

**OPTIMASI PENGGUNAAN BAKTERI PROBIOTIK  
SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN SELULER  
PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

**Agus Suryahman**

Dosen Sekolah Tinggi Teknologi Kelautan Balik Diwa Makassar

**ABSTRAK**

Optimalisasi Probiotik sebagai imunostimulan untuk peningkatan respon imun seluler dari *Litopenaeus vannamei* terhadap *Vibrio harveyi* oleh karena terdapat banyak penyakit pada udang disebabkan oleh bakteri ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri probiotik, mengetahui pengaruh probiotik terhadap respon imun seluler udang vannamei dan memperoleh perlakuan terbaik dalam penelitian. Penelitian dilakukan dalam 2 tahap uji: (1) In-Vitro, dan (2) In-vivo. Setiap tahap dianalisis dengan rancangan acak lengkap. Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah meningkatkan respon imun seluler sebelum uji tantang dan juga setelah uji tantang dengan *V. harveyi*. Setelah uji tantang *V. harveyi* mendapatkan perlakuan terbaik pada dosis probiotik  $10^6$  sel/ml/gram pakan. Nilai hitungan haemocyte total (THC) adalah  $11 \times 10^6$  sel/ml.

**Kata Kunci:** Imunostimulan, *Litopenaeus vannamei*, Probiotik, *Vibrio harveyi*.

**PENDAHULUAN**

Salah satu penyebab timbulnya penyakit adalah akibat rusaknya lingkungan tambak sebagai akibat dari pencemaran internal. Hal itu disebabkan karena sistem budidaya udang, terutama yang menerapkan teknologi intensif merupakan salah satu kegiatan budidaya yang potensial menghasilkan limbah organik. Bahan organik ini bersumber dari kotoran udang dan ikan, sisa-sisa makanan yang tidak termakan oleh udang dan ikan, fases yang tidak terurai serta adanya organisme yang mati. Tingginya kadar protein dan senyawa nitrogen lainnya serta lemak dalam pakan udang menyebabkan kualitas limbah yang dihasilkan juga akan berbahaya jika dibandingkan dengan tambak-tambak yang hanya dipergunakan untuk pemeliharaan ikan. Optimalisasi cara pemberian pakan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap besarnya limbah yang

dihasilkan melalui residu dan bahan yang dicerna (Smith, 2002).

Penyakit pada udang diklasifikasikan dalam dua kelompok, yaitu penyakit infeksi dan penyakit non infeksi. Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh organisme pathogen seperti parasit, jamur, bakteri, dan virus yang dapat menular dari satu inang ke inang lainnya melalui air, sentuhan langsung antara inang, inang perantara, peralatan dan aktifitas manusia (Rodriguez dan Moullac, 2000). Sedangkan penyakit non infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan non pathogen seperti nutrisi, kualitas air, racun, dan penanganan (Murdjani, 2002).

Di dalam saluran pencernaan udang terjadi proses pencernaan nutrisi dan ada mikroba yang dikenal dengan bakteri. Bakteri ini mampu meningkatkan proses metabolisme karena mampu menghasilkan enzim

*ekstraselluler*. Proses metabolisme bakteri yang menghasilkan enzim *ekstraselluler* yaitu antara lain enzim *protease, amylase dan lipase*. Enzim-enzim tersebut membantu menghidrolisa zat gizi protein, lemak dan karbohidrat sehingga menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana dan mudah dicerna oleh udang vannamei (Maharanie, 2005).

Salah satu alternatif untuk mencegah timbulnya berbagai penyakit adalah dengan pemberian probiotik. Probiotik sebagai agensia pengendali flora mikroba patogen pada media pemeliharaan (Irianto, 2003). Selain itu, Probiotik juga merupakan salah satu bahan yang dikembangkan dalam upaya peningkatan efisiensi pakan yang terbuang dan tidak sempat dimakan oleh ikan (Feliatra, 2004).

Pada akuakultur probiotik telah berhasil digunakan sebagai agensia pengendali flora mikroba pada tangki-tangki pemeliharaan udang melalui penebaran mikroba hidup ke tangki-tangki (Garriques dan Arevalo, 1995), dan perbaikan kualitas perairan dan menekan *V. luminescens* melalui penebaran mikroba ke tambak (Moriarty, 1998). Irianto (2002), menggunakan sel bakteri probiotik yang dimatikan atau tidak aktif sebagai suplemen pakan dan ternyata tetap memiliki kemampuan menekan tingkat mortalitas saat diuji tantang dengan bakteri *A. Salmonicida* ORN6, suatu strain *atypical* pada ikan mas (*C. Auratus*) meskipun tidak menggunakan sel hidup, tetapi tetap terjadi perbaikan status ikan yang ditunjukkan dengan meningkatnya respon

imun seperti meningkatkan aktivitas lisozim, aktivitas makrofag dan fagositosis.

## MATERI DAN METODE

### Bakteri *Bacillus megaterium*

Isolasi bakteri yang diambil dari saluran pencernaan, media hidup udang dan sedimen tambak dengan langkah kerja adalah :

- Sampel udang, air dan sedimen dari tambak dibawa ke laboratorium menggunakan termos es.
- Pembedahan udang yaitu bagian saluran pencernaan yang terdiri dari *foregut, midgut,* dan *hindgut,* selanjutnya dilakukan penggerusan.
- Sampel sedimen yang diambil dari 6 titik tambak kemudian dihomogenkan menjadi satu sampel
- Sampel air yang diambil dari 6 titik juga dihomogenkan menjadi satu sampel
- Teknik isolasi dilakukan dengan melakukan pengenceran berseri, yaitu 10 gram sampel dimasukkan dalam 90 ml NaFis dan dihomogenkan dengan vortex (pengenceran  $10^{-1}$ ). Masukkan 1 ml larutan dari pengenceran  $10^{-1}$  ke dalam 9 ml akuades steril dan homogenkan menggunakan vortex (pengenceran  $10^{-2}$ ). Dilakukan pengenceran bertingkat hingga  $10^{-9}$ .
- Masukkan 1 ml larutan hasil pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  ke dalam 3 cawan petri, masukkan PCA 10 ml dalam cawan petri dan digoyang agar merata. Biarkan hingga membeku dan diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam.

- Warna dan ukuran koloni yang tumbuh pada PCA diamati dan dibandingkan dengan buku pedoman identifikasi *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Koloni-koloni tersebut kemudian dimurnikan melalui Sub Culture Technique (SCT) dalam tabung reaksi, dan disimpan pada suhu refrigerator hingga dilakukan analisis lebih lanjut.

#### Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan morfologi koloni, sifat gram, motilitas, dan sel bakteri serta pengujian sifat biokimia menurut *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology* (Buchanan and Gibbson, 1974).

#### Penghitungan kepadatan Isolat Bakteri Probiotik

Teknik yang digunakan adalah agar tuang untuk menentukan jumlah hidup (viable count) dari bakteri, kemudian digunakan pengenceran  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  untuk menghitung jumlah. Masukkan 1 ml ke dalam cawan dan lakukan ulangan dua kali. Setelah itu inkubasi lempengan agar pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam (Lay, 1994).

#### Uji In-vitro

Uji in-vitro dilakukan dengan cara cakram, yaitu suatu cara penentuan kepekaan mikroba patogen (*V. harveyi*) terhadap bakteri hasil isolasi dengan menggunakan cakram disk yang sudah mengandung bakteri hasil isolasi.

- Biakan murni bakteri *V. harveyi* ditanam pada media agar TSA kemudian diinkubasi

pada suhu kamar selama 24 jam sehingga pertumbuhan bakteri optimal, buat konsentrasi *V. harveyi* dengan kepadatan  $10^8$  sel/ml berdasarkan optical density.

- Penanaman bakteri *V. harveyi* pada lempeng agar dilakukan dengan cara menspread sebanyak 1 ml bakteri *V. harveyi* pada agar TSA. Kemudian diratakan dengan menggunakan kapas steril.
- Isolat bakteri hasil isolasi diambil dan disentrifuge untuk mendapatkan supernatan. Masing-masing kertas cakram steril ditetesi supernatan bakteri tersebut.
- Setelah 15 – 30 menit, diletakkan kertas cakram yang sudah mengandung bakteri hasil isolasi pada permukaan lempeng agar. Agar ditekan supaya isolat bakteri meresap kedalam agar dengan baik. Perlu diperhatikan jarak cakram yang diberi isolat bakteri dari tepi plate tidak boleh kurang dari 15 mm dan jarak cakram dengan cakram yang lain tidak boleh kurang dari 24 mm. Cakram yang telah ditempel tidak boleh dipindahkan lagi.
- Pembacaan hasil dilakukan setelah diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 18 – 24 jam dengan cara mengukur daerah hambatan yang terbentuk disekitar kertas cakram (mm).
- Inkubasi dapat dilakukan sampai 48 jam untuk mengetahui sifat dari isolat bakteri. Jika daerah hambatan tetap bening selama 48 jam maka isolat bakteri tersebut bersifat bakteriosidal. Tapi jika daerah hambatan setelah 24 jam ditumbuhi bakteri *V. alginolyticus* maka isolat bakteri tersebut

bersifat bakteristatik (Wattimena *et al.*, 1991).

### Uji In-Vivo

Aplikasi pakan ditambah isolat bakteri dengan menggunakan metode yang dilakukan Irianto *et al.*, (2004). Isolat bakteri yang telah ditanam di media TSB dipanen dengan menggunakan sentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C dan disuspensi dengan larutan garam fisiologis (0,9%) hingga diperoleh kepadatan  $10^{10}$  sel/ml (dengan perhitungan langsung menggunakan haemositometer). Kemudian 1 ml suspensi tersebut dicampur pada 1 gr pelet udang kering dengan cara disemprotkan secara merata.

### Aplikasi Probiotik Pada Udang Vaname

Udang uji diberi pakan yang telah ditambah isolat bakteri sebanyak 5% dari berat tubuhnya dan dilakukan secara adlibitum (sekenyang-kenyangnya) dengan frekuensi 4 kali yaitu jam 06.00, 10.00 dan 14.00 dan 18.00 WIB,

Mengukur kualitas air yang meliputi salinitas, DO, dan pH dilakukan satu kali seminggu dan suhu diukur setiap hari.

### Uji Antagonis *Vibrio harveyi*

Uji antagonis bakteri *V. harveyi* dilakukan dengan cara perendaman dengan kepadatan bakteri  $10^6$  selama 6x24 jam.

### Total Hemocyte Count (THC)

Hemolim sebanyak 50  $\mu$ l diambil menggunakan spet (1 mL # 26) di bagian ventral udang pada abdomen kedua kemudian dicampur antikoagulan (10% sodium citrate, pH

7.2) dengan volume yang sama dan diberi pewarna Trypan blue solution sebanyak 100  $\mu$ L.

*Total haemocyte count* (THC) dihitung menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop cahaya dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{THC} = \text{jumlah sel total} \times 5 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}/10 \text{ (cell/mm}^3\text{)}$$

### Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, maka digunakan analisa keragaman satu arah (One Way Anova) atau uji F. Jika hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata (F hitung > F table) maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Total Hemocyt Count (THC)

Berdasarkan hasil uji Anova menunjukkan bahwa nilai rerata Total Hemosit Count udang vannamei dengan pemberian probiotik dan sebelum diuji tantang dengan *V. harveyi* (Tabel 1.) hasilnya adalah berbeda nyata pada taraf ( $p > 0,05$ ). Begitu pula setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* hasil uji Anova menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf ( $p > 0,01$ ).

Terjadinya peningkatan THC adalah karena molekul lectin yang merupakan bagian pertahanan humoral udang berfungsi untuk melakukan pengenalan terhadap benda asing (*non self recognition*) yang masuk kedalam tubuh udang (Rodriguez dan Le Moullac,

Tabel 1. Data Total Rerata Hemosit (sel/ml) Udang vannamei (*L. vannamei*) sebelum ujiantang dan pasca ujiantang dengan *V. harveyi*.

Perlakuan	Jumlah Rata-rata THC	Jumlah Rata-rata THC
	Sebelum Uji Tantang	Setelah Uji Tantang
A (10 <sup>4</sup> )	7.800.000	5.600.000
B (10 <sup>5</sup> )	6.400.000	6.800.000
C (10 <sup>6</sup> )	10.300.000	11.000.000
D (10 <sup>7</sup> )	6.250.000	6.566.667
K(-)	3.700.000	-
K(+)	-	4.140.000

2000). Sedangkan menurut Lopez *et al.*, (2003), hemocyanin akan meningkat pada juwana (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi pakan yang mengandung imunostimulan.

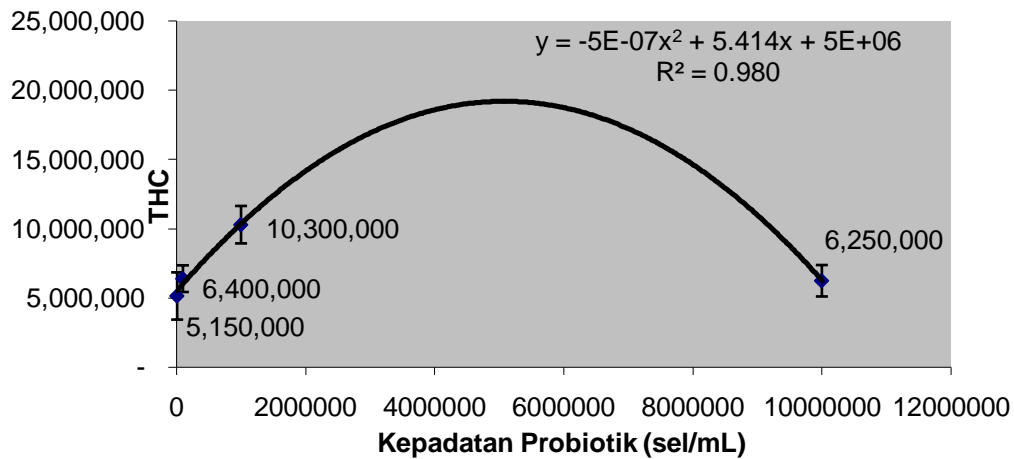
Disamping hal tersebut kandungan bakteri gram positif seperti pada bakteri probiotik dari *B. megaterium* dan *B. firmus* adalah memiliki tetrapeptida peptidoglikan (Alimuddin, Hala, dan Juada, 2005).

Sjofjan *et al* (2005), Probiotik merupakan mikroorganisme hidup non patogen yang mekanisme kerjanya mendesak mikroorganisme non-indegenous keluar dari ekosistem saluran pencernaan dan mengganti lokasi mikroorganisme patogen (translokasi). Didalam saluran pencernaan berhubung probiotik berasal dari mikroorganisme indigenous, sehingga proses translokasi adalah alamiah dalam ekosistem usus. Mikroba patogen non endogenous merupakan benda asing, oleh karena itu didesak keluar dari

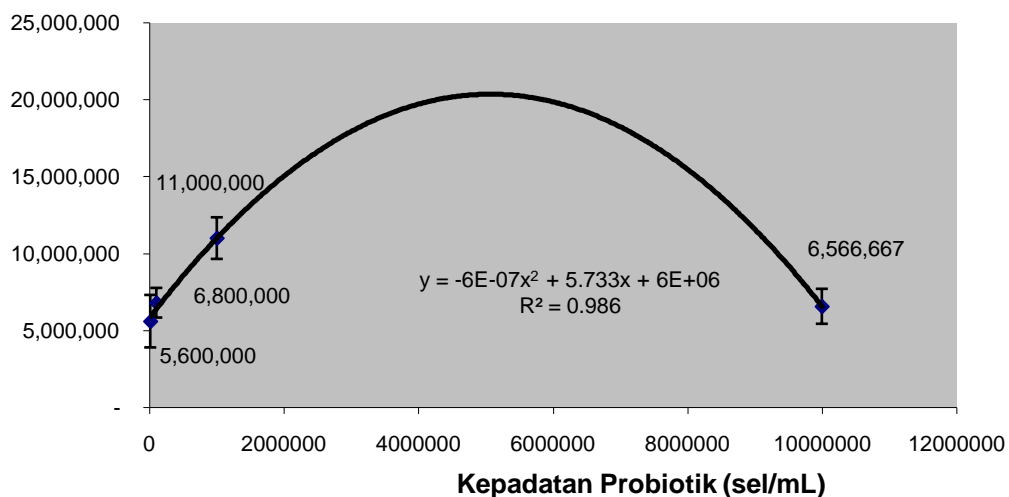
saluran pencernaan. Dengan demikian mekanisme probiotik dalam usus adalah mempertahankan keseimbangan, mengeliminasi mikroorganisme yang tidak diharapkan atau bakteri patogen dari induk semang, disamping itu terjadi peningkatan sistem imun pada inangnya yang memacu pembentukan sel-sel darah. (Soeharsono, 1998).

Probiotik bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* berfungsi sebagai imunostimulan seperti dikatakan Ringo dan Gatesoupe (1998), probiotik berfungsi sebagai imunostimulan dengan demikian akan merangsang terjadinya proliferasi dan difrensiasi sel-sel imunokompeten seperti makrofag pada ikan.

Persamaan Total Hemosit Count dengan pemberian probiotik dari bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* sebelum dan sesudah diuji tantang dengan *V. harveyi* dapat dilihat pada grafik dalam Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Hubungan Persamaan Antara Kepadatan Bakteri Probiotik Yang Berbeda Dengan Total Hemosit Count Sebelum Uji Tantang.



Gambar 2. Grafik Hubungan Antara Kepadatan Bakteri Probiotik Yang Berbeda Dengan Total Hemosit Count Setelah Uji Tantang.

Peningkatan Total Hemosit Count baik sebelum uji tantang yang dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan juga setelah dilakukan uji tantang dengan *V. harveyi* disebabkan karena secara internal pada tubuh udang mendapatkan antigen berupa imunostimulan dari probiotik *B. megaterium* dan *B. firmus*. Hal ini juga karena hemosit udang merupakan sel darah yang mempunyai peranan sangat penting dalam sistem tanggap kebal udang,

dan akan meningkat secara pesat apabila terjadi suatu infeksi (Tizard, 1988).

Hemosit merupakan salah satu komponen darah pada udang yang berfungsi sebagai pertahanan non-spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminir patogen melalui fagositosis (Anderson, 1992). Effendi et al., 2004 menambahkan bahwa hemosit meningkat karena adanya serangan patogen maka sel hemosit akan melakukan proses degranulasi, cytotoxicity dan lisis terhadap

material tersebut sehingga adanya pathogen yang menyerang akan merangsang pula untuk memproduksi sel-sel darah sebagai bentuk perlawanan pada pathogen.

Selain itu peningkatan THC disebabkan karena terjadinya lonjakan pernafasan pada udang vannamei. Menurut Castro *et al.* (2004) bahwa akan terjadi peningkatan yang maksimal pada *respiratory burst* (lonjakan pernafasan) pada ikan setelah dilakukan pemberian imunostimulan. Peningkatan jumlah THC pada udang karena hemosit disintesa mitosis oleh jaringan hematopoietic yang merupakan sepasang *epigastric nodule*. Produksi hemosit yang meningkat tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis setelah pemberian probiotik sebagai imunostimulan. Jaringan tersebut terletak tepat berada pada bagian depan (*anterior stomach*), merupakan tempat sintesa.

## KESIMPULAN

Penggunaan bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* dapat meningkatkan respon imun seluler pada udang vaname dengan nilai  $THC=11 \times 10^6$ .

Namun demikian masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui peranan enzim ekstraseluler khususnya protease yang dihasilkan oleh bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* terhadap aktivitas fagositosis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Feliatra., I. Effendi., E. Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Jurnal Natur Indonesia 6(2): 75-80 (2004) ISSN 1410-9379.
- Irianto, A. 2003. Probiotik Akuakultur. Gadjah Mada University Press. Hal 53- 56.
- Rodriguez, J., and G. Le Moullac, 2000. State of The Art of Immunological Tools and Health Control of Penaeid Shrimp. Aquaculture 191: 109-119
- Lopez, N., G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela, C. Pascual, A. Sanchez, & C. Rosas. 2003. Physiological, Nutritional, and Immunological Role of Dietary  $\beta$  1-3 Glucan and Ascorbic Acid 2-Monophosphate in *Litopenaeus vannamei* Juveniles. Aquaculture 224:223-243.
- Effendi, S; Alexander, R dan Akbar, T. 2004. Peningkatan Hemosit Benur Udang Windu (*Penaeus monodon Fabricus*) Pasca Perendaman Ekstrak Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) Pada Konsentrasi Yang Berbeda. Jurnal Sains dan Teknologi, Agustus 2004, Vol 14 No.2: 46-53.
- Maharanie, 2005. Pengaruh Peanambahan Bakteri Gram Positif Hasil Isolasi Dari Saluran Pencernaan Udang Dalam Pakan untuk Meningkatkan Daya Cerna dan Pertumbuhan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Thesis. Program Studi Budidaya Perairan. Minat Sumberdaya Hayati Perairan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi Bakteri Dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus. Disertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya Malang 117 Hal.
- Smith. D.M. D.M.A. Bufford, S.J. Tabrett, S.J. Irvin and L. Ward., 2002. The Effect Of Feeding Frequency On Water Quality and Growth of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Aquacultur. 207 (125-136).