



**POTENSI EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN
BAWANG PUTIH UNTUK PENCEGAHAN INFEKSI
Vibrio parahaemolyticus PADA BUDIDAYA UDANG VANAME**

MOHAMAD IQBAL KURNIAWINATA



**PROGRAM DOKTOR ILMU AKUAKULTUR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul Potensi Ekstrak Pasak Bumi, Kunyit Putih dan Bawang Putih untuk Pencegahan Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum 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 di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2024

Mohamad Iqbal Kurniawinata
NIM C1601201012

RINGKASAN

OHAMAD IQBAL KURNIAWINATA. Potensi Ekstrak Pasak Bumi, Kunyit Putih dan Bawang Putih untuk Pencegahan Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada Kegiatan Budidaya Udang Vaname. Dibimbing oleh SUKENDA, DINAMELLA AHJUNINGRUM, WIDANARNI, dan JULIE EKASARI

Upaya peningkatan produksi udang menyebabkan perkembangan pesat dari budidaya udang dengan teknologi tradisional dan semi intensif menuju intensif. Budidaya udang intensif ditandai dengan penggunaan padat tebar yang tinggi. Sistem budidaya ini dapat menimbulkan berbagai penyakit jika terjadi ketidakseimbangan antara lingkungan, patogen dan organisme budidaya. Penyakit itu menjadi faktor penting penghambat perkembangan budidaya udang. Pengendalian penyakit melalui penggunaan fitobiotik sebagai pakan aditif dalam budidaya memiliki kelebihan seperti pengolahan yang sederhana, serta ramah lingkungan untuk digunakan dalam jangka waktu lama. Pasak bumi (*Eurycoma gifolia*), kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan bawang putih (*Allium sativum*) memiliki potensi untuk digunakan sebagai fitobiotik. Sehingga diperlukan penelitian untuk mengevaluasi potensi pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai fitobiotik untuk pengendalian penyakit vibriosis pada udang vaname.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai fitobiotik untuk pengendalian infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada budidaya udang vaname. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, (1) Evaluasi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus*, (2) Efektivitas ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dalam meningkatkan status kesehatan dan kelangsungan hidup udang yang diuji tantang *V. parahaemolyticus*; (3) Evaluasi efektivitas ekstrak fitobiotik dan keragaman mikrobiota usus udang yang dipelihara dengan penambahan ekstrak pasak bumi di tambak

Tahap pertama pada penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri, dan antibiofilm ekstrak tiga bahan fitobiotik yaitu pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*. Fitobiotik diekstrak dengan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 (b/v) dengan metode maserasi. Ekstrak digunakan untuk uji penghambatan terhadap *V. parahaemolyticus*. Analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) menunjukkan bahwa senyawa bioaktif fitokimia yang terdapat dalam pasak bumi lebih beragam dengan kandungan total fenol dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih dan bawang putih yaitu sebesar 9,61 % (b/b) dan 13,38 QE/g. Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) menunjukkan nilai konsentrasi ekstrak yang bersifat bakterisida pada pasak bumi memiliki nilai konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan yang ditemukan pada ekstrak kunyit putih atau bawang putih. Nilai MIC pasak bumi dalam menghambat aktivitas bakteri *V. parahaemolyticus* hingga 100% didapatkan pada dosis 100 mg mL⁻¹. Masing-masing ekstrak juga memiliki kemampuan penghambatan dan destruksi biofilm *V. parahaemolyticus*. Ekstrak pasak bumi dan bawang putih memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan menghambat dan mendestruksi pembentukan biofilm *V. parahaemolyticus*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pasak bumi memiliki potensi sebagai antibakteri dan antibiofilm.

Tahap kedua bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih pada pakan terhadap respons imun dan resistansi udang vaname terhadap infeksi *V. parahaemolyticus*. Perlakuan yang diuji adalah empat perlakuan pemberian pakan dengan penambahan fitobiotik yang berbeda yang dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan penambahan fitobiotik dalam pakan meliputi ekstrak fitobiotik pasak bumi sebanyak 1,6% (EL16), ekstrak kunyit putih sebanyak 6,4% (CZ64), dan ekstrak bawang putih 6,4% (AS64), dan campuran fitobiotik 1:1:1 (C1) dalam pakan. Udang uji berukuran awal $2,53 \pm 0,22$ g diberi pakan perlakuan secara *at satiation* sebanyak empat kali sehari selama 42 hari masa pemeliharaan. Uji tantang bakteri *V. parahaemolyticus* melalui injeksi (10^5 CFU ekor⁻¹) dilakukan pada akhir pemeliharaan selama tujuh hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak fitobiotik dalam pakan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan respons imun pada udang yang diuji tantang *V. parahaemolyticus* ditunjukkan oleh adanya peningkatan *total hemocyte count*, aktivitas fagositosis, aktivitas *phenoloxidase*, dan *respiratory burst*. Hasil uji tantang dengan *V. parahaemolyticus* menunjukkan bahwa penambahan ekstrak fitobiotik mampu mengurangi kerusakan struktur sel usus dan hepatopankreas, menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* serta mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang dibandingkan dengan kontrol.

Tahap ketiga bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas fitobiotik ekstrak pasak bumi pada pemeliharaan udang vaname di tambak. Parameter yang diamati meliputi kinerja pertumbuhan dan efisiensi pakan yang diukur yaitu bobot akhir, laju pertumbuhan spesifik rasio konversi pakan, tingkat kelangsungan hidup, serta mengamati gejala klinis yang muncul saat *outbreak* penyakit terjadi. Berdasarkan gejala klinis dan uji konfirmasi PCR menunjukkan bahwa tambak pemeliharaan positif terserang penyakit *acute hepatopancreatic necrosis disease* dan *white feces disease*. Penambahan ekstrak pasak bumi (EL16) mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang hingga 95% pada saat *outbreak* penyakit itu terjadi. Selain itu, EL16 mampu meningkatkan biomassa panen dan menurunkan nilai rasio konversi pakan (RKP) dibandingkan perlakuan kontrol.

Hasil seluruh tahapan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pasak bumi merupakan perlakuan terbaik yang mampu meningkatkan kelangsungan hidup, respons imun, mengurangi populasi *V. parahaemolyticus* Rf^R, mengurangi kerusakan hepatopankreas dan usus pada udang vaname setelah uji tantang. Selain itu, efektivitas ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) terbukti mampu mengurangi dampak dari infeksi alami yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*, mampu menjaga keragaman dan stabilitas mikrobiota usus, sehingga mampu meningkatkan kelangsungan hidup, biomassa panen dan mengurangi rasio konversi pakan lebih baik dibandingkan dengan udang yang dipelihara tanpa penambahan fitobiotik. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) dapat menjadi alternatif untuk mengendalikan wabah penyakit yang terjadi pada kegiatan budidaya udang, sehingga mampu meningkatkan produktivitas budidaya.

Kata kunci: bawang putih, kunyit putih, pasak bumi, *P. vanammei*, *V. parahaemolyticus*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

ADHAMAD IQBAL KURNIAWINATA. *Potential of Tongkat Ali, White Turmeric, and Garlic Extracts for the Prevention of Vibrio parahaemolyticus Infection in Pacific White Shrimp Aquaculture*. Supervised by SUKENDA, NAMELLA WAHJUNINGRUM, WIDANARNI, dan JULIE EKASARI.

Efforts to increase shrimp production have driven the rapid development of shrimp farming systems from traditional and semi-intensive technologies to intensive ones. Intensive shrimp farming is characterized by high stocking densities, which can lead to various diseases if there is an imbalance between the environment, pathogens, and cultured organisms. Diseases are a significant factor hindering the development of shrimp farming. Disease control through the use of probiotics as feed additives in aquaculture offers advantages such as simple processing and environmental friendliness for long-term use. Tongkat ali (*Eurycoma longifolia*), white turmeric (*Curcuma zedoaria*), and garlic (*Allium sativum*) have potential as probiotics. Therefore, research is needed to evaluate the potential of tongkat ali, white turmeric, and garlic as probiotics for controlling vibriosis in Pacific white shrimp.

This research aims to evaluate the effectiveness of tongkat ali, white turmeric, and garlic extracts as probiotics for controlling *Vibrio parahaemolyticus* infection in Pacific white shrimp farming. The study is conducted in three stages: (1) Evaluating the antibacterial properties of tongkat ali, white turmeric, and garlic extracts against *V. parahaemolyticus*, (2) Assessing the effectiveness of these extracts in enhancing the health status and survival of shrimp challenged with *V. parahaemolyticus*, and (3) Evaluating the effectiveness of probiotic extracts and microbiota diversity in shrimp reared with the addition of tongkat ali extract in ponds.

The first stage aims to evaluate the antibacterial and antibiofilm activities of three probiotic extracts, tongkat ali, white turmeric, and garlic, against the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. The probiotics are extracted using 96% ethanol as a solvent in a 1:10 (b/v) ratio using maceration. The extracts are used to test inhibition against *V. parahaemolyticus*. Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS) analysis shows that the bioactive phytochemical compounds in tongkat ali are more diverse, with higher total phenol and total flavonoid contents compared to white turmeric and garlic extracts, at 9.61% (w/w) and 13.38 QE/g, respectively. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) indicates that the bactericidal concentration of tongkat ali extract is lower than that of white turmeric and garlic extracts. The MIC value of tongkat ali in inhibiting *V. parahaemolyticus* activity by 100% is achieved at a dose of 16 mg mL⁻¹. Each extract also exhibits the ability to inhibit and destroy the biofilm of *V. parahaemolyticus*. Tongkat ali and garlic extracts are more effective in inhibiting bacterial growth and biofilm formation and destruction compared to white turmeric extract. These results suggest that tongkat ali has potential as an antibacterial and antibiofilm agent.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

The second stage aims to evaluate the effects of feeding tongkat ali, white turmeric, and garlic extracts on the immune response and resistance of Pacific white shrimp to *V. parahaemolyticus* infection. The treatments tested include four different phytobiotic-supplemented feeds compared to a control. The phytobiotic feed supplements include 1.6% tongkat ali extract (EL16), 6.4% white turmeric extract (CZ64), 6.4% garlic extract (AS64), and a 1:1:1 mixture of the three phytobiotics (C1). Test shrimp, initially weighing 2.53 ± 0.22 g, are fed the experimental diets ad libitum four times daily for 42 days. Bacterial challenge with *V. parahaemolyticus* via injection (10^5 CFU shrimp⁻¹) is conducted at the end of the rearing period for seven days. Results indicate that phytobiotic extracts in the feed improve growth performance and immune response in shrimp challenged with *V. parahaemolyticus*, evidenced by increased total hemocyte count, phagocytic activity, phenoloxidase activity, and respiratory burst. The challenge test with *V. parahaemolyticus* shows that phytobiotic extracts reduce intestinal and hepatopancreas cell damage, inhibit *V. parahaemolyticus* growth, and enhance shrimp survival compared to the control.

The third stage aims to evaluate the effectiveness of tongkat ali extract as a phytobiotic in pond-reared Pacific white shrimp. Observed parameters include growth performance and feed efficiency, measured as final weight, specific growth rate, feed conversion ratio, survival rate, and clinical symptoms during disease outbreaks. Clinical symptoms and PCR confirmation tests show that the rearing pond is positive for acute hepatopancreatic necrosis disease and white feces disease. Adding tongkat ali extract (EL16) increases shrimp survival to 95% during disease outbreaks. Additionally, EL16 enhances harvest biomass and reduces feed conversion ratio (FCR) compared to the control treatment.

Overall, the results of this research demonstrate that tongkat ali extract is the most effective treatment for enhancing shrimp survival, immune response, reducing *V. parahaemolyticus* population, and minimizing hepatopancreas and intestinal damage in challenged shrimp. Furthermore, the effectiveness of 1.6% tongkat ali extract (EL16) in mitigating the impact of natural *V. parahaemolyticus* infection is proven to maintain gut microbiota diversity and stability, thereby improving survival, harvest biomass, and feed conversion ratio better than shrimp reared without phytobiotic addition. This indicates that 1.6% tongkat ali extract (EL16) can be an alternative for controlling disease outbreaks in shrimp farming, thus enhancing production productivity..

Keywords: garlic, *P. vannamei*, tongkat ali, *V. parahaemolyticus*, white tumeric

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2024

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

arang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

arang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB

**POTENSI EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN
BAWANG PUTIH UNTUK PENCEGAHAN INFEKSI
Vibrio parahaemolyticus PADA BUDIDAYA UDANG VANAME**

MOHAMAD IQBAL KURNIAWINATA

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor
pada
Program Studi Ilmu Akuakultur

**PROGRAM DOKTOR ILMU AKUAKULTUR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Luar Komisi pada Ujian Tertutup Disertasi:

- 1. Nunak Nafiqoh
- 2. Mia Setiawati

Luar Komisi pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

- 1. Nunak Nafiqoh
- 2. Mia Setiawati

Disertasi : Potensi Ekstrak Pasak Bumi, Kunyit Putih dan Bawang Putih untuk Pencegahan Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname
: Mohamad Iqbal Kurniawinata
: C160120012

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Ir. Sukenda M.Sc



Pembimbing 2:
Dinamella Wahjuningrum, S.Si, M.Si



Pembimbing 3:
Dr. Ir. Widanarni, M.Si

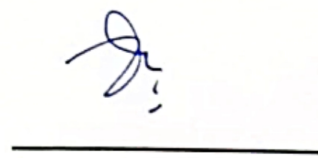


Pembimbing 4:
Julie Ekasari, S.Pi, M.Sc



Diketahui oleh

Dekan Program Studi:
Dr. Ir. Iis Diatin, M.M
196309081990022001



Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan:
Dr. Ir. Fredinan Yulianda, M.Sc
196307311988031002



Tanggal Ujian Tertutup: 16 Juli 2024
Tanggal Ujian Terbuka: 7 Agustus 2024

Tanggal Lulus:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji dan syukur Penulis panjatkan kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala limpahan nikmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Disertasi ini berjudul Potensi Ekstrak Pasak Bumi, Kunyit Putih dan Bawang Putih untuk Pencegahan Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname. Penelitian ini mencoba memanfaatkan bahan alami yang merupakan kearifan lokal untuk pengendalian *outbreak* penyakit pada udang vaname sebagai upaya pengganti antibiotik.

Terima kasih penulis sampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia dalam hal ini Kementerian Pendidikan, Kebudayaan Riset dan Teknologi atas beasiswa yang telah diberikan. Ucapan Terima kasih penulis sampaikan kepada komisi pembimbing: Prof. Dr. Ir. Sukenda, M.Sc., Dr. Dinamella Wahjuningrum, S.Si, M.Si., Prof. Dr. Ir. Widanarni, M.Si dan Dr. Julie Ekasari, S.Pi., M.Sc., yang telah membimbing dan memberi masukan yang bersifat membangun kepada penulis sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. terima kasih juga disampaikan kepada penguji luar komisi Dr. Nunak Nafiqoh, S.Pi, M.Si., dan Dr. Ir. Mia Setiawati, M.Si., yang telah berkenan memberikan kritik, saran serta koreksi yang konstruktif sebagai penguji pada sidang disertasi penulis. Terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Ir. Iis Diatin, MM yang telah banyak memberikan masukan dan dukungan dalam penulisan disertasi ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada *owner* Sukenda Farm atas izin dan penyediaan lokasi penelitian, serta Pak Hadi, Mas Riono dan seluruh pegawai Sukenda Farm yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di lapang; Laboran Laboratorium Kesehatan Organisme Akuatik dan tendik Departemen Budidaya Perairan IPB; Saudara/i Dendi, Yanuar, Yudha, Sukma, Ariel, Rifqi; Rekan-rekan BDP 51, Magister AKU 2019, Doktor AKU 2020; Rekan PMDSU Batch V Imam, Gustilatov, Adit dll; serta seluruh pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada keluarga tercinta ayah Irwan Hermansyah, ibu Rosmawati, bapak mertua Slamet AK, mama mertua Maryati, istri Pipit Damayanti, adik Rana, ipar, ponakan, dan semua keluarga besar yang telah memberikan dukungan dan doa dalam penyelesaian studi ini.

Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2024

Mohamad Iqbal Kurniawinata

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Hipotesis	5
1.6 Kebaruan Penelitian (<i>Novelty</i>)	6
1.7 Kerangka Pikir	6
EVALUASI EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN BAWANG PUTIH SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM TERHADAP <i>V. parahaemolyticus</i>	8
2.1 Abstrak	8
2.2 Pendahuluan	9
2.3 Metode	10
2.4 Hasil	14
2.5 Pembahasan	19
2.6 Simpulan	20
EFEKTIVITAS EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN BAWANG PUTIH DALAM MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN DAN KELANGSUNGAN HIDUP UDANG VANAME YANG DIUJI TANTANG <i>V. parahaemolyticus</i>	21
3.1 Abstrak	21
3.2 Pendahuluan	22
3.3 Metode	23
3.4 Hasil	28
3.5 Pembahasan	35
3.6 Simpulan	37
EVALUASI EFEKTIVITAS FITOBIOTIK PASAK BUMI DAN PENGARUHNYA TERHADAP KERAGAMAN MIKROBIOTA USUS UDANG VANAME DI TAMBAK	37
4.1 Abstrak	37
4.2 Pendahuluan	38
4.3 Metode	40
4.4 Hasil	43
4.5 Pembahasan	49
4.6 Simpulan	53
PEMBAHASAN UMUM	53
SIMPULAN DAN SARAN	58
6.1 Simpulan	58
6.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	70
REKAM JEJAL HIDUP	74

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

1	<i>State of the art</i> penelitian ini	4
2	Hasil pemeriksaan skrining fitokimia simplisia dan ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih	14
3	Hasil analisis total fenol dan total flavonoid ekstrak pasak bumi, bawang putih dan kunyit putih	14
4	Identifikasi komponen enam puncak utama senyawa hasil analisis ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih menggunakan <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> (GC-MS)	16
5	Aktivitas antibakteri ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dengan konsentrasi berbeda terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> Rf ^R	17
6	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> dan <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> pada pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih melawan <i>V. parahaemolitycus</i>	17
7	Aktivitas penghambatan biofilm <i>V. parahaemolyticus</i> dengan penambahan suspensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih	18
8	Aktivitas penghambatan biofilm <i>V. parahaemolyticus</i> dengan penambahan suspensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih	18
9	Rancangan penelitian pakan udang dengan penambahan ekstrak fitobiotik	24
10	Kualitas air selama pemeliharaan	25
11	Pertumbuhan udang vaname setelah 42 hari pemeliharaan yang diberi pakan penambahan ekstrak fitobiotik	29
12	<i>Total Vibrio Count</i> (TVC) dan total <i>V. parahaemolyticus</i> Rf ^R (Vp ^R) pada usus udang vaname yang diberi penambahan ekstrak fitobiotik.	31
13	Pengaruh pemberian fitobiotik selama 42 hari pada histologi usus udang vaname	32
14	Rancangan penelitian pemeliharaan udang vaname dengan pemberian pakan yang diperkaya ekstrak fitobiotik pasak bumi	40
15	Kualitas air selama pemeliharaan di tambak	41
16	Pertumbuhan udang vaname di tambak setelah 56 hari pemeliharaan.	43
17	Total bakteri dan total <i>Vibrio</i> di usus udang vaname pada saat <i>outbreak</i> penyakit.	44
18	Indeks keanekaragaman alfa komunitas bakteri di usus udang <i>P. vannamei</i> menurut sekuensing berbasis <i>Oxford Nanopore Technology</i> (ONT).	47

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR GAMBAR

Tahapan penelitian potensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih untuk pencegahan infeksi <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pada budidaya udang vaname	7
Kromatogram hasil analisis ekstrak Fitobiotik dengan <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS). (A) pasak bumi (<i>E. longifolia</i>), (B) kunyit putih (<i>C. zedoaria</i>), (C) bawang putih (<i>A. sativum</i>).	15
Nilai penghambatan ekstrak fitobiotik dengan konsentrasi berbeda.	18
<i>Total haemocyte count</i> udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> .	29
Aktivitas Fagositosis udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> .	30
Aktivitas phenoloxidase udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> .	30
<i>Respiratory burst</i> udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> .	31
Kelangsungan hidup (KH) udang vaname pasca uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> .	32
Histopatologi usus hasil pewarnaan <i>hematoxylin eosin</i> (HE) udang vaname sebelum uji tantang (kiri), setelah uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> (kanan)	33
Histopatologi hepatopankreas hasil pewarnaan <i>hematoxylin eosin</i> (HE) udang vaname sebelum uji tantang (kiri), setelah uji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i> (kanan)	34
Gejala klinis yang teramati selama pemeliharaan udang vaname di tambak. (A) Kematian udang di luar hapa; (B) adanya kotoran berwarna putih pada air pemeliharaan; (D) pengamatan makroskopis udang; dan (E) kondisi usus udang.	44
Hasil konfirmasi <i>V. parahaemolyticus</i> dengan primer AP4 menggunakan analisis PCR.	45
Histopatologi usus dari <i>P. vannamei</i> yang secara alami terinfeksi penyakit.	45
Pola kematian dan kelangsungan hidup udang vaname yang dipelihara selama 56 hari.	46
Diagram Venn keanekaragaman bakteri tingkat OTU.	46
Top 10 komposisi kelimpahan relatif komunitas bakteri usus pada tingkat filum (a), genus (b), dan spesies (c) udang <i>P. vannamei</i> .	48
<i>Heatmaps</i> kelimpahan relatif spesies bakteri yang teridentifikasi.	49
Mekanisme kerja fitobiotik dalam mengendalikan infeksi <i>V. parahaemolyticus</i> , meningkatkan imunitas, serta modifikasi mikrobiota usus udang vaname	55

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR LAMPIRAN

1	Identifikasi komponen utama senyawa hasil analisis ekstrak pasak bumi menggunakan <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> (GC-MS)	70
2	Identifikasi komponen utama senyawa hasil analisis ekstrak kunyit putih menggunakan <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> (GC-MS)	70
3	Identifikasi komponen utama senyawa hasil analisis ekstrak bawang putih menggunakan <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> (GC-MS)	71
4	Tahapan next generation sequencing menggunakan <i>Oxford Nanopore Technology</i>	72
5	Tahapan analisis bioinformatika menggunakan <i>Oxford Nanopore Technology</i>	73

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Produksi udang vaname *Penaeus vannamei* meningkat setiap tahunnya dan merupakan jenis yang paling produktif di dunia dibandingkan dengan jenis udang lainnya. Total produksi udang vaname global mencapai 7,9 juta ton pada tahun 2022 (FAO 2024). Indonesia menjadi salah satu negara terbesar dalam ekspor udang pada tahun tersebut dan diupayakan meningkat pada tahun-tahun berikutnya. Peningkatan akan permintaan udang tersebut menyebabkan perkembangan pesat dari sistem budidaya udang intensif. Budidaya udang intensif ditandai dengan penggunaan padat tebar yang tinggi. Sistem budidaya ini dapat menimbulkan berbagai penyakit jika terjadi ketidakseimbangan antara lingkungan, patogen dan produk pertanian. Penyakit selalu menjadi faktor penting penghambat perkembangan budidaya udang. Berdasarkan hasil survei *Global Aquaculture Alliance* (GAA), masalah utama dalam budidaya udang global adalah penyakit (Anderson *et al.* 2018; 2019). Penyakit pada lingkungan budidaya dapat disebabkan oleh berbagai patogen seperti bakteri, virus, jamur dan protozoa (McGladdery *et al.* 2011). Salah satu penyakit udang yang disebabkan oleh bakteri adalah Vibriosis.

Vibriosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang umumnya menyerang berbagai spesies udang dan selalu menjadi ancaman dalam kegiatan budidaya udang. Ada banyak penyakit yang berhubungan dengan infeksi *Vibrio* pada udang, seperti *luminescent disease*, sindrom zoea II, *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND)/*early mortality syndrome* (EMS), *white feces disease* (WFD) dan *High lethal vibrio disease* (HLVD) (Abdel-Latif *et al.* 2022). Diantara banyak spesies bakteri dari genus *Vibrio*, bakteri *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri yang paling banyak menjadi perhatian akhir-akhir ini. *V. parahaemolyticus* memiliki toksin *pirA* dan *pirB* menjadi salah satu agen penyebab AHPND. Kasus AHPND pertama kali dilaporkan terjadi di Cina (2009), dan kemudian menyebar ke negara lain seperti Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012), Meksiko (2013), Filipina (2015) and Amerika (2016) (Kumar *et al.* 2021). *V. parahaemolyticus* yang diduga kuat menjadi penyebab AHPND juga telah terdeteksi positif di beberapa daerah di Indonesia (Saputra *et al.* 2023; Suryana *et al.* 2023).

Dalam upaya mengatasi penyakit tersebut, diperlukan upaya mengontrol populasi bakteri *Vibrio*. Penggunaan antibiotik untuk mengendalikan patogen *Vibrio* sering dilakukan oleh pembudidaya karena kemudahannya. Namun, penggunaan antibiotik yang terus menerus dapat menyebabkan resistensi bakteri, akumulasi residu pada daging dan pencemaran lingkungan, yang dapat mengancam kesehatan konsumen dan lingkungan perairan (Ng *et al.* 2009). Akhir-akhir ini penggunaan tanaman obat (fitobiotik) sebagai bahan tambahan pakan atau bahan baku pengobatan cenderung meningkat sebagai alternatif bahan kimia dan obat sintetis (Van Hai 2015). Fitobiotik mengandung senyawa kimia yang bermanfaat bagi tubuh organisme dengan merangsang nafsu makan, meningkatkan kinerja pertumbuhan, dan bertindak sebagai imunostimulan, antibakteri, antivirus dan agen antiparasit (protozoa, monogenes) (Kaur & Shah 2017).

Wilayah Indonesia memiliki potensi alam yang mendukung dalam penggunaan fitobiotik. Penggunaan jamu atau tanaman obat dalam kegiatan

lidaya juga telah banyak diterapkan. Mayoritas studi semacam itu pada awalnya asarkan pada tradisi dan cerita rakyat ditransfer dari generasi ke generasi dan batas pada wilayah geografis tertentu. Menariknya, beberapa dari penelitian ngan jelas menggambarkan efek stimulasi langsung yang bergantung pada dosis i fitobiotik ini atau ekstrak herbal terhadap daya tahan tubuh ikan. Akan tetapi, ormasi rinci terkait sifat, komposisi senyawa, dan manfaat dari tanaman obat ebut masih minim diketahui. Dalam kebanyakan kasus, tanaman segar langsung asukkan ke dalam air pemeliharaan dan digunakan untuk meningkatkan kualitas ngurangi ikan stres, meningkatkan daya tahan ikan terhadap patogen dan ngobati penyakit ikan. Studi ini menunjukkan bahwa pembudidaya nggunakan tanaman dan dosis tergantung pada pengalaman pribadi dan asal is mereka. Sejumlah penelitian ilmiah mendukung penggunaan tanaman obat am budidaya (Harikrishnan *et al.* 2011).

Beberapa tanaman yang berpotensi sebagai fitofarmaka diantaranya pasak ni (*Eurycoma longifolia*) (Rehman *et al.* 2016), kunyit putih (*Curcuma oaria*) (Gharge *et al.* 2021) dan bawang putih (*Allium sativum*) (Delgado *et al.* 22). Keefektifan pasak bumi dikaitkan dengan adanya kandungan berbagai bahan yawa bioaktif termasuk quassinoid, alkaloid, glikosida, eurycomanol, ycomanone, dan lain-lain (Rehman *et al.* 2016). Akar pasak bumi mempunyai idungan bioaktif yang memiliki efek sebagai antikanker serta kemopreventif dan nomodulator. Studi lain tentang pasak bumi melaporkan adanya berbagai sifat nakologis penting seperti sebagai antimalaria, antitumor, antikanker, idiabates, afrodisiak, aktivitas anxiolytic dan anti-parasit (Al-Salahi *et al.* 2014). nyit putih atau yang sering disebut dengan temu putih merupakan spesies asli *tive species*) India, telah dibudidayakan di seluruh Asia Tenggara (Siriruga *et al.* 2007), termasuk Indonesia. Kunyit putih memiliki metabolit sekunder utama upa terpenoid, khususnya seskuiterpenoid, fenolik, tanin, saponin, alkaloid, enoid, dan steroid (Tariq *et al.* 2016). Kunyit putih telah dilaporkan terdapat nya berbagai macam aktivitas anti inflammatory (Ullah *et al.* 2014), aktivitas *atoprotective*, *antifungal activity* dan *antimicrobial* (Chachad *et al.* 2016; arge *et al.* 2021). Bawang putih mengandung senyawa organik belerang yang gat reaktif dan memiliki aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri bahkan la konsentrasi yang sangat rendah (Salehi *et al.* 2019). Beberapa artikel telah nunjukkan aktivitas antibakteri ekstrak bawang putih (*allicin* dan turunan erang lainnya) yang terkandung dalam bawang putih dapat mencegah tumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Bawang putih juga memiliki it antimikroba, antijamur, antivirus (Bhatwalkar *et al.* 2021).

Kegunaan ketiga tanaman ini telah dipelajari sebelumnya secara terpisah. mbinasi pasak bumi, kunyit putih, dan bawang putih sebagai fitobiotik dalam a formula memiliki beberapa alasan yang kuat berdasarkan sifat-sifat unik dan ergis dari masing-masing bahan. Sehingga diperlukan informasi untuk nyelidiki hubungan antara ketiga fitobiotik tersebut dan efektivitasnya dalam icegahan infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* pada budidaya udang vaname.

Perumusan Masalah

Masalah utama dalam budidaya udang dunia hingga saat ini adalah tingginya adian penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen, terutama *Vibrio ahaemolyticus*, yang dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang signifikan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Sistem budidaya intensif, yang ditandai dengan padat tebar tinggi, meningkatkan risiko terjadinya wabah penyakit karena ketidakseimbangan antara lingkungan, patogen, dan organisme budidaya. Upaya-upaya yang dilakukan untuk mengatasi masalah penyakit vibriosis pada udang salah satunya dengan penggunaan antibiotik yang dianggap lebih aplikatif dan praktis. Akan tetapi, penggunaan antibiotik secara terus-menerus dalam pengendalian penyakit dapat menimbulkan berbagai masalah, termasuk keamanan pangan, resistensi antibiotik dan dampak negatif terhadap lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif yang efektif dan ramah lingkungan untuk pengendalian penyakit. Fitobiotik didefinisikan sebagai tumbuhan yang mengandung senyawa kimia yang bermanfaat bagi tubuh inang, fungsinya dapat sebagai *feed additive* pada formulasi pakan untuk meningkatkan produktivitas udang. Fitobiotik, seperti pasak bumi (*Eurycoma longifolia*), kunyit putih (*Curcuma zedoaria*), dan bawang putih (*Allium sativum*), muncul sebagai kandidat potensial untuk menggantikan antibiotik dalam pengendalian penyakit pada budidaya udang.

