

**ANALISA AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA
UDANG WINDU (*Penaeus monodon Fabricus*)
YANG DIINFEKSI *Vibrio harveyi* PASCA PEMBERIAN
IMUNOSTIMULAN OMP *Vibrio alginolyticus***

Achmad Sudianto

Program Ilmu Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas PGRI Ronggolawe Tuban
Email: achmadsudianto@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim protease pada udang windu (*Penaeus monodon Fabricus*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* pascapemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus*. Dosis yang digunakan adalah 10 µg/kg bw, 20 µg/kg bw dan 30 µg/kg bw serta kontrol positif dan kontrol negatif sebagai pembandingan. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Hasil penelitian berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$), pada aktivitas enzim superoksida dismutase dan protease pada udang windu (*Penaeus monodon Fabricus*) yang diinfeksi *Vibrio harveyi* pasca pemberian imunostimulan OMP *Vibrio alginolyticus*. Aktivitas enzim protease berdasarkan uji BNT diketahui kontrol negatif tidak berbeda nyata dengan kontrol positif, dosis 10 µg/kg bw dan dosis 30 µg/kg bw (sig 0,430 sig 0,524 dan sig 0,116). Namun keempatnya berbeda nyata dengan dosis 20 µg/kg bw (sig 0,001), berdasarkan uji regresi diketahui 61,5% dosis OMP mempengaruhi aktivitas enzim protease, nilai rerata aktivitas enzim protease tertinggi yaitu pada perlakuan dosis 20 µg/kg bw sebesar 130,31 unit. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* yang optimal adalah 20 µg/kg bw.

Kata kunci : *Penaeus monodon Fabricus*, OMP, Protease

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the activity of protease enzymes in tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricus*) infected by *Vibrio harveyi* bacteria after giving immunostimulant made from OMP of *Vibrio alginolyticus*. The doses used were 10 µg / kg bw, 20 µg / kg bw and 30 µg / kg bw as well as positive control and negative controls as comparison. Each treatment was performed 3 replications. The results of the study based on the ANOVA test showed that there was a significant difference ($p < 0.05$) in the activity of superoxide dismutase and protease enzymes in tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricus*) infected with *Vibrio harveyi* after giving immunostimulant made from OMP of *Vibrio alginolyticus*. The activity of protease enzyme based on BNT test showed that negative control was not significantly different with positive control, dose 10 µg / kg bw and dose 30 µg / kg bw (sig 0.430 sig 0.524 and sig 0.110). However, the difference was significantly different with the dose of 20 µg / kg bw (sig 0.001), based on the regression test known 61.5% dose of OMP influenced the activity of protease enzyme, the mean value of the highest protease enzyme activity at treatment dose 20 µg / kg bw around 130.31 units. Based on the results of this study can be concluded that the dose of immunostimulant made from *Vibrio alginolyticus* bacteria reached optimal result on 20 µg / kg bw.

Keywords: *Penaeus monodon Fabricus*. OMP. Protease

PENDAHULUAN

Penyakit pada udang diklasifikasikan dalam 2 kelompok yaitu penyakit infeksi dan penyakit noninfeksi. Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen seperti parasit, jamur, bakteri dan virus yang dapat menular dari satu inang ke inang yang lain melalui air, sentuhan langsung antara inang, inang perantara, peralatan dan aktifitas manusia (Rodriguez dan Moulllac, 2000). Adapun penyakit non infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan non patogen seperti nutrisi, kualitas air, racun, dan penanganan (Murjani *et al.*, 2003). Pada saat terjadinya serangan patogen, yang pertama kali berperan dalam sistem pertahanan tubuh udang adalah kutikula yang memiliki kemampuan antimikroba melalui lendir yang dihasilkan. Pertahanan selanjutnya adalah hemosit yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan internal udang (Supamattaya *et al.*, 2000; Van de Braak, 2002).

Hemosit adalah sel darah udang yang memiliki fungsi sama

seperti sel darah putih (leukosit) pada hewan vertebrata. Hemosit pada udang dapat dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu sel hyaline, semigranular dan granular (Effendy *et al.*, 2004). Ketiga tipe hemosit ini memiliki peranan penting dalam sistem imun udang yaitu melalui proses fagositosis, encapsulasi, cytotoxicity dan melanisasi (Johansson *et al.*, 2000). Untuk mengaktifkan enzim protease maupun pembentukan ROS dalam proses fagositosis, diperlukan stimulan yang berasal dari luar tubuh udang yang dikenal dengan imunostimulan. Bahan stimulan yang dapat digunakan antara lain kelompok senyawa biologi seperti dinding sel bakteri, senyawa kompleks karbohidrat, ekstrak dari hewan dan tanaman obat, peptida, nukleotida dan bahan-bahan yang berasal dari produk sintetis (Raa, 2000; Citarasu *et al.*, 2006).

Kelompok *reactive oxygen* ini dihasilkan di vakuola fagositosis dan ketika dikeluarkan tidak menutup kemungkinan dapat merusak sel host. Untuk mencegah kerusakan tersebut, sel maupun

organisme menggunakan tiga strategi pertahanan. Yang pertama adalah dengan melibatkan antioksidan dengan berat molekul rendah antara lain ascorbate, α -tocopherol dan glutathione yang langsung berinteraksi dengan ROS untuk menetralkan. Dua pertahanan yang lain adalah melibatkan enzim yang berperan dalam metabolisme ROS (SOD, catalase dan glutathione peroxidase) atau memperbaiki kerusakan makromolekular menjadi asam nukleat, protein dan lemak (enzim perbaikan DNA, protease dan lipase) yang disebabkan oleh ROS (Holmblad and Soderhall, 1999)

OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan salah satu bahan potensial yang dapat digunakan sebagai imunostimulan karena bahan aktifnya mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dalam menghadapi serangan patogen pada ikan kerapu tikus (Maftuch, dkk., 2005). Beta Glukan dan LPS merupakan salah satu jenis protein dan polisakarida yang melimpah pada dinding sel bakteri yang mampu meningkatkan aktifitas fagositosis makrofage dan kekebalan

tubuh ikan Mas (*Cyprinus carpio*) menghadapi infeksi bakteri (Fujiki *et al.*, 1997).

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Reproduksi Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya dan Laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Prosedur penelitian

Persiapan Hewan Uji

Udang windu diperoleh dari tambak tradisional di Kecamatan Bangil Kabupaten Pasuruan dengan berat rata-rata 24,14 g sebanyak 75 ekor. Untuk proses aklimatisasi, udang dipelihara dalam bak plastik dengan kapasitas 50 l. Masing-masing bak berisi 5 ekor udang yang telah diadaptasi selama 24 jam. Selama masa pemeliharaan diberikan pakan komersil berupa pelet sebanyak 2x per hari dengan berat 10 % total biomass.

Imunisasi

Setelah adaptasi udang di imunisasi dengan sistim booster, booster ke 1 dilakukan pada hari pertama dengan mengimunisasi udang windu dengan dosis OMP 10 μ g, 20 μ g, dan 30 μ g dengan menggunakan adjuvant complete, dan diadaptasikan kembali selama 7 hari, selanjutnya booster ke 2 dilakukan dengan mengimunisasi kembali udang windu dengan dosis OMP 10 μ g, 20 μ g, dan 30 μ g dengan menggunakan adjuvant incomplete dan diadaptasikan kembali hingga hari ke-14. Selanjutnya diuji tantang dengan menggunakan bakteri *Vibrio harveyi* kepadatan 10⁷ dengan metode perendaman. Setelah 24 jam pasca infeksi dilakukan pengamatan dan pengambilan hemolimf untuk dilakukan analisa terhadap aktivitas enzimprotease. Masing-masing kontrol dan perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analysis of Variance (ANOVA) dengan SPSS 16 for windows. Uji

lanjutan dengan menggunakan Duncan test.

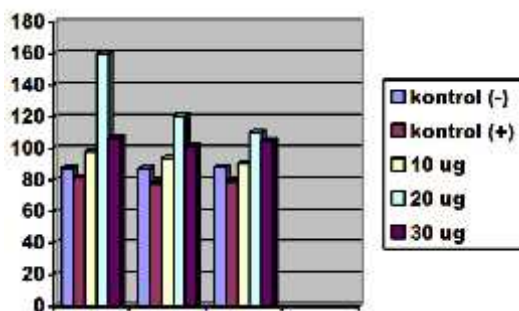
HASIL

Enzim Protease

Aktivitas enzim protease dinyatakan dalam unit aktivitas dimana 1 unit aktivitas protease didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang mampu membebaskan 1 μ g tirosin ekivalen setiap menit pada kondisi analisa. Penghitungan aktivitas enzim protease pada hemosit udang windu dilakukan setelah 24 jam pasca infeksi bakteri *Vibrio harveyi* (setelah pemberian imunostimulan). (Tabel 2). Aktivitas Enzim Protease Pada Hemosit Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr) Pasca Pemberian Imunostimulan OMP Bakteri *Vibrio alginolyticus* dan di Uji Tantang Dengan Bakteri *Vibrio harveyi*. (Tabel 1).

Tabel 1. Aktivitas Enzim Protease Pada Hemosit Udang Windu (*Penaeusmonodon Fabr*) Pasca Pemberian Imunostimulan OMP Bakteri *Vibrio alginolyticus* dan di Uji Tantang Dengan Bakteri *Vibrio harveyi*.

Perlakuan	Aktivitas enzim protease (unit)		
	A	B	C
Kontrol (-)	87.5861	87.0132	88.1024
Kontrol (+)	81.6360	77.9548	78.8776
10 µg	97.9595	93.6552	90.5290
20 µg	160.2039	120.7053	110.0300
30 µg	106.7621	101.7580	104.8658



Gambar 1. Pola Perubahan Aktivitas Enzim Protease Pada Hemosit Udang Windu (*Penaeus monodon Fabr*) Pasca Pemberian Imunotimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* dan Uji Tantang Bakteri *Vibrio harveyi*.

PEMBAHASAN

Fagositosis merupakan proses penting pada sistem pertahanan seluler udang windu. Saat terjadinya penelanan mikroorganisme oleh hemosit akan diikuti dengan

dihasilkannya beberapa bahan antimikroba. Salah satu substansi tersebut adalah kelompok *reactive oxygen* yang terdiri atas anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), ion hidroksida (OH^-) dan oksigen (O_2). Meskipun oksigen merupakan komponen penting bagi organisme aerob tapi dapat juga menjadi toxic ketika substansi *reactive oxygen* tersebut dihasilkan pada saat proses respirasi (Campa-Cordova *et al.*, 2002).

Radikal bebas sangat diperlukan bagi kelangsungan beberapa proses fisiologis dalam tubuh, terutama untuk transportasi elektron. Namun, radikal bebas yang berlebihan dapat membahayakan tubuh karena dapat merusak makromolekul dalam sel seperti karbohidrat, protein, DNA dan sebagainya. Kerusakan makromolekul selanjutnya dapat mengakibatkan kematian sel (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Kelompok *reactive oxygen* ini dihasilkan di vakuola fagositosis dan ketika dikeluarkan tidak menutup kemungkinan dapat merusak sel host. Untuk mencegah

kerusakan tersebut, sel maupun organisme menggunakan tiga strategi pertahanan. Yang pertama adalah dengan melibatkan antioksidan dengan berat molekul rendah antara lain ascorbate, a-tocopherol dan glutathione yang langsung berinteraksi dengan ROS untuk menetralkan. Dua pertahanan yang lain adalah melibatkan enzim yang berperan dalam metabolisme ROS (SOD, catalase dan glutathione peroxidase) atau memperbaiki kerusakan makromolekul menjadi asam nukleat, protein dan lemak (enzim perbaikan DNA, protease dan lipase) yang disebabkan oleh ROS (Holmblad and Soderhall, 1999). Superoksida dismutase merupakan enzim yang berada dalam cairan intraseluler yang berpartisipasi pada proses degradasi senyawa radikal bebas intraseluler. Enzim ini mempunyai sebuah atom oligo elemen pada sisiaktifnya. Superoksida dismutase mengkatalisis dismutasi O_2^- menjadi H_2O_2 . Enzim ini menghambat kehadiran simultan dari O_2 dan H_2O_2 yang berasal dari pembentukan radikal hidroksi (OH).

Hasil uji Anova (*Analysis of Variance*) menunjukkan bahwa nilai rerata aktivitas enzim protease udang windu (*Penaeus monodon* Fabr) pasca pemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* adalah berbeda nyata ($p < 0,05$). Uji Duncan menunjukkan bahwa pemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* dosis 20 μ g mempunyai nilai rerata aktivitas enzim protease tertinggi dari kelima perlakuan yaitu 130,31 unit, sedangkan rerata aktivitas enzim protease pada pemberian dosis 30 μ g, 10 μ g, dan kontrol positif adalah 104,46 unit, 94,047 unit, 87,567 unit atau secara statistik dianggap tidak berbeda nyata, tetapi berbeda nyata dengan kontrol negatif yaitu 79,489 unit.

Saat terdapat antigen yang masuk, hemosit akan melakukan proses degranulasi dan akan menghasilkan beberapa protein. Salah satu diantaranya adalah enzim protease. Enzim ini memiliki peranan sebagai enzim lisosom dan aktivator prophenol oksidase menjadi enzim phenol oksidase (Van de Braak, 2002).

Setelah pemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus*, rerata aktivitas enzim protease pada hemosit mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Dalam keadaan tidak aktif enzim protease ini akan berada di dalam hemosit sebagai *inactive serine proteinase* (pppA). Saat terdapat antigen yang masuk, hemosit (granula dan semi granula) akan melakukan ikatan dengan material tersebut selanjutnya mengirimkan “*signal*” biokimia dan molekul untuk aktivasi enzim protease tersebut menjadi *Prophenoloksidase activating enzim* (ppA). PpA selanjutnya akan berperan sebagai aktivator dalam proses aktivasi Prophenoloksidase (Propo) menjadi enzim Phenoloksidase (PO). Aktivasi tersebut akan diikuti dengan proses oksidase phenol menjadi quinon, yang merupakan senyawa antibakteri yang dapat membasmi patogen (Smith *et al.*,2003).

Yeh *et al* (2005) menyatakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim Phenoloksidase pada udang *Litopenaeus vannamei* pasca

pemberian imunostimulan. Peningkatan ini diduga sebagai akibat meningkatnya aktivitas enzim protease yang merupakan aktivator pembentukan enzim Phenoloksidase tersebut. Bahgat *et al* (2002) dalam penelitiannya untuk mengetahui sensitifitas enzim protease dan phenoloksidase pada hemosit *Biomphalaria glabrata* terhadap perubahan pH melaporkan bahwa meningkatnya aktivitas enzim serine protease diikuti pula dengan meningkatnya aktivitas enzim phenoloksidase.

Setelah uji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi* selama 24 jam, terjadi peningkatan aktivitas enzim protease pada hemosit dengan rerata untuk sampel yang diberi imunostimulan masih lebih tinggi dibandingkan kontrol. Perubahan aktivitas enzim protease tersebut diperkirakan berhubungan dengan proses fagositosis yang dilakukan sel hemosit. Bersama-sama dengan enzim lysosom lainnya yaitu lysozyme, esterase, phosphatase, phospholipase dan peroxidase, enzim ini akan berperan sebagai antibakterial. Di dalam hemosit juga

terdapat enzyme inhibitor antara lain α_2 -macroglobulin, Kazal, Serpin dan pacifastin yang berperan mengendalikan lonjakan aktivitas enzim protease dan mencegah terjadinya over aktivasi yang dapat merusak jaringan host itu sendiri (Van de Braak, 2002).

KESIMPULAN

1. Pemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* pada udang windu (*Penaeus monodon* Fabr) berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease.
2. Dosis pemberian imunostimulan OMP bakteri *Vibrio alginolyticus* yang optimal untuk meningkatkan aktivitas enzim protease udang windu (*Penaeus monodon* Fabr) adalah 20 μ g.

DAFTAR PUSTAKA

Bahgat,M, M. Doenhoff, M,Kirschfink and A.Ruppel. 2002. Serine Protease and Phenoloksidase Activities in Hemocytes of *Biomphalaria glabrata* Snails With Varyumh Susceptibility to Infection With The Parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* (2002) 88 : 489-494.

Campa-Cordova, A.I, N. Y. Hernandez Saavedra, R. De Philippis and F. Ascencio. 2002. Generation of Superoxide Anion and SOD Activity in Haemocytes and Muscle of American White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a Response to β -glucan and Sulphated Polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, (2002) : 353–366

Effendy, S; Alexander .R dan Akbar .T. 2004. Peningkatan Haemosit 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.

Fujiki, K., Shin, D.-H., Nakao, M., Yano, T., 1997. Effects of