

**PEMANFAATAN BAKTERI PROBIOTIK SEBAGAI IMUNOSTIMULAN
UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN SELULER PADA UDANG VANAMEI
(*Litopenaeus vannamei*)**

Agus Suryahman

Program Studi Budidaya Perairan STITEK Balik Diwa Makassar
Agus_almakassar@yahoo.co.id

ABSTRAK

Optimalisasi probiotik sebagai immuno-stimulan untuk meningkatkan respon kekebalan *Litopenaeus vannamei* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*, yang merupakan penyebab terjadinya penyakit pada udang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh bakteri probiotik, yang dapat memberikan pengaruh terbaik terhadap respon kekebalan udang vannamei yang dilakukan pada beberapa perlakuan. Penelitian dilaksanakan dalam 2 tahapan; (1) *In-Vitro* dan (2) *In-vivo*. Setiap tahapan dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiap perlakuan mengalami peningkatan respon kekebalan sebelum dan sesudah diuji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi*. Setelah uji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi* diperoleh respon kekebalan terbaik pada dosis 10^6 cell/ml/gram feed. Jumlah aktifitas fagositosis mencapai 10^6 cell/ml.

Kata Kunci : respon kekebalan, *Vibrio harveyi*, in-vivo, in-vitro, vannamei

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 patogen 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 patogen seperti nutrisi, kualitas air, racun, dan penanganan (Murdjani, 2002).

Didalam saluran pencernaan udang terjadi proses pencernaan nutrient 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 *Vibrio luminesens* 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.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakteri probiotik terhadap aktifitas fagositosis system imun seluler pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)

MATERI DAN METODE

Isolasi Bakteri

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

1. Sampel udang, air dan sedimen yang berasal dari tambak dibawa ke laboratorium menggunakan termos es.
2. Pembedahan udang yaitu bagian saluran pencernaan yang terdiri dari *foregut*, *midgut*, dan *hindgut* selanjutnya dilakukan penggerusan.
3. Sampel sedimen yang diambil dari 6 titik tambak kemudian dihomogenkan menjadi satu sampel
4. Sampel air yang diambil dari 6 titik juga dihomogenkan menjadi satu sampel
5. 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} dalam 9 ml akuades steril dan homogenkan dengan vortex (pengenceran 10^{-2}). Dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-9} .
6. 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°C selama 48 jam.
7. 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°C selama 24-48 jam (Lay, 1994).

Uji In-vitro

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

1. Biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* ditanam pada media agar TSA kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam sehingga pertumbuhan bakteri optimal, buat konsentrasi *Vibrio harveyi* dengan kepadatan 10^8 sel/ml berdasarkan optical density.
2. Penanaman bakteri *Vibrio harveyi* pada lempeng agar dilakukan dengan cara menspread sebanyak 1 ml bakteri *Vibrio harveyi* pada agar TSA. Kemudian diratakan dengan menggunakan kapas steril.
3. Isolat bakteri hasil isolasi diambil dan disentrifuge untuk mendapatkan supernatan.

Masing-masing kertas cakram steril ditetesi supernatan bakteri tersebut.

4. 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.
5. Pembacaan hasil dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 – 24 jam dengan cara mengukur daerah hambatan yang terbentuk disekitar kertas cakram (mm).
6. 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 *Vibrio alginolyticus* maka isolat bakteri tersebut bersifat bakteriostatik (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 (sekenyangan-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 *Vibrio harveyi* dilakukan dengan cara perendaman dengan kepadatan bakteri 10⁶ selama 6x24 jam.

Parameter Penelitian

Uji Aktifitas Fagositosis

Prosedur Perhitungan Aktifitas Fagositosis

1. 0,1 ml hemolim diambil dari tubuh udang dan dicampur dengan antikoagulan
2. Hemolim disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit 4°C.
3. Hemosit ditetaskan pada objek glas dan diratakan kemudian ditambahkan 0,1 ml latex beads (10⁸ beads/ml) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.
4. Objek glass difiksasi dengan glutaraldehide 2,5%
5. Objek glass dicuci dengan medium untuk menghilangkan sel yang tidak melekat, dikeringanginkan dan diwarnai dengan larutan giemsa, dibiarkan selama 20-30 menit dan dicuci dengan air mengalir
6. Objek glass diperiksa dengan mikroskop 400x dan dihitung untuk determinasi perbandingan

sel yang menelan latex. Aktifitas fagositosis dirumuskan dengan

$$\text{Aktifitas fagositosis} = \frac{SB}{SD} \times 100\%$$

Keterangan:

SB = Jumlah sel yang menelan beads

SD = Jumlah sel yang diamati

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

Berdasarkan perhitungan persentase fagositosis udang vaname setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Data Rerata Persentase Fagositosis Udang Vaname Sesudah Uji Tantang Dengan Bakteri *Vibrio harveyi* .

Perlakuan	Nilai Aktivitas Fagositosis
A(10 ⁴)	26,20
B(10 ⁵)	36,87
C(10 ⁶)	51,09
D(10 ⁷)	40,46
K-	9,78
K+	15,62

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai rerata persentase fagositosis udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan pemberian probiotik setelah diuji tantang dengan

Vibrio harveyi hasilnya adalah berbeda sangat nyata pada taraf (F hitung $> 0,01$). Dari hasil uji BNT setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* diperoleh hasil bahwa pemberian probiotik dari bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* dengan kepadatan 10^6 sel/ml memiliki nilai rerata persentase fagositosis tertinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lain dengan kepadatan bakteri yang berbeda dimana nilai persentase fagositosis dengan kepadatan bakteri 10^6 sel/ml setelah diuji tantang yaitu sebesar 51,09%, sedangkan nilai rerata persentase fagositosis dengan kepadatan 10^7 , 10^5 , dan 10^4 berturut-turut 40,46%, 36,87%, dan 26,20%.

Nilai persentase fagositosis ini meningkat dengan cepat setelah uji tantang bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif tanpa uji tantang yang hanya memiliki nilai persentase fagositosis 6,78% dan kontrol positif setelah uji tantang memiliki nilai persentase fagositosis 12,30%. Kenaikan nilai persentase fagositosis diduga bahwa semakin memacu pembentukan sel-sel darah udang terutama pada hemosit udang vannamei pada saat mendapatkan antigen dari imunostimulan berupa probiotik bakteri *B. megaterium* dan *B. firmus* dan akan meningkatkan kemampuan kerjanya ketika ada ransangan untuk melawan bakteri patogen dari *V. harveyi*.

Seperti dijelaskan bahwa Hemosit adalah sel darah udang yang memiliki fungsi sama seperti sel darah putih (leukosit) pada hewan vertebrate. Pada udang terdapat lectin yang berfungsi untuk melakukan penengenalan terhadap benda asing (*non self recognition*). Hemosit pada udang dapat dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu sel hyaline, semi granular dan granular dan ketiga tipe hemosit ini memiliki peranan penting dalam sistem imun

udang yaitu melalui proses fagositosis, encapsulasi, cytotoxicity dan melanisasi (Toban, 2008).

Menurut Menasaveta *et al*, 2000 bahwa dengan pemberian probiotik pada udang windu (*Penaeus monodon*) dan dilakukan uji tantang selama 10 hari, aktifitas fagositosis mengalami peningkatan. Persentase fagositosis meningkat dari 2,2% menjadi 10,5% sedangkan indeks fagositosis juga mengalami peningkatan setelah diuji tantang dengan *V. Harveyi* dari 0,1 menjadi 2,7 indeks fagositosis.

Kecendrungan peningkatan aktivitas fagositosis disinyalir merupakan indikator adanya kemampuan dalam mekanisme pertahanan non spesifik dalam melawan infeksi dan fagositosis merupakan salah satu dari mekanisme pertahanan diri berbentuk sel utama pada krustacea (Permana, 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan bakteri *Bacillus megaterium* dan *Bacillus firmus* sebagai probiotik dapat meningkatkan aktifitas fagositosis pada sistem imun seluler.

Saran

Perlunya dilakukan 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 β 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 cereviseae*) Pada Konsentrasi Yang Berbeda. Jurnal Sains dan Teknologi, Agustus 2004, Vol 14 No.2: 46-53.

Maharani, 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).