Penggunaan pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dalam pengendalian penyakit pada budidaya udang sudah dilakukan oleh pembudidaya udang baik penggunaan bahan tunggal maupun kombinasinya. Pasak bumi secara empiris digunakan sebagai obat untuk detoksifikasi, obat kuat, peningkat imunitas, serta antikanker. Senyawa bioaktif dalam pasak bumi seperti kuasinoid, flavonoid, dan alkaloid memiliki efek anti kanker, kemopreventif, dan imunomodulator. Kunyit putih diketahui memiliki aktivitas anti inflamasi, anti fungi, dan antimikroba. Bawang putih mengandung senyawa organik belerang yang reaktif dan memiliki aktivitas antimikroba luas bahkan pada konsentrasi rendah. Informasi tentang pemanfaatan pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih secara komprehensif untuk melihat efektivitasnya dalam pengendalian penyakit bakteri pada udang vaname masih terbatas. Pendekatan pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai kandidat fitobiotik untuk pencegahan penyakit pada budidaya udang disajikan lebih detail pada Tabel 1. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dan antibiofilm dari ekstrak fitobiotik tersebut terhadap bakteri patogen *V. parahaemolyticus*, serta mengkaji efektivitasnya dalam meningkatkan kesehatan dan kelangsungan hidup udang vaname hingga skala lapang, sehingga dapat menawarkan solusi yang berkelanjutan dan ramah lingkungan bagi industri budidaya udang.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengevaluasi efektivitas ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai fitobiotik untuk pengendalian infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada kegiatan budidaya udang vaname. Penelitian ini secara khusus bertujuan:

1. Mengevaluasi aktivitas antibakteri, dan antibiofilm ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Mengevaluasi pemberian ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai imunostimulan melalui pakan terhadap respons imun dan resistensi udang vaname terhadap infeksi *V. parahaemolyticus*.

Mengevaluasi efektivitas penambahan ekstrak pasak bumi ke dalam pakan dan pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang untuk pengendalian penyakit dan peningkatan produksi udang di tambak.

Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu menawarkan solusi alternatif bahan alami yang efektif untuk mengendalikan infeksi bakteri dan mengurangi resistensi antibiotik. Selain itu, sebagai imunostimulan dalam pakan fitobiotik diharapkan dapat meningkatkan kesehatan dan ketahanan udang, mengurangi mortalitas, dan meningkatkan produktivitas budidaya udang serta mengembangkan strategi pengelolaan budidaya udang yang berkelanjutan. Secara keseluruhan, manfaat penelitian ini diharapkan mampu memberikan solusi ramah lingkungan dan berkelanjutan untuk pengendalian penyakit dan peningkatan produksi dalam industri budidaya udang.

Tabel 1 *State of the art* penelitian ini

Aspek	Informasi Terkini (State of the Art)	Referensi
Produksi Udang vaname	Produksi udang vaname global mencapai 7,9 juta ton pada tahun 2022. Indonesia menjadi salah satu negara terbesar dalam ekspor udang dan diharapkan meningkat pada tahun-tahun mendatang.	FAO 2024
Budidaya Intensif	Sistem budidaya udang intensif berkembang pesat karena meningkatnya permintaan udang, namun dapat menimbulkan berbagai penyakit jika terjadi ketidakseimbangan lingkungan.	Anderson <i>et al.</i> 2018; 2019
Masalah Penyakit	Penyakit merupakan masalah utama dalam budidaya udang global. Patogen seperti bakteri, virus, jamur, dan protozoa dapat menyebabkan penyakit pada udang.	McGladdery <i>et al.</i> 2011; Abdel-Latif <i>et al.</i> 2022
Vibriosis	Vibriosis, disebabkan oleh bakteri <i>Vibrio</i> , merupakan ancaman besar dalam budidaya udang. <i>V. parahaemolyticus</i> menjadi perhatian karena menyebabkan AHPND.	Kumar <i>et al.</i> 2021; Saputra <i>et al.</i> 2023; Suryana <i>et al.</i> 2023
Pengendalian bakteri <i>Vibrio</i>	Penggunaan antibiotik sering dilakukan, tetapi menyebabkan resistensi bakteri dan pencemaran lingkungan.	Ng <i>et al.</i> 2009

Tabel 1 *State of the art* penelitian ini

Aspek	Informasi Terkini (State of the Art)	Referensi
Alternatif Pengendalian (Fitobiotik)	Penggunaan tanaman obat sebagai alternatif mulai meningkat. Fitobiotik mengandung senyawa yang bermanfaat sebagai imunostimulan, antibakteri, antivirus, dan antiparasit.	Harikrishnan <i>et al.</i> 2011; Van Hai 2015; Kaur & Shah 2017
Potensi Fitobiotik di Indonesia	Penggunaan jamu dalam budidaya juga sudah banyak diterapkan berdasarkan tradisi dan studi ilmiah.	Harikrishnan <i>et al.</i> 2011
Tanaman Berpotensi sebagai Fitofarmaka	1. Pasak Bumi (<i>Eurycoma longifolia</i>): Mengandung quassinoid, alkaloid, dan lainnya. Digunakan untuk detoksifikasi, peningkat imunitas, dan antikanker.	Rehman <i>et al.</i> 2016; Al-Salahi <i>et al.</i> 2014;
	2. Kunyit Putih (<i>Curcuma zedoaria</i>): Mengandung terpenoid, fenolik, dan lainnya. Memiliki aktivitas anti inflamasi, hepatoprotektif, antifungi, dan antimikroba	Gharge <i>et al.</i> 2021; Tariq <i>et al.</i> 2016; Ullah <i>et al.</i> 2014; Chachad <i>et al.</i> 2016;
	3. Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>): Mengandung senyawa organik belerang yang memiliki aktivitas antimikroba luas terhadap bakteri.	Delgado <i>et al.</i> 2022; Salehi <i>et al.</i> 2019; Bhatwalkar <i>et al.</i> 2021
Kombinasi Fitobiotik	Kombinasi pasak bumi, kunyit putih, dan bawang putih dalam satu formula memiliki potensi sinergis untuk mengatasi infeksi bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> pada budidaya udang vaname.	Penelitian ini

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu :

1. Aplikasi ekstrak fitobiotik memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menyebabkan penghambatan pertumbuhan dan biofilm bakteri *V. parahaemolyticus*;
2. Aplikasi ekstrak fitobiotik mampu meningkatkan respon imun dan resistensi udang vaname (*P. vannamei*) yang diuji tantang dengan bakteri *V. parahaemolyticus*;
3. Penggunaan ekstrak fitobiotik mampu menjaga stabilitas keragaman struktur mikrobiota usus serta meningkatkan produktivitas dan kelangsungan hidup udang vaname yang dipelihara di tambak udang.

Kebaruan Penelitian (*Novelty*)

Penelitian ini merupakan kajian yang baru dalam hal:

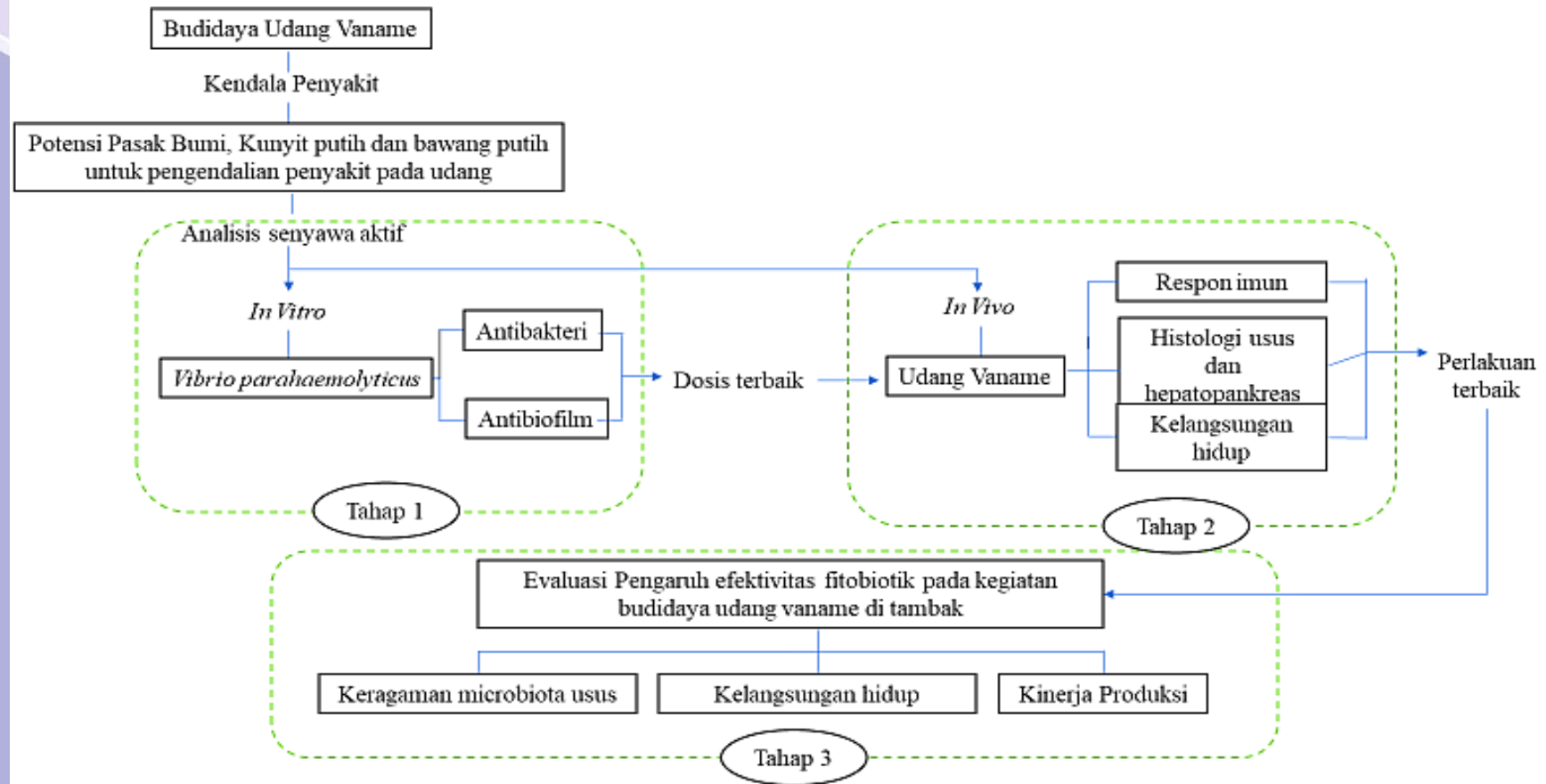
Kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi dan beragam pada ekstrak pasak bumi memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antibiofilm terhadap *Vibrio parahaemolyticus* yang lebih baik dibandingkan kunyit putih dan bawang putih. Penggunaan ekstrak pasak bumi mampu meningkatkan respons imun dan kelangsungan hidup udang vaname yang di uji tantang *V. parahaemolyticus*. Aplikasi ekstrak pasak bumi dengan dosis 1,6% dalam pakan dapat menjaga stabilitas keragaman mikrobiota usus, serta meningkatkan produksi dan kelangsungan hidup udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* secara alami di tambak.

Kerangka Pikir

Ruang lingkup penelitian ini terdiri dari tiga tahap (Gambar 1). Tahap Pertama adalah “Evaluasi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai antibakteri dan antibiofilm terhadap *V. parahaemolyticus*. Pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dibuat dalam bentuk ekstrak untuk dianalisis kandungan senyawa aktif dan pengujian dosis tunggal dari setiap fitobiotik berdasarkan kemampuan masing-masing ekstrak fitobiotik terkait penghambatan pertumbuhan dan biofilm bakteri *V. parahaemolyticus*. Hasil uji pada tahap ini disajikan pada Bab 2.

Penelitian selanjutnya Tahap Kedua “Efektivitas ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dalam meningkatkan status kesehatan dan kelangsungan hidup udang vaname yang diuji tantang *V. parahaemolyticus*”. Hasil dari tahap pertama akan didapatkan dosis terbaik dari masing-masing ekstrak yang akan digunakan pada tahap selanjutnya. Udang vaname berukuran seragam dipelihara selama 42 hari yang kemudian dianalisis untuk respon imunitas dan kelangsungan hidup udang vaname yang diinfeksi *V. parahaemolyticus*. Hasil uji pada tahap ini disajikan pada Bab 3. Hasil terbaik yang diperoleh pada tahap ini akan digunakan pada tahap selanjutnya.

Penelitian dilanjutkan pada Tahap Ketiga yaitu “Evaluasi efektivitas fitobiotik pasak bumi dan pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang vaname di tambak”. Hasil terbaik yang diperoleh dari tahap kedua akan digunakan pada tahap selanjutnya. Penelitian tahap ini dilakukan untuk melihat kemampuan ekstrak pasak bumi dalam menjaga keragaman mikrobiota usus udang sehingga mampu meningkatkan kelangsungan hidup dan kinerja produksi udang vaname yang dipelihara pada skala tambak. Hasil uji pada tahap ini disajikan pada Bab 4 dan Pembahasan Umum disajikan pada Bab 5. Kemudian ditutup dengan Kesimpulan dan Saran pada Bab 6.



bar 1 Tahapan penelitian potensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih untuk pencegahan infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada budidaya udang vaname

EVALUASI EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN BAWANG PUTIH SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM TERHADAP *V. parahaemolyticus*

Abstrak

Fitobiotik merupakan salah satu bahan yang dapat digunakan untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan menggantikan peran antibiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri, dan antibiofilm ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*. Fitobiotik diekstrak dengan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 (b/v) dengan metode maserasi. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) menunjukkan bahwa senyawa bioaktif kimia yang terdapat dalam pasak bumi lebih beragam dengan kandungan total fenol dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih dan bawang putih yaitu sebesar 9,61 % (b/b) dan 13,38 QE/g. Nilai MIC pasak bumi dalam menghambat aktivitas bakteri *V. parahaemolyticus* hingga 100% didapatkan pada dosis 16 mg mL⁻¹. Ekstrak pasak bumi dan bawang putih memiliki kemampuan lebih baik dalam menghambat pertumbuhan serta menghambat dan mendestruksi biofilm *V. parahaemolyticus* dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih. Simpulan dari penelitian ini yaitu, senyawa bioaktif pasak bumi lebih bervariasi dan memiliki konsentrasi total fenol dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan bawang putih atau kunyit putih. Ekstrak pasak bumi dan bawang putih memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antibiofilm untuk patogen *V. parahaemolyticus*.

Kata Kunci: bawang putih, kunyit putih, fitobiotik, pasak bumi, *V. parahaemolyticus*

Abstract

Phytobiotics are natural substances that can be used for disease control caused by bacteria, serving as alternatives to antibiotics. The aim of this study is to evaluate the antibacterial and antibiofilm activities of tongkat ali, white turmeric, and garlic extracts against the growth of the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. Phytobiotics were extracted using 96% ethanol as a solvent in a 1:10 (w/v) ratio using maceration method. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis revealed that tongkat ali contains a more diverse range of bioactive phytochemicals, with higher total phenol and total flavonoid contents compared to white turmeric and garlic extracts, at 9.61% (w/w) and 13.38 QE/g, respectively. The MIC value of tongkat ali required to inhibit *V. parahaemolyticus* activity by 100% was found to be 16 mg mL⁻¹. Tongkat ali and garlic extracts demonstrated superior abilities to inhibit growth and both inhibit and destroy *V. parahaemolyticus* biofilm formation compared to white turmeric extract. The conclusion of this study is that tongkat ali's bioactive compounds are more varied and have higher total phenol and total flavonoid concentrations compared to garlic or white turmeric. Tongkat ali and garlic extracts exhibit effective antibacterial and antibiofilm properties against the pathogen *V. parahaemolyticus*.

Keywords: garlic, phytobiotics, tongkat ali, *V. parahaemolyticus*, white tumeric

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

2.2 Pendahuluan

2.2.1 Latar belakang

Vibrio parahaemolyticus merupakan flora normal yang dapat menjadi patogen di lingkungan perairan budidaya (Lee *et al.* 2015). Penggunaan antibiotik sebagai solusi cepat untuk mengendalikan penyakit di akuakultur telah menyebabkan meningkatnya resistensi patogen terhadap antibiotik (Shamsuddin *et al.* 2013). Karena dampak negatif dari penggunaan antibiotik, telah dikembangkan berbagai strategi biokontrol lain, termasuk penggunaan senyawa aktif alami dari tanaman atau fitobiotik (Huynh *et al.* 2011).

Fitobiotik dianggap sebagai alternatif yang aman dan efektif sebagai pengganti antibiotik dalam akuakultur. Tumbuhan memiliki struktur senyawa kompleks dengan berbagai metabolit sekunder yang berfungsi sebagai agen antimikroba potensial (Mabona *et al.* 2013). Beberapa tanaman yang berpotensi sebagai fitobiotik termasuk pasak bumi (*Eurycoma longifolia*), kunyit putih (*Curcuma zedoaria*), dan bawang putih (*Allium sativum*).

Pasak bumi secara empiris digunakan sebagai obat untuk detoksifikasi, obat kuat, peningkat imunitas, serta antikanker. Senyawa bioaktif dalam pasak bumi seperti kuasinoid, flavonoid, dan alkaloid memiliki efek anti kanker, kemopreventif, dan imunomodulator (Rehman *et al.* 2016). Kunyit putih diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi, antifungal, dan antimikroba (Ullah *et al.* 2014; Chachad *et al.* 2016). Bawang putih mengandung senyawa organik belerang yang reaktif dan memiliki aktivitas antimikroba luas bahkan pada konsentrasi rendah (Salehi *et al.* 2019; Bhatwalkar *et al.* 2021).

Bakteri *Vibrio* dapat bertahan di lingkungan perairan dengan membentuk biofilm, yang dimediasi oleh mekanisme *quorum sensing*. Pembentukan biofilm membantu bakteri dalam mengoptimalkan pemanfaatan nutrisi, meningkatkan ketahanan terhadap bahan antimikroba, stres, dan virulensinya (Liu *et al.* 2018). Evaluasi kemampuan fitobiotik sebagai bahan antimikroba dan antibiofilm secara *in vitro* sangat penting untuk memahami efek penghambatannya terhadap mikroorganisme uji (Balouiri *et al.* 2016). Sehingga diperlukan uji untuk mengetahui kemampuan antimikroba dan antibiofilm dari senyawa aktif alami yang terkandung dalam pasak bumi, kunyit putih, dan bawang putih terhadap *V. parahaemolyticus*.

2.2.2 Rumusan Masalah

Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname telah dilaporkan menyebabkan berbagai penyakit yang berdampak pada penurunan produksi budidaya dan kerugian ekonomi global yang signifikan. Penggunaan antibiotik seringkali menjadi solusi cepat untuk mengendalikan penyakit ini, namun penggunaannya yang berlebihan menyebabkan peningkatan resistensi patogen terhadap antibiotik. Selain itu, bioakumulasi residu antibiotik dalam jaringan organisme yang dikonsumsi dapat berpotensi membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengendalian yang lebih ramah lingkungan, seperti fitobiotik. Penggunaan fitobiotik sebagai metode pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri memerlukan evaluasi *in vitro* terhadap bahan aktif ekstrak tanaman, guna mengidentifikasi komposisi senyawa yang berpotensi sebagai agen antibakteri dan antibiofilm.

2.2.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri, dan antibiofilm ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*.

Metode

2.3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian tahap pertama dilakukan pada bulan April sampai Juni 2023 bertempat di Laboratorium Kesehatan Organisme Akuatik, Laboratorium *Marine Center* dan Laboratorium Nutrisi, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor; Analisis Gas kromatografi Laboratorium Kesehatan Daerah, DKI Jakarta; Analisis Fitokimia dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka dan Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor

2.3.2 Persiapan Bubuk Bawang Putih, Kunyit Putih, Pasak Bumi

Sampel bahan yang digunakan diperoleh dari pasar tradisional di Bogor, Jawa Barat. Bawang putih dan kunyit putih segar yang digunakan dibersihkan dari kotoran dengan air lalu dipotong kecil dan dikeringkan dengan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Tanaman uji yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan dan disaring dengan saringan mesh size 0,5–1 mm. Pasak bumi berupa serutan kayu dibentuk serbuk, dengan menggunakan mesin penggiling bubuk kayu. Masing-masing simplisia yang didapatkan selanjutnya disimpan dalam wadah kedap udara.

2.3.3 Pembuatan Ekstrak Bawang Putih, Kunyit Putih, dan Pasak Bumi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menimbang masing-masing 50 g bubuk simplisia, bubuk diekstraksi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 (b/v). Selanjutnya dimaserasi selama 24 jam dengan pengadukan menggunakan orbital shaker pada suhu ruang. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring *Whatman no 41*. Sisa saringan dimaserasi kembali sebanyak dua kali dengan metode yang sama seperti maserasi pertama. Hasil maserasi dipekatkan dengan evaporator *vaccum* pada suhu 30-45 °C kemudian disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Adhesina *et al.* 2018). Hasil rendemen masing-masing ekstrak ditampilkan pada Lampiran 1.

2.3.4 Skrining Fitokimia

Evaluasi awal fitokimia yang diekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode Harborne (1984) untuk menguji keberadaan alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, serta steroid.

- Alkaloid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 50 mg lalu ditambah H₂SO₄, dikocok hingga keduanya tercampur. Campuran disaring dan ditambah dengan pereaksi Meyer dengan melihat endapan putih, Wagner

dengan melihat endapan coklat, dan Dragendorff dengan melihat endapan jingga, jika terdapat endapan tersebut maka sampel dikategorikan positif mengandung alkaloid.

- *Saponin*

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 50 mg, ditambah air panas kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Sampel yang telah didiamkan kemudian ditetesi HCl 2 N sebanyak 1 tetes. Hasil uji positif saponin akan ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil.

- *Tanin*

Sampel sebanyak 50 mg dididihkan dengan aquades selama 3 menit. Larutan kemudian disaring dan ditetesi FeCl₃ 1%. Hasil positif akan ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman pada larutan ekstrak.

- *Fenolik*

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 50 mg, dicampur dengan 0.25 mL etanol, ditambah 2 tetes FeCl₃ 5%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau biru pada larutan ekstrak.

- *Flavonoid*

Sampel sebanyak 50 mg ditambah dengan serbuk Mg sebanyak 0.05 mg; amil alkohol sebanyak 0,2 mL; dan alkohol sebanyak 4 mL. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada larutan ekstrak.

- *Steroid dan triterpenoid*

Sampel sebanyak 50 mg ditambah dengan kloroform hingga terendam kemudian ditambah anhidrida asam asetat 5 tetes dan H₂SO₄ 3 tetes. Hasil positif uji steroid ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi biru. Hasil positif uji triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah kecoklatan pada lapisan permukaan sampel.

2.3.5 Analisis Total Fenol dan Flavonoid

Masing-masing ekstrak fitobiotik diukur konsentrasi total fenol dengan metode spektrofotometri (Sahreen *et al.* 2010). Ekstrak fitobiotik ditimbang sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 mL etanol 95%. Kemudian dilarutkan dalam 5 mL aquades dan dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan reagen folin-ciocalteu 50% (v/v) sebanyak 0,5 mL. Larutan didiamkan selama 5 menit, kemudian menambahkan 1 mL natrium karbonat 5% (b/v). Larutan dihomogenkan dan diinkubasi di ruang gelap pada suhu kamar selama satu jam. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 725 nm menggunakan spektrofotometer. Larutan standar menggunakan asam galat. Total fenol yang diperoleh dinyatakan sebagai ekivalen asam galat (GAE) dalam mg/g ekstrak kering.

Analisis kadar flavonoid dengan metode spektrofotometri (Mayur *et al.* 2010). Sebanyak 10 µL ekstrak, 60 µL metanol, 10 µL aluminium chloride (10% b/v), 10 µL *potassium acetate* (1 M) dan 120 µL aquades dicampur merata dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur pada 415 nm

menggunakan *spektrofotometer*. Kadar flavonoid dinyatakan sebagai *equivalent quercetin* (QE) dalam mg/g ekstrak kering.

2.3.6 Analisis dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Ekstrak fitobiotik dilarutkan dalam etanol dengan perbandingan 1: 1 (b/v). Volume injeksi sampel 2 μL , jenis kolom HP-5MS (panjang 30 m, diameter 0,5 mm, lebar 0,25 μm). Gas helium (99,999%) digunakan sebagai pembawa gas pada total aliran total 104 μL / menit, dengan waktu 30 menit pada suhu oven 50 °C, suhu injektor 290 °C, dan aux suhu 290 °C. Jumlah senyawa yang diperoleh tercermin dari jumlah puncak pada kromatogram. Nama senyawa yang ditemukan diinterpretasikan berdasarkan data spektrum massa dari setiap puncak dicocokkan dengan database *GC-MS Pyrolysis*.

2.3.7 Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak fitobiotik dilakukan dengan metode difusi agar Kirby Bauer. Ekstrak fitobiotik diencerkan menggunakan *dimethylsulfoxide* (DMSO) 10% pada konsentrasi 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; dan 64 mg mL^{-1} . *V. parahaemolyticus* dengan konsentrasi 10^8 CFU mL^{-1} sebanyak 0,05 mL disebar pada permukaan media SWC agar. Kertas cakram diameter 6 mm dengan daya serap 15 μL di rendam selama 5 menit pada masing-masing konsentrasi ekstrak fitobiotik, selanjutnya ditempelkan pada media *sea water complete* (SWC) agar. Kontrol negatif digunakan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sedangkan kontrol positif digunakan *Chloramphenicol* 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas antibakteri ekstrak fitobiotik diukur berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.

2.3.8 *Minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal concentration* (MBC)

Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) menggunakan Zhang *et al.* (2018), yang kemudian dimodifikasi. Konsentrasi stok masing-masing ekstrak 64 mg mL^{-1} diencerkan secara serial (faktor pengenceran 1:1) dalam tabung reaksi dengan media SWC cair sehingga konsentrasi perlakuan adalah 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg mL^{-1} . Kontrol negatif dengan larutan PBS. Kontrol positif digunakan *Chloramphenicol* 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, masing-masing diulang tiga kali. Setiap tabung perlakuan kemudian diinokulasi dengan 100 μL *V. parahaemolyticus* Rf^{R} (densitas 10^8 CFU mL^{-1}) yang telah dicuci dua kali dengan larutan PBS. Tabung reaksi untuk semua perlakuan selanjutnya di *shaker* pada suhu 28-29°C dan kecepatan 140 rpm selama 24 jam. Suspensi dihitung dengan menumbuhkan kembali 100 μL setiap perlakuan dengan media TCBS diikuti dengan inkubasi selama 24 jam. Nilai MIC adalah konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). MBC dihitung sebagai konsentrasi terendah yang dapat membunuh 99% bakteri atau bersifat bakterisidal.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

2.3.9 Penghambatan ekstrak fitobiotik terhadap *V. parahaemolyticus*

Nilai penghambatan dengan metode *microdilution* menggunakan *microplates* berdasarkan Zhang *et al.* (2018) yang kemudian dimodifikasi. Faktor dilusi 1:1 menggunakan media SWC cair sehingga konsentrasi perlakuan 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg mL⁻¹. Setiap sumur berisi larutan perlakuan sebanyak 100 µl kemudian diinokulasikan *V. parahaemolyticus* Rf^R (kepadatan 10⁸ CFU mL⁻¹) sebanyak 10 µl (perlakuan sama dengan uji MIC dan MBC). Suspensi perlakuan dishaker pada suhu 28–29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 24 jam, kemudian diukur pada 630 nm *microplate reader* untuk menentukan nilai penghambatan. Blanko sampel merupakan absorbansi dari perlakuan sebelum diinokulasi suspensi *V. parahaemolyticus* Rf^R. Rumus menghitung persentase penghambatan terhadap *V. parahaemolyticus* Rf^R yaitu (Zhang *et al.* 2018):

$$\text{Nilai penghambatan (\%)} = \frac{(\text{ODr} - \text{ODs})}{(\text{ODr} - \text{ODb})} \times 100$$

Dimana ODr merupakan absorbansi kontrol negatif, ODs merupakan absorbansi sampel dan ODb merupakan absorbansi blanko sampel.

2.3.10 Aktivitas Antibiofilm

Aktivitas penghambatan dan destruksi biofilm bakteri *V. parahaemolyticus* diamati menggunakan metode Raissa *et al.* (2020). Penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan memasukkan suspensi bakteri *V. parahaemolyticus* yang telah ditambahkan perlakuan suspensi fitobiotik sebanyak 200 µL ke dalam sumur *microplate* 96 lubang. Selanjutnya diinkubasi suhu ruang *overnight*. Aktivitas destruktif biofilm dilakukan dengan terlebih dahulu memasukkan sebanyak 200 µL suspensi bakteri ke sumur *microplate* 96 lubang dan diinkubasi suhu ruang *overnight*, selanjutnya suspensi fitobiotik dimasukkan ke dalam sumur inkubasi bakteri tersebut. Kontrol positif yang digunakan untuk kedua pengujian tersebut yaitu suspensi bakteri, sedangkan media kultur sebagai kontrol negatif. Selanjutnya sel planktonik dibuang dan biofilm dibilas dengan aquabides dua kali dan dikering anginkan selama 30 menit. Selanjutnya biofilm yang terbentuk diwarnai dengan larutan kristal violet 0,4% sebanyak 200 µL selama 30 menit. Kristal violet kemudian dibuang dan sel dibilas kembali dengan aquabides sebanyak lima kali dan dikeringanginkan selama 30 menit. Selanjutnya sebanyak 200 µL etanol absolut ditambahkan ke sumur *microplate* yang terwarnai untuk melarutkan pewarna selama 30 menit. Selanjutnya etanol ditransfer ke *microplate* baru sebanyak 100 µL dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* dengan OD 595 nm. Selanjutnya rumus perhitungan aktivitas penghambatan dan destruksi dapat di lihat di bawah ini.

$$\% \text{ Aktivitas} = [(\text{OD kontrol positif} - \text{OD Sampel}) : \text{OD kontrol positif}] \times 100$$

2.3.11 Analisis Data

Semua data dinyatakan dalam bentuk rata-rata ± standar deviasi. Homogenitas dan normalitas data dievaluasi masing-masing. Perbandingan antar

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

perlakuan ditentukan dengan *one way* ANOVA dilanjutkan dengan uji *post hoc* Duncan pada taraf signifikansi 0,05. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak statistik SPSS 24.0 dan tabulasi data menggunakan *Microsoft Excel*. Hasil senyawa fitokimia, MIC, dan MBC dianalisis secara deskriptif.

