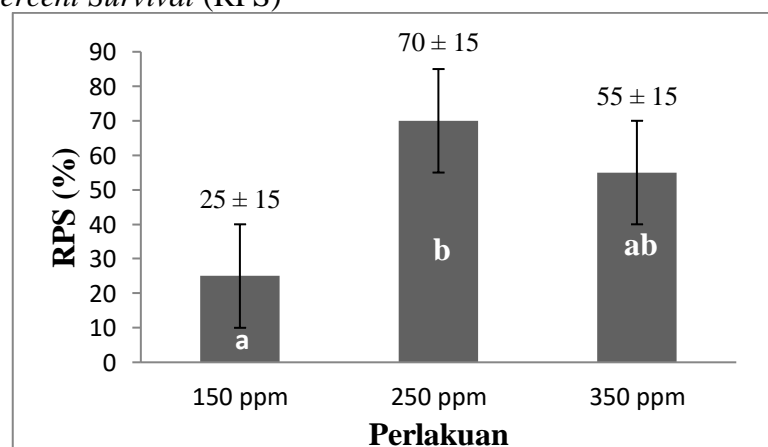
Gambar 1. Kelangsungan hidup udang vaname setelah perendaman (Rerata ± Standar Deviasi)

Rata-rata nilai kelangsungan hidup terendah terdapat pada perlakuan A (udang sakit) sebab serangan *V. harveyi* menyebabkan perubahan tingkah laku udang menjadi lemah dan kehilangan nafsu makan yang akhirnya menyebabkan kematian. Hal tersebut sesuai dengan menurut Sari *et al.* (2015) Udang yang terinfeksi *V. harveyi* akan mengalami perubahan tingkah laku berupa respon terhadap pakan menurun, udang menjadi pasif, berenang miring dan mendekati aerasi. Pemberian ekstrak sebagai anti bakteri mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dengan cara mempengaruhi bakteri dengan merusak dinding selnya sehingga akan pecah dan bakteri tidak dapat bertahan terhadap pengaruh luar, atau mengganggu keutuhan membran sel bakteri sehingga pertukaran zat aktif atau metabolit ke dalam dan keluar sel akan terganggu (Pelczar & Chan, 1988).

Mekanisme kerja tanin yaitu dengan mengganggu proses sintesa

mukopeptida dan berikatan dengan peptidoglikan dinding sel bakteri sehingga pembentukan sel baru akan terganggu (Jawetz *et al.*, 2001) dan akhirnya mengalami kerusakan (Fitriet *et al.*, 2018). Menurut Triantoet *et al.* (2004) bakteri *Vibrio* merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai kandungan peptidoglikan yang dapat menentukan bentuk sel serta memberikan kekakuan yang dibutuhkan untuk melindungi bakteri dari perobekan osmotik. Saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Terjadi kerusakan dinding sel bakteri menyebabkan sel bakteri tanpa dinding yang disebut protoplasma (Jawetz *et al.*, 2001). Kerusakan pada dinding sel bakteri akan menyebabkan kerusakan membran sel, yaitu hilang sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuk zat-zat antara lain air, nutrisi, enzim-enzim tidak terseleksi sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup.

Relative Percent Survival (RPS)



Keterangan : huruf yang berbeda menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$)

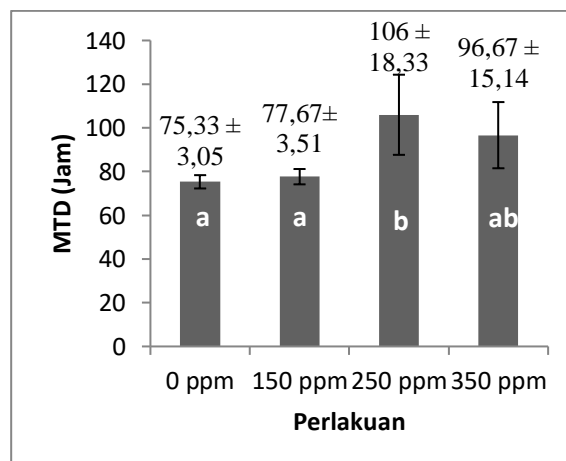
Gambar 2. Relative Percent Survival udang vaname (Rerata ± Standar Deviasi)

