

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

**PROTECTIVE EFFECTS OF *Pandanus tectorius* LEAF EXTRACT  
AGAINST BIOTIC AND ABIOTIC STRESSORS IN  
GNOTOBIOTIC *Artemia* TEST SYSTEM**

**PRATHIBHA PATABANDIGE SARATH KUMARA  
PATABANDI**

**APRIL 2024**

**Main Supervisor : Prof. Dr. Yeong Yik Sung, Ph.D**

**Co-Supervisors : Assoc. Prof. Dr. Kartik Baruah, Ph.D  
Assoc. Prof. Dr. Parisa Norouzitallab, Ph.D  
Dr. Yosie Andriani, Ph.D**

**School/Institute : Institute of Climate Adaptation and Marine  
Biotechnology**

**ABSTRACT**

This thesis work investigated a more sustainable and environmentally friendly approach to replacing chemical-based alternatives for improving abiotic stress tolerance and preventing shrimp diseases in aquaculture. The efficacy of methanolic *Pandanus tectorius* leaf extract (PLE) as a natural alternative for increasing shrimp tolerance to lethal abiotic stressors (i.e., temperature at 42°C for 15 min, pH 5.3 for 24 h, and salinity at 100 g/L for 48 h), and *Vibrio campbellii* (10<sup>6</sup> cells/mL), the latter of which causes Vibriosis, was examined. *Artemia franciscana* brine shrimp was used as the model organism in this study because it can be hatched axenically and grown in gnotobiotic systems. These systems provide conditions for precise evaluation of the prophylactic and metaphylactic effects of specific compounds or extracts, and the impact on host-environment or host-microbe interactions. The application of PLE

increased *Artemia*'s tolerance to abiotic stresses and *Vibrio* challenge at the series of doses (1 g/L - 6 g/L) during pretreatment. Tolerance can also be achieved by exposing the *Artemia* to methanolic PLE during the challenge in continuous exposure at 0.2 g/L. Methanolic PLE was found to be non-toxic to *Artemia* up to 6 g/L during pretreatment and 1 g/L during continuous exposure. It also increased the expression of genes necessary for maintaining the structural integrity of the exoskeleton against abiotic stresses, and innate immune genes (*hsp70*, *hsp60*, *hsp90*, *hmgbl*, *proPO*, and *tgase*) that protect against *Vibrio*. The upregulation of heat shock proteins and other immune genes following methanolic PLE exposure, as demonstrated by qPCR and transcriptomic analysis, as well as their potential roles and mechanistic actions in contributing to protection, were discussed. Moreover, it was revealed that methanolic PLE inhibited virulence factors such as enzyme activities (i.e., caseinase, lipase, phospholipase), swimming and swarming motilities, *Vibrio* colonisation in *Artemia*, and bacterial growth significantly. This study added to our understanding of the molecular basis of stress responses in shrimp, as well as the potential of methanolic PLE as a stress and bacterial disease control strategy. Further research should focus on optimizing methanolic PLE dosage, application methods, and its long-term effects on *Artemia*.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia  
Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Doktor Falsafah

**KESAN PERLINDUNGAN EKSTRAK DAUN *Pandanus*  
*tectorius* TERHADAP STRES BIOTIK DAN ABIOTIK DALAM  
SISTEM UJIAN *Artemia* GNOBIOTIK**

**PRATHIBHA PATABANDIGE SARATH KUMARA  
PATABANDI**

**APRIL 2024**

**Penyelia : Prof. Dr. Yeong Yik Sung, Ph.D**

**Penyelia Bersama : Assoc. Prof. Dr. Kartik Baruah, Ph.D  
Assoc. Prof. Dr. Parisa Norouzitallab, Ph.D  
Dr. Yosie Andriani, Ph.D**

**Pusat Pengajian : Institut Adaptasi Iklim Dan Bioteknologi  
Marin**

**ABSTRAK**

Kerja tesis ini telah menyelidik pendekatan yang lebih mampan dan mesra alam untuk menggantikan alternatif berasaskan bahan kimia untuk meningkatkan toleransi terhadap tekanan abiotik dan mencegah penyakit udang dalam akuakultur. Keberkesanan ekstrak daun *Pandanus tectorius* (PLE) berasaskan metanol sebagai alternatif semula jadi untuk meningkatkan toleransi udang terhadap tekanan abiotik yang boleh menyebabkan kematian (iaitu, suhu pada 42°C selama 15 minit, pH 5.3 selama 24 jam, dan saliniti pada 100 g/L selama 48 jam), serta *Vibrio campbellii* ( $10^6$  sel/mL) yang menyebabkan penyakit Vibriosis, telah dikaji. *Artemia franciscana* digunakan sebagai model dalam kajian ini kerana organisma ini boleh menetas dalam keadaan bebas mikrob dan dipelihara dalam sistem gnotobiotik. Kesan profilaktik dan metafilik sebatian atau ekstrak tertentu, serta kesan terhadap interaksi perumah-persekitaran atau perumah-mikrob dapat dinilai dengan tepat dengan menggunakan sistem ini. Penggunaan PLE pada dos 1 g/L dan 6 g/L semasa pra-rawatan telah

berupaya meningkatkan toleransi *Artemia* terhadap tekanan abiotik dan *Vibrio*. Peningkatan toleransi yang sama juga boleh dicapai dengan mendedahkan *Artemia* kepada 0.2 g/L PLE berasaskan methanol secara berterusan. PLE berasaskan metanol didapati tidak toksik kepada *Artemia* pada 6 g/L semasa pra-rawatan dan 1 g/L semasa pendedahan berterusan. Ia juga meningkatkan ekspresi gen yang diperlukan untuk mengekalkan integriti struktur eksoskeleton semasa tekanan abiotik, dan gen imun semula jadi (hsp70, hsp60, hsp90, hmgb1, proPO, dan tgase) yang memberi perlindungan daripada jangkitan *Vibrio*. Peningkatan ekspresi protein kejutan haba dan gen imun lain selepas pendedahan kepada PLE berasaskan metanol, seperti yang ditunjukkan oleh qPCR dan analisis transkriptomik, serta peranan dan mekanisme tindakan yang berpotensi dalam menyumbang kepada perlindungan, telah dibincangkan. Selain itu, kajian ini telah menunjukkan bahawa PLE berasaskan metanol mampu menghalang faktor virulen seperti aktiviti enzim (iaitu, kaseinase, lipase, fosfolipase), motiliti berenang dan pengerumunan, pengkolonian *Vibrio* dalam *Artemia*, dan pertumbuhan bakteria dengan ketara. Kajian ini menyumbang kepada pemahaman tentang asas molekul tindak balas tekanan dalam udang, serta potensi PLE berasaskan metanol sebagai strategi kawalan tekanan dan penyakit bakteria. Penyelidikan lanjut perlu memberi tumpuan kepada pengoptimuman dos PLE berasaskan metanol, kaedah aplikasi, dan kesan jangka panjangnya terhadap *Artemia*.