Hasil

2.4.1 Skrining fitokimia

Hasil skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih disajikan pada Tabel 2. Hasil pengujian menunjukkan masing-masing ekstrak fitobiotik memiliki kandungan senyawa alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, triterpenoid dan glikosida, serta tidak ditemukannya kandungan steroid pada masing-masing ekstrak fitobiotik. Sedangkan, senyawa tanin hanya ditemukan pada ekstrak pasak bumi.

Tabel 2 Hasil pemeriksaan skrining fitokimia simplisia dan ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih

Senyawa Fitokimia	Ekstrak Etanol		
	Pasak Bumi	Kunyit Putih	Bawang Putih
Alkaloid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Tanin	+	-	-
Fenolik	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Steroid	-	-	-
Triterpenoid	+	+	+

Keterangan : (-) = tidak terdeteksi ; (+) = terdeteksi

2.4.2 Analisis Total Fenol dan Flavonoid

Hasil pengukuran total fenol dan total flavonoid ditampilkan pada Tabel 3. Nilai total fenol dan total flavonoid ditemukan paling tinggi pada ekstrak pasak bumi yaitu sebesar 9,61 % (b/b) dan 13,38 QE/g.

Tabel 3 Hasil analisis total fenol dan total flavonoid ekstrak pasak bumi, bawang putih dan kunyit putih.

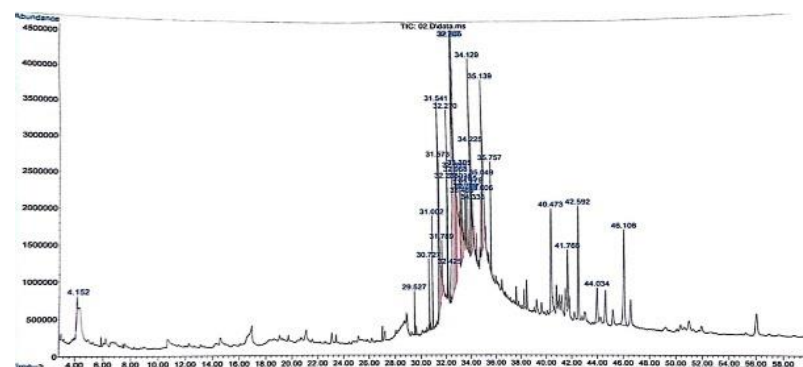
Sampel	Parameter	
	Total Fenol % (b/b)	Total Flavonoid mg QE/g
Ekstrak Pasak Bumi	9,61	13,38
Ekstrak Bawang Putih	0,68	6,63
Ekstrak Kunyit Putih	4,72	4,88

Ket: Kadar flavonoid dinyatakan sebagai *quercetin equivalent* (QE) dalam mg g⁻¹ ekstrak kering

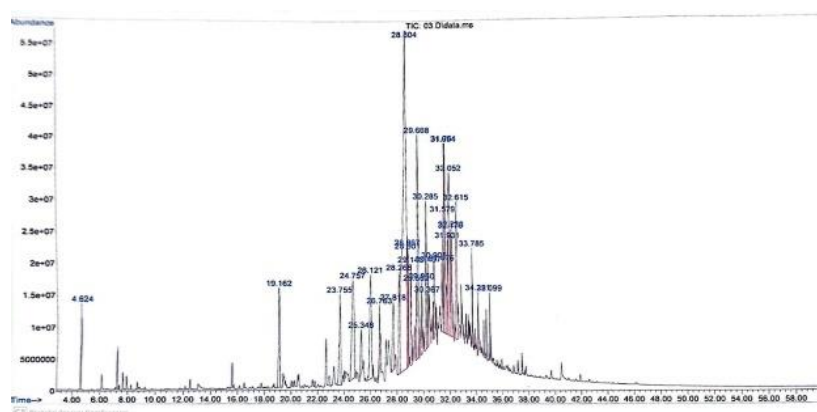
2.4.3 Analisis Fitobiotik dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Hasil kromatogram masing-masing ekstrak fitobiotik mengkonfirmasi kehadiran berbagai senyawa bioaktif dengan waktu retensi berbeda (RT). Puncak masing-masing komponen diperoleh dari spektrum massa dan ditunjukkan pada Gambar 2. Enam senyawa tertinggi diidentifikasi berdasarkan RT. Nama senyawa dan fungsi senyawa diprediksi dan disajikan pada Tabel 4.

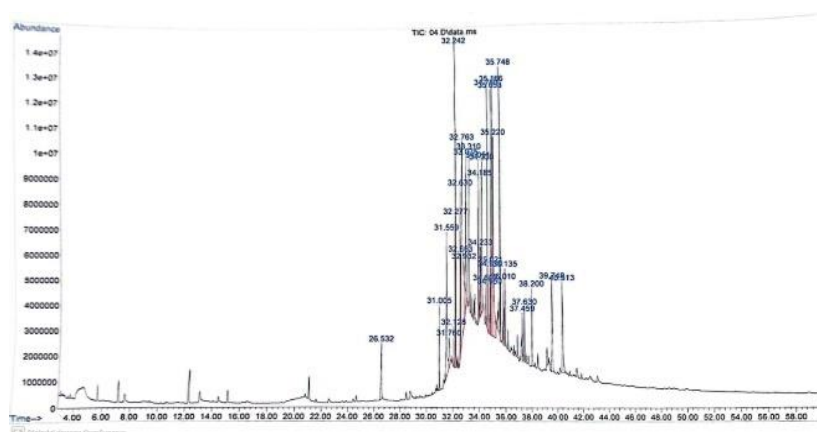
A



B



C



Gambar 2 Kromatogram hasil analisis ekstrak Fitobiotik dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). (A) pasak bumi (*E. longifolia*), (B) kunyit putih (*C. zedoaria*), (C) bawang putih (*A. sativum*).

Tabel 4 Identifikasi komponen enam puncak utama senyawa hasil analisis ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih menggunakan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS)

Sampel	RT	Kandungan (%)	Nama Senyawa	Kelompok Senyawa	Fungsi	Pustaka
Pasak Bumi	32,71	31,36	9-octadecenoic acid	<i>Oleic acid</i>	Anti-inflammatory, Antiandrogenic, Cancer preventive, antibacterial	Sreekumar <i>et al.</i> 2014
	31,54	6,94	Hexadecanoic acid	<i>Palmitic Acid</i>	Antioxidant, Hypocholesterolemic, Nematicide, Pesticide, Lubricant, Antiandrogenic	Krishnamoorthy & Subramaniam 2014
	46,11	6,12	Stigmastane-3,6-dione, (5.alpha.)-	<i>Steroid</i>	Antimicrobial activity	Zhao <i>et al.</i> 2005
	40,47	5,54	.Gamma.-sitosterol	<i>Phytosterol</i>	antiinflammatory, antioxidant, and anticancer	Salehi <i>et al.</i> 2020
	42,59	4,71	Stigmast-4-EN-3-ONE	<i>Steroid</i>	antimicrobial activity	Udobre <i>et al.</i> 2015
	31,57	3,60	<i>Hexadecane</i>	<i>Alkane</i>	Antibacterial, antioxidant activity	Kumar <i>et al.</i> 2011
Kunyit Putih	28,81	29,55	2H-1-Benzothiopyran-4-carbonitrile, 3,4-dihidro-3-methyl-,trans-	No Information	<i>No activity reported</i>	-
	24,76	6,44	Isocurcumenol	Sesquiterpenes	Anticancer, antitumor	Lakshmi <i>et al.</i> 2011
	29,67	5,93	1-Butyn-3-one, 1-(6,6-dimethyl-1,2-epoxycyclohexyl)-	<i>Dihydroboldenone</i>	<i>No activity reported</i>	-
	26,12	5,13	.Beta. Turmeron	<i>ketone monoterpenes</i>	antiinflammatory, antimicrobial, and anticancer properties	Nair <i>et al.</i> 2019
	23,75	3,27	.Beta.-Cymene	<i>Monoterpenes</i>	antioxidant, antiinflammatory, antiparasitic, antidiabetic, antiviral, antitumor, antibacterial, and antifungal activities	
	19,16	3,11	.Alpha.-Curcumene	<i>Sesquiterpenes</i>	Antibacterial activities	
Bawang Putih	32,66	21,70	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	<i>Linolenic acid</i>	Anti-inflammatory, hypocholesterolemic, cancer preventive, insectifuge, antiarthritic, hepatoprotective, antiandrogenic, nematicide, antibacterial activity	Krishnamoorthy & Subramaniam 2014
	35,32	9,38	1,3,12-Nonadecatriene	Alkenes	<i>No activity reported</i>	-
	35,22	6,22	1-Tricosane	Alkanes	<i>No activity reported</i>	-
	35,06	5,24	Icosane	Alkanes	Antifungal	Karanja <i>et al.</i> 2012
	21,56	4,93	Octadecanoic acid	<i>Stearic acid</i>	Antioxidant, anti-inflammatory	Dr. Dukes
	40,51	4,50	.gamma.-Sitosterol	<i>Phytosterol</i>	anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties	Salehi <i>et al.</i> 2020

2.4.1 Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ketiga ekstrak fitobiotik dengan berbagai konsentrasi dirangkum pada Tabel 5. Hasil uji zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak pasak bumi dan bawang putih mampu menghambat *V. parahaemolyticus* Rf^R, sedangkan ekstrak kunyit putih tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk. Perlakuan konsentrasi ekstrak pasak bumi dan bawang putih yang memiliki zona hambat terbesar adalah perlakuan konsentrasi 64 mg mL⁻¹.

Tabel 5 Aktivitas antibakteri ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dengan konsentrasi berbeda terhadap *V. parahaemolyticus* Rf^R

Konsentrasi (mg mL ⁻¹)	Diameter zona hambat (mm)		
	Ekstrak pasak bumi	Ekstrak kunyit putih	Ekstrak bawang putih
4	6,93±0,95 ^b	0,00±0,00 ^a	6,54±0,47 ^b
8	8,40±0,40 ^c	0,00±0,00 ^a	7,38±0,16 ^b
16	10,53±0,45 ^d	0,00±0,00 ^a	8,47±0,55 ^c
32	12,53±0,59 ^e	0,00±0,00 ^a	9,23±0,06 ^d
64	13,10±0,14 ^e	0,00±0,00 ^a	10,82±0,28 ^e
Kontrol positif (chloramphenicol 30 µg mL ⁻¹)	14,8 ± 0,06 ^f	14,8 ± 0,06 ^b	14,8 ± 0,06 ^f
Kontrol negatif (PBS)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Keterangan: data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata ± standar deviasi. PBS; phosphate buffer saline. Kategori : sangat kuat (>20mm), kuat (>10-20mm), sedang (5-10mm) dan lemah (<5mm).

2.4.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Pasak bumi (*E. longifolia*) dan bawang putih (*A. sativum*) menunjukkan kemampuan MIC pada dosis 0,031 mg mL⁻¹ sedangkan kunyit putih (*C. zedoaria*) nilai MIC pada dosis 0,125 mg mL⁻¹. Nilai MBC pasak bumi terdapat pada dosis 16 mg mL⁻¹ yang dikonfirmasi dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* pada media TCBS, sedangkan kunyit putih dan bawang putih pada dosis 64 mg mL⁻¹ belum menunjukkan nilai MBC, yang ditunjukkan dengan masih adanya bakteri *V. parahaemolyticus* yang tubuh pada dosis tersebut.

Tabel 6 Minimum Inhibitory Concentration dan Minimum Bactericidal Concentration pada pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih melawan *V. parahaemolyticus*

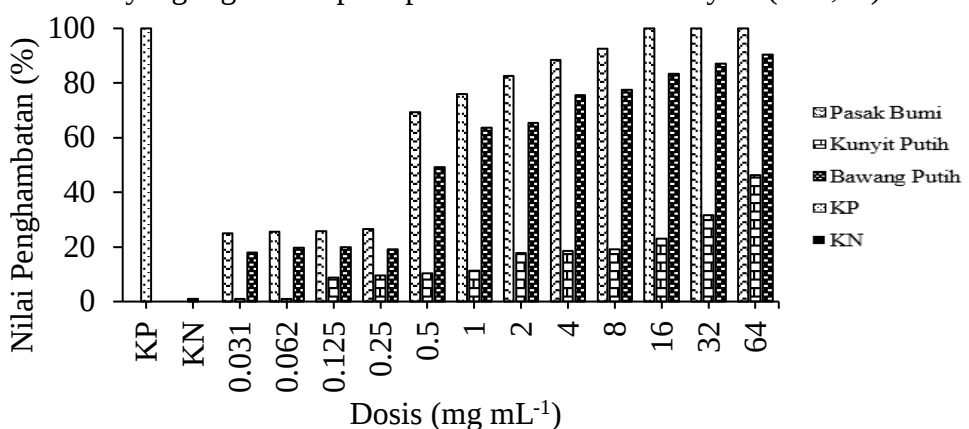
	Pasak bumi	Kunyit putih	Bawang putih
MIC (mg mL ⁻¹)	0,031	0,125	0,031
MBC (mg mL ⁻¹)	16	>64	>64

MIC: Minimum Inhibitory Concentration, MBC : Minimum Bactericidal Concentration

2.4.3 Penghambatan Ekstrak Fitobiotik Terhadap *V. parahaemolyticus* Rf^R

Konsentrasi terendah ekstrak pasak bumi dan bawang putih dari penelitian ini yaitu 0,031 mg/mL mampu menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* Rf^R masing-masing sebesar 25,08% dan 17,97%, sedangkan kunyit putih dosis terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* yaitu

0,125mg mL⁻¹ mampu menghambat sebesar 8,71%. Perlakuan yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri hingga 100% yaitu perlakuan ekstrak pasak bumi dengan dosis sebesar 16 mg mL⁻¹ (Gambar 3). Semua perlakuan konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini berbeda nyata (P<0,05).



Gambar 3 Nilai penghambatan ekstrak fitobiotik dengan konsentrasi berbeda.

2.4.4 Aktivitas Penghambatan dan Destruksi Biofilm *V. parahaemolyticus*

Hasil pengamatan aktivitas penghambatan biofilm *V. parahaemolyticus* dengan penambahan suspensi fitobiotik disajikan pada Tabel 7. Aktivitas penghambatan biofilm pada perlakuan ekstrak bawang putih signifikan lebih tinggi dibandingkan perlakuan ekstrak pasak bumi dan kunyit putih (p<0,05).

Tabel 7 Aktivitas penghambatan biofilm *V. parahaemolyticus* dengan penambahan suspensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih

Perlakuan	Kontrol (OD 595 nm)	Ekstrak Fitobiotik (OD 595 nm)	% Penghambatan
Ekstrak pasak bumi		0,34±0,01	90,57±0,21 ^b
Ekstrak kunyit putih	3,56±0,17	0,74±0,03	79,62±0,69 ^a
Ekstrak bawang putih		0,25±0,03	93,18±0,83 ^c

Keterangan: *Superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan p<0,05). Kepadatan *V. parahaemolyticus* yang diujikan yaitu 10⁴ CFU mL⁻¹.

Hasil pengamatan aktivitas destruksi biofilm *V. parahaemolyticus* dengan penambahan suspensi fitobiotik disajikan pada Tabel 8. Aktivitas destruksi *biofilm* pada perlakuan ekstrak bawang putih signifikan lebih tinggi dibandingkan perlakuan ekstrak pasak bumi dan kunyit putih (p<0,05)..

Tabel 8 Aktivitas penghambatan biofilm *V. parahaemolyticus* dengan penambahan suspensi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih

Perlakuan	Kontrol (OD 595 nm)	Ekstrak Fitobiotik (OD 595 nm)	% Destruksi
Ekstrak pasak bumi		0,97±0,06	70,08±3,69 ^b
Ekstrak kunyit putih	3,24±0,27	2,49±0,12	22,82±7,96 ^a
Ekstrak bawang putih		0,54±0,04	83,14±2,65 ^c

Keterangan: *Superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan p<0,05). Kepadatan *V. parahaemolyticus* yang diujikan yaitu 10⁴ CFU mL⁻¹.

2.5 Pembahasan

Aktivitas penghambatan *V. parahaemolyticus* oleh ekstrak fitobiotik berkaitan dengan senyawa fitokimia dari masing-masing ekstrak tanaman. Spesies tumbuhan yang memiliki aktivitas farmakologis disebabkan fitokonstituennya seperti glikosida, saponin, flavonoid, steroid, tanin, alkaloid dan terpenoid (Batiha *et al.* 2018). Skrining fitokimia ekstrak *E. longifolia*, *C. zedoaria* dan *A. sativum* menunjukkan masing-masing ekstrak memiliki kandungan senyawa alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, dan triterpenoid (Tabel 2). Sedangkan, senyawa tanin hanya ditemukan pada ekstrak pasak bumi. Ekstrak pasak bumi pada penelitian ini juga mengandung total fenol, dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih maupun bawang putih yaitu sebesar 9,61 % (b/b) dan 13,38 QE/g. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kandungan bahan aktif yaitu jenis tanaman, metode ekstraksi, jenis pelarut dan proses penyimpanan.

Senyawa kimia yang berasal dari tumbuhan, seperti fenolik, flavonoid, dan tanin, dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas banyak mikroorganisme, termasuk bakteri patogen (Li *et al.* 2014). Fenolik merupakan kelompok fitokimia terbesar yang menyumbang sebagian besar aktivitas antioksidan pada tanaman (Okpuzar 2009). Senyawa fenol mampu menghambat pertumbuhan bakteri melalui dua mekanisme utama. Pertama, fenol merusak permeabilitas selektif membran sel mikroba. Hal ini terjadi karena fenol mengubah tegangan permukaan membran, sehingga menyebabkan keluarnya metabolik penting dan menginaktifkan enzim-enzim pada bakteri. Kedua, fenol menginaktifkan protein pada membran sel bakteri dengan cara berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen. Pengikatan ini menghambat sintesa protein bakteri, yang merupakan proses penting untuk pertumbuhan dan reproduksi bakteri.

Flavonoid adalah kelompok terbesar senyawa fenolik alami, yang terdapat di berbagai bagian tanaman baik dalam keadaan bebas maupun sebagai glikosida. Mereka ditemukan memiliki banyak aktivitas biologis termasuk antimikroba, penghambatan adhesi mitokondria, antiulkus, anti artritis, antiangiogenik, antikanker, penghambatan protein kinase, dan lain-lain. Cushnie dan Lamb (2005a) menjelaskan bahwa flavonoid sebagai antibakteri disebabkan oleh tiga mekanisme: (1) Penghambatan sintesis asam nukleat (Ulanowska *et al.* 2006), (2) Penghambatan fungsi membran sitoplasma (Chusnie & Lamb 2005b), dan (3) Penghambatan metabolisme energi (Eumkeb *et al.* 2013).

Senyawa-senyawa lain yang terkandung pada masing-masing ekstrak juga terdapat khasiat yang dimilikinya. Alkaloid berkhasiat sebagai antimalaria, antidiabetes, antimikroba dan antidiare (Qiu *et al.* 2014). Saponin memiliki peran antimikroba, *anti inflammatory*, meningkatkan pertumbuhan, dan meningkatkan kekebalan terhadap stres (Chakraborty *et al.* 2021). Tanin memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antimikroba dan anti inflamasi (Pizzi 2021).

Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa ekstrak etanol *E. longifolia*, *C. zedoaria* dan *A. sativum* mengandung masing-masing 20 (Lampiran 2) , 17 (Lampiran 3) dan 26 (Lampiran 4) senyawa berdasarkan hasil analisis GC-MS. Enam senyawa tertinggi berdasarkan persen area diidentifikasi nama, kelompok dan fungsi senyawa kimianya (Tabel 4). Kandungan senyawa dominan yang terkandung dalam pasak bumi dan bawang putih yaitu 9-octadecenoic acid (*Oleic acid*) dan 9,12-Octadecadienoic acid (*Z,Z*)- (*Linolenic acid*) memiliki peran sebagai antimikroba (Sreekumar *et al.* 2014; Krishnamoorthy & Subramaniam

14), sedangkan senyawa dominan yang ditemukan pada kunyit putih yaitu *2H-benzothiopyran-4-carbonitrile*, *3,4-dihydro-3-methyl-,trans-* masih belum etahui fungsi dan aktivitas biologis nya. Hal ini diduga yang mendasari bahwa nampuan pasak bumi dan bawang putih terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* lebih baik dibandingkan dengan kunyit putih.

Aktivitas antimikroba dari ekstrak tumbuhan dan senyawa aktifnya direspon gan beberapa mekanisme seperti, biosintesis protein bakteri, penghancuran mbran sel, biosintesis dinding sel, menghambat replikasi DNA, menghambat ir metabolisme, menghambat sintesis energi mikroba, menghambat virulensi kroba, dan menghambat pembentukan biofilm (Micymaray 2019; Khameneh *et al.* 2019; Ganesan & Xu 2017; Gorniak *et al.* 2019). Berdasarkan hasil uji ibakteri ketiga bahan menunjukkan, semakin tinggi konsentrasi ekstrak pasak ni dan bawang putih yang digunakan maka semakin besar zona hambat, dan nilai ng hambatan terhadap *V. parahaemolyticus* Rf^R. Perlakuan ekstrak kunyit putih la penelitian ini tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk dari nua konsentrasi. Perlakuan pasak bumi (konsentrasi 16 mg/mL) pada penelitian bersifat bakterisidal. Hal ini terlihat dari diameter zona hambat dengan nilai ng hambatan *V. parahaemolyticus* Rf^R sebesar 100% setelah diinkubasi 24 jam. elitian lain dengan menggunakan ekstrak daun *Ginkgo biloba* juga dapat ng hambatan pertumbuhan *Shewanella putrefaciens* hingga 0 log CFU mL⁻¹ setelah jam dengan nilai penghambatan sebesar 100%, sedangkan nilai penghambatan i dosis MIC terhadap *Saprophytic staphylococcus* sebesar 22,78% (Zhang *et al.* 18).

Vibrio dapat bertahan di lingkungan perairan dengan pembentukan biofilm alente & Wan 2021). Pembentukan biofilm merupakan mekanisme yang mediasi oleh *quorum sensing* (Liu *et al.* 2018), yang dilakukan oleh bakteri untuk ngefisienkan pemanfaatan nutrisi di lingkungan dan meningkatkan ahanannya terhadap paparan bahan-bahan antimikroba, stres, dan meningkatkan ilensi bakteri tersebut (Packiavathy *et al.* 2013). Menurut Liu *et al.* (2018), lus formasi biofilm diawali dengan perlekatan bakteri pada suatu permukaan, ta sekresi enzim ekstraseluler dan pembentukan formasi matriks. biofilm hingga bentuk formasi biofilm yang matang. Apabila biofilm sudah melewati masa tangnya, maka akan terjadi kolaps biofilm dan sel bakteri akan dilepas ke gkungan, dan apabila lingkungan mendukung siklus awal dapat dimulai kembali. sil penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dan destruksi film bakteri *V. parahaemolyticus* dengan penambahan suspensi fitobiotik, yang ng indikasikan kemampuan masing-masing ekstrak untuk menghambat dan truksi biofilm. Sedangkan aktivitas destruksi biofilm berkaitan dengan adanya stansi hidrolitik dan antibakteri yang dihasilkan oleh ekstrak fitobiotik sehingga mpu mendestruksi formasi biofilm *V. parahaemolyticus* tersebut. Berdasarkan il yang diperoleh penghambatan dan destruksi biofilm ekstrak bawang putih nunjukan hasil paling baik, disusul oleh ekstrak pasak bumi, dan kunyit putih.

Simpulan

Senyawa bioaktif pada pasak bumi lebih bervariasi dan memiliki konsentrasi al fenol dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan bawang putih u kunyit putih. Ekstrak pasak bumi dan bawang putih memiliki kemampuan agai antibakteri dan antibiofilm untuk patogen *V. parahaemolyticus*.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

III EFEKTIVITAS EKSTRAK PASAK BUMI, KUNYIT PUTIH DAN BAWANG PUTIH DALAM MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN DAN KELANGSUNGAN HIDUP UDANG VANAME YANG DIUJI TANTANG *V. parahaemolyticus*

3.1 Abstrak

Penggunaan fitobiotik melalui pakan dapat menjadi salah satu strategi penanganan penyakit seperti vibriosis. Penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih pada pakan terhadap respons imun dan resistansi udang vaname terhadap infeksi *V. parahaemolyticus*. Perlakuan yang diuji adalah empat perlakuan pemberian pakan dengan penambahan fitobiotik yang berbeda yang dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan penambahan fitobiotik dalam pakan meliputi ekstrak fitobiotik pasak bumi sebanyak 1,6% (EL16), ekstrak kunyit putih sebanyak 6,4% (CZ64), ekstrak bawang putih 6,4% (AS64), dan campuran fitobiotik 1:1:1 (C1) dalam pakan. Udang uji berukuran awal $2,53 \pm 0,22$ g diberi pakan perlakuan secara *ad satiation* sebanyak empat kali sehari selama 42 hari masa pemeliharaan. Uji tantang bakteri *V. parahaemolyticus* melalui injeksi (10^5 CFU ekor⁻¹) dilakukan pada akhir pemeliharaan selama tujuh hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak fitobiotik dalam pakan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan respons imun pada udang. Hasil uji tantang dengan *V. parahaemolyticus* menunjukkan bahwa penambahan ekstrak fitobiotik mampu mengurangi kerusakan struktur sel usus dan hepatopankreas, menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* serta mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang. Simpulan dari penelitian ini adalah perlakuan ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) merupakan perlakuan terbaik yang mampu meningkatkan respons imun, kelangsungan hidup, dan performa pertumbuhan udang vaname yang di uji tantang *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Fitobiotik, histopatologi, *P. vannamei*, respon imun, *V. parahaemolyticus*

Abstract

*The use of phytobiotics through feed can be an effective strategy for managing diseases such as vibriosis. This second phase of the research aims to evaluate the effects of feeding extracts of tongkat ali, white turmeric, and garlic on the immune response and resistance of Pacific white shrimp to Vibrio parahaemolyticus infection. Four different phytobiotic-supplemented feed treatments were tested and compared to a control. The phytobiotic feed supplements included 1.6% tongkat ali extract (EL16), 6.4% white turmeric extract (CZ64), 6.4% garlic extract (AS64), and a 1:1:1 mixture of the three phytobiotics (C1). Test shrimp, initially weighing 2.53 ± 0.22 g, were fed the experimental diets ad libitum four times daily for a 42-day rearing period. A bacterial challenge with *V. parahaemolyticus* via injection (10^5 CFU shrimp⁻¹) was conducted at the end of the rearing period for seven days. The results showed that the addition of phytobiotic extracts in the feed improved*

with performance and immune response in shrimp. The challenge test with *parahaemolyticus* indicated that the addition of phytobiotic extracts reduced intestinal and hepatopancreas cell damage, inhibited *V. parahaemolyticus* growth, and enhanced shrimp survival. The conclusion of this study is that the 1.6% tongkat extract (EL16) treatment was the most effective, significantly enhancing immune response, survival, and growth performance of Pacific white shrimp challenged with *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Histopathology, immune responses, *P. vannamei*, phytobiotics, *V. parahaemolyticus*

Pendahuluan

3.2.1 Latar belakang

Budidaya udang merupakan salah satu sektor perikanan yang penting, namun memiliki tantangan besar terkait risiko penyakit (Choi *et al.* 2016). Penyakit yang umum muncul dalam budidaya udang disebabkan oleh berbagai agen patogen seperti virus, bakteri, protozoa, fungi, dan parasit metazoa (Mastan, 2015). Salah satu penyakit bakteri yang paling sering menyerang berbagai spesies udang adalah vibriosis, yang disebabkan oleh bakteri dari genus *Vibrio* spp. dalam keluarga *Vibrionaceae* (Mancuso *et al.* 2015). Penyakit ini terus menjadi ancaman serius dalam budidaya udang (Ajlan, 2016).

Vibriosis telah dilaporkan oleh banyak peneliti sebagai penyakit yang disebabkan oleh setidaknya 14 spesies *Vibrio*, termasuk *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. mimicus*, *V. damsella*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. campbellii*, *V. ordalii*, *V. mediterranei*, *V. orientalis*, dan *V. logei* (Ajlan, 2016). Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Vibrio* pada udang mencakup *luminescent disease*, sindrom Zoea II, *acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)/early mortality syndrome (EMS)*, *white feces disease (WFD)*, dan *high lethal vibrio disease (HLVD)* (Abdel-Latif *et al.* 2022).

Pengendalian penyakit vibriosis umumnya dilakukan dengan penggunaan bahan kimia dan antibiotik. Namun, penggunaan ini membawa dampak negatif terhadap manusia dan lingkungan, seperti berkembangnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik, penurunan efektivitas antibiotik akibat penggunaan berulang, serta kontaminasi lingkungan (Limbu *et al.* 2018). Oleh karena itu, diperlukan alternatif yang efektif, ekonomis, dan ramah lingkungan untuk membatasi penggunaan antibiotik dalam budidaya perikanan.

Penggunaan tanaman obat atau fitobiotik menjadi strategi yang ditetapkan dalam penelitian sebelumnya untuk pengendalian penyakit. Fitobiotik memiliki beberapa keunggulan, antara lain bahan baku yang mudah diperoleh, teknik yang sederhana, dan kemampuan degradasi yang baik sehingga tidak mencemari lingkungan meski digunakan dalam jangka waktu lama (Van Hai, 2015). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa penambahan fitobiotik dalam pakan dapat meningkatkan nafsu makan, aktivitas enzim pencernaan (Pu *et al.* 2017), respon imun, dan ketahanan terhadap infeksi patogen pada ikan dan udang (Pu *et al.* 2017).

Penelitian tahap pertama menunjukkan bahwa pasak bumi (*Eurycoma longifolia*), kunyit putih (*Curcuma zedoaria*), dan bawang putih (*Allium sativum*) mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, fenolik, alkaloid, dan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

steroid dan terbukti memiliki peran sebagai antimikroba dan antibiofilm pada *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan kemampuan masing-masing bahan, penggabungan dari ketiga bahan ini diharapkan mampu memberikan spektrum manfaat yang luas, mulai dari peningkatan daya tahan tubuh, pencegahan infeksi, hingga perbaikan kesehatan pencernaan pada udang, sehingga menjadikannya pilihan yang efektif dan holistik dalam pengobatan tradisional maupun modern. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya dilakukan untuk mengevaluasi efektivitas masing-masing ekstrak fitobiotik dan kombinasinya dalam peningkatan imunitas dan kelangsungan hidup udang vaname yang terinfeksi *V. parahaemolyticus*.

3.2.2 Rumusan Masalah

Pengendalian vibriosis pada udang vaname menghadapi tantangan karena penggunaan antibiotik yang berdampak negatif pada kesehatan dan lingkungan. Fitobiotik seperti pasak bumi (*E. longifolia*), kunyit putih (*C. zedoaria*), dan bawang putih (*A. sativum*) mengandung senyawa aktif yang dapat menghambat *V. parahaemolyticus* dan berpotensi meningkatkan kesehatan serta respons imun udang. Rumusan masalah penelitian ini adalah: (1) Apakah ekstrak fitobiotik tersebut efektif menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*? (2) Bagaimana pengaruhnya terhadap kesehatan dan respons imun udang vaname? (3) Apa dampaknya terhadap kelangsungan hidup udang? Penelitian ini akan mengevaluasi efektivitas fitobiotik sebagai alternatif pengendalian vibriosis yang aman dan ramah lingkungan.

3.2.3 Tujuan

Penelitian bertujuan mengevaluasi pemberian ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih sebagai imunostimulan melalui pakan terhadap respons imun dan resistansi udang vaname terhadap infeksi *V. parahaemolyticus*.

3.3 Metode

3.3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2023, bertempat di *Marine Center*, Departemen Budidaya Perairan (BDP), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University. Analisis kesehatan dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

3.3.2 Persiapan Serbuk dan Ekstrak Fitobiotik

Sampel bahan yang digunakan diperoleh dari pasar tradisional Pasar Anyar Kota Bogor, Jawa Barat. Bawang putih dan kunyit putih yang digunakan dibersihkan dari kotoran dengan air lalu dipotong kecil dan dikeringkan dengan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Bahan uji yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan dan disaring dengan saringan dengan *mesh size* 0,5–1 mm. Pasak bumi berupa serutan kayu dibentuk serbuk, dengan menggunakan mesin penggiling bubuk kayu sebelum dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 60°C.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menimbang masing-masing 50 g bubuk simplisia, bubuk diekstraksi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 (b/v). Selanjutnya dimaserasi selama 24 jam dengan pengadukan menggunakan orbital *shaker* pada suhu ruang. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no 41. Sisa saringan dimaserasi kembali sebanyak dua kali dengan metode yang sama seperti maserasi pertama. Hasil maserasi dipekatkan dengan evaporator *vaccum* pada suhu 30-45°C kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Adhesina *et al.* 2018).

3.3.3 Persiapan Bakteri Uji

Isolat *V. parahaemolyticus* didapat dari Lab. Kesehatan Organisme Akuatik, Departemen BDP, IPB. Selanjutnya genom bakteri *V. parahaemolyticus* diamplifikasi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan primer spesifik bagi *V. parahaemolyticus* yaitu *recA* F (5'-GCT-AGT-AGA-AAA-AGC-GGG-TG-3') dan *recA* R (5'-GCA-GGT-GCT-TCT-GGT-TGA-G-3') dengan target ampikon 165 bp (Ma *et al.* 2015).

Bakteri dikultur pada media *thiosulfate citrate bile-salt sucrose* (TCBS) (Difco, US) dan Chrome Agar (Himedia, India). Koloni yang tumbuh diinokulasikan pada media *sea water complete* (SWC) cair sebanyak 50 mL dan diinkubasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 160 rpm selama 18 jam pada suhu 28-29°C hingga diperoleh kepadatan bakteri sebanyak 10⁹ CFU mL⁻¹ (metode *total plate count*). Selanjutnya dilakukan pengenceran kepadatan bakteri hingga sesuai untuk dosis ujiantang.

3.3.4 Rancangan Penelitian dan Persiapan Pakan Uji

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas lima perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali (Tabel 9). Penentuan dosis masing-masing fitobiotik didapatkan dari nilai *minimum bactericidal concentration* (MBC) pada Tabel 6 .

Tabel 9 Rancangan penelitian pakan udang dengan penambahan ekstrak fitobiotik

Kode	Keterangan
K	Pakan kontrol (tanpa penambahan ekstrak fitobiotik)
EL16	Pakan + Ekstrak pasak bumi (1,6%)
AS64	Pakan + Ekstrak bawang putih (6,4%)
CZ64	Pakan + Ekstrak kunyit putih (6,4%)
C1	Pakan + Kombinasi Ekstrak pasak bumi, bawang putih, dan kunyit putih (1:1:1)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan udang komersial dengan kandungan protein 41%, serat kasar 3%, lemak 7%, kadar air 12%, dan abu 13%. Lima jenis pakan dipersiapkan dengan mencampurkan ekstrak fitobiotik pada pakan (*coating*) secara manual dengan menggunakan binder putih telur sebanyak 2% (v/v) dan air sebagai pelarut sebanyak 6% (v/b). Pakan yang telah dicampur bahan fitobiotik dikeringudarkan lalu disimpan pada lemari pendingin bersuhu 4°C sebelum digunakan.

3.3.5 Pemeliharaan Udang

Udang *post larva* 12 (PL 12) dipelihara terlebih dahulu hingga mencapai bobot rata-rata $2,53 \pm 0,22$ g. Selanjutnya, sebanyak 200 ekor udang dipindahkan ke dalam masing-masing bak fiber silinder dengan volume air 450 L. Pakan uji diberikan sebanyak empat kali sehari yaitu pada pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB dengan *feeding level* awal 7% yang kemudian disesuaikan secara bertahap berdasarkan hasil sampling. Pemeliharaan udang vaname dilaksanakan selama 42 hari. Suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut dan total amonia nitrogen diukur setiap tujuh hari sekali selama pemeliharaan untuk pengamatan parameter kualitas air. Hasil pengukuran kualitas air selama masa pemeliharaan disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10 Kualitas air selama pemeliharaan

Parameter kualitas air	Hasil	Standar*
Dissolved Oxygen (mg/L)	4,9 – 5,5	Minimum 4
Suhu (°C)	28,6 – 30,9	Minimum 27
Salinitas (g/L)	25	10 – 32
pH (mg/L)	7,6 – 8,4	7,5 – 8,5
Amonia	0,05 – 0,28	
Nitrit (NO ₂) (mg/L)	0,23 – 1,34	Maksimum 1
Nitrat (NO ₃) (mg/L)	2,03 – 4,36	

*Ket: SNI 8008:2014

3.3.6 Uji Tantang dengan *V. Parahaemolyticus* Rf^R

Uji tantang bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan di akhir pemeliharaan pada wadah akuarium berukuran 60 cm × 30 cm × 30 cm yang diisi udang yang berasal dari masing-masing bak uji sebanyak 15 ekor per akuarium selama tujuh hari. Uji tantang dilakukan dengan cara menyuntikan bakteri *V. parahaemolyticus* Rf^R 10^5 CFU udang⁻¹ (LD50) secara intramuskular pada bagian punggung antara segmen kedua dan ketiga sebanyak masing-masing 100 µL ekor⁻¹. Udang yang mati diamati setiap hari selama tujuh hari.

3.3.7 Pertumbuhan dan Efisiensi Pakan selama Pemeliharaan

Udang ditimbang pada awal dan akhir pemeliharaan untuk mendapatkan biomassa udang. Pakan yang diberikan ditimbang dan dicatat selama pemeliharaan 56 hari untuk menghitung jumlah konsumsi pakan. Parameter kinerja pertumbuhan dan efisiensi pakan yang diukur yaitu Wo, Wt, JKP, LPS, RKP dan TKH. Pertumbuhan dan efisiensi pakan dihitung dengan rumus :

- Laju pertumbuhan spesifik (LPS) dihitung mengacu pada Lugert *et al.* (2014):

$$LPS (\% \text{ hari}^{-1}) = \frac{\ln(Wt) - \ln(Wo)}{t} \times 100$$

Keterangan:

- LPS = Laju pertumbuhan spesifik (% hari⁻¹)
- t = Periode pengamatan (hari)
- Wt = Bobot rata-rata udang pada akhir pemeliharaan (g)
- Wo = Bobot rata-rata udang pada awal pemeliharaan (g)

- Rasio konversi pakan (RKP) dihitung mengacu kepada Watanabe (1988):

$$RKP = \frac{JKP}{Wt - Wo + Wd}$$

Keterangan:

- RKP = Rasio konversi pakan
- Wt = Biomassa udang hidup pada akhir pemeliharaan (g)
- Wo = Biomassa udang pada awal pemeliharaan (g)
- Wd = Biomassa udang mati selama pemeliharaan (g)
- JKP = Jumlah konsumsi pakan selama pemeliharaan (g)

3.3.8 Total Hemocyte Count (THC)

Perhitungan total hemosit dilakukan dengan cara hemolim udang diambil dari ventral sinus menggunakan syringe steril bervolume 1 mL yang telah diisi antikoagulan (4°C) (30 mM *trisodium citrate*, 0.34 M *sodium chloride*, 10 mM EDTA, 0,12 M *glucosa*, pH 7,55) dengan perbandingan 1:3. Campuran hemolim dan antikoagulan dimasukkan ke dalam *microtube* lalu dihomogenkan dengan cara menggoyangkan tangan membentuk angka delapan. Campuran hemolim-antikoagulan tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam bidang hitung pada hemositometer untuk dihitung jumlah total hemosit. Pengamatan sel hemosit dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (Hamsah *et al.* 2019). Perhitungan jumlah total hemosit menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total hemocyte} = \text{rata-rata} \sum \text{sel} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{faktor pengenceran}$$

3.3.9 Aktivitas Fagositosis (AF)

Aktivitas fagositosis diukur dengan cara mencampurkan sampel hemolim udang 100 µL dengan suspensi *Staphylococcus aureus* (10⁷ CFU mL⁻¹) 25 µL lalu diinkubasi selama 20 menit, kemudian dibuat preparat ulas yang difiksasi dengan metanol selama lima menit dan dikeringkan kembali, kemudian diwarnai dengan pewarna giemsa selama 20 menit. Preparat ulas diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali untuk mengetahui aktivitas fagositik yang didasarkan pada persentase dari 100 sel fagosit yang menunjukkan proses fagositosis (Chen *et al.* 2014).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

3.3.10 Aktivitas *Phenoloxidase* (PO)

Aktivitas *phenoloxidase* diukur berdasarkan formasi *dopachrome* yang dihasilkan oleh L-DOPA berdasarkan. (Zhao *et al.* 2017) campuran hemolim dan antikoagulan sebanyak 1 mL disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang sedangkan pelet sel disuspensi kembali dengan ditambahkan 1 mL larutan *cacodylate-citrate buffer* (0,01 M sodium cacodylate, 0,45 M *sodium chloride*, 0,10 M *trisodium citrate*, pH 7) kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu dan waktu yang sama. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet sel ditambahkan 200 µL *sodium cacodylate buffer*. Sebanyak 100 µL suspensi sel ditambahkan 50 µL tripsin (1 mg mL⁻¹ dalam *cacodylate buffer*) dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah inkubasi, L-DOPA ditambahkan sebanyak 50 µL (3 mg mL⁻¹ dalam *cacodylate buffer*) lalu didiamkan selama 5 menit. Sebanyak 800 µL *cacodylate buffer* ditambahkan dalam suspensi sel lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur *microplate* titer. Berbeda dengan larutan uji, larutan standar mengandung 100 µL suspensi hemosit, 50 µL *cacodylate buffer* sebagai pengganti tripsin dan 50 µL L-DOPA. *Optical density* (OD) diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 492 nm. DO dinyatakan sebagai formasi *dopachrome* dalam 50 µL hemolim

3.3.11 *Respiratory Burst* (RBs)

Aktivitas *respiratory burst* diukur berdasarkan adanya produksi *superoxide anion* (O²⁻). Produksi *superoxide anion* diukur menggunakan NBT (*nitroblue tetrazolium*). Campuran hemolim dan antikoagulan sebanyak 100 µL diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Campuran tersebut lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, pelet sel selanjutnya diwarnai dengan 100 µL NBT solution 0,3% dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah 2 jam, suspensi NBT disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang, ditambahkan 100 µL metanol absolut dan disentrifugasi kembali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Pelet sel yang terbentuk dicuci sebanyak 2 kali dengan metanol 70%, dikeringkan, ditambahkan sebanyak 120 µL KOH dan 140 µL *dimethyl sulfoxide* (DMSO) kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur *microplate* titer. Hasil pewarnaan diamati menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm dengan KOH atau DMSO sebagai larutan standar (blanko). *Respiratory burst* dinyatakan sebagai reduksi NBT per 10 µL hemolim

3.3.12 *Total Vibrio Count* (TVC) dan populasi *V. Parahaemolyticus* Rf^R

Penghitungan *Total vibrio count* (TVC) dan total *V. parahaemolyticus* Rf^R (Vp^R) dilakukan pada sampel usus. Permukaan tubuh udang didesinfeksi menggunakan etanol 95%, kemudian bilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali. Organ usus (bagian abdomen segmen keempat) dipotong-potong menggunakan gunting hingga hancur dan homogen. Selanjutnya usus ditimbang sebanyak 0,1 g dan dihomogenkan kembali dalam 0,9 mL larutan PBS, kemudian disebar pada media agar. Media agar *thiosulphate citrate bile-salt sucrose* (TCBS) untuk menghitung TVC, media TCBS yang telah ditambahkan

penanda rifampisin untuk menghitung V_p^R . Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C dan menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh setelah 24 jam.

3.3.13 Histopatologi Usus dan Hepatopankreas

Histopatologi usus dan hepatopankreas diamati setelah ujiantang. Jaringan usus dan hepatopankreas diambil kemudian difiksasi dengan larutan Davidson selama 24-72 jam. Selanjutnya jaringan dipotong dengan ukuran 1x1 cm dengan ketebalan 3-5 mm. Kemudian dilanjutkan dengan tahap dehidrasi, clearing, embedding, blocking paraffin, sectioning, staining. Pewarnaan menggunakan haematoxylin dan eosin (H&E). Selanjutnya diamati dengan mikroskop pada perbesaran 10x.

3.3.14 Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup (KH) dihitung 7 hari setelah ujiantang dengan rumus dalam Liu *et al.* (2019).

$$KH (\%) = \frac{N_t}{N_o} \times 100$$

Keterangan :

- KH = Kelangsungan hidup (%)
- No = Jumlah udang pada awal pemeliharaan (ekor)
- Nt = Jumlah udang pada akhir pemeliharaan (ekor)

3.3.15 Analisis Data

Semua data dinyatakan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi. Homogenitas dan normalitas data dievaluasi masing-masing menggunakan uji Levene dan Shapiro-Wilk. Perbandingan antar perlakuan ditentukan dengan one way ANOVA dilanjutkan dengan uji post hoc Duncan pada taraf signifikansi 0,05. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak statistik SPSS 24.0 dan tabulasi data menggunakan *Microsoft Excel*. Pengamatan histopatologi usus dan hepatopankreas dianalisis secara deskriptif

Hasil

3.4.1 Pertumbuhan dan Efisiensi Pakan

Kinerja pertumbuhan udang vaname yang diberi ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih melalui pakan selama 42 hari pemeliharaan dapat dilihat pada Tabel 11. Parameter performa pertumbuhan meliputi bobot akhir (Wt), laju pertumbuhan spesifik (LPS), dan rasio konversi pakan (RKP). Pemeliharaan dengan penambahan ekstrak fitobiotik (EL16, CZ64, AS64 dan C1) mampu meningkatkan nilai bobot akhir, laju pertumbuhan spesifik, dan juga rasio konversi pakan dibandingkan kontrol ($p < 0,05$).

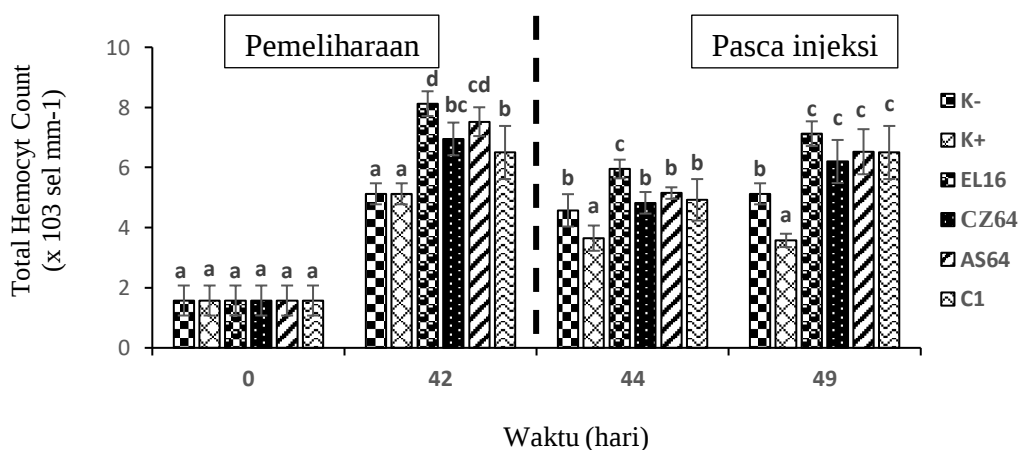
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel 11 Pertumbuhan udang vaname setelah 42 hari pemeliharaan yang diberi pakan penambahan ekstrak fitobiotik

Parameter	Treatment				
	Kontrol	EL16	CZ64	AS64	C1
Bobot awal (g)	2,5±0,22	2,5±0,22	2,5±0,22	2,5±0,22	2,5±0,22
Bobot akhir (g)	7,31±0,26	8,03±0,29	7,55±0,41	7,90±0,63	7,68±0,61
LPS (%/hari)	2,55 ± 0,09	2,78 ± 0,09	2,63± 0,13	2,73 ± 0,19	2,67 ± 0,19
RKP	1,63	1,22	1,47	1,23	1,33

3.4.2 Total Haemocyte Count

Nilai THC udang vaname pasca pemberian pakan dengan penambahan ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi serta pasca infeksi ditampilkan pada Gambar 4. Setelah 42 hari pemeliharaan dengan pemberian pakan mengandung ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasinya, THC udang vaname meningkat signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan kontrol. Selama pemeliharaan dan dua hari pasca infeksi, udang vaname pada perlakuan ekstrak pasak bumi (EL16) memiliki nilai THC tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain ekstrak fitobiotik lainnya.

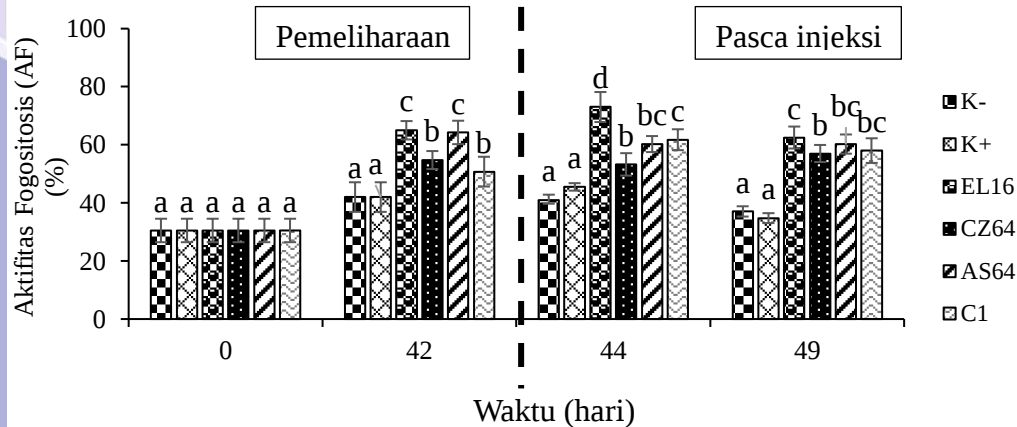


Keterangan : huruf yang berbeda di atas diagram batang menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$).

Gambar 4 Total haemocyte count udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

3.4.3 Aktivitas Fagositosis (AF)

Nilai aktivitas fagositosis (AF) pada udang yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak fitobiotik, baik setelah perlakuan pakan dan pasca uji tantang, lebih tinggi dan berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol, dengan perlakuan paling baik ditunjukkan oleh perlakuan ekstrak pasak bumi (Gambar 5).

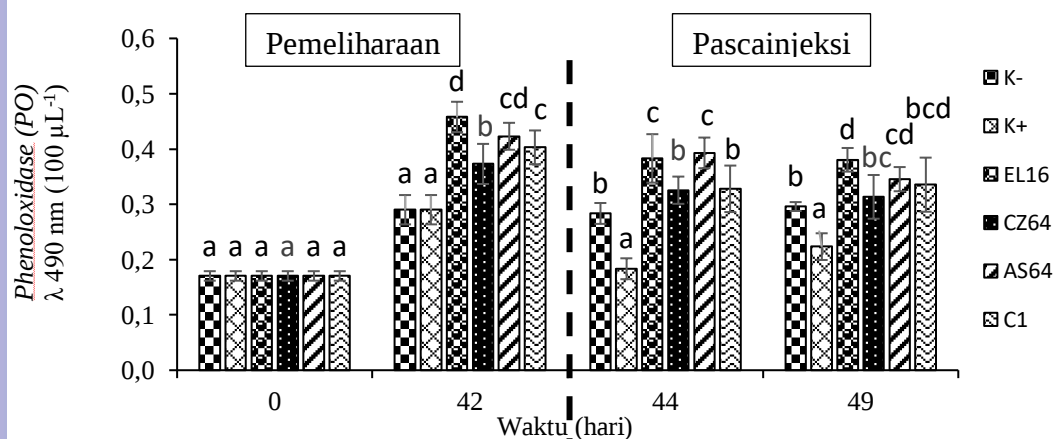


Keterangan : huruf yang berbeda di atas diagram batang menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$).

Gambar 5 Aktivitas Fagositosis udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

3.4.1 Aktivitas Phenoloxidase (PO)

Pemberian ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi pada pakan memberikan hasil aktivitas PO yang lebih tinggi dibandingkan kontrol setelah 42 hari pemeliharaan ($P < 0,05$). Aktivitas PO udang vaname pada perlakuan ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi pasca infeksi juga signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan KP dan KN. Setelah pemeliharaan dan pasca injeksi, udang vaname pada perlakuan ekstrak EL16 memiliki nilai AF tertinggi dibandingkan dengan perlakuan CZ64, AS64, dan C1.

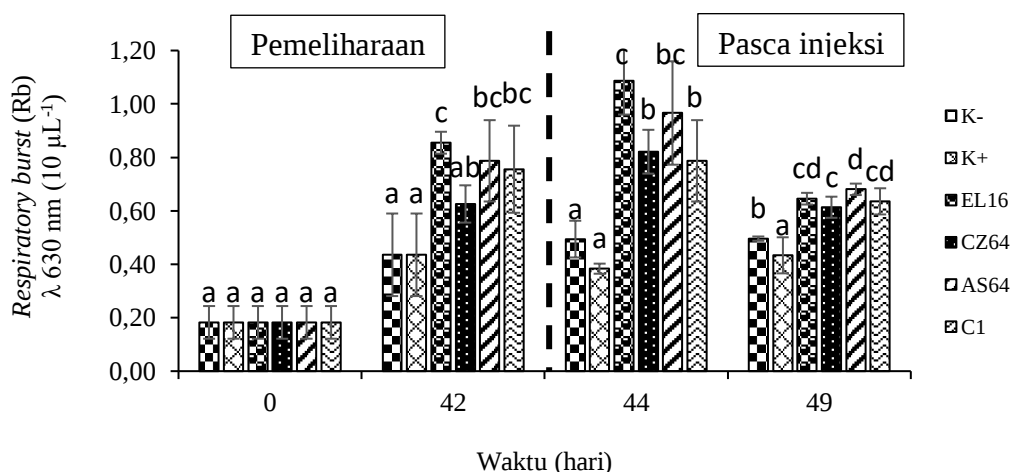


Keterangan : huruf yang berbeda di atas diagram batang menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$).

Gambar 6 Aktivitas phenoloxidase udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

3.4.2 Aktivitas Respiratory Burst (RBs)

Selaras dengan hasil RB, pemberian ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi memberikan aktivitas PO yang lebih tinggi dibandingkan kontrol setelah 42 hari pemeliharaan ($P<0,05$). Aktivitas RB udang vaname pada perlakuan ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi pasca injeksi juga signifikan lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan perlakuan KP dan KN. Selama pemeliharaan dan pasca injeksi, udang vaname pada perlakuan ekstrak EL16 memiliki nilai THC lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan CZ64, AS64, dan C1.



Keterangan : huruf yang berbeda di atas diagram batang menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p<0,05$).

Gambar 7 Respiratory burst udang vaname hari ke-0, dan 42 selama pemeliharaan serta hari ke-44, dan 49 pasca uji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

3.4.3 Total Vibrio Count (TVC) dan populasi *V. Parahaemolyticus* Rf^R

Pemberian ekstrak fitobiotik mampu untuk menurunkan total *Vibrio count* dan total *V. parahaemolyticus* Rf^R pada usus udang vaname (Tabel 12). Nilai *V. parahaemolyticus* Rf^R pada hari ke-44 dan 49 perlakuan ekstrak EL16, CZ64, AS64 dan C1 lebih rendah dan berbeda nyata ($p<0,05$) terhadap kontrol positif.

Tabel 12 Total *Vibrio Count* (TVC) dan total *V. parahaemolyticus* Rf^R (Vp^R) pada usus udang vaname yang diberi penambahan ekstrak fitobiotik.

Parameter (log 10 cfu/g)	Hari	Perlakuan					
		KN	KP	EL16	CZ64	AS64	C1
TVC	0	4,39±0,07 ^a	4,39±0,07 ^a	4,39±0,07 ^a	4,39±0,07 ^a	4,39±0,07 ^a	4,39±0,07 ^a
	42	6,43±0,42 ^a	6,43±0,42 ^a	6,84±0,47 ^a	6,68±0,11 ^a	6,34±0,08 ^a	6,69±0,22 ^a
	44	6,62±0,18 ^a	7,42±0,43 ^b	7,63±0,04 ^b	7,33±0,34 ^b	7,38±0,10 ^b	7,46±0,14 ^b
	49	6,26±0,12 ^a	6,44±0,45 ^a	5,99±0,26 ^a	6,38±0,44 ^a	6,13±0,25 ^a	6,45±0,12 ^a
Vp ^R	0	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	42	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	44	0,00±0,00 ^a	5,93±0,26 ^c	5,51±0,09 ^b	5,83±0,14 ^c	5,48±0,11 ^b	5,74±0,07 ^{bc}
	49	0,00±0,00 ^a	4,84±0,35 ^d	3,00±0,38 ^b	3,72±0,15 ^c	3,60±0,25 ^c	3,70±0,14 ^c

Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama (nilai rata-rata ± simpangan baku) menunjukkan perbedaan nyata ($p<0,05$).

3.4.4 Histologi Usus dan Hepatopankreas

Hasil gambaran histologi usus udang vaname setelah pemberian ekstrak fitobiotik dapat dilihat pada Tabel 13 dan Gambar 9. Usud pada perlakuan EL16 menunjukkan *villus height* (VH) dan *villus width* (VW) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). *Intestinal wall thickness* pada perlakuan AS64 lebih tinggi signifikan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan *villus width* (VW) tidak terdapat perbedaan antar perlakuan maupun dengan kontrol ($p > 0,05$) (Tabel 13).

Tabel 13 Pengaruh pemberian fitobiotik selama 42 hari pada histologi usus udang vaname

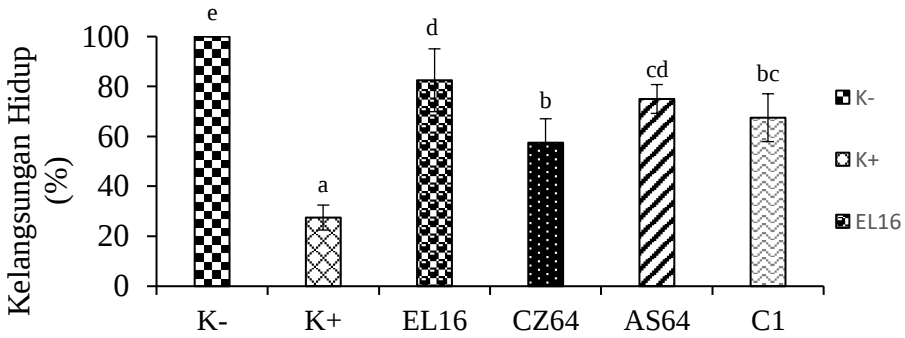
Perlakuan	<i>Villus height</i> (μm)	<i>Villus width</i> (μm)	<i>Intestinal wall thickness</i> (μm)
Kontrol	23,14 $\pm$ 2,83 ^a	19,03 $\pm$ 4,51 ^a	22,36 $\pm$ 0,59 ^a
EL16	65,56 $\pm$ 0,91 ^c	41,50 $\pm$ 0,86 ^c	31,84 $\pm$ 2,32 ^c
CZ64	40,92 $\pm$ 0,71 ^b	18,84 $\pm$ 5,52 ^a	27,62 $\pm$ 2,66 ^b
AS64	46,12 $\pm$ 4,25 ^b	36,72 $\pm$ 9,74 ^{bc}	36,57 $\pm$ 1,27 ^d
C1	39,37 $\pm$ 7,85 ^b	30,65 $\pm$ 1,95 ^b	27,98 $\pm$ 1,43 ^b

Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama (nilai rata-rata $\pm$ simpangan baku) menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$).

Hasil histologi usus setelah uji tantang, kontrol positif menunjukkan terjadinya kerusakan sel-sel epitel usus dan hilangnya lipatan-lipatan pada vili usus udang vaname serta terjadinya peluruhan dinding usus (Gambar 9). Sedangkan pada perlakuan ekstrak fitobiotik tunggal dan kombinasi, kerusakan pada sel epitel usus juga terjadi namun tidak terdapat peluruhan dinding usus (Gambar 9). Pemberian pakan perlakuan EL16 menunjukan hasil terbaik ditunjukkan dengan hanya sedikit terjadi kerusakan sel epitel dan terdapat lipatan vili usus yang masih utuh.