Nilai *Relative percent survival* (RPS) tertinggi udang vaname selama pengobatan dengan ekstrak daun *Avicennia alba* pada perlakuan C sebesar $70 \pm 15\%$ dan terendah pada perlakuan B sebesar $25 \pm 15\%$ (Gambar 2). Hasil uji T diketahui bahwa pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* terhadap nilai RPS udang vaname yang terinfeksi *V. harveyi* berbeda nyata ($P < 0,05$). Dimana, pengaruh pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* dengan konsentrasi 250 ppm tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 350 ppm, namun berbeda nyata dengan konsentrasi 150 ppm. Sebab dengan konsentrasi minimum 250 ppm dapat memberikan perlindungan diri pada udang vaname dari infeksi *V. harveyi* (RPS) yaitu hingga 70%. Pada ekstrak etanol daun *Avicennia marina* memberikan perlindungan diri terhadap post larva udang vaname berkisar 34,33 – 80% (Septiani *et al.*, 2018). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pengobatan menggunakan ekstrak daun *Avicennia alba* termasuk kategori efektif mengobati udang

vaname yang terinfeksi *V. harveyi*, sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup. Menurut Parenrengi *et al.* (2013) perlakuan dianggap efektif jika nilai RPS $> 60\%$.

Mean Time to Death (MTD)

Hasil dari nilai MTD selama 21 hari pemeliharaan menunjukkan bahwa rerata waktu kematian terlama (MTD) terdapat pada pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* pada konsentrasi 250 ppm, selama $106 \pm 18,33$ jam, sedangkan pada udang yang tidak diberi ekstrak memiliki rerata nilai MTD $75 \pm 3,05$ jam (Gambar 3). Dari hasil uji statistik diketahui bahwa pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* terhadap waktu kematian udang vaname yang terinfeksi *V. harveyi* berbeda nyata ($P < 0,05$). Hasil uji lanjut Duncan diketahui bahwa adanya pengaruh pemberian ekstrak daun *Avicennia alba* dengan konsentrasi 250 ppm tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 350 ppm, namun berbeda nyata dengan konsentrasi 0 ppm dan 150 ppm.



Keterangan : huruf yang berbeda menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Gambar 3. *Mean Time to Death*/MTD (jam) udang vaname setelah perendaman (Rerata \pm Standar Deviasi)

Kesimpulan

Ekstrak daun *Avicennia alba* pada konsentrasi 250 ppm dapat memberikan pengaruh nyata dalam meningkatkan kelangsungan hidup, RPS, dan MTD udang vaname yang terserang *V. harveyi*.

