

PENGARUH BAHAN AKTIF HIDROKUINON DARI BUAH *Sonneratia caseolaris* TERHADAP PARAMETER HEMOLIMPH UDANG WINDU, *Penaeus monodon* FAB., YANG DIINFEKSI SECARA BUATAN DENGAN *Vibrio harveyi*

The Effect of Hydroquinone Extracted from *Sonneratia caseolaris* Fruit on the Hemolymph of Tiger Prawn, *Penaeus monodon* Fab., Infected by *Vibrio harveyi*

Arifuddin¹⁾, Sukenda²⁾ & D. Dana²⁾

¹⁾ Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Sulawesi Selatan, Indonesia

²⁾ Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

ABSTRACT

Study on the effect of hydroquinone extracted from *S. caseolaris* fruit on *Penaeus monodon* immune system was carried out. Hydroquinone was extracted by methanol and chloroform using a soxhlet apparatus. Two kinds of *in vivo* experiments were conducted that were (1) shrimps were only injected with hydroquinone and (2) shrimps were injected with hydroquinone and challenged with *Vibrio harveyi*. Total hemocyte, differential hemocyte and phagocytic index were examined on shrimp injected with only hydroquinone and shrimp injected with hydroquinone and challenged with *V. harveyi*. Total hemocyte of hydroquinone injected shrimp increased significantly by day 5 from $8,33 \times 10^6$ to $4,93 \times 10^7$ cells/ml. Hyaline and semi granular hemocyte cells by day 7 decreased from 61,15% to 27,84% and 8,14% to 2,53%, respectively. However, granular hemocyte cells increase significantly from 30,71% to 69,63%. Phagocytic index increased significantly by day 7 from 0,41 to 0,76. These findings indicated that crude hydroquinone can increase non spesifik imune response of *P. monodon* against *V. harveyi* infection.

Key words: hydroquinone, *Sonneratia caseolaris*, *Vibrio harveyi*, *Penaeus monodon*, immune system

ABSTRAK

Kajian tentang efek hidrokuinon yang diekstraksi dari buah *S. caseolaris* pada sistem imun udang windu, *Penaeus monodon*, dilakukan. Hidrokuinon diekstraksi dengan methanol dan kloroform. Dua jenis percobaan *in vivo* dilakukan yaitu (1) udang hanya diinjeksi dengan hidrokuinon (2) udang diinjeksi dengan hidrokuinon kemudian diuji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi*. Total hemosit, diferensial hemosit dan indeks pagositasi diperiksa pada udang yang diinjeksi dengan hidrokuinon saja dan pada udang yang diinjeksi dengan hidrokuinon dan diuji tantang dengan bakteri *V. harveyi*. Total hemosit meningkat secara nyata sampai hari ke 5 dari $8,33 \times 10^6$ ke $4,93 \times 10^7$ sel/ml. Hyaline dan sel-sel semi granular sampai hari ke 7 masing-masing turun dari 61,15% ke 27,84% dan 8,14% ke 2,53%. Hasil ini menunjukkan bahwa hidrokuinon dapat meningkatkan respon imun spesifik pada udang terhadap infeksi *V. harveyi*.

Kata kunci: hidrokuinon, *Sonneratia caseolaris*, *Vibrio harveyi*, *Penaeus monodon*, sistem imun

PENDAHULUAN

Ekstrak buah mangrove *Sonneratia caseolaris* mengandung beberapa jenis bahan aktif alami seperti: flavonoid, steroid, fenol hidrokuinon dan tanin, yang aktif sebagai senyawa antibakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro* (Naiborhu *et al.* 2002). Selain itu, secara *in vivo*, memberi efek immunostimulasi (Maryani 2003). Hidrokuinon yang diekstraksi dari buah *S. caseolaris* menunjukkan aktifitas antibakterial (Mihopoulos *et al.* 1999; Tsoukatou *et al.* 2002), antifungal (Tsoukatou *et al.* 2002), antioksidan (Aknin *et al.* 1999), dan mampu menstimulasi sel-sel *progenitor* makrofage granulosit tikus secara *in vitro* dan *in vivo* (Henschler *et al.* 1996).

Efek antibakterial dan immunostimulasi yang ditunjukkan oleh bahan aktif hidrokuinon sangat menarik untuk dikaji, terutama untuk mengantisipasi penggunaan antibiotik secara berkala yang dapat menyebabkan resistensi bakteri (Baticados 1988) dan

persistensi dalam tubuh. Hemolimph yang sangat berperan dalam sistem pertahanan non spesifik udang adalah hemosit yang dapat digunakan untuk mengkaji pengaruh immunostimulasi. Hemosit berperan untuk membersihkan partikel-partikel asing dalam hemocoel dengan aktivitas fagositosis, enkapsulasi dan agregasi nodular (Soderhall & Cerenius 1992). Hemosit juga terlibat dalam penyembuhan luka dengan peng-gumpalan seluler dan permulaan proses koagulasi dengan melepas faktor-faktor yang dibutuhkan untuk gelasi plasma (Vargas-Albores 1998), dan membawa dan melepaskan sistem prophenoloxidase (proPO) (Hernandez-Lopez *et al.* 1996).

Vibrio harveyi merupakan agen utama penyebab penyakit vibriosis yang menyerang organisme vertebrata dan invertebrata laut pada area geografis yang luas (Zhang & Austin 2000). Bakteri tersebut merupakan patogen pada udang penaeid yang dibudidayakan (Sunaryanto & Mariam 1986;

Karunasagar *et al.* 1994; Vandenberghe *et al.* 1998). *V. harveyi* sebagai patogen udang yang signifikan di beberapa negara tropik dapat menyebabkan mortalitas hingga 100% di hatchery (Alvares *et al.* 1998), termasuk di Indonesia pada udang *Penaeus monodon* (Sunaryanto & Maryam 1986).

Sehubungan dengan hal di atas, dilakukan penelitian secara *in vivo* yang bertujuan untuk menguji potensi bahan aktif hidrokuinon dari buah mangrove *S. caseolaris* dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* dan mengkaji potensi immunostimulasinya dalam meningkatkan ketahanan tubuh udang windu terhadap infeksi *V. harveyi*

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari Pebruari hingga November 2003. Ekstraksi bahan aktif dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Uji antibakterial secara *in vitro* dan histologi dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Pengujian *in vivo* dan pengamatan parameter imunologis dilaksanakan di Laboratorium Basah, Divisi Pakan Buatan dan Laboratorium Hama-Penyakit Ikan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

Ekstraksi Bahan Aktif Hidrokuinon

Serbuk halus buah *S. caseolaris* dengan kadar air 18,335% seberat 100 g dikemas dalam kertas saring, dan kemudian diekstraksi pada suhu kamar dengan merendamnya menggunakan pelarut metanol dan kloroform (rasio volume 1:2) dalam tabung Erlenmeyer (rasio pelarut dengan bahan 5:1, v/w). Proses ini diulangi empat kali (Aknin *et al.* 1999). Maserat yang diperoleh dievaporasi dalam penguap putar (*rotary evaporator*) pada temperatur 50°C dan dilanjutkan dengan pengeringan dalam *freeze dryer* untuk mendapatkan bahan aktif *crude* hidrokuinon (dipastikan dengan uji kualitatif menggunakan KOH 10% yang memberi warna coklat).

Penyediaan Bakteri

Bakteri *V. harveyi* ditumbuhkan dalam media *sea water complete* (SWC) dan kepadatannya ditentukan dengan mengukur kerapatan optik (*optical density*, OD) dalam media cair menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Nilai OD = 1 \approx 2,13 x 10⁹ cfu/ml).

Pemberian Bahan Aktif Hidrokuinon dan Uji Tantang

Pemberian bahan aktif hidrokuinon dan uji tantang pada udang windu, *Penaeus monodon*, (berat rata-rata 52,35±10.22 g) dilakukan dengan metode injeksi. Bahan aktif hidrokuinon dengan konsentrasi 3.000 ppm sebanyak 0,1 ml/individu dan bakteri *V. harveyi* sebanyak 3,61x10⁴±8,43x10³ cfu/g bobot tubuh udang uji diinjeksikan pada sinus ventral di segmen kedua abdominal dengan menggunakan syringe 1 ml (*needle* 26 G x 1/2"). Selang waktu pemberian hidrokuinon dan *V. Harveyi* pada udang seperti diterangkan di bawah.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan dua seri percobaan yang berbeda yaitu percobaan dengan pemberian perlakuan hidrokuinon tanpa uji tantang dan dengan uji tantang dengan bakteri *V. harveyi*. Percobaan yang terakhir dilakukan dengan dua waktu uji tantang yang berbeda yaitu uji tantang pada hari ke-7 setelah perlakuan dan sehari sebelum perlakuan. Dosis dan cara pemberian hidrokuinon dan bakteri *V. Harveyi* seperti diceritakan di atas.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam ujicoba ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua perlakuan dan empat ulangan (jumlah individu udang uji) dan dua kontrol. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah hemosit total, diferensial hemosit, dan indeks fagositik.

Analisis Data

Data hemosit total, diferensiasi sel hemosit, dan indeks fagositik dianalisis dengan analisis variansi pengukuran berulang (*repeated measures analysis of variance*) (Petrie & Watson 2002). Setelah analisis tersebut dilanjutkan uji kontras polinomial antar waktu pengamatan dan uji jarak berganda Duncan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hemosit Total

Hemosit total udang uji yang diinjeksi hidrokuinon ternyata dan lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan tanpa pemberian hidrokuinon (Gambar 1). Hemosit total udang yang diinjeksi hidrokuinon meningkat secara kuadratik ($p < 0,05$) dengan berjalannya waktu, dan pada hari ke-5 didapat total hemosit tertinggi. Hemosit total udang uji yang diinjeksi dengan hidrokuinon 7 hari sebelum uji tantang (Hc) lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan yang sehari sebelum uji tantang (Kc) atau tanpa diinjeksi hidrokuinon (Ho dan Ko). Hemosit total udang uji yang diberi perlakuan Ko, Ho dan Kc tidak menunjukkan perbedaan nyata.

Peningkatan total hemosit udang uji yang diinjeksi hidrokuinon mengindikasikan bahwa bahan aktif tersebut mampu merangsang pembentukan sel-sel hemosit yang kemudian dilepaskan ke dalam hemolimf. PBS steril yang diinjeksikan pada udang uji ternyata dapat juga meningkatkan total hemosit. Hal ini didukung pendapat Lorenzon *et al.* (1999) bahwa total hemosit pada Crustacea menurun dengan cepat setelah diinjeksi dengan bahan asing, sementara total hemosit seringkali meningkat setelah diinjeksi PBS.

Penurunan total hemosit setelah ujiantang berhubungan dengan aktifitas pertahanan yang berbeda. Hemosit akan bermigrasi ke tempat injeksi menyebabkan berkurangnya konsentrasi sel dalam hemolimf (Van de Braak 2002). Hemosit beragregat menjadi gumpalan setelah infeksi bakteri yang akut dan injeksi bahan asing (Smith & Ratcliffe 1980). Degranulasi dapat diikuti oleh lisis sel (Soderhall *et al.* 1986), dan oleh karena itu sejumlah hemosit dapat juga hilang selama proses degranulasi.

Diferensial Hemosit

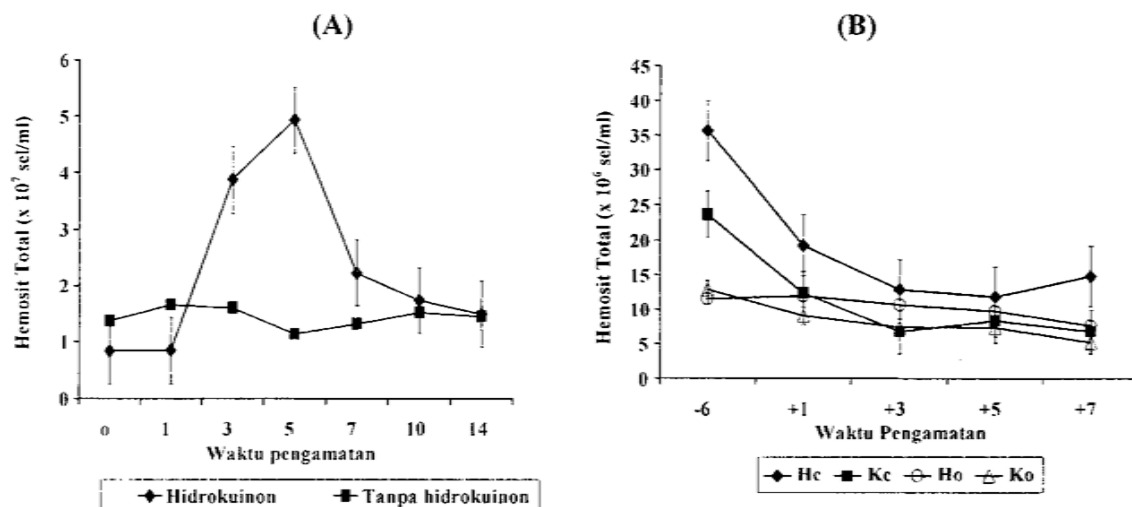
Persentase jenis sel hemosit udang uji mengalami perubahan yang signifikan setelah diinjeksi hidrokuinon (Gambar 2). Peningkatan sel-sel granular yang signifikan diikuti dengan penurunan sel-sel hyalin dan semi granulosit. Persentase sel-sel granulosit udang uji yang memperoleh perlakuan hidrokuinon cenderung bersifat kuadrat, Persentase sel granulosit pada perlakuan He dan Ho tidak berbeda nyata, tetapi keduanya berbeda nyata dengan Kc dan Ko ($p < 0,05$).

Penurunan persentase sel-sel hyalin dan semi granular bukan merupakan pengaruh negatif dari pemberian hidrokuinon tetapi merupakan implikasi dari peningkatan sel-sel granular. Dalam hal ini, sel-sel

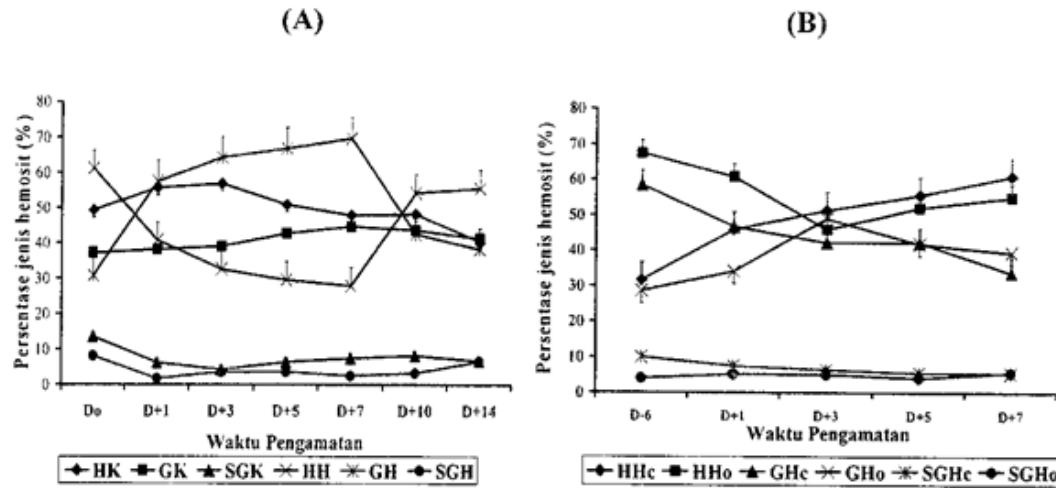
granular merupakan sel-sel matang dari kedua sel yang lainnya. Peningkatan sel-sel granular dalam hemosit merupakan salah satu parameter peningkatan status kesehatan atau ketahanan tubuh udang yang tentunya tidak lepas dari peran dan fungsi dari jenis sel lain dalam hemosit. Menurut Soderhall & Cerenius (1992), kerjasama dan komunikasi sel dibutuhkan paling tidak pada beberapa reaksi pertahanan dan terjadi ketika mikroorganisme atau parasit dikenali dan respon imun dibentuk. Bachere (2000) mengemukakan berdasarkan karakteristik morfologi dan sitokimia, beberapa fungsi dan keterlibatan dalam reaksi pertahanan yang berbeda berhubungan dengan jenis sel yang berbeda, misalnya sel hyalin dengan koagulasi, sel granular dan semi granular dengan fagositosis dan sistem proPO. Kemampuan sel granular untuk melakukan aktifitas fagositosis dan terlibat dalam sistem proPO akan memberikan proteksi ganda terhadap patogen yang tentunya akan lebih meningkatkan status kesehatan udang.

Indeks Fagositik

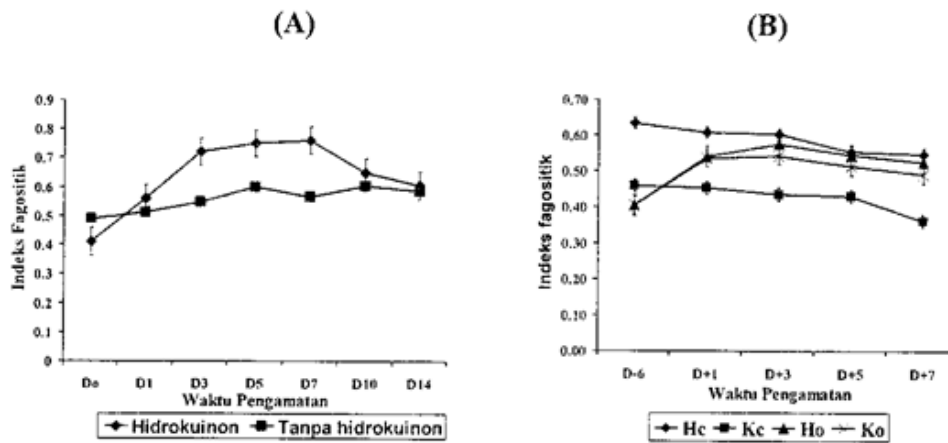
Indeks fagositik hemosit udang uji meningkat setelah diinjeksi hidrokuinon atau PBS steril sebelum ditantang dengan *V. harveyi* dan menurun sehari setelah ujiantang (Gambar 3). Nilai indeks fagositik udang uji yang diberi perlakuan hidrokuinon berbeda nyata dan terdapat pengaruh interaksi antara perlakuan dan waktu ($p < 0,05$), dimana nilai indeks pada hari ke-3, 5 dan 7 lebih tinggi dan berbeda nyata dengan interaksi antara waktu dan perlakuan lainnya. Nilai parameter indeks fagositik menunjukkan kecenderungan (*trend*) yang bersifat kuadrat ($p < 0,05$), dimana titik balik kurva (nilai respon tertinggi) terjadi pada hari ke-7.



Gambar 1. Hemosit total *Penaeus monodon* Fab. yang diinjeksi hidrokuinon tanpa ujiantang (A) dan yang diinjeksi hidrokuinon atau PBS steril 7 hari sebelum (Hc, Kc) dan sehari setelah (Ho, Ko) ujiantang dengan *Vibrio harveyi* (B).



Gambar 2. Persentase jenis sel hemosit udang windu, *Penaeus monodon* Fab., yang diinjeksi hidrokuinon tanpa uji tantang (A) dan yang diinjeksi hidrokuinon atau PBS steril 7 hari sebelum (Hc) dan sehari setelah (Ho) uji tantang dengan *Vibrio harveyi* (B). Huruf pertama pada keterangan Gambar melambangkan jenis hemosit: H, hyalin, G, Granulosit, SG, semi granulosit; huruf kedua pada melambangkan perlakuan: K, tanpa injeksi hidrokuinon, H, injeksi hidrokuinon, Hc, seminggu sebelum uji tantang, Ho, sehari setelah uji tantang.



Gambar 3. Indeks fagositik udang windu, *Penaeus monodon* Fab., yang diinjeksi hidrokuinon tanpa uji tantang (A) dan yang diinjeksi hidrokuinon atau PBS steril 7 hari sebelum (Hc, Kc) dan sehari setelah (Ho, Ko) uji tantang dengan *Vibrio harveyi* (B). Batang vertikal menunjukkan rata-rata \pm S.E.

Nilai indeks fagositik antara perlakuan Hc dan Ho yang tidak menunjukkan perbedaan nyata, tetapi keduanya menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) dengan Kc dan Ko yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) mengindikasikan bahwa perlakuan hidrokuinon efektif meningkatkan nilai indeks fagositik udang uji.

Peningkatan nilai indeks fagositosis udang uji setelah mendapatkan perlakuan bahan aktif hidrokuinon pada dasarnya merupakan implikasi dari peningkatan sel-sel granular yang melakukan aktifitas fagositosis. Henschler *et al.* (1996) mengemukakan bahwa hidrokuinon mampu menstimulasi sel-sel progenitor makrofage granulosit tikus secara *in vitro* dan *in vivo*. Menurut Hose *et al.* (1990), granulosit merupakan sel fagositik utama pada udang, lobster dan kepiting. Sel

granular kemampuan memfagosit partikel asing tetapi dengan frekuensi yang lebih rendah dibandingkan dengan sel semi granular (Hose & Martin 1989). Sel granular telah dibuktikan memainkan peranan yang signifikan dalam sistem pertahanan udang karena aktifitas antibakterialnya (Chisholm & Smith 1995). Sel hemosit yang paling kecil adalah hyalin dianggap juga sebagai fagosit (Soderhall & Cerenius 1992). Berdasarkan seri percobaan yang dilakukan terungkap bahwa bahan aktif *crude* hidrokuinon bersifat antibakterial dan immunostimulan yang meningkatkan nilai parameter pertahanan tubuh non spesifik seperti total hemosit hingga hari ke-5, sel-sel granulosit dan indeks fagositik hingga hari ke-7.

KESIMPULAN

Hidrokuinon bersifat immunostimulan yang meningkatkan nilai parameter pertahanan tubuh non spesifik seperti total hemosit hingga hari ke-5, sel-sel granulosit dan indeks fagositik hingga hari ke-7.

DAFTAR PUSTAKA

- Aknin, M., T.L.A. Dayan, A. Rudi, Y. Kashman & E.M. Gaydou. 1999. Hydroquinone antioxidant from the Indian Ocean tunicate *Aplidium savignyi*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47: 4175—4177.
- Alvares, J.D., B. Austin, A.M. Alvares & H. Reyes, 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Disease*, 21:313-316.
- Bachere E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191: 3-11.
- Baticados, M.C.L. 1988. Control of luminous bacterial infection in prawn hatcheries. SEAFDEC. *Asian Aquaculture*, 10: 1-10.
- Chisholm, J.R.S. & V.J. Smith. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110:39-45.
- Henschler, R., H.R. Glatt, CM. Heyworth. 1996. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Health Perspectives*, 104 (Supplement 6).
- Hernandez-Lopez, J., T. Gollas-Galvan, F. Vargas-Albores. 1996. Activation of prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C:61-66.
- Hose, J.E. & G.G. Martin. 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53: 335-346.
- Hose, J.E., G.G. Martin & A.S. Gerard. 1990. A decapoda hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178: 33-45.
- Karunasagar, L., R. Pai, G. Malathi & I. Karunasagar 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* Fab. larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- Lorenzon, S., S. De Guarrini, V.J. Smith & E.A. Ferrero. 1999. Effects of LPS injection on circulating hemocytes in crustaceans *in vivo*. *Fish Shell. Immunology*, 9:31-50.
- Maryani. 2003. Peranan Ekstrak Kelopak dan Buah Mangrove *Sonneratia caseolaris* untuk Pencegahan dan Pengobatan terhadap Serangan Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi* pada Udang Windu, *Penaeus monodon* Fab. Tesis. Program Studi Ilmu Perairan, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mihopoulos, N., C. Vagias, I. Chinou, C. Roussakis, M. Scoullou, C. Harvala & V. Roussis. 1999. Antibacterial and cytotoxic natural and synthesized hydroquinones from sponge *Ircinia spinosula*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54: 417-423.
- Naiborhu, P.E., D. Dana & Sukenda. 2002. Ekstraksi dan Manfaat Ekstrak Mangrove (*Sonneratia alba* dan *Sonneratia caseolaris*) sebagai Bahan Alami Anti Bakteri pada Patogen Udang Windu, *V. Harveyi*. Tesis, Program Studi Ilmu Perairan, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Petrie, A. & P. Watson 2002. *Statistic for Veterinary and Animal Science*. Blackwell Science, U.K.
- Smith, V.J. & N.A. Ratcliffe. 1980. Cellular defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L), *in vivo* hemocytic and histopathological responses to injected bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35:65-74.
- Soderhall, K., V.J. Smith & M. Johansson. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell and Tissue Research*, 243:43-49.
- Soderhall, K. & L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Disease*, 2: 3—23.
- Sunaryanto, A. & A.Mariam 1986. Occurrence of pathogenic bacteria causing luminiscence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bulletin of Brackishwater Aquaculture Development Center*, 8: 64-70.

- Tsoukatou, M., C. Hellio, C. Vagias, C. Harvala & V. Roussis. 2002. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54: 161-171.
- Van de Braak, K. 2002. Hemocytic Defence in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Disertasi, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen, Netherlands. <http://www.gcw.nl/dissertations/3218/dis3218.pdf>. [2 Juli 2003]
- Vandenbergh, J., Y. Li, L. Verdonck, J. Li, P. Sorgeloos, H.S. Hu & J. Swings. 1998. Vibriosis associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea; Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169: 121-132.
- Vargas-Albores, F. 1998. Activation of shrimp cellular defence function by microbial product, p: 161-166. *In* T. Flegel (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Zhang, X. H. & B. Austin. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonid. *Journal of Fish Disease*, 23:93-102.