3.4.5 Kelangsungan Hidup

Nilai kelangsungan hidup (KH) udang vaname setelah diuji tantang dengan *V. parahaemolyticus* pada perlakuan EL16, CZ64, AS64, dan C1 lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan perlakuan kontrol positif (Gambar 8). Kelangsungan hidup tertinggi terdapat pada perlakuan EL16 sebesar 82,5% disusul AS64, C1 dan CZ64 masing-masing sebesar 75%, 67,5% dan 57,5%.

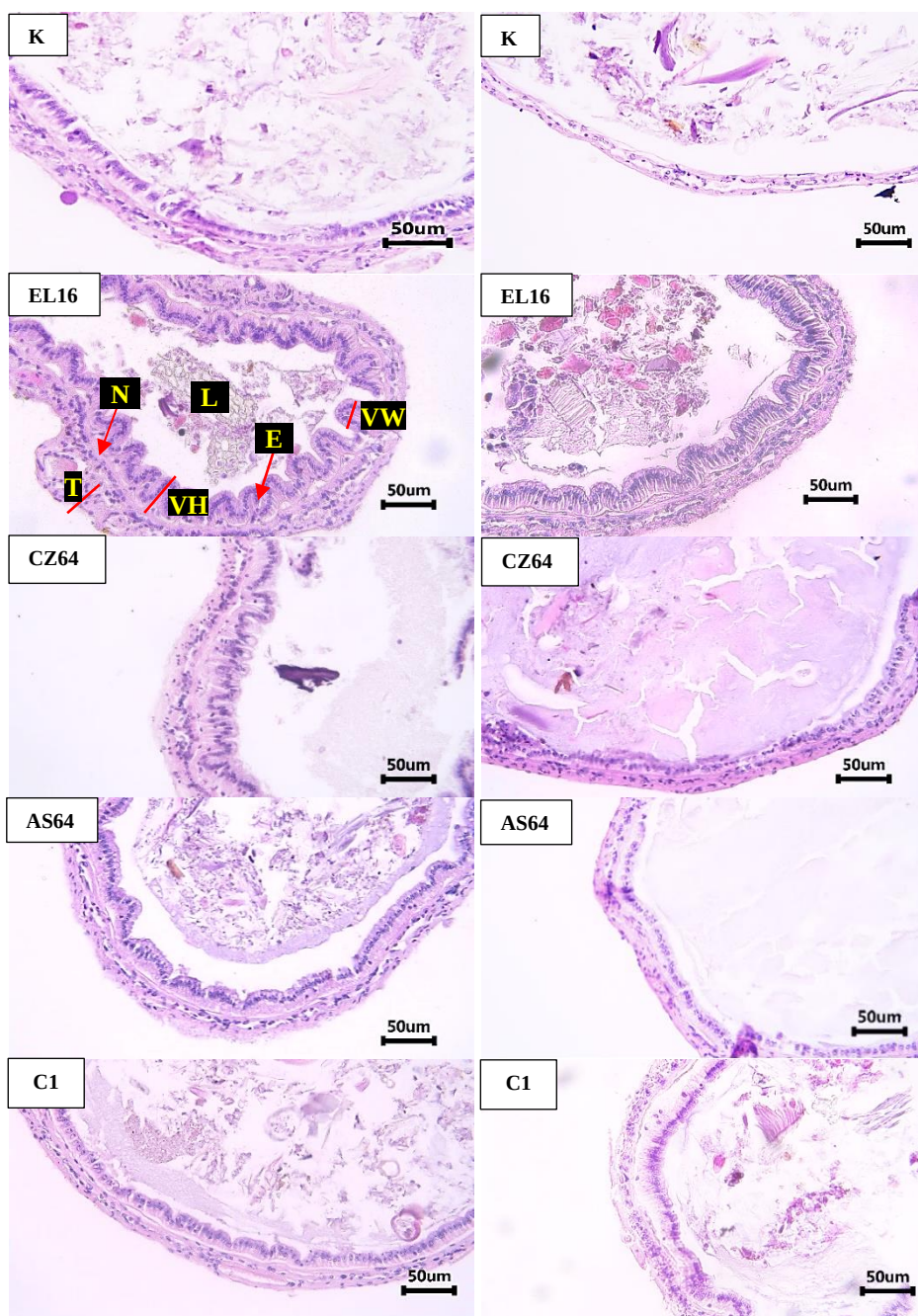


Gambar 8 Kelangsungan hidup (KH) udang vaname pasca uji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Pasca 42 hari pemeliharaan

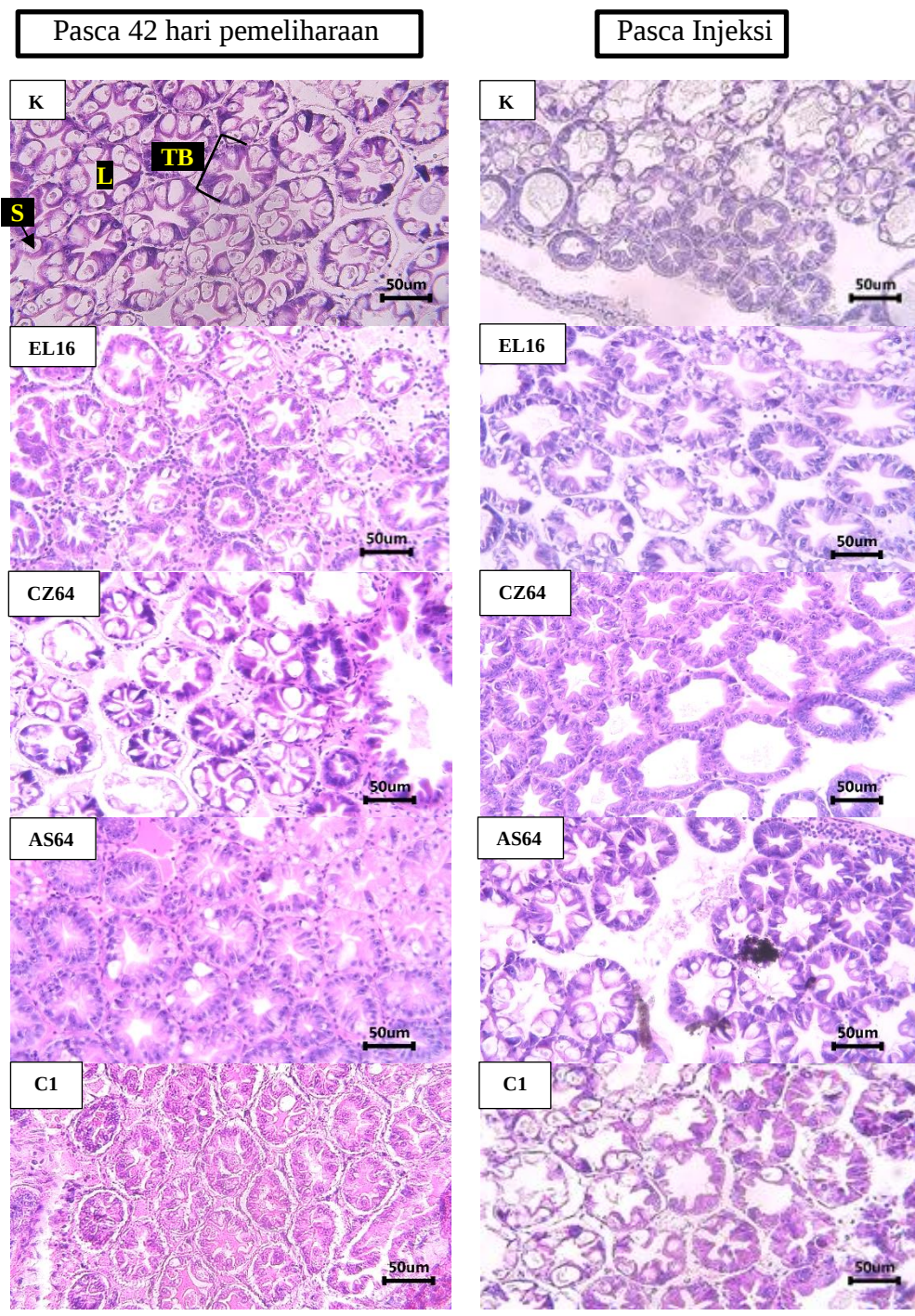
Pasca Injeksi



Gambar 9 Histopatologi usus hasil pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) udang vaname sebelum uji tantang (kiri), setelah uji tantang dengan *V. parahaemolyticus* (kanan)

Hasil histologi hepatopankreas setelah uji tantang (Gambar 10, bagian kanan), menunjukkan terjadinya kerusakan hepatopankreas udang yang ditunjukkan dengan pembesaran inti hepatopankreas, kolaps tubulus hepatopankreatik, kekurangan *Blassenzelen* (sel B), *fibrillenzen* (sel F), sel epitel *restzellen* (sel R) dan terjadi pengelupasan sel (Gambar 10). Perlakuan ekstrak pasak bumi EL16,

nunjukkan kemampuan dalam mencegah kerusakan hepatopankreas yang lebih ah dibandingkan dengan perlakuan kontrol.



Gambar 10 Histopatologi hepatopankreas hasil pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) udang vaname sebelum uji tantang (kiri), setelah uji tantang dengan *V. parahaemolyticus* (kanan)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

3.5 Pembahasan

Selain sebagai antibakteri dan immunostimulan bahan herbal juga diharapkan mampu meningkatkan pertumbuhan udang. Hasil penelitian yang didapat pada penelitian ini menunjukkan kemampuan masing-masing ekstrak fitobiotik dalam meningkatkan performa pertumbuhan udang vaname yang meliputi peningkatan nilai bobot akhir, dan laju pertumbuhan spesifik, serta menurunkan nilai rasio konversi pakan selama 42 hari pemeliharaan. Ekstrak *E. longifolia* menunjukan hasil performa pertumbuhan yang paling baik dibandingkan dengan ekstrak lainnya.

Tanaman obat mengandung senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai imunostimulan alami yang mampu mensimulasikan sistem kekebalan tubuh inang terhadap patogen (Bartender & Nen 2013). Meningkatkan imunitas dianggap sebagai strategi yang efektif untuk mengendalikan penyakit pada udang. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa herbal dapat meningkatkan kapasitas kekebalan tubuh dengan meningkatkan jumlah total hemosit, fagositosis, aktivitas antibakteri, aktivitas bakteriolitik, dan meningkatkan resistensi terhadap patogen (Chandran *et al.* 2016).

Udang vannamei, seperti krustasea lainnya, tidak memiliki sistem kekebalan spesifik. Sebagai gantinya, mereka bergantung pada mekanisme kekebalan bawaan yang melibatkan respons seluler dan humoral. Respons seluler dimediasi oleh hemosit, yaitu sel darah yang berperan dalam berbagai fungsi seperti fagositosis, enkapsulasi, dan sitotoksitas. Sedangkan respons humoral melibatkan kaskade pengaktif *prophenoloxidase* (*proPO*) dan protein terkait imun seperti lisozim dan peptida antimikroba. Hemosit memainkan peran penting dalam kedua respons ini dan merupakan kunci pertahanan tubuh udang vannamei. Udang memiliki tiga jenis sel hemosit, yaitu hialin, semi granular, dan granular. Ketiga jenis sel ini bekerja sama untuk menghancurkan partikel asing yang masuk ke dalam tubuh udang. Cara kerjanya meliputi fagositosis (menelan), enkapsulasi (membungkus), pembentukan nodul (pengumpulan), dan produksi komponen-komponen humoral yang disimpan dalam granula hemosit seperti protein antikoagulan, aglutinin, enzim *proPO*, peptida antimikroba, dan inhibitor protease (Li & Xiang *et al.* 2006).

Pemberian ekstrak fitobiotik ini mampu meningkatkan respons imun seperti THC, PO, dan RBs pada udang vaname sebelum dan setelah uji tantang. Ekstrak fitobiotik diyakini memiliki potensi sebagai imunostimulan yang dapat merangsang respons imun pada udang. Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa pemberian serbuk simplisia dan ekstrak fitobiotik dapat meningkatkan respons kekebalan dan ketahanan terhadap *V. parahaemolyticus* pada udang vaname (Munaeni *et al.* 2020b). Pemberian ekstrak pasak bumi pada pakan EL16 pada penelitian ini merupakan perlakuan terbaik yang mampu meningkatkan respons imun pada udang vaname. Hal ini terlihat dari tingginya nilai dari parameter THC, PO, dan RBs sebelum dan setelah uji tantang pada perlakuan EL16.

Usus merupakan tempat utama pencernaan nutrisi dan penyerapan, sehingga kesehatan usus sangat penting untuk pertumbuhan hewan normal. Bahan bioaktif yang kaya akan antioksidan, antibakteri dan antiinflamasi dalam pakan bermanfaat membantu meningkatkan integritas dan kekencangan mukosa usus, mencegah penetrasi zat berbahaya, mengurangi invasi mikroorganisme patogen, dan melindungi usus dari kerusakan (Neves *et al.* 2024). Mukosa usus, merupakan pembatas terbesar antara tubuh dan lingkungan luar, mudah terganggu oleh faktor-

tor seperti mikroorganisme patogen, faktor proinflamasi, dan antigen. Penghalang mekanis pada mukosa usus dapat mencegah kerusakan pada usus yang disebabkan oleh zat asing dan mengurangi permeabilitas mukosa usus, sehingga dapat menjaga kesehatan usus (Lian *et al.* 2024). Vilus usus merupakan indeks fisiologi yang mempengaruhi penyerapan nutrisi oleh usus. Vili yang panjang biasanya disamakan dengan efisiensi daya serap yang tinggi dan gambaran kesehatan pada saluran usus hewan (Valladao *et al.* 2017). Pemberian ekstrak fitobiotik pada penelitian ini juga mampu memberikan nilai rasio perimeter mikrovili yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 8 dan Tabel 13). Menurut Dimitroglou *et al.* (2011), nilai rasio perimeter yang tinggi dan peningkatan lipatan mukosa usus menunjukkan luas permukaan dari mikrovili usus. Penggunaan dosis dan jenis ekstrak fitobiotik yang berbeda pada penelitian ini juga mempengaruhi banyaknya lipatan mukosa usus udang vaname. Hal ini terlihat adanya perbedaan yang signifikan pada perlakuan EL16, CZ64 dan AS64 (Gambar 9). Kristiansen *et al.* (2011) menyatakan bahwa tinggi atau luas mikrovili usus mempengaruhi luas permukaan usus yang dapat meningkatkan jumlah serapan nutrisi sehingga mendukung pertumbuhan organisme budidaya. Dengan demikian, semakin banyak lipatan dan kerapatan mikrovili usus pada perlakuan ekstrak fitobiotik mampu meningkatkan luas permukaan dari penyerapan nutrisi dalam saluran pencernaan.

Ekstrak fitobiotik mampu menekan jumlah bakteri *V. parahaemolyticus* Rf^R di usus udang setelah uji tantangan. Tingginya TVC kontrol negatif hari ke-44 banding lurus dengan tingginya populasi *V. parahaemolyticus* Rf^R di usus udang setelah uji tantangan. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa simplisia dan ekstrak bawang dayak dapat mengurangi populasi *V. parahaemolyticus* pada usus, hepatopankreas, dan otot udang vaname setelah uji tantangan (Munaeni *et al.* 2020a). Martin *et al.* (2004) menjelaskan bahwa udang yang terpapar bakteri patogen *parahaemolyticus* dapat mengalami kerusakan pada membran epitel usus (gigit). Membran ini berfungsi sebagai penghalang masuknya patogen ke dalam tubuh udang dan dapat mengganggu fungsi osmoregulasi. Penurunan populasi *parahaemolyticus* Rf^R di usus udang akibat pemberian ekstrak fitobiotik diduga mampu mengurangi kerusakan pada membran usus udang vaname. Hal ini terlihat dari berkurangnya lisis dan peluruhan mikrovili di usus dibandingkan dengan kontrol positif. Usus udang yang terinfeksi *V. parahaemolyticus*, terutama pada kontrol positif mengalami kerusakan struktur usus sehingga terlihat tidak utuh. Kerusakan yang terjadi yaitu lumen tidak memiliki batasan yang jelas, sel-sel lepas dan mengalami nekrosis, serta tidak memiliki columnar epithelium (Gambar 9). Ekstrak fitobiotik yang ditambahkan dalam pakan dapat meningkatkan morfologi usus.

Raja *et al.* (2017) menjelaskan bahwa infeksi *V. parahaemolyticus* pada udang juga dapat menyebabkan kerusakan pada hepatopankreas. Kasus infeksi AHPND yang disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* menyerang usus udang dengan memproduksi racun biner seperti TOXA (12,7 kDa) dan TOXB (50,1 kDa) yang menyerupai biner racun insektisida dari spesies *Photobacterium*, serangga *Photobacterium insect related (Pir) toxin*; PirA dan PirB. Racun ini menyebabkan pengelupasan sel dan kerusakan pada hepatopankreas, yang akhirnya menyebabkan kegagalan organ dan kematian (Kumar *et al.* 2020; Sirikharin *et al.* 2015). Selain hepatopankreas, toksin AHPND juga ditemukan beracun bagi hemolimfa dan lambung

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

(Luangtrakul *et al.* 2021). Dalam penelitian ini, hepatopankreas udang yang tidak diberi ekstrak fitobiotik (kontrol) menunjukkan pembesaran inti hepatopankreas, kolaps tubulus hepatopankreatik, kekurangan *Blassenzellen* (sel B), *fibrillenzen* (sel F), sel epitel *restzellen* (sel R) dan terjadi pengelupasan sel (Gambar 10). Pemberian ekstrak fitobiotik diketahui mampu mengurangi kerusakan hepatopankreas setelah ujiantang. Terlihat dari hasil pengamatan setelah diujiantang dengan *V. parahaemolyticus*, tingkat kerusakan jaringan hepatopankreas udang vaname pada perlakuan fitobiotik yaitu EL16, CZ64, AS64, dan C1 menunjukkan kerusakan hepatopankreas yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif (Gambar 10). Temuan ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak fitobiotik berperan dalam melindungi udang terhadap kerusakan jaringan, yang mungkin berkaitan oleh adanya kandungan antioksidan yang dimiliki oleh masing-masing ekstrak fitobiotik.

Fitobiotik telah terbukti memainkan peran menguntungkan dengan mengurangi kepadatan *V. parahaemolyticus*, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, dan menjaga jaringan hepatopankreatik dari patogen, sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup udang dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif. Ekstrak pasak bumi (EL16) menunjukkan hasil yang paling efektif dalam melindungi udang dan meningkatkan peluang kelangsungan hidup udang yang diujiantang dengan *V. parahaemolyticus* dibandingkan dengan ekstrak kunyit putih (CZ64), bawang putih (AS64) maupun kombinasinya (C1).

3.6 Simpulan

Perlakuan ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) merupakan perlakuan terbaik yang mampu meningkatkan respons imun, kelangsungan hidup, dan performa pertumbuhan udang vaname yang diujiantang *V. parahaemolyticus*.

IV EVALUASI EFEKTIVITAS FITOBIOTIK PASAK BUMI DAN PENGARUHNYA TERHADAP KERAGAMAN MIKROBIOTA USUS UDANG VANAME DI TAMBAK

4.1 Abstrak

Penggunaan ekstrak pasak bumi dalam pakan terbukti mampu meningkatkan respons imun dan kelangsungan hidup udang vaname yang terinfeksi alami *V. parahaemolyticus*. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengevaluasi efektivitas penambahan ekstrak pasak bumi ke dalam pakan dan pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang untuk pengendalian penyakit dan peningkatan produksi udang di tambak. Perlakuan penambahan fitobiotik dalam pakan meliputi ekstrak fitobiotik *E. longifolia* sebanyak 1,6% (EL16) dalam pakan dibandingkan dengan kontrol. Udang uji berukuran awal $3,30 \pm 0,20$ g diberi pakan perlakuan secara *ad satiation* sebanyak empat kali sehari selama 56 hari masa pemeliharaan. Parameter yang diamati meliputi kinerja pertumbuhan dan efisiensi pakan pengamatan gejala klinis yang muncul saat *outbreak* penyakit terjadi serta analisis keragaman mikrobiota usus udang menggunakan *next generation sequencing*. Penambahan ekstrak pasak bumi (EL16) mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang hingga 95% pada saat *outbreak* penyakit. Selain itu, EL16 mampu

meningkatkan biomassa panen dan menurunkan nilai rasio konversi pakan (RKP) andingkan perlakuan kontrol. Ekstrak pasak bumi juga mampu memodulasi nposisi mikrobiota usus udang sekaligus menghambat kelimpahan bakteri ogen khususnya *Vibrio* sp. pada usus udang. Simpulan dari penelitian ini yaitu trak fitobiotik pasak bumi dengan dosis 16 g kg⁻¹ pakan mampu menjaga bilitas mikrobiota usus, memproteksi udang dari *outbreak* penyakit AHPND dan ningkatkan produksi.

ata kunci : *acute hepatopancreatic necrosis disease*, fitobiotik, mikrobiota usus, *next generation sequencing*, tambak udang

Abstract

The use of tongkat ali (Eurycoma longifolia) extract in feed has proven effective in enhancing the immune response and survival rate of vannamei shrimp naturally infected with Vibrio parahaemolyticus. The objective of this study is to evaluate the effectiveness of adding tongkat ali extract to feed and its effect on the diversity of shrimp gut microbiota for disease control and increasing shrimp production in ponds. The treatment involved adding 1.6% (EL16) tongkat ali extract to the feed, compared to a control. Test shrimp, initially weighing 3.30 ± 0 g, were fed the experimental diets ad libitum four times daily for a 56-day growing period. Parameters observed included growth performance, feed efficiency, clinical symptoms during disease outbreaks, and gut microbiota diversity analysis using next-generation sequencing. The addition of tongkat ali extract (EL16) increased shrimp survival rates to 95% during disease outbreaks. Moreover, EL16 improved harvest biomass and reduced the feed conversion ratio (FCR) compared to the control. The tongkat ali extract also modulated the gut microbiota composition, reducing the abundance of pathogenic bacteria, particularly Vibrio sp., in the shrimp gut. The conclusion of this study is that the phytobiotic tongkat ali extract at a dosage of 16 g kg⁻¹ feed can maintain gut microbiota stability, protect shrimp from AHPND outbreaks, and enhance production.

Keywords: *acute hepatopancreatic necrosis disease*, phytobiotic, *P. vannamei*, shrimp pond, white feces disease,,

Pendahuluan

4.2.1 Latar Belakang

Udang vaname (*Penaeus vannamei*) merupakan salah satu spesies krustasea yang paling banyak dibudidayakan dengan nilai ekonomi tinggi dalam akuakultur global (FAO 2022). Peningkatan produksi udang telah mendorong perkembangan pesat sistem budidaya dengan teknologi intensif, yang ditandai dengan padat tebar tinggi. Sistem ini dapat meningkatkan risiko serangan berbagai penyakit jika terjadi ketidakseimbangan antara lingkungan, patogen, dan organisme yang dibudidayakan. Penyakit selalu menjadi faktor penting yang menghambat perkembangan budidaya udang. Berdasarkan hasil survei *Global Aquaculture Alliance* (GAA), masalah utama dalam budidaya udang global adalah penyakit (Anderson *et al.* 2018; 2019).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Kematian udang akibat wabah penyakit dapat secara signifikan mengurangi produktivitas budidaya karena menurunkan kelangsungan hidup hingga sekitar 60% (Lee *et al.* 2015; Huang *et al.* 2016). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mikrobiota usus memainkan peran penting dalam proses fisiologis pada inang, seperti akuisisi nutrisi, aktivasi sistem kekebalan tubuh, dan pertahanan awal terhadap infeksi (Zhu *et al.* 2016; Fan & Li 2019). Mikrobiota usus terdiri dari berbagai bakteri komensal yang memberikan perlindungan alami terhadap kolonisasi patogen dan merangsang respons kekebalan inang, terutama selama invasi patogen (Stecher & Hardt 2011). Ketidakseimbangan mikrobiota usus (dysbiosis) dapat membuat inang lebih rentan terhadap patogen. Dysbiosis mikrobiota usus dapat mengganggu stabilitas fungsi normal dan memperburuk penyakit (Rungrasamee *et al.* 2016).

Di antara penyakit yang terdaftar pada Organisasi Kesehatan Hewan Dunia (*World Organization for Animal Health*, WOA), *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) adalah salah satu ancaman terbesar bagi budidaya udang di Asia dan Amerika Latin (Tang *et al.* 2020). Agen patogenik utama AHPND adalah strain unik dari *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), bakteri Gram-negatif yang umumnya ditemukan di habitat akuatik (Santos *et al.* 2020). Strain Vp penyebab AHPND mengandung plasmid yang mengkode gen toksin *PirAVp* dan *PirBVp*, sementara plasmid ini tidak ditemukan pada strain Vp non-penyakit AHPND (Yang *et al.* 2014). Strain Vp penyebab AHPND awalnya mengkolonisasi lambung udang dan melepaskan toksin biner dari lambung ke hepatopankreas, menginduksi lepasnya sel epitel tubulus yang diikuti oleh kematian udang (Lai *et al.* 2015; Prachumwat *et al.* 2019). Selain itu, toksin *PirABVp* dapat memodulasi virulensi spesies *Vibrio* non-penyakit AHPND dan memperburuk vibriosis (Tran *et al.* 2020).

Penelitian sebelumnya mengemukakan bahwa penggunaan ekstrak pasak bumi dalam pakan dapat meningkatkan respons imun dan kelangsungan hidup udang vaname yang diuji tantang dengan *V. parahaemolyticus*. Oleh karena itu, perlu diteliti efektivitas fitobiotik ekstrak pasak bumi dan pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang vaname di tambak.

4.2.2 Rumusan Masalah

Penyakit tetap menjadi penghambat utama dalam pengembangan budidaya udang, sering kali terjadi akibat ketidakseimbangan antara lingkungan, patogen, dan organisme yang dibudidayakan. Ketidakseimbangan ini dapat menyebabkan gangguan pada mikrobiota usus, yang berperan penting dalam proses fisiologis inang, seperti akuisisi nutrisi, aktivasi sistem kekebalan tubuh, dan pertahanan awal terhadap infeksi. Ketika keseimbangan mikrobiota usus terganggu, udang menjadi lebih rentan terhadap serangan patogen seperti *V. parahaemolyticus*. Penggunaan antibiotik untuk mengatasi masalah ini membawa risiko resistensi patogen dan dampak negatif terhadap kesehatan manusia serta lingkungan. Sebagai solusi, ekstrak pasak bumi telah terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus*, meningkatkan respons imun, dan meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname. Oleh karena itu, penelitian ini akan mengevaluasi efektivitas fitobiotik ekstrak pasak bumi serta pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang vaname di tambak,

sebagai langkah untuk mengembangkan metode pengendalian penyakit yang lebih aman dan berkelanjutan.

4.2.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efektivitas penambahan ekstrak pasak bumi ke dalam pakan dan pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota usus udang untuk pengendalian penyakit dan peningkatan produksi udang di tambak.

Metode

4.3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2023 sampai Februari 2024 bertempat di Tambak Budidaya Udang Pinang Gading, Bakauheni, Lampung.

4.3.2 Rancangan Penelitian dan Persiapan Pakan Uji

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari dua perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak lima kali. Perlakuan yang diberikan seperti pada Tabel 14. Fitobiotik yang digunakan berdasarkan hasil terbaik dari tahap dua yaitu perlakuan ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16).

Tabel 14 Rancangan penelitian pemeliharaan udang vaname dengan pemberian pakan yang diperkaya ekstrak fitobiotik pasak bumi

Kode	Keterangan
K	Pemeliharaan udang dengan pemberian pakan kontrol
EL16	Pemeliharaan udang dengan pemberian pakan yang diperkaya ekstrak pasak bumi 1,6%

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan udang komersial dengan kadar protein 41%, serat kasar 3%, lemak 7%, kadar air 12%, dan kadar abu 13%. Pakan perlakuan dipersiapkan dengan mencampurkan ekstrak fitobiotik *E. longifolia* pada pakan (*coating*) secara manual dengan menggunakan binder putih telur sebanyak 2% (v/v) dan air sebagai pelarut sebanyak 6% (v/b).

4.3.3 Pemeliharaan Udang

Udang PL 12 dipelihara terlebih dahulu selama 40 hari pemeliharaan pada waring dengan ukuran hingga mencapai bobot rata-rata $3,30 \pm 0,20$ g. Selanjutnya, sebanyak 200 ekor m^{-3} dipindahkan ke dalam masing-masing waring hapa dengan ukuran $100 \times 100 \times 150$ cm. Pakan uji diberikan sebanyak empat kali sehari yaitu pada pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB dengan *feeding level* awal 7% yang kemudian disesuaikan secara bertahap berdasarkan hasil sampling setiap 14 hari sekali. Pemeliharaan udang vaname dilaksanakan selama 56 hari. Parameter kualitas air terdiri dari parameter harian dan parameter mingguan yang diamati setiap 14 hari sekali selama 56 hari. Parameter harian terdiri dari suhu, salinitas, pH dan DO, sedangkan parameter mingguan terdiri

dari total organik matter (TOM), alkalinitas, total amonia nitrogen (TAN), amonia, nitrit, nitrat, dan fosfat. Hasil pengukuran kualitas air selama masa pemeliharaan disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15 Kualitas air selama pemeliharaan di tambak.

Parameter kualitas air	Hasil	Standar*
Suhu (°C)	26 – 31	Minimum 27
Salinitas (g L ⁻¹)	40	10 – 32
pH (mg L ⁻¹)	6,77 – 8,31	7,5 – 8,5
TOM (mg L ⁻¹)	46 – 93	Maksimum 90
Alkalinitas (mg L ⁻¹)	175 – 225	100 – 150
Total Ammonia Nitrogen (mg L ⁻¹)	0,24 – 0,76	
Amonia (NH ₃) (mg L ⁻¹)	0,01 – 0,05	Maksimum 0,1
Nitrit (NO ₂) (mg L ⁻¹)	0,17 – 0,73	Maksimum 1
Nitrat (NO ₃) (mg L ⁻¹)	1,58 – 2,85	

*Ket: SNI 8008:2014

4.3.4 Performa Pertumbuhan

Udang ditimbang pada awal dan akhir pemeliharaan untuk mendapatkan biomassa udang. Pakan yang diberikan ditimbang dan dicatat selama pemeliharaan 56 hari untuk menghitung jumlah konsumsi pakan. Parameter kinerja pertumbuhan dan efisiensi pakan yang diukur yaitu Wo, Wt, JKP, LPS, RKP dan KH. Pertumbuhan dan efisiensi pakan dihitung dengan rumus :

- Laju pertumbuhan spesifik (LPS) dihitung mengacu pada Lugert *et al.* (2014):

$$LPS (\% \text{ hari}^{-1}) = \frac{\ln(Wt) - \ln(Wo)}{t} \times 100$$

Keterangan:

- LPS = Laju pertumbuhan spesifik (% hari⁻¹)
- t = Periode pengamatan (hari)
- Wt = Bobot rata-rata udang pada akhir pemeliharaan (g)
- Wo = Bobot rata-rata udang pada awal pemeliharaan (g)

- Rasio konversi pakan (RKP) dihitung mengacu kepada Watanabe (1988):

$$RKP = \frac{JKP}{Wt - Wo + Wd}$$

Keterangan:

- RKP = Rasio konversi pakan
- Wt = Biomassa udang hidup pada akhir pemeliharaan (g)
- Wo = Biomassa udang pada awal pemeliharaan (g)
- Wd = Biomassa udang mati selama pemeliharaan (g)
- JKP = Jumlah konsumsi pakan selama pemeliharaan (g)

4.3.5 Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya infeksi vibriosis yang terjadi selama pemeliharaan. Pengamatan gejala klinis yang

diamati meliputi, perubahan tingkah laku, pola makan udang, mortalitas udang selama pemeliharaan, patologi dan makroskopis organ luar udang.

4.3.6 Total Bacterial Count (TVC) dan Populasi Total Vibrio Count (TVC)

Penghitungan *total bacterial count* (TBC) dan *total vibrio count* (TVC) pada usus udang dijelaskan secara rinci pada sub 3.3.11. Media agar *thiosulphate citrate bile-salt sucrose* (TCBS) digunakan untuk menghitung TVC, dan media *sea water complete* (SWC) untuk menghitung TBC. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung setelah 24 jam.

4.3.7 Konfirmasi *V. parahaemolyticus* pada Udang Mati

Udang yang mati saat pemeliharaan dikonfirmasi menggunakan analisis *polymerase chain reaction* (PCR). Primer spesifik yang digunakan untuk konfirmasi *V. parahaemolyticus* penyebab AHPND yaitu primer nested PCR AP4. Langkah pertama menggunakan AP4F1 (5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3') dan AP4R1 (5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3') dengan target ampikon 1,269 bp. Langkah kedua menggunakan primer AP4F2 (5'-TGA-GAA-TAC-GGG-ACG-TGG-G-3') dan AP4R2 (5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3') dengan target ampikon 230 bp (Dangtip *et al.* 2015).

4.3.8 Histopatologi Usus dan Hepatopankreas

Histopatologi usus dan hepatopankreas diamati pada saat *outbreak* penyakit. Jaringan usus dan hepatopankreas diambil kemudian difiksasi dengan larutan Davidson selama 24-72 jam. Selanjutnya jaringan dipotong dengan ukuran 1x1 cm dengan ketebalan 3-5 mm. Kemudian dilanjutkan dengan tahap *dehydration, clearing, embedding, blocking paraffin, sectioning, staining*. Pewarnaan dilakukan menggunakan *haematoxylin* dan *eosin* (H&E). Selanjutnya diamati dengan mikroskop pada perbesaran 10x.

4.3.9 Pola kematian dan Kelangsungan Hidup Udang Vaname

Pola kematian merupakan catatan dan akumulasi kematian harian yang terjadi selama pemeliharaan, sedangkan nilai kelangsungan hidup (KH) udang vaname dihitung pada akhir pemeliharaan dengan menggunakan rumus Liu *et al.* (2019):

$$KH (\%) = \frac{N_t}{N_o} \times 100$$

Keterangan :

- KH = Kelangsungan hidup (%)
- No = Jumlah udang pada awal pemeliharaan (ekor)
- Nt = Jumlah udang pada akhir pemeliharaan (ekor)

4.3.10 Keragaman Mikrobiota di Saluran Pencernaan Udang Vaname

Pengujian keragaman mikrobiota di saluran pencernaan udang vaname dilakukan pada akhir pemeliharaan dengan menggunakan teknik NGS (*New Generation Sequencing*). Usus udang dibedah dan diambil secara aseptik. Sampel usus secara terpisah dimasukkan ke dalam microtube 2 mL dan diberi

DNA *Shield* untuk pengawetan DNA. Sampel disimpan pada *freezer* dengan suhu -80°C untuk kemudian proses ekstraksi DNA. Preparasi sampel dilakukan secara *on ice* menggunakan *dry ice* untuk menjaga suhu tetap dingin yang kemudian disimpan dalam *deep freezer* pada suhu -80°C . Selanjutnya adalah ekstraksi DNA sampel menggunakan metode CTAB. Konsentrasi DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer NanoDrop dan fluorometer Qubit. Persiapan *library* dilakukan menggunakan Kit dari *Oxford Nanopore Technology*. Amplifikasi PCR *full length* gen 16S rRNA pada daerah V1-V9 dilakukan dengan menggunakan primer 27F-1492R (5' AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' dan 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Nanopore sequencing dioperasikan oleh perangkat lunak MinKNOW versi 23.04.5. *Base calling* dilakukan menggunakan Guppy versi 6.5.7 dengan *high-accuracy model* (Wick *et al.* 2019). Kualitas file FASTQ divisualisasikan menggunakan NanoPlot, dan penyaringan kualitas dilakukan menggunakan NanoFilt (de Coster *et al.* 2018; Nygaard *et al.* 2020). Bacaan diklasifikasikan menggunakan *Centrifuge classifier* (Kim *et al.* 2016). Indeks Bakteri dan Arkea dibangun menggunakan database NCBI 16S RefSeq. Alur sequencing dan analisis bioinformatik dapat dilihat pada Lampiran 5 dan 6.

4.3.11 Analisis Data

Data yang diperoleh ditampilkan dalam rata-rata $\pm$ standar deviasi. Analisis statistik dilakukan dengan *one way* ANOVA untuk melihat perbedaan antar perlakuan. Analisis statistik dilakukan dengan software SPSS 24.0 dan tabulasi data menggunakan *Microsoft excel*. Analisis dan visualisasi keragaman mikrobiota saluran usus dilakukan menggunakan Pavian, dan RStudio menggunakan R versi 4.2.3.

4.4 Hasil

4.4.1 Performa Pertumbuhan

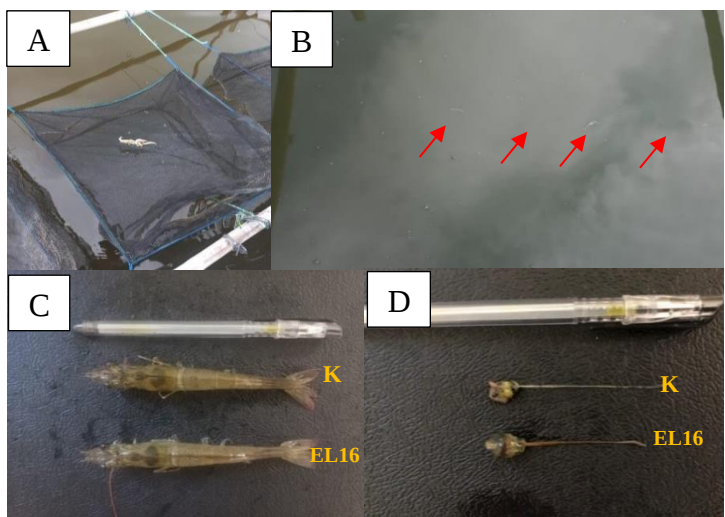
Hasil pengamatan pertumbuhan udang vaname selama 56 hari dapat dilihat pada (Tabel 16). Perlakuan pakan dengan penambahan ekstrak pasak bumi (EL16) mampu meningkatkan biomassa panen dan menurunkan nilai rasio konversi pakan (RKP) dibandingkan perlakuan kontrol Tabel 16.

Tabel 16 Pertumbuhan udang vaname di tambak setelah 56 hari pemeliharaan.

Parameter	Treatment	
	Kontrol	EL16
Bobot awal (g)	$3,3 \pm 0,18$	$3,3 \pm 0,18$
Bobot akhir (g)	$23,73 \pm 1,04^*$	$18,36 \pm 0,03$
Jumlah konsumsi pakan/JKP (g)	$3978,67 \pm 86,94$	$4032,33 \pm 98,51^*$
Laju pertumbuhan spesifik/LPS (%/hari)	$3,52 \pm 0,08^*$	$3,06 \pm 0,00$
Kelangsungan hidup/KH (%)	$17,17 \pm 2,57$	$95,33 \pm 2,57^*$
Biomassa akhir (g)	$811,39 \pm 87,08$	$3500,72 \pm 98,52^*$
Rasio konversi pakan (RKP)	$1,40 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,02^*$

4.4.2 Gejala Klinis Udang di Tambak

Gejala klinis udang saat terjadi *outbreak* penyakit ditandai dengan adanya kematian udang pada wadah pemeliharaan (Gambar 11 A). Terlihat juga adanya kotoran putih yang mengambang pada permukaan air pemeliharaan (Gambar 11 B). Selain itu, pengamatan kondisi udang terlihat bahwa udang sakit menunjukkan kondisi warna yang lebih pucat, karapas yang lunak dan kondisi usus yang terlihat kosong (Gambar 11 C dan D).



Ket : tanda panah berwarna merah menunjukkan kotoran putih

Gambar 11 Gejala klinis yang teramati selama pemeliharaan udang vaname di tambak. (A) Kematian udang di luar hapa; (B) adanya kotoran berwarna putih pada air pemeliharaan; (D) pengamatan makroskopis udang; dan (E) kondisi usus udang.

4.4.3 Total Bacterial Count (TBC) dan Total Vibrio Count (TVC)

Hasil pengamatan total bakteri pada air dan usus udang ditampilkan pada Tabel 17. Nilai total bakteri pada usus udang kontrol adalah $\log 7,99 \pm 0,39$, lebih tinggi dibandingkan pada usus udang EL16 yaitu $\log 6,51 \pm 0,54$. Begitupula, total *Vibrio* pada sampel usus udang kontrol yaitu $\log 7,16 \pm 0,16$ lebih tinggi dibandingkan dengan total *Vibrio* pada usus udang EL16 yaitu $\log 6,31 \pm 0,18$.

Tabel 17 Total bakteri dan total *Vibrio* di usus udang vaname pada saat *outbreak* penyakit.

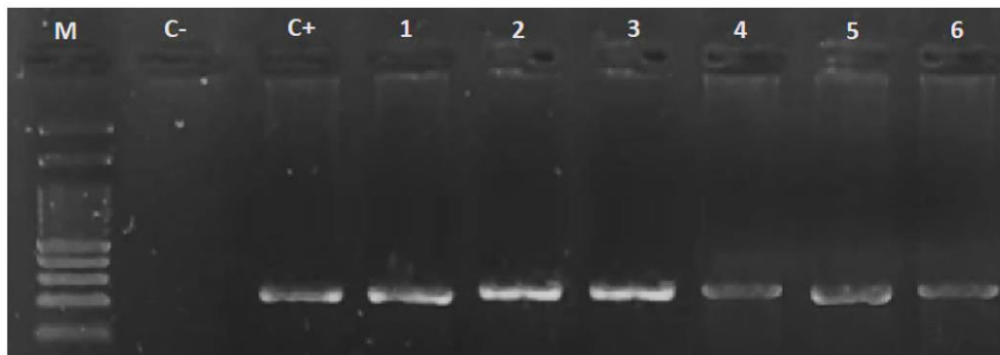
Perlakuan	TBC Usus ($\log 10 \text{ CFU g}^{-1}$)	TVC Usus ($\log 10 \text{ CFU g}^{-1}$)
K	$7,99 \pm 0,39$	$7,16 \pm 0,16$
EL16	$6,51 \pm 0,54$	$6,31 \pm 0,18$

Keterangan : TBC=total bacterial count; TVC = Total Vibrio Count.

4.4.4 Konfirmasi *V. parahaemolyticus* pada Udang Mati

Hasil analisis PCR disajikan pada Gambar 12. Hasil analisis menunjukkan bahwa tambak budidaya pada saat penelitian berlangsung positif terinfeksi penyakit yang disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* dengan terbentuknya pita DNA yang teramplifikasi pada ukuran 230 bp.

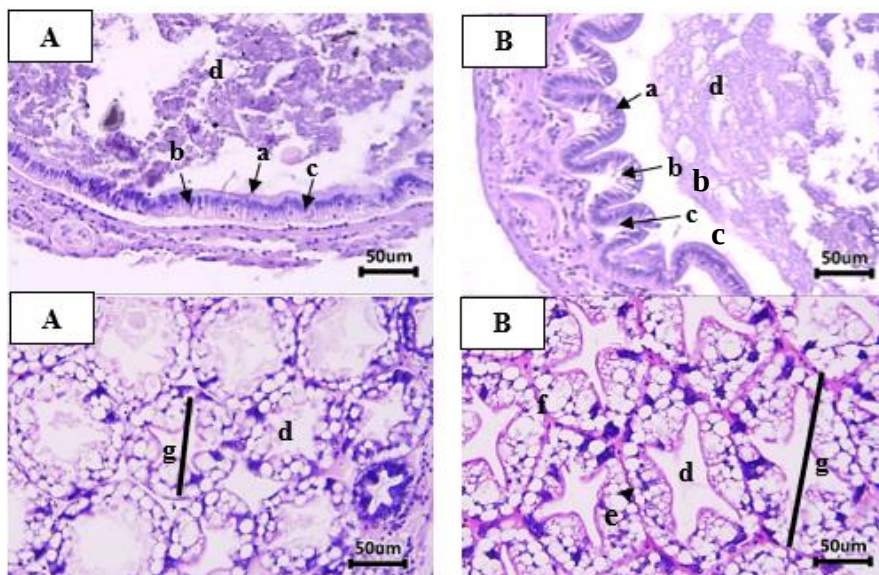
Hak Cipta Dilindungi! Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 12 Hasil konfirmasi *V. parahaemolyticus* dengan primer AP4 menggunakan analisis PCR. Keterangan: M=Marker; C-=Kontrol negatif; C+ = kontrol positif; 1, 2, 3 = sampel udang perlakuan kontrol; dan 4, 5, 6 = sampel udang perlakuan ekstrak pasak bumi.

4.4.5 Histologi usus dan hepatopankreas udang

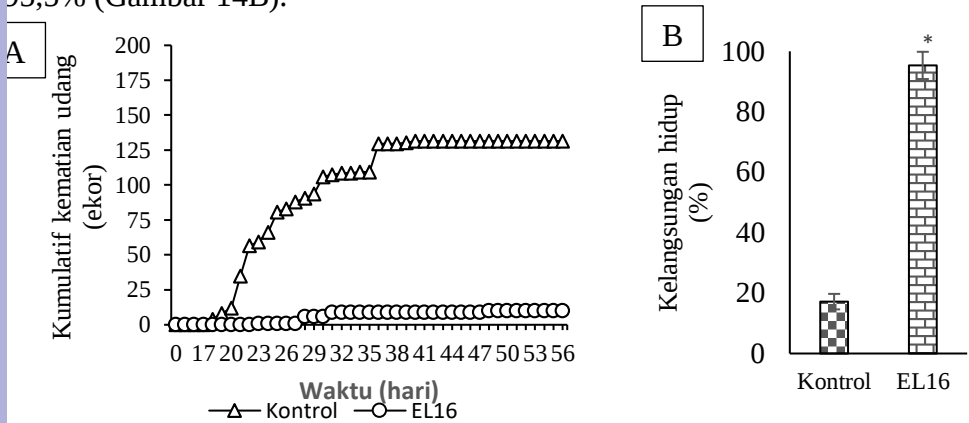
Hasil histopatologi usus udang pada saat terjadi *outbreak* penyakit ditampilkan pada Gambar 13. Berdasarkan hasil histopatologi terlihat bahwa morfologi usus udang kontrol (Gambar 13A) mengalami kerusakan dan penipisan lapisan dinding usus serta berkurangnya lipatan-lipatan vili yang terbentuk. Udang yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak pasak bumi menunjukkan morfologi usus yang baik dan lapisan dinding usus yang tebal (Gambar 13B). Berdasarkan hasil histopatologi hepatopankreas (Gambar 13 C dan D) terlihat bahwa sel-sel tubular pada hepatopankreas udang kontrol terjadi kerusakan atau peluruhan dibandingkan dengan perlakuan ekstrak fitobiotik (EL16).



Gambar 13 Histopatologi usus dari *P. vannamei* yang secara alami terinfeksi penyakit. Keterangan: (A) usus udang kontrol, (B) usus udang yang diberi pakan ekstrak fitobiotik (EL16), (C) hepatopankreas udang kontrol, (D) hepatopankreas udang yang diberi pakan ekstrak fitobiotik (EL16), (a) brush border, (b) epithelium, (c) nukleus, (d) lumen, (e) F-sel, (f) B-sel. dan (g) tubulus.

4.4.6 Pola Kematian dan Kelangsungan Hidup Udang Vaname.

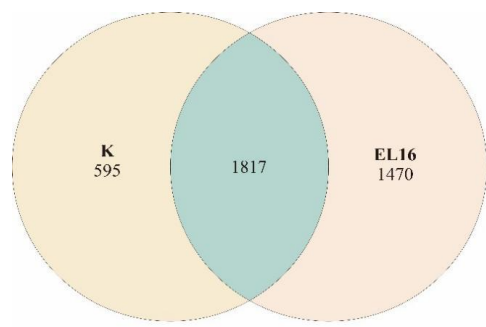
Kematian udang pertama kali terlihat pada hari ke-17 masa pemeliharaan pada perlakuan kontrol (Gambar 14A). Kematian disebabkan terjadinya *outbreak* penyakit. Kematian udang pada perlakuan kontrol terus terjadi hingga hari ke-40. Kelangsungan hidup pada akhir pemeliharaan menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol hanya sebesar 17,17% sedangkan pada perlakuan ekstrak pasak bumi mampu menjaga kelangsungan hidup udang selama *outbreak*, hal ini ditunjukkan dengan nilai kelangsungan hidup udang yang tinggi mencapai 95,5% (Gambar 14B).



Gambar 14 Pola kematian dan kelangsungan hidup udang vaname yang dipelihara selama 56 hari. Pola kematian udang vaname yang terjadi selama pemeliharaan (A), dan kelangsungan hidup udang vaname di akhir pemeliharaan (B). Tanda bintang menunjukkan hasil yang berbeda nyata antar perlakuan.

4.4.7 Keragaman Mikrobiota di Lingkungan dan Saluran Pencernaan Udang Vaname

Grafik Venn menunjukkan jumlah *Operational Taxonomy Unit* (OTU) bersama dan OTU unik dalam masing-masing kelompok yang berbeda (Gambar 15). Sampel usus udang yang dipelihara dengan penambahan ekstrak EL16 pada pakan menunjukkan nilai OTU unik yang lebih tinggi yaitu 1470 dibandingkan dengan udang yang dipelihara dengan pakan tanpa penambahan fitobiotik yaitu 595, dengan OTU bersama yaitu sebesar 1817.



Gambar 15 Diagram Venn keanekaragaman bakteri tingkat OTU. (K) sampel usus udang kontrol, dan (EL16) sampel usus udang yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak pasak bumi.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

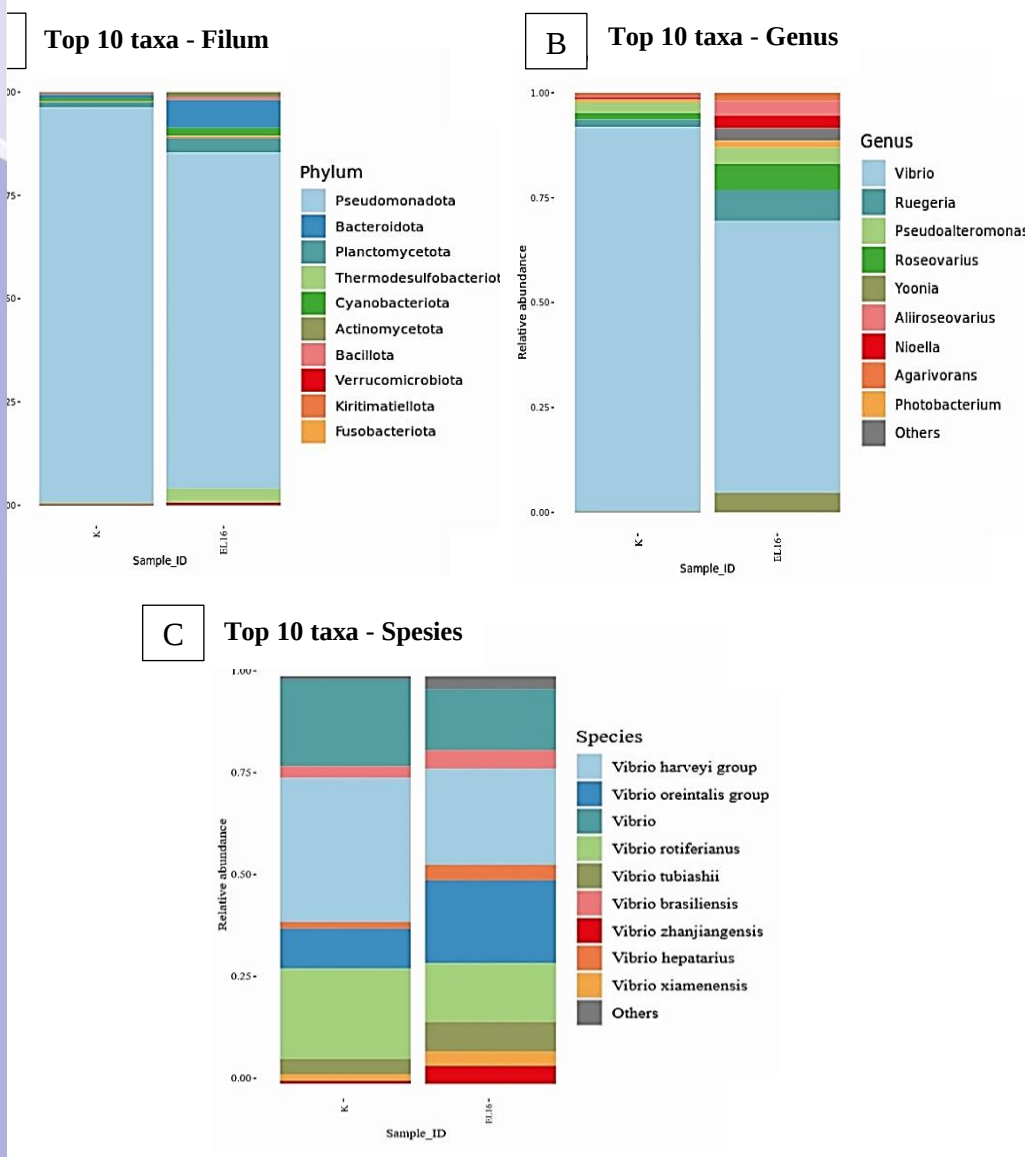
Keragaman alfa diterapkan pada analisis keragaman komunitas mikroba dalam sampel (Li *et al.* 2013), dengan menganalisis keragaman sampel tunggal yang dapat mencerminkan kekayaan dan keragaman komunitas mikroba pada setiap sampel. Keragaman Alfa digunakan untuk menganalisis keragaman spesies dalam sampel komunitas. Secara umum, *sequence* dengan identitas lebih dari 97% dikelompokkan menjadi satu unit taksonomi operasional. Indeks analisis keragaman alfa untuk sampel yang berbeda pada identitas 97% yang ditunjukkan pada Tabel 18. Indeks kekayaan dihitung berdasarkan indeks Chao1 dan ACE, sedangkan indeks keragaman dihitung berdasarkan indeks Shannon dan Simpson. Tingginya nilai indeks yang diperoleh menunjukkan nilai kekayaan dan keragaman mikrobiota yang lebih tinggi. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai kekayaan dan keragaman komunitas mikroba dalam sampel usus udang EL16 lebih tinggi dibandingkan dengan sampel usus udang kontrol.

Tabel 18 Indeks keanekaragaman alfa komunitas bakteri di usus udang *P. vannamei* menurut sekuensing berbasis *Oxford Nanopore Technology* (ONT).

Sampel	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
K	3858.89	3947.62	3.98	0.94
EL16	4959.20	4916.47	5.71	0.98

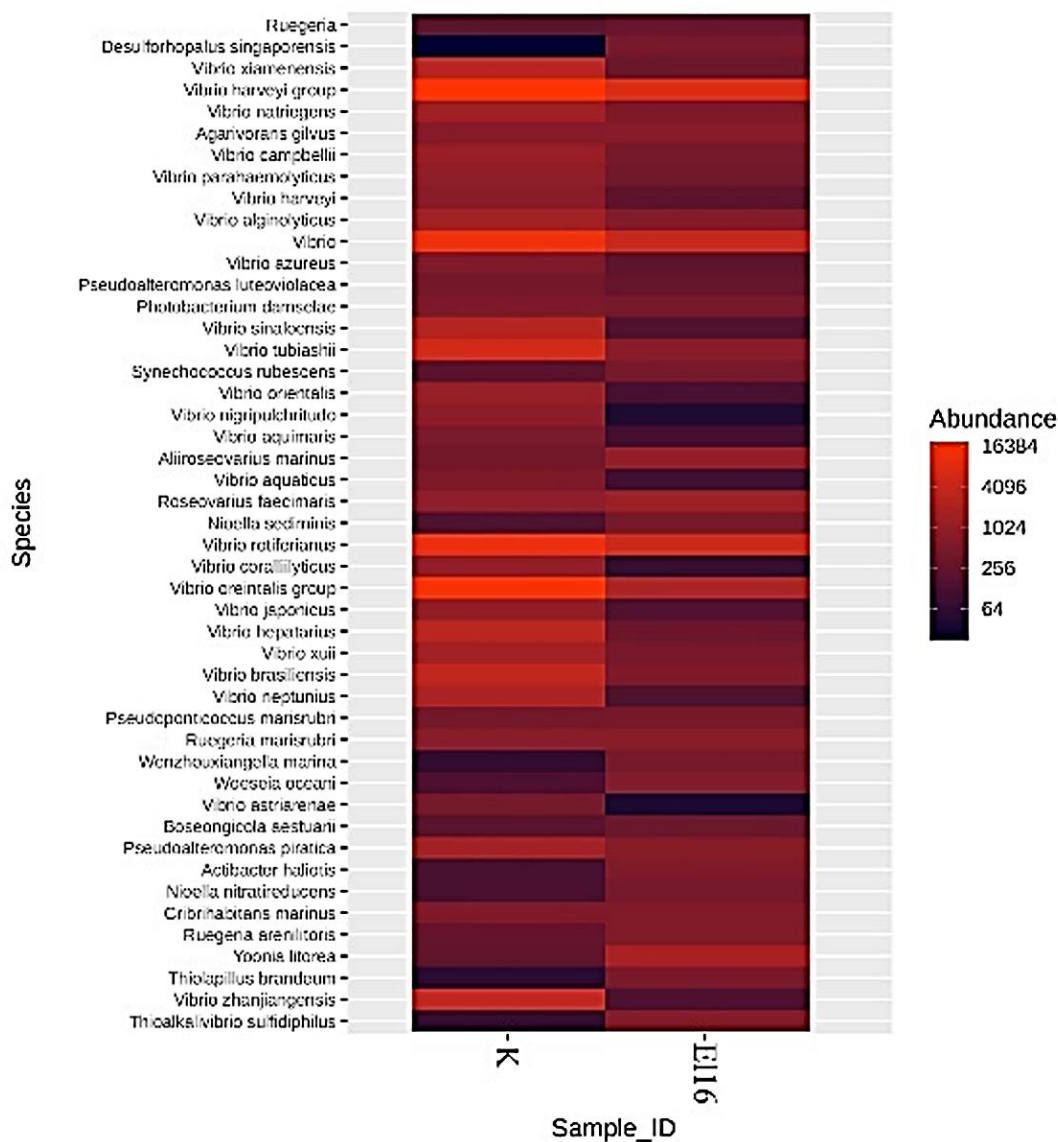
Berdasarkan hasil kelimpahan yang diperoleh pada setiap tingkat taksonomi, plot batang diplot untuk menunjukkan 10 klasifikasi teratas level filum, genus, dan spesies (Gambar 19 A, B dan C). Pada tingkat filum, filum paling banyak terdapat pada perlakuan sampel K dan EL16 secara berturut-turut adalah Pseudomonadota (95,69% dan 81,3%), Bacteriodota (0,77% dan 6,76%), Planctomycetota (1,29% dan 3,47%) dan Thermodesulfobacteriota (0,38% dan 3,42%), menjadi filum dengan kelimpahan relatif bakteri yang berbeda yang ditemukan pada kedua sampel usus udang. Selain itu, Bacillota, Cyanobacteria, Fusobacteriota, Kiritimatiellota, Verrucomicrobiotra muncul pada masing-masing sampel dengan kelimpahan relatif >2%.

Genus yang paling dominan pada kedua kelompok adalah *Vibrio*. Kelimpahan relatif Genus *Ruegeria*, *Pseudoalteromonas*, *Roseovarius*, *Yoonia*, *Aliiroseovarius*, *Nioella*, *Agarivorans* dan *Photobacterium* ditemukan lebih tinggi pada usus udang EL16 dibandingkan dengan kontrol. Pada level spesies kedua sampel baik pada usus udang kontrol maupun usus udang EL16 didominasi oleh spesies *Vibrio* sp. Berdasarkan hasil (Gambar 19 B dan C), dominasi *Vibrio* lebih tinggi ditemukan pada sampel usus udang kontrol dibandingkan dengan usus udang EL16.



Gambar 16 Top 10 komposisi kelimpahan relatif komunitas bakteri usus pada tingkat filum (a), genus (b), dan spesies (c) udang *P. vannamei*.

Selanjutnya dari keseluruhan total 47 spesies bakteri dari 19 genus berbeda dipertimbangkan untuk dianalisis. Analisis *heatmaps* menunjukkan perbedaan yang jelas terkait kelimpahan relatif bakteri yang berbeda antara sampel usus udang kontrol (K) dengan usus udang yang dipelihara dengan penambahan ekstrak masak bumi (EL16). Spesies *Vibrio* sp. dominan ditemukan pada sampel usus udang K dibandingkan dengan usus udang EL16. *Heatmaps* kelimpahan relatif spesies bakteri yang teridentifikasi ditampilkan pada Gambar 17.



Gambar 17 Heatmaps kelimpahan relatif spesies bakteri yang teridentifikasi.

4.5 Pembahasan

Perubahan lingkungan dapat menimbulkan terjadinya stres pada ikan, dan meningkatkan potensi populasi bakteri di perairan termasuk bakteri patogen (Raman *et al.* 2013). Penggunaan ekstrak pasak bumi dosis 1,6% pada penelitian ini mampu meningkatkan biomassa akhir, kelangsungan hidup dan menurunkan rasio konversi pakan udang vaname selama pemeliharaan. Reverter (2014) mencatat bahwa ekstrak tumbuhan memiliki sejumlah aktivitas yang bermanfaat dalam budidaya ikan, seperti anti-stres, pemacu pertumbuhan, stimulasi nafsu makan, efek hepatoprotektif, peningkatan imunostimulasi, dan sifat anti-patogen. Ini disebabkan oleh kandungan beragam senyawa aktif seperti alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, fenol, dan steroid.

Laju pertumbuhan spesifik (LPS) udang vaname yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak EL16 yaitu 3,06 % hari⁻¹, lebih rendah dibandingkan

dengan perlakuan kontrol yaitu 3,52 % hari⁻¹. Hal ini berbeda dengan penelitian tahap sebelumnya dimana perlakuan fitobiotik menunjukkan hasil LPS lebih baik dibandingkan kontrol. Begitu juga hasil penelitian Yin (2023), suplementasi *Andrographis paniculata* dapat meningkatkan nilai bobot akhir, SGR dan menurunkan nilai FCR. Nilai LPS akhir yang rendah pada perlakuan ekstrak EL16 dalam penelitian ini dapat dipengaruhi oleh kepadatan udang akibat perbedaan jumlah kematian yang terjadi pada kedua perlakuan tersebut. Kematian yang terjadi pada perlakuan kontrol mencapai lebih dari 50%, sedangkan pada perlakuan ekstrak hanya kurang dari 5%. Pengurangan kepadatan mendorong peningkatan bobot akhir. Da Silveira *et al.* (2020) menjelaskan, pengurangan kepadatan ini memungkinkan peningkatan 47% pada biomassa akhir.

Pengurangan kepadatan pada perlakuan kontrol disebabkan oleh adanya *outbreak* penyakit yang terjadi pada tambak pemeliharaan. Berdasarkan hasil gejala klinis yang ditemukan selama pemeliharaan, terlihat bahwa udang mengalami kematian pada hari ke-17 dan terus berlangsung hingga hari ke-40, terjadi penurunan nafsu makan, karapas lunak, dan kondisi usus yang terlihat kosong (Gambar 14E). Tambak budidaya pada saat penelitian berlangsung positif terinfeksi penyakit yang disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* AHPND (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*) yang terkonfirmasi positif menggunakan primer AP4. Agen penyebab AHPND adalah bakteri *Vibrio* termasuk *V. parahaemolyticus* (Han *et al.* 2015; Lee *et al.* 2015), *V. campbellii* (Dong *et al.* 2017b) dan *V. harveyi* (Kondo *et al.* 2015) yang mengandung toksin biner, *pirABvp*, yang terbukti faktor virulensi dari penyakit ini. Gen *pirABvp* ini terletak di plasmid besar (69-70 kb) pada strain *Vibrio* (Han *et al.* 2015, Lee *et al.* 2015; Sirikharin *et al.* 2015). AHPND dapat mengakibatkan penurunan produksi dan kerugian ekonomi yang sangat besar di beberapa negara (Williams *et al.* 2017). AHPND muncul selama 20 hari pertama kultur, menyebabkan hingga 100% kematian pada kasus yang parah. Bakteri penyebab AHPND dilaporkan terutama menargetkan kelenjar pencernaan (hepatopankreas) dan merusak sel R (resorptif), B (blister), F (fibrillar) dan E (embrionik) hepatopankreatik, sehingga mengakibatkan disfungsi dan kematian besar pada udang (Dong *et al.* 2017a; Han *et al.* 2015; Campa-Córdova *et al.* 2017).

Selain itu, terlihat juga ditemukannya kotoran berwarna putih di atas permukaan air. Kotoran putih juga identik dengan salah satu penyakit yang sering berkaitan dengan *V. parahaemolyticus*, yaitu penyakit *white feces disease* (WFD). Kasus WFD juga pernah dilaporkan menjadi salah satu penyakit yang muncul di tambak budidaya udang (Kurniawinata *et al.* 2021; 2022). Menurut Tang *et al.* (2016), selain menghambat pertumbuhan pada udang, penyakit WFD juga dapat meningkatkan RKP dan menurunkan kelangsungan hidup udang vaname. Penambahan ekstrak pasak bumi 1,6% pada pakan (EL16), telah terbukti mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname pada saat terjadi infeksi alami patogen di tambak. Udang yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak EL16 mampu menunjukkan kelangsungan hidup hingga 95%. Penelitian Waode *et al.* (2022) mengemukakan bahwa pemberian pakan dengan suplementasi bawang hutan mampu meningkatkan kelangsungan hidup *P. vanamei* setelah diuji tantang dengan *V. parahaemolyticus*.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Kesehatan usus mempengaruhi kesehatan udang karena mukosa usus menyediakan penghalang penting terhadap masuknya patogen. Kesehatan usus berkaitan dengan integritas strukturalnya, komponen lendir, dan molekul kekebalan. Struktur mukosa usus udang dapat rusak oleh stres lingkungan dan infeksi patogen, yang dapat meningkatkan risiko invasi patogen dan merusak kekebalan inang. Ketika integritas mukosa usus rusak karena stres, patogen dapat mengambil kesempatan untuk menembus penghalang usus, masuk ke dalam tubuh dan mengganggu kekebalan tubuh inangnya (Liang *et al.* 2023). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa perubahan lingkungan air dan paparan polutan lingkungan menyebabkan perubahan signifikan pada mikroba usus hewan air (Liang *et al.* 2023; Valena *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020), sehingga menyebabkan peradangan dan gangguan kekebalan tubuh inangnya (Santana *et al.* 2023). Keanekaragaman bakteri mempunyai fungsi penting dalam kemampuan ekologis, yang mengalami penurunan pada udang yang sakit, dan berhubungan erat dengan tingkat keparahan penyakit udang (Xiong *et al.* 2015). Penambahan ekstrak pasak bumi pada pakan mampu meminimalisir kerusakan saluran usus akibat stress lingkungan maupun infeksi patogen. Senyawa bioaktif seperti asam organik, enzim, dan peptida, dapat mendorong pertumbuhan dan memperbaiki sel mukosa usus, meningkatkan fungsi penghalang usus, dan mencegah penetrasi zat berbahaya (Lian *et al.* 2024). Selain itu, kaya akan bahan bioaktif dalam pakan juga dapat mengatur fungsi sistem kekebalan tubuh, meningkatkan generasi dan aktivitas sel kekebalan tubuh, dan meningkatkan daya tahan dan kekebalan tubuh hewan (Lian *et al.* 2024).

Struktur komunitas mikroba usus udang penting bagi kesehatan inangnya, yang dapat diatur melalui pola pemberian pakan (David *et al.* 2014). Analisis keragaman komposisi mikrobiota di usus udang vaname pada akhir pemeliharaan dilakukan menggunakan teknologi *high throughput / next generation sequencing*. Penilaian keragaman bakteri melalui sekuensing gen 16S *ribosomal RNA* (16S rRNA) telah menjadi pendekatan yang banyak digunakan dalam mikrobiologi lingkungan, terutama sejak munculnya teknologi *high throughput sequencing*. *Oxford Nanopore Technology*. menyediakan sekuensing pembacaan panjang yang mencakup urutan panjang penuh gen 16S rRNA (wilayah V1-V9) melalui proses *throughput* yang cepat, murah, dan tinggi (Bahram *et al.* 2018), sehingga dapat digunakan untuk mengenal dan menganalisis kelimpahan mikrobiota usus udang vaname.

Diagram Venn dibuat untuk memvisualisasikan tumpang tindih dan perbedaan komunitas mikroba pada sampel usus udang. Hasil menunjukkan 595 OTU dan 1470 OTU dari 3882 OTU (15,33% dan 37,86%) membentuk mikrobioma unik yang ditemukan pada usus udang kontrol maupun usus udang EL16 secara berturut-turut. Hasil tersebut menunjukkan bahwa keragaman mikrobiota usus pada udang EL16 lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Nilai keragaman mikrobiota diwakilkan oleh nilai estimator kekayaan (Chao1 dan AC), dan indeks keragaman (Shannon dan Simpson). Berdasarkan hasil menunjukkan keragaman dan kekayaan bakteri usus lebih tinggi pada sampel usus udang EL16. Rendahnya nilai kekayaan dan keragaman komunitas bakteri usus pada udang kontrol dapat dikaitkan dengan *outbreak* penyakit yang terjadi pada udang. Banyak studi melaporkan bahwa keragaman mikrobiota pada

usus individu yang sakit menunjukkan keragaman dan stabilitas yang lebih rendah dibandingkan individu yang sehat (Li *et al.* 2017). Berkurangnya keragaman bakteri dalam usus udang juga telah dilaporkan terdeteksi pada saat wabah penyakit dan kematian pada udang (Xiong *et al.* 2015; Xiong *et al.* 2017; Kurniawinata *et al.* 2022). Pemberian ekstrak pasak bumi 1.6% pada pakan terbukti mampu menjaga keragaman dan stabilitas mikrobiota usus pada udang yang dipelihara. Menurut Aguilera-Rivera *et al.* (2014), keragaman yang tinggi pada mikroorganisme usus memiliki peranan yang baik dalam menjaga kesehatan organisme yang dibudidayakan.

Terdapat total 47 spesies bakteri dari 19 genus berbeda yang selanjutnya dipertimbangkan untuk dianalisis. Filum yang mendominasi pada kedua sampel usus baik kontrol dan EL16 secara berturut-turut yaitu Pseudomonadota (sinonim Proteobacteria) (95,69% dan 81,3%), Bacteroidota (0,77% dan 6,76%), Planctomycetota (1,29% dan 3,47%) dan Thermodesulfobacteriota (0,38% dan 3,42%). Berdasarkan hal tersebut Pseudomonadota menunjukkan dominasi tertinggi untuk kedua sampel usus udang dengan tren perlakuan kontrol lebih tinggi dibandingkan perlakuan ekstrak pasak bumi. Pseudomonadota adalah filum paling melimpah yang dilaporkan untuk larva *P. vannamei* yang sehat dan sakit ((Wang *et al.* 2020; Xue *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2016), pada udang remaja *P. vannamei* (Xiong *et al.* 2015; Zeng *et al.* 2017), dan *P. monodon* dewasa liar dan budidaya (Rungrassamee *et al.* 2014). Secara umum, kelimpahan relatif Pseudomonadota sebagai bakteri gram negatif mencerminkan kondisi kesehatan budidaya perikanan (Blandford *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018). Peningkatan kelimpahan Pseudomonadota merupakan potensi risiko munculnya penyakit. Salah satu jenis bakteri dari kelompok ini adalah bakteri *Vibrio* (*gammaproteobacteria*) yang dikenal sebagai patogen pada udang (Thomas *et al.* 2019).

Bacteroidota adalah filum kedua paling melimpah yang dilaporkan pada larva udang sehat (Zheng *et al.* 2016) dan remaja *P. vannamei* (Wang *et al.* 2019). Hasil penelitian ini konsisten dengan pengamatan dominansi kelimpahan Bacteroidota yang lebih rendah dibandingkan dengan Pseudomonadota. Perhatian tertuju pada dua filum dalam saluran pencernaan: Bacillota (sinonim Firmicutes) dan Bacteroidetes. Rasio antara kedua filum ini (rasio Firmicutes/Bacteroidetes (F/B)) telah dikaitkan dengan menjaga kondisi homeostasis, dan perubahan dalam rasio ini dapat menyebabkan berbagai patologi pada inang. Rasio F/B adalah indeks penting untuk beberapa proses di mana mikrobiota memainkan peran penting dalam inangnya. Rasio F/B juga merupakan salah satu kelompok bakteri penting untuk kesehatan dan kekebalan pada krustasea (Duan *et al.* 2018; Foyals *et al.* 2019). Misalnya, peningkatan kelimpahan spesies Firmicutes atau Bacteroidetes tertentu masing-masing menyebabkan obesitas dan inflamasi pada usus (Abenavoli *et al.* 2019; Shen *et al.* 2018). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rasio Bacillota/Bacteroidota pada usus udang kontrol dan udang EL16 adalah 0,38 dan 0,10. Rasio ini dapat dipengaruhi oleh peningkatan filum lain. Filum yang paling bervariasi dan berkontribusi terhadap *dysbiosis* adalah Pseudomonadota (Shin *et al.* 2015) dan berkorelasi dengan penurunan Firmicutes dan keragaman mikroba umum pada penyakit radang usus (Morgan *et al.* 2012).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Selanjutnya filum *Planctomycetota* juga menunjukkan kelimpahan yang lebih tinggi ditemukan pada perlakuan fitobiotik. Filum ini terdistribusi baik pada lingkungan terestrial, air laut, air payau, dan juga lingkungan air laut (Dedysh *et al.* 2020). Di lingkungan akuatik, jenis bakteri ini ditemukan berasosiasi dengan berbagai jenis bakteri dan organisme lain seperti agregat *Cyanobacter*, *algae*, *sponge*, dan juga berasosiasi terhadap mikrobiota saluran pencernaan (Kabore *et al.* 2020).

Genus *Vibrio* merupakan genus yang mendominasi yang ditemukan dalam kedua sampel usus udang vaname pada penelitian ini. Genus *Vibrio* dikenal sebagai patogen terhadap organisme budidaya. Menariknya dari hasil penelitian ini top 10 kelimpahan relatif spesies yang ditemukan merupakan kelompok dari genus *Vibrio*, yaitu *V. harveyi group*, *V. oreintalis group*, *V. rotiferianus*, *V. tubiashii*, *V. brasiliensis*, *V. zhanjiangensis*, *V. hepatarius*, *V. xiamenensis*. Spesies *V. harveyi group* menjadi spesies yang paling dominan ditemukan pada kedua sampel dengan kelimpahan relatif tertinggi yaitu pada sampel usus udang kontrol. Spesies *Vibrio* lainnya yang dikonfirmasi menjadi agen patogen pada udang seperti *V. parahaemolyticus*, *V. owensi* dan *V. campbelli* memiliki kelimpahan relatif yang tinggi ditemukan pada sampel usus udang kontrol. Tingginya kelimpahan spesies *Vibrio* sp. pada usus udang diduga berasosiasi terhadap penyakit yang terjadi pada udang vaname saat pemeliharaan berlangsung.

Di sisi lain, pemberian pasak bumi juga mampu meningkatkan kelimpahan relatif bakteri non patogen. Beberapa genus bakteri bermanfaat diperkaya setelah udang diberi pakan EL16, termasuk genus *Ruegeria*. *Ruegeria* adalah anggota kelas *Roseobacter*, dengan kemampuan metabolisme penting, dan terlibat dalam pemanfaatan protein (Barreto-Curiel *et al.* 2018). Peningkatan kelimpahan *Ruegeria* berkorelasi positif dengan pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang (Guo *et al.* 2020). Berdasarkan hal tersebut, terlihat kemampuan ekstrak pasak bumi mampu menghambat dan meminimalisir dominasi bakteri patogen khususnya spesies *Vibrio* sp. di dalam saluran pencernaan udang vaname dan meningkatkan kelimpahan bakteri non patogen pada usus udang. Komposisi mikrobiota yang sesuai berkorelasi terhadap kesehatan udang (Xiong 2018).

4.6 Simpulan

Ekstrak fitobiotik pasak bumi dengan dosis 16 g kg⁻¹ pakan mampu menjaga stabilitas mikrobiota usus, memproteksi udang dari outbreak penyakit AHPND dan meningkatkan produksi.

V PEMBAHASAN UMUM

Penyakit pada udang merupakan salah satu hambatan utama dalam usaha budidaya. Masalah penyakit ini memiliki dampak ekonomi yang signifikan karena dapat menurunkan produksi dan kualitas udang, bahkan dapat menyebabkan kematian massal atau kegagalan total dalam produksi. Penggunaan antibiotik seringkali dianggap sebagai solusi cepat untuk mengendalikan penyakit, namun penggunaan yang berlebihan dari agen terapeutik dan profilaksis ini dapat

ngakibatkan patogen menjadi lebih resisten terhadap antibiotik. Selain itu, akumulasi residu antibiotik pada jaringan organisme yang mengonsumsinya dapat mengakibatkan kerusakan dan dampak serius pada kesehatan manusia (Samsuddin *et al.* 2013). Fitobiotik muncul sebagai salah satu alternatif untuk mengurangi atau menghindari ketergantungan pada antibiotik dalam budidaya dan untuk meningkatkan sistem imun udang terhadap infeksi patogen.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa herbal kaya akan zat yang dapat meningkatkan kekebalan tubuh atau bertindak sebagai imunostimulan (Ariefqi *et al.* 2020). Berbeda dengan vaksin, imunostimulan fitobiotik bekerja dengan modulasi respons imun bawaan atau non-spesifik. Saat ini, imunostimulan fitobiotik banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit pada ikan dan udang. Cara tradisional, fitobiotik dan ekstraknya terbukti efektif dalam meningkatkan kerja sistem kekebalan tubuh dan direkomendasikan sebagai alternatif alami yang baik sebagai imunostimulan dalam akuakultur.

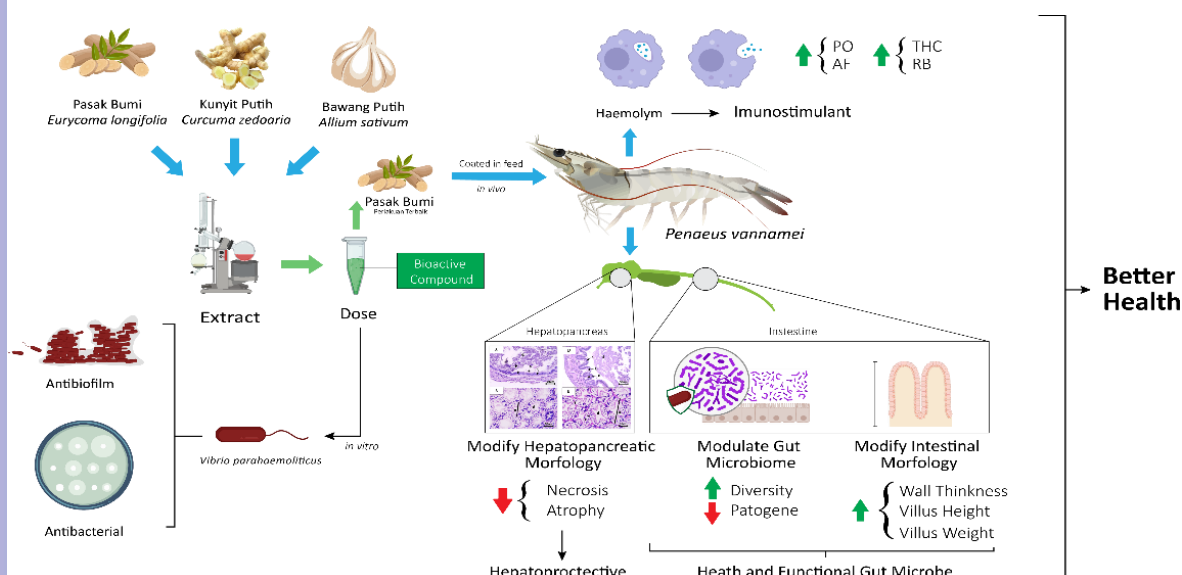
Ekstrak tumbuhan telah banyak digunakan dalam budidaya udang karena memiliki berbagai manfaat, seperti mengurangi stres, merangsang nafsu makan, meningkatkan pertumbuhan, memberikan efek hepatoprotektif, meningkatkan imunostimulasi, dan memiliki sifat anti-patogen. Manfaat ini disebabkan oleh kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, fenolik, steroid, atau minyak esensial yang terdapat dalam tumbuhan. Dibandingkan dengan antibiotik dan kemoterapi tradisional, ekstrak tumbuhan memiliki beberapa keuntungan, yaitu lebih mudah didapat, ramah lingkungan, aman bagi organisme yang mengonsumsinya, meninggalkan residu minimum pada organisme, dan tidak berisiko menyebabkan resistensi patogen. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari tumbuhan dapat meningkatkan pertumbuhan tumbuhan dan bertindak sebagai imunomodulator pada udang (Harikrishnan *et al.* 2011; Van Hai 2015).

Ekstrak fitobiotik pasak bumi (*E. longifolia*), kunyit putih (*C. zedoaria*), dan bawang putih (*A. sativum*) dalam penelitian ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus*, bertindak sebagai imunomodulator, dan juga sebagai motor pertumbuhan. Aktivitas antimikroba dari ekstrak tumbuhan dan senyawa aktifnya bekerja melalui beberapa mekanisme seperti biosintesis protein bakteri, penghancuran membran sel, biosintesis dinding sel, penghambatan replikasi DNA, penghambatan jalur metabolisme, penghambatan sintesis energi mikroba, penghambatan virulensi mikroba, serta penghambatan pembentukan biofilm (Icymaray 2019; Khameneh *et al.* 2019; Ganesan & Xu 2017; Gorniak *et al.* 2019). Bakteri *Vibrio* dapat bertahan di lingkungan perairan dengan membentuk film (Valente & Wan 2021). Pembentukan biofilm ini dimediasi oleh mekanisme *quorum sensing* (Liu *et al.* 2018), yang dilakukan oleh bakteri untuk mengoptimalkan pemanfaatan nutrisi di lingkungan, meningkatkan ketahanan terhadap bahan antimikroba dan stres, serta meningkatkan virulensinya (Sankiavathy *et al.* 2013). Menurut Liu *et al.* (2018), siklus pembentukan biofilm dimulai dengan perlekatan bakteri pada suatu permukaan, diikuti dengan sekresi polisakarida ekstraseluler dan pembentukan matriks biofilm hingga terbentuk biofilm yang matang. Setelah biofilm mencapai kematangan, biofilm akan kolaps dan sel bakteri akan dilepaskan ke lingkungan. Jika kondisi lingkungan mendukung, siklus dapat dimulai kembali. Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan suspensi fitobiotik dapat menghambat dan merusak biofilm bakteri *V. parahaemolyticus*,

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

mengindikasikan kemampuan masing-masing ekstrak untuk menghambat dan menghancurkan biofilm. Aktivitas destruksi biofilm berkaitan dengan substansi hidrolitik dan antibakteri yang dihasilkan oleh ekstrak fitobiotik, yang mampu merusak formasi biofilm *V. parahaemolyticus*.

Dari ketiga bahan fitobiotik yang diuji, ekstrak pasak bumi terbukti menjadi yang paling unggul. Pemberian ekstrak pasak bumi dengan dosis 1,6% pada pakan (EL16) terbukti menjadi perlakuan yang paling efektif dalam meningkatkan respons imun pada udang vaname. Mekanisme kerja pengaplikasian sistem fitobiotik pasak bumi dalam menghambat *V. parahaemolyticus*, serta pengaruhnya dalam meningkatkan respons imun, performa pertumbuhan, dan komposisi mikrobiota usus udang vaname yang diinfeksi *V. parahaemolyticus* yang dihasilkan dari penelitian ini disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18 Mekanisme kerja fitobiotik dalam mengendalikan infeksi *V. parahaemolyticus*, meningkatkan imunitas, serta modifikasi mikrobiota usus udang vaname

Kemampuan antibakteri dan antibiofilm dari ekstrak ini disebabkan oleh kandungan senyawa bioaktif yang lebih beragam dan lebih tinggi. Senyawa alami dari tumbuhan, seperti fenolik, flavonoid, dan tanin, berperan penting dalam aktivitas biokimia seperti antioksidan, antimutagenik, antikarsinogenik, serta kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Fenol menghambat pertumbuhan bakteri melalui dua mekanisme utama. Pertama, fenol merusak permeabilitas selektif membran sel mikroba dengan mengubah tegangan permukaan membran, menyebabkan keluarnya metabolit penting dan menginaktivkan enzim-enzim bakteri. Kedua, fenol menginaktivkan protein pada membran sel bakteri dengan mengikat protein tersebut melalui ikatan hidrogen, yang menghambat sintesis protein bakteri, proses penting untuk pertumbuhan dan reproduksi bakteri.

Selain itu, flavonoid merupakan kelompok terbesar dari senyawa fenolik alami yang ditemukan di berbagai bagian tanaman, baik dalam bentuk bebas maupun sebagai glikosida. Senyawa ini memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sifat antimikroba, penghambatan adhesi mitokondria, antiulkus, anti

itis, antiangiogenik, antikanker, dan penghambatan protein kinase, serta lain-lain. Cushnie dan Lamb (2005a) mengungkapkan bahwa flavonoid bertindak sebagai antibakteri melalui tiga mekanisme: (1) Penghambatan sintesis asam lemak (Ulanowska *et al.* 2006), (2) Penghambatan fungsi membran sitoplasma (Cushnie & Lamb 2005b), dan (3) Penghambatan metabolisme energi (Eumkeb *et al.* 2013).

Kandungan senyawa dominan dalam pasak bumi, seperti *9-octadecenoic acid* (asam oleat) yang memiliki sifat anti-inflamasi dan antibakteri (Sreekumar *et al.* 2014); *hexadecanoic acid* (asam palmitat) yang berfungsi sebagai antioksidan (Sishnamoorthy & Subramaniam 2014); *stigmastane-3,6-dione* (steroid) yang memiliki kemampuan antimikroba; *gamma-sitosterol* (fitosterol) dengan sifat anti-inflamasi, antioksidan, dan antikanker (Salehi *et al.* 2020); *stigmast-4-EN-3-ONE* (steroid) yang juga antimikroba (Udobre *et al.* 2015); dan *hexadecane* (alkana) yang memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan (Kumar *et al.* 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pakan yang mengandung ekstrak pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dapat meningkatkan respons imun pada udang. Penelitian sebelumnya juga membuktikan bahwa pemberian serbuk simplisia dan ekstrak fitobiotik dapat meningkatkan respons imun dan resistansi terhadap *parahaemolyticus* pada udang vaname (Munaeni *et al.* 2022). Menurut Aguirre-zmán *et al.* (2009), ekstrak fitobiotik mampu meningkatkan respons kekebalan seluler seperti *total hemocyte count* (THC) sebelum dan sesudah uji tantangan. Penelitian ini menemukan bahwa krustasea, termasuk udang, memiliki sistem kekebalan tubuh yang mencakup pertahanan seluler dan humoral. Sel hemosit pada udang terdiferensiasi dari tiga jenis, yaitu sel hialin, sel semi granular, dan sel granular, yang masing-masing memiliki peran tertentu dalam pertahanan tubuh. Misalnya, sel granular terlibat dalam produksi melanin, peptida antimikroba, dan reaksi sitotoksik, sementara sel hialin berperan dalam fagositosis. Hauton (2012) menambahkan bahwa sel granular juga berperan dalam menghancurkan partikel asing melalui mekanisme seperti fagositosis dan enkapsulasi. Sistem kekebalan tubuh dapat bekerja secara individu maupun bersinergi untuk memberikan perlindungan terhadap infeksi.

Pemberian ekstrak pasak bumi dengan dosis 1,6% pada pakan (EL16) terbukti menjadi perlakuan yang paling efektif dalam meningkatkan respons imun pada udang vaname. Hal ini dibuktikan dengan peningkatan nilai THC, PO, dan RB sebelum dan sesudah uji tantangan pada kelompok perlakuan EL16. Menurut Apinesiar & Amar (2015), efek imunostimulan pada organisme budidaya dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti sumber imunostimulan, dosis, cara pemberian, durasi pemberian, dan spesies organisme budidaya. Penggunaan dosis tinggi ekstrak kunyit putih (CZ64) dan bawang putih (AS64), yaitu 6,4% pada pakan, diyakini dapat menekan respons imun pada udang vaname.

Tingkat kelangsungan hidup yang tinggi pada perlakuan dengan penambahan ekstrak fitobiotik menunjukkan kemampuan fitobiotik dalam merangsang sistem kekebalan tubuh pada udang vaname. Pu *et al.* (2017) menyatakan bahwa penggunaan tanaman obat dalam budidaya hewan dapat meningkatkan respons kekebalan tubuh, ekspresi gen yang terkait dengan kekebalan tubuh, serta resistensi terhadap infeksi patogen. Penelitian lain yang dilakukan oleh Talpur & Iqbal (2012) menggunakan serbuk bawang putih dalam pakan juga menunjukkan peningkatan respons kekebalan tubuh, tingkat kelangsungan hidup,

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

dan resistensi terhadap infeksi *V. harveyi* pada ikan kakap *Lates calcarifer*. Penggunaan serbuk dari tanaman obat *Syzygium cumini* juga terbukti dapat meningkatkan respons kekebalan tubuh, respons fisiologis, dan respons biokimia, yang pada akhirnya meningkatkan tingkat kelangsungan hidup setelah diuji tantang dengan *V. parahaemolyticus* (Prabu *et al.* 2018).

Selain itu, kesehatan usus memiliki pengaruh yang besar terhadap kesehatan udang secara keseluruhan. Kesehatan usus berkaitan dengan integritas strukturalnya, komponen lendir, dan molekul kekebalan. Struktur mukosa usus udang dapat rusak oleh stres lingkungan dan infeksi patogen, yang dapat meningkatkan risiko invasi patogen dan melemahkan sistem kekebalan inang. Ketika integritas mukosa usus terganggu oleh stres, patogen dapat memanfaatkan kesempatan tersebut untuk menembus penghalang usus, masuk ke dalam tubuh, dan mengganggu sistem kekebalan tubuh inangnya (Liang *et al.* 2023). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa perubahan lingkungan air dan paparan polutan lingkungan menyebabkan perubahan signifikan pada mikroba usus hewan air (Liang *et al.* 2023; Valena *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020), yang kemudian menyebabkan peradangan dan gangguan sistem kekebalan tubuh inangnya (Santana *et al.* 2023). Keanekaragaman bakteri memainkan peran penting dalam kemampuan ekologis dan menurun pada udang yang sakit, yang berhubungan erat dengan tingkat keparahan penyakit udang (Xiong *et al.* 2015). Penambahan ekstrak pasak bumi pada pakan mampu meminimalisir kerusakan saluran usus akibat stres lingkungan maupun infeksi patogen.

Ekstrak fitobiotik pasak bumi, mampu mengurangi dan menekan jumlah bakteri patogen, terutama *V. parahaemolyticus*, baik yang diinjeksikan secara langsung maupun yang terjadi infeksi secara alami di dalam usus udang, serta efektif dalam menghambat dominasi bakteri patogen lainnya. Saat terjadi wabah penyakit, ekstrak pasak bumi dapat menstabilkan kelimpahan bakteri dan menekan dominasi *Vibrio* sp. di saluran pencernaan udang vaname, serta meningkatkan kelimpahan bakteri non-patogen di usus udang. Hal ini terlihat dari indeks keragaman mikrobiota pada sampel usus udang yang diberi pakan dengan ekstrak pasak bumi yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Tingginya keragaman dan komposisi mikrobiota yang sesuai akan berhubungan dengan kesehatan udang (Xiong 2018). Penurunan bakteri patogen khususnya *Vibrio* sp. diduga mampu mengurangi kerusakan pada membran usus udang vaname. Hal ini terlihat dari berkurangnya lisis dan peluruhan mikrovili di usus dibandingkan dengan kontrol positif. Usus udang yang terinfeksi *V. parahaemolyticus*, terutama pada kontrol positif, mengalami kerusakan struktur usus sehingga terlihat tidak utuh. Kerusakan tersebut meliputi lumen yang tidak memiliki batasan yang jelas, sel-sel yang terlepas dan mengalami nekrosis, serta tidak memiliki epitel kolumnar (Gambar 8 dan 13A). Penambahan ekstrak fitobiotik dalam pakan dapat memperbaiki morfologi usus. Senyawa bioaktif seperti asam organik, enzim, dan peptida dapat mendorong pertumbuhan dan memperbaiki sel mukosa usus, meningkatkan fungsi penghalang usus, dan mencegah penetrasi zat berbahaya (Lian *et al.* 2024). Selain itu, bahan bioaktif yang kaya dalam pakan juga dapat mengatur fungsi sistem kekebalan tubuh, meningkatkan produksi dan aktivitas sel kekebalan tubuh, serta meningkatkan daya tahan dan kekebalan tubuh hewan (Lian *et al.* 2024).

Hasil keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pasak bumi merupakan perlakuan terbaik yang mampu meningkatkan tingkat

kelangsungan hidup, respons kekebalan tubuh, mengurangi populasi *parahaemolyticus*, serta mengurangi kerusakan pada hepatopankreas dan usus udang vaname setelah diuji tantang. Selain itu, efektivitas ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) terbukti mampu mengurangi dampak dari infeksi alami yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*, menjaga keragaman dan stabilitas mikrobiota usus, sehingga meningkatkan tingkat kelangsungan hidup, biomassa panen, dan mengurangi rasio konversi pakan lebih baik dibandingkan dengan udang yang dipelihara tanpa penambahan fitobiotik. Ini menunjukkan bahwa ekstrak pasak bumi 1,6% (EL16) dapat menjadi alternatif untuk mengendalikan wabah penyakit yang terjadi dalam budidaya udang, sehingga meningkatkan produktivitas budidaya.

VI SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian fitobiotik pasak bumi, kunyit putih dan bawang putih dapat digunakan sebagai fitobiotik untuk pengendalian *V. parahaemolyticus*. Tetapi, pasak bumi menunjukkan hasil yang lebih efektif dibandingkan dengan bahan lainnya. Hal ini ditunjukkan oleh:

Komposisi senyawa bioaktif dan konsentrasi kandungan fitokimia pada pasak bumi memiliki kemampuan antibakteri dan antibiofilm yang lebih baik dibandingkan dengan bawang putih dan kunyit putih.

Ekstrak pasak bumi menunjukkan hasil yang lebih baik dalam meningkatkan kelangsungan hidup dan respon imun, serta mengurangi populasi bakteri *V. parahaemolyticus* Rf^R pada usus udang vaname setelah uji tantang.

Pasak bumi efektif dalam menjaga stabilitas mikrobiota dalam usus, memperbaiki kelangsungan hidup dan performa pertumbuhan udang yang dipelihara di tambak.

2. Saran

Perlu penelitian lanjutan terkait aplikasi pemberian fitobiotik pasak bumi dalam bentuk lain, seperti simplisia, atau pun penggunaan rebusan air pasak bumi. Hal ini untuk mencari solusi dari mahalnnya biaya yang diperlukan untuk proses produksi.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif HM, Yilmaz E, Dawood MA, Ringø E, Ahmadifar E, Yilmaz S. 2022. Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*. 551: 737951.
- Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aiello V, Romano B, De Lorenzo A, Izzo AA, *et al.* 2019. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients*. 11: 2690.
- Adeshina I, Jenyo-Oni A, Emikpe BO, Ajani EK, Tawwab MA. 2018. Stimulatory effect of dietary clove, *Eugenia caryophyllata*, bud extract on growth performance, nutrient utilization, antioxidant capacity, and tolerance of African catfish, *Clarias gariepinus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *J World Aquacult Soc.* 1–16
- Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Escalante K, Chávez C, Cuzon G, Gaxiola G. 2014. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 424:215–219.
- Ajlan A. 2016. Medicinal plants: a review. *Nat Prod Ind J.* 12(3): 1–6.
- Al-Salahi OS, Ji D, Majid AM, Kit-Lam C, Abdullah WZ, Zaki A, Jamal Din SK, Yusoff NM, Majid AS. 2014. Anti-tumor activity of *Eurycoma longifolia* root extracts against K-562 cell line: in vitro and in vivo study. *PLoS One*. 9(1): e83818.
- Anderson JL, Valderrama D, Jory D. 2018. *GOAL 2017: Shrimp Production Review*. Colombia. June 2018. Pp 1-54
- Anderson JL, Valderrama D, Jory D. 2019. *GOAL 2019: Shrimp Production Review*. Chennai, India. Oktober 2019. Pp 1-58.
- Ang HH, Hitotsuyanagi Y, Fukaya H, Takeya K. 2002. Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Phytochem*. 59: 833-837.
- Apines-Amar MJS, Amar MC. 2015. *Use of immunostimulants in shrimp culture. Biotechnological advances in shrimp health management in the Philippines*. Kerala, India: Research Signpost. pp 45–71
- Ariefqi MN, Syamsunarno MR, Rosdianto AM. 2020. Utilization of efficacious herbs as supplements in disease control in aquaculture. *Indones. Med. Veterinus*. 9(6): 1000-1009
- Bahram M, Anslan S, Hildebrand F, Bork P, Tedersoo L. 2018. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify divers and novel archaeal taxa from the environment. *Environ. Microbiol. Rep.* 11(4): 487-494.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 6: 71–79.
- Barreto-Curiel F, Ramirez-Puebla ST, Ringoe E, Escobar A, Godoy-Lozano EE, Vazques-Duhalt R, Sanchez- Flores A, Viana MT. 2018. Effects of extruded aquafeed on growth performance and gut microbiome of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 245
- Barreto-Curiel, Ramirez-Puebla ST, Ringø E, Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano E, Vazquez-Duhalt R, Sanchez-Flores A, Viana MT. 2018. Effects of extruded aquafeed on growth performance and gut microbiome of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 245: 91-103

Alkhalaf GE, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa EH, Rashwan EK. 2020. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomol.* 10 (2); 202.

Anderson MI, Taylor-Brown A, Schlacher TA, Nowak B, Polkinghorne A. 2018. Epitheliocystis in fish: An 425 emerging aquaculture disease with a global impact. *Transbound Emerg Dis.* 65(426): 1436-1446.

Atwal S, Mondal R, Krishna SBN, Adam JK, Govender P, Anupam R. 2021. Antibacterial Properties of Organosulfur Compounds of Garlic (*Allium sativum*). *Front. Microbiol.* 12: 613077.

Benítez-Córdova AI, León-Gallo AF, Romero-Maldonado A, Ibarra-Serrano AC, Rosales-Mendoza S, Hirono I, Angulo C. 2017. Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *J. Fish Dis.* 40: 1725–1729.

Biswas L, Muhtadi WK, Rizki MI, Rahman RA, Suhendri MR, Hidayat A. 2018. Potential medicinal plants for improve the immune system from Borneo Island and the prospect to be developed as nanomedicine. *MATEC Web of Conferences.* 154: 04006.

Chachad DP, Talpade MB, Jagdale SP. 2016. Antimicrobial activity of rhizomes of *Curcuma zedoaria* Rosc. *Int J Sci Res.* 5(11):938–940.

Chakraborty J, Mitra S, Tallei TE, Tareq AM, Nainu F, Cicia D, Dhama K, Emran TB, Simal-Gandara J, Capasso R. 2021. Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. *Life.* 11(4) : 1– 26.

Chen YY, Chen JC, Lin YC, Putra DF, Kitikiew S, Li CC, Hsieh JF, Liou CH, Yeh ST. 2014. Shrimp that have received carrageenan via immersion and diet exhibit immunocompetence in phagocytosis despite a post-plateau in immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.* 36: 352-366.

Coi MY, Stevens AM, Smith SA, Taylor DP, Kuhn DD. 2016. Strain and dose infectivity of *Vibrio parahaemolyticus*: the causative agent of early mortality syndrome in shrimp. *Aquac Res.* 48:3719–3727.

Shahnie TPT, Lamb AJ. 2005a. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26(5): 343-356.

Shahnie TPT, Lamb AJ. 2005b. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J. Ethnopharmacol.* 101(1-3). 243-248.

Silveira LGP, Krummenauer D, Poersch LH, Foes GK, Rosas VT, Wilson Wasielesky Jr W. 2020. The effect of partial harvest on production and growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technologic system. *Aquaculture.* 546: 737408.

Smith LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 505: 559–563.

Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, van Broeckhoven C. 2018. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinform.* 34(15):2666-2669.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Dedysh SN, Henke P, Ivanova AA, Kulichevskaya IS, Philippov DA, Meier - Kolthoff JP, Goker M, Huang S, Overmann J. 2020. 100 - year - old enigma solved: identification, genomic characterization and biogeography of the yet uncultured *Planctomyces bekefii*. *Environ Microbiol.* 22: 198-211
- Delgado DLC, Caceres LLC, Gómez SAC, Odio AD. 2023. Effect of dietary garlic (*Allium sativum*) on the zootechnical performance and health indicators of aquatic animals: A mini-review. *Vet World.* 16(5):965-976.
- Dimitroglou A, Reynolds P, Ravnoy B, Johnsen F, W Sweetman J, Johansen J, Davies DJ. 2011. The effect of mannan oligosaccharide supplementation on atlantic salmon smolts *Salmo salar* L. fed diets with high levels of plant proteins. *J Aquac Res Dev.* S1:1-6.
- Dong X, Bi D, Wang H, Zou P, Xie G, Wan X, Yang Q, Zhu Y, Chen M, Guo C, et al. 2017a. pirABvp-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the Same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Front. Microbiol.* 8: 1859.
- Dong X, Wang H, Zou P, Chen J, Liu Z, Wang X, Huang J. 2017b. Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Gut Pathog.* 9: 1–5.
- Duan Y, Wang Y, Liu Q, Dong H, Li H, Xiong D, Zhang J. 2019. Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary resistant starch. *Sci. Rep.* 9 1–10.
- Elias NA, Abu Hassan MS, Yusoff NAH, Tosin OV, Harun NA, Rahmah S, Hassan M. 2023. Potential and limitation of biocontrol methods against vibriosis: a review. *Aquacult Int* 31: 2355–2398
- Eumkeb G, Chukrathok S. 2013. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine.* 20 (3-4): 262-269.
- Fan L, Li QX. 2019. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. *Aquaculture.* 505:450–461.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2023. *GLOBEFISH: Information and Analysis on Market Trade of Fisheries and Aquaculture*. [Diakses 2023 June 10]. <https://www.fao.org/in-action/-globefish/market-reports>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2024. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action*. Rome. [Diakses 2024 June 10]. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>.
- Foysal MJ, Fotedar R, Tay CY, Gupta SK. 2019. Dietary supplementation of black soldier fly (*Hermetica illucens*) meal modulates gut microbiota, innate immune response and health status of marron (*Cherax cainii*, Austin 2002) fed poultry-by-product and fishmeal based diets. *PeerJ.* 7:e6891.
- Ganesan K, Xu B. 2017. A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans, *Nutrients.* 9(5): 455.
- Gharge S, Hiremath SI, Kagawad P, Jivaje K, Palled MS Suryawanshi SS. 2021. *Curcuma zedoaria* Rosc (Zingiberaceae): a review on its chemical, pharmacological and biological activities. *Futur J Pharm Sci.* 7. 166. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00316-1>

niak I, Bartoszewski R, Kroliczewski J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Rev.* 18(1): 241–272.

o H, Peng Y, Liu Y, Wang Z, Hu J, Liu J, Ding Q Gu J. 2020. Development and investigation of novel antifouling cellulose acetate ultrafiltration membrane based on dopamine modification. *Int. J. Biol. Macromol.* 160: 652-659.

msah H, Widanarni W, Alimuiddin A, Yuhana M, Junior MZ, Hidayatullah D. 2019. Immune response and resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic, prebiotic, and synbiotic through the bioencapsulation of *Artemia* sp. *Aquac Int.* 27: 567-580.

n J, Tang KFJ, Tran LH, Lightner DV. 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 113: 33–40.

ikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2011. Review: Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture.* 317:1-15.

uton C. 2012. The scope of the crustacean immune system for disease control. *J Invert Pathol.* 110:251-260.

ynh TG, Yeh ST, Lin YC, Shyu JF, Chen LL, Chen JC. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. chinense powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 31:286-293.

poré OD, Godreuil S, Drancourt M. 2020. Planctomycetes as host-associated bacteria: a perspective that holds promise for their future isolations, by mimicking their native environmental niches in clinical microbiology laboratories. *Front Cell Infect.* 10: 519301.

ranja E, Boga H, Muigai A, Wamunyokoli F, Kinyua J, Nonoh J. 2012. Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected *Streptomyces* species isolated from selected Kenyan national parks. In: Scientific conference proceeding

ur R, Shah TK. 2017. A review on role of plant waste products on fish growth, health and production. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2017; 5(3): 583-589

ameneh B, Iransahy M, Soheili V, Bazzaz BS. 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint, *Antimicrob. Resist. Infect. Contr.* 8(1):1–28.

n D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. 2016. Centrifuge: Rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.* 26:1721–1729

ndo H, Van PT, Dang LT. 2015. Draft genome sequence of non- *Vibrio parahaemolyticus* acute diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.* 3:2014–2015.

KP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2023. *Kejar Target Produksi Udang Nasional, KKP Ciptakan Kemandirian Produksi Induk Udang Unggul.* [Diakses 2023 Mei 27]. <https://kkp.go.id/djpb/>.

shnamoorthy K, Subramaniam P. 2014. Phytochemical Profiling of Leaf, Stem, and Tuber Parts of *Solena amplexicaulis* (Lam.) Gandhi Using GC-MS. *Int Sch Res Notices.* 2014: 567409. 13p.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Kristiansen M, Merrifield DL, Vecino JLG, Myklebust R, Ringø E. 2011. Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Aquac Res Dev*. 1:1-8.
- Kumar V, Bhatnagar AKJ, Srivastava JN. 2011. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *J. Med. Plant Res*. 5(32): 7043-7048.
- Kumar R, Ng TH, Wang HC. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Rev. Aquac*. 12: 1867–1880.
- Kumar V, Roy S, Behera BK, Bossier P, Das BK. 2021. *Acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*.13: 1-28.
- Kurniawinata MI, Sukenda S, Wahjuningrum D, Widanarni W, Hidayatullah D. 2021. White faeces disease and abundance of bacteria and phytoplankton in intensive pacific white shrimp farming. *Aquac Res*. 52:5730–5738.
- Kurniawinata MI, Sukenda S, Wahjuningrum D, Widanarni W. 2022. Bacterial diversity and community composition in the gut and rearing water of Pacific White shrimp *Penaeus vannamei* during an outbreak of white feces disease. *Aquaculture*. 559(18):738431
- Lai HC, Ng TH, Ando M, Lee CT, Chen IT, Chuang JC, Mavichak R, Chang SH, Yeh MD, Chiang YA, Takeyama H, Hamaguchi H, Lo CF, Aoki T, Wang C. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*. 47:1006–1014.
- Lakshmi S. Padmaja G, Remani P. 2011. Antitumour Effects of Isocurcumenol Isolated from *Curcuma zedoaria* Rhizomes on Human and Murine Cancer Cells. *Int. J. Med. Chem*. <https://doi.org/10.1155/2011/253962>.
- Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, Huang MF, Lin SJ, Chen CY, Lin SS, *et al*. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci*. 112:10798-10803.
- Li T, Li H, Gatesoupe FJ, She R, Lin Q, Yan X, Li J, Li X. 2017. Bacterial signatures of "red-operculum" disease in the gut of crucian carp (*Carassius auratus*). *Microb Ecol*. 74:510–521.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 6: 6020–6047.
- Lian X, Shi M, Liang Y, Lin Q, Zhang L. 2024. The Effects of Unconventional Feed Fermentation on Intestinal Oxidative Stress in Animals. *Antioxidants*. 13: 305.
- Liang J, Nie Z, Zhao Y, Qin S, Nian F, Tang D. 2023. Effects of Jujube Powder on Growth Performance, Blood Biochemical Indices, and Intestinal Microbiota of Broiler. *Animals*. 13: 3398
- Limbu SM, Zhou L, Sun SX, Zhang ML, Du ZY. 2018. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environ. Int*. 115: 205-219.
- Liu Y, Qin Q, Defoirdt T. 2018. Does quorum sensing interference affect the fitness of bacterial pathogens in the real world?. *Environ Microbiol*. 20(11):3918-3926.

Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, Li P. 2019. Effects of chitooligosaccharides supplementation with different dosages, molecular weights and degrees of deacetylation on growth performance, innate immunity and hepatopancreas morphology in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Carbohydr Polym.* 226: 115254.

angtrakul W, Boonchuen P, Jaree P, Kumar R, Wang HC, Somboonwiwat K. 2021. Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. *PLoS Pathog.* 17(3).

bona U, Viljoen A, Shikanga E, Marston A. Van Vuuren S. 2013. Antimicrobial activity of Southern African medicinal plants with dermatological relevance: from an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *J Ethnopharm.* 148:45-55.

ncuso M, Genovese M, Guerrera MC, Casella G, Genovese L, Piccolo G, Maricchiolo G. 2015. First episode of vibriosis in wild specimens of *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) in the Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 56: 355–361.

rtin GG, Rubin N, Swanson E. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Dis Aquat Organ.* 60(1):21-9.

stan SA. 2015. Incidences of white feces syndrome (WFS) in farm-reared shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Andhra Pradesh. *Indo Am J Pharm Res.* 5:3044–3047.

yur B, Sandesh S, Shruti S, Sung-Yum S. 2010. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *J Med Plants Res.* 4: 1547-1553.

Gladdery S, Woo P, Bruno D. 2011. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). *Fish Dis Disord.* 748-854.

ckymaray S. 2019. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics.* 8(4): 257.

rgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, *et al.* 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13, R79.

naeni W, Widanarni, Yuhana M, Setiawati M, Wahyudi AT. 2020. Effect in white shrimp *Litopenaeus vannamei* of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Powder on immune genes expression and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 102: 218–227.

ir A, Amalraj A, Jacob J, Kunnumakkara A and Gopi S. 2019. Noncurcuminoids from turmeric and their potential in cancer therapy and anticancer drug delivery formulations. *Biomol.* 9 (13). DOI:10.3390/biom9010013.

vin C, Moovendhan A, Suganya AM, Tamilselvi A, Bebin, Immanuel G, Palavesam A. 2016. Influence of polyherbal formulation (AquaImmu) as a potential growth promotor and immunomodulator in shrimp *Penaeus monodon*. *Aquacult Rep.* 4: 143–149.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Neves N, De Dea Lindner J, Stockhausen L, Delziovo FR, Bender M, Serzedello L, Cipriani LA, Ha N, Skoronski E, Gisbert E, *et al.* 2024. Fermentation of Plant-Based Feeds with *Lactobacillus acidophilus* Improves the Survival and Intestinal Health of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Reared in a Biofloc System. *Animals*. 14: 332.
- Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bow Dis*. 300-310.
- Nygaard, A.B., Tunsjø, H.S., Meisal, R. and Charnock, C., 2020. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Scien Rep*. 10: 1-10.
- Okpuzar J, Ogbunugafor H, Kareem GK, Igwo-Ezikpe MN. 2009. In vitro investigation of antioxidant phenolics compounds in extract of *Senne alata*. *Res J Phytochem*. 3: 68-76.
- Packiavathy IASV, Sasikumar P, Pandian S.K, Ravi AV. 2013. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio spp.* by curcumin. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97: 10177–10187.
- Pizzi A. 2021. Tannins medical / pharmacological and related applications: A critical review. *Sustain. Chem. Pharm*. 22: 100481.
- Prabu DL, Chandrasekar S, Ambashankar K, Dayal JS, Ebeneezar S, Ramachandran K, Kavitha M, Vijayagopal P. 2018. Effect of dietary *Syzygium cumini* leaf powder on growth and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and defense against virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 489:9-20.
- Prachumwat A, Taengchaiyaphum S, Mungkongwongsiri N, AldamaCano DJ, Flegel TW, Sritunyalucksana K. 2019. Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. *J World Aquacult Soc*. 50:5–17.
- Pu H, Li X, Du Q, Cui H, Xu Y. 2017. Research progress in the application of chinese herbal medicines in aquaculture. *Engineering*. 3:731–737.
- Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, Wang XJ. 2014. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med*. 12(6):401-6.
- Raja R, Sridhar R, Balachandran C, Palanisammi A, Ramesh S, Nagarajan K. 2017. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.020.
- Raman RP, Prakash C, Makesh M, Pawar NA. 2013. Enviromental Stress Mediated Disease of Fish: An Overview. *Adv. In. Fish. Res* 5: 141-158.
- Rehman SU, Choe K, Yoo HH. 2016. Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. *Molecules*. 21(3):331
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasa P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspective. *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.04.

nggrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Chaiyapechara S, Jiravanichpaisal P, Karoonuthaisiri N. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS One*. 9:e91853

nggrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Karoonuthaisiri N. 2016. Bacterial Dynamics in intestines of the black Tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *J Invertebr Pathol* 133:12– 19.

reen S, Khan MR, Khan RA. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opacus* fruits. *Food Chem*. 122:1205-1211.

ehi B, Azzini E, Zucca P, Varoni ME, Kumar NA, Dini L, Panzarini E, Rajkovic J, Fokou PVT, Peluso I, Mishra AP, Nigam M, *et al.* 2020. Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion. *Appl. Sci.* 10 (3)

ehi B, Zucca P, Orhan I.E, Azzini E, Adetunji C.O, Mohammed S.A, Banerjee S.K, Sharopov F, Rigano D, Sharifi-Rad J, Armstrong L, Martorell M, Sureda A, Martins N, Selamoğlu Z, Ahmad Z. 2019. Allicin and health:A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 86(1):502–516

atana TM, Dantas FdM, Monteiro Dos Santos DK, Kojima JT, Pastrana YM, De Jesus RS, Gonçalves LU. 2023. Fish Viscera Silage: Production, Characterization, and Digestibility of Nutrients and Energy for Tambaqui Juveniles. *Fishes*. 8: 111.

atos HM, Tsai C-Y, Maquiling KRA, Tayo LL, Mariatulqabtiah AR, Lee CW, Chuang KP. 2020. Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquac Int*. 28:169–185.

outra A, Maftuch M, Andayani S, Yanuhar U. 2023. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Serang, Banten, Indonesia. *Biodivers J*. 24(4).

amsuddin AA, Najiah M, Suvik A, Azariyah MN, Kamaruzzaman BY, Effendy AW, Akbar-John B. 2013. Antibacterial properties of selected mangrove plants against *Vibrio* species and its cytotoxicity against *Artemia salina*. *World Appl. Sci. J.* 2: 333–340

en ZH, Zhu CX, Quan YS, Yang ZY, Wu S, Luo WW, Tan B, Wang XY. 2018. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 24: 5–14.

n NR, Whon TW, Bae JW. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 33: 496–503.

ikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, Chi TD, Mavichak R, Proespraiwong P, Nuangsaeng B, Thitamadee S, Flegel TW, Sritunyalucksana K. 2015. Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*. 10:e0126987.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Siriruga P, Larsen K, Maknoi C. 2007. The Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): Distribution and Classification With Reference to Species Diversity in Thailand. *Gard. Bull. Singapore*. 59(1&2): 203-207.
- Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. 2014. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. *Biomed Res Int*. 2014:2014:686921.
- Sriurairatana S, Boonyawiwat V, Gangnonngiw W, Laosutthipong C, Hiranchan J, Flegel TW. 2014. White Feces Syndrome of Shrimp Arises from Transformation, Sloughing and Aggregation of Hepatopancreatic Microvilli into Vermiform Bodies Superficially Resembling Gregarines. *PLoS One*. 9(6):e99170.
- Stecher B, Hardt WD. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol*. 14:82–91
- Suryana A, Asih ENN, Insafitri I. 2023. Fenomena infeksi *acute hepatopancreatic necrosis disease* pada budidaya udang vaname di Kabupaten Bangkalan. *J Mar Res*. 12: 212-220.
- Talpur AD, Ikhwanuddin M. 2012. Dietary effects of garlic *Allium sativum* on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*. 364-365:6-12.
- Tang KF, Bondad-Reantaso MG, Arthur JR, MacKinnon B, Hao B, AldaySanz V, Dong X, Liang Y. 2020. Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual, p 1–65. In FAO fisheries and aquaculture circular
- Tariq S., Imran M., Mushtaq Z dan Asghar N. 2016. Phytopreventive Anti Hypercholesterolemia and Antilipidemic Perspectives of Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe.) Herbal Tea. *Lipids Health Dis*. 15(39): 1-10.
- Thomas PJ, Boller AJ, Satagopan S, Tabita FR, Cavanaugh CM, Scott KM. 2019. Isotope discrimination by form IC RubisCO from *Ralstonia eutropha* and *Rhodobacter sphaeroides*, metabolically versatile members of 'Proteobacteria' from aquatic and soil habitats. *Environ Microbiol*. 21: 72-80.
- Tran PTN, Kumar V, Bossier P. 2020. Do acute hepatopancreatic necrosis disease-causing PirABVP toxins aggravate vibriosis?. *Emerg Microbes Infect*. 9:1919–1932.
- Udobre AS, Etim EI, Udobang JA Udoh AE. 2015. Antimicrobial Activity of Stigmast-4-En-3-One and 2,4- Dimethylhexane Isolated from *Nauclea latifolia*. *Int. J. Phytopharm. Res*. 6(2): 65-68.
- Ulanowska K, Tkaczyk A, Konopa G, Wegrzyn G. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*. 184(5). 271-278.
- Ullah HM, Zaman S, Juhara F, Akter L, Tareq SM, Masum EH, Bhattacharjee R. 2014. Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complement. Altern. Med*. 14:346.
- Valladao GMR, Gallani SU, Pala G, Jesus RB, Kotzent S, Costa JC, Silva TFA, Pilarski F. 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquac. Res*. 48: 5640–5649.

lena RDL, Sobrinho AGdS, Romanzini EP, Andrade ND, Oliveira VDS. 2020. Peanut meal and crude glycerin in lamb diets: Meat quality and fatty acid profile. *Small Rumin. Res.* 185: 106076.

lente CDS, Wan AH. 2021. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *J Invertebr Pathol.* 181: 107527.

n Hai N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture.* 446: 88–96.

ng AR, Ran C, Ringø E, Zhou ZG. 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev Aquacult.* 10: 626–640.

ng J, Huang Y, Xu K, Zhang X, Sun H, Fan L, Yan M. 2019. White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 84 130–137.

ng T, Xu M, Wang J, Wan W, Sun H. 2020. A combination of rapeseed, cottonseed and peanut meal as a substitute of soybean meal in diets of Yellow River carp *Cyprinus carpio* var. *Aquac. Nutr.* 26: 1520–1532.

ng Y, Wang K, Huang L, Dong P, Wang S, Chen H, Lu Z, Hou D, Zhang D. 2020. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome.* 8: 1–16

tanabe T. 1988. *Fish nutrition and mariculture*. Departement of Aquatic Biosciences. Tokyo University of Fisheries. 233 p.

ck RR, Judd LM, Holt KE. 2019. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* 20:129.

lliams SL, Jensen RV, Kuhn DD, Stevens AM. 2017. Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes Early Mortality Syndrome in shrimp. *Aquaculture.*

ong J. 2018. Progress in the gut microbiota in exploring shrimp disease pathogenesis and incidence. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 7343-7350.

ong J, Wang K, Wu J, Qiuqian L, Yang K, Qian Y, Zhang D. 2015. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(16): 6911-9.

ong J, Zhu J, Dai W, Dong C, Qiu Q, Li C. 2017. Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environ Microbiol.* 19:1490–1501

e M, He Y, Chen D, Wang L, Liang H, Liu J, Wen CQ. 2020. Temporal dynamics of aquatic microbiota and their correlation with environmental factors during larviculture of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 529:735605

ng YT, Chen IT, Lee CT, Chen CY, Lin SS, Hor LI, Tseng TC, Huang YT, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Wang HC, Lo CF. 2014. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* 2:e00816-14.

n X, Zhuang X, Liao M, Cui Q, Yan C, Huang J, Jiang Z, Huang L, Luo W, Liu Y, Wang W. 2023. *Andrographis paniculata* improves growth and non-specific immunity of shrimp *Litopenaeus vannamei*, and protects it

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

from *Vibrio alginolyticus* by reducing oxidative stress and apoptosis. *Dev Comp Immunol.* 139: 104542.

Zhang N, Lan W, Wang Q, Sun X, Xie J. 2018. Antibacterial mechanism of *Ginkgo biloba* leaf extract when applied to *Shewanella putrefaciens* and *Saprophytic staphylococcus*. *Aquacult Fish.* 3:163-169.

Zhao Z, Xie J, Liu B, Ge X, Song C, Ren M, Zhou Q, Miao L, Zhang H, Zhang H, Shan F, *et al.* 2017. The effects of emodin on cell viability, respiratory burst and gene expression of Nrf2-Keap1 signaling molecules in the peripheral blood leukocytes of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol.* 62: 75-85.

Zheng Y, Yu M, Liu J, Qiao Y, Wang L, Li Z, Zhang XH, Yu M. 2017. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Front. Microbiol.* 8:1362

Zheng Y, Yu M, Liu Y, Su Y, Xu T, Yu M, Zhang XH. 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture.* 451: 163–169

Zhu J, Dai W, Qiu Q, Dong C, Zhang J, Xiong J. 2016. Contrasting ecological processes and functional compositions between intestinal bacterial community in healthy and diseased shrimp. *Microb Ecol.* 72:975–985.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.