Daftar Pustaka

- Assani, S. (1994). *Mikrobiologi Kedokteran*. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Chen, Y.B., Zhou, J.F., Wan, X.H., & Gao, S. (2012). Establishment of a multiplex PCR and an investigation of co-infection rate of WSSV and IHHNV in *Penaeus vannamei* in northern of Jiangsu. *J Anim Vet Adv*, 11 (2): 181-185.
- Davis, W. & Strout, T. (1971). Disc method of microbiological antibiotic assay. *Applied Microbiology*, 22 (4): 59 – 73.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25: 472 – 479.
- Effendie. (1997). *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara, Yogyakarta.
- Ellis, A. (1988). *Fish Vaccination*. Academic Press, New York.
- Fitri, M.Z., Kismiyati, & Mubarak, A.S. (2018). Daya Antibakteri Ekstrak Daun Api-Api (*Avicennia alba*) terhadap *Vibrio harveyi* Penyebab Vibriosis secara Invitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2): 131 – 136
- Huang, H., Lin, X., Xiang, J., & Wang, P. (2013). Selection of *Vibrio harveyi* - resistant *Litopenaeus vannamei* via three-round challenge selection with pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 35: 328 – 333.
- Isarangkura, A. & Sae-Hae, S. (2002). A Review of The Economic Impacts of Aquatic Animal Disease. *FAO Fisheries Technical Paper*: 253-286.
- Jawetz, E., Melnik, J., & Adelberg, E. (2005). *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran (Jilid 1)*, diterjemahkan oleh Eddy Mudihard. Salemba Medika, Jakarta.
- Jithendran, K.P., Poornima, M., Balasubramanian, C.P., & Kulasekarapandian, S. (2010). Diseases of mud crabs (*Scylla* spp.): an overview. *Indian J Fish*, 57 (3): 55 – 63.
- Khanjure, P.V. & Rathod, J.L. (2010). Antimicrobial activity of extracts of *Acanthus ilicifolius* extracted from the mangroves of Karwar Coast Karnataka. *Rec. Res. Sci. Technol*, 2(6): 98 – 99.
- Martorelli, S.R., Overstreet, R.M., & Jovonovich, J.A. (2010). First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine crustaceans. *Bull Mar Sci*, 86(1): 117 – 131.
- Maryani, Dana, D., & Sukenda. (2002). Peranan ekstrak kelopak dan buah mangrove *Sonneratia caseolaris* (L) terhadap infeksi bakteri *Vibrio harveyi* pada udang windu (*Penaeus monodon* fab.). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 1: 129 – 138.
- Parenrengi, A., Tenriolu, A., & Tampangallo, B. (2013). Uji tantang udang windu *Penaeus*

- monodon* transgenis menggunakan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. *Prosiding Konferensi Akuakultur Indonesia*: 226 - 233
- Pelczar, M.J., & Chan, E.S. (1988). *Dasar-dasar Mikrobiologi. Edisi I*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Phouc, L.H., Corteel, M., Thanh, N. C., Nauwynk, H., Pensaert, M., Alday-Sanz, V., Van Den Broeck, W., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2009). Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290: 61 – 68.
- Prabhu, V.V. & Guruvayoorappan, C. (2012). Phytochemical Screening of Methanolic Extract of Mangrove *Avicenni marina* (Forssk.) *Vierh. Der Pharmacia Sinica*, 3(1): 64 – 70.
- Rangkuti, R.A. (2017). Pencegahan Penyakit Ko-Infeksi Ringan White Spot Syndrome Virus (WSSV) dan *Vibrio harveyi* pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Suplementasi Pakan Mengandung Mikrokapsul Sinbiotik. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sari, R., Sarjito, & Haditomo, A. (2015). Penambahan Serbuk Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dalam Pakan terhadap Kelulushidupan dan Histopatologi Hepatopankreas Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*) yang Diinfeksi Bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 4(1): 26 – 32.
- Septiani, G., Priyatno, S., & Anggoro, S. (2012). Antibacterial Activity of Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Extracts on The In Vitro Growth of The *Vibrio harveyi*. *J. Veteriner*, 13(3): 257 – 262.
- Badan Standar Nasional. 2006. SNI 01-7246-2006. *Produksi udang vaname (Litopenaeus vannamei) di Tambak dengan Teknologi Intensif*. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Soonthornchai, W., Rungrassamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Soderhall, K., Jiravanichpaisal, P. (2010). Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Dev Com Immunol*, 34: 19 – 28.
- Suciati, A., Wardiyanto, & Sumino. (2012). Efektifitas ekstrak daun *Rhizophora mucronata* dalam menghambat pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* dan *Vibrio harveyi*. *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 1(1): 1 – 8.
- Trianto, A., Edi, W., Suryono, & Rahayu, S. (2004). Ekstrak daun mangrove *Aegiceras corniculatum* sebagai anti bakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 9(4): 186 – 189.
- Zulham, R. (2004). Potensi ekstrak mangrove *Sonneratia caseolaris* dan *Avicenia marina* untuk pengendalian bakteri *Vibrio harveyi* pada larva udang windu (*Penaeus monodon* fabr.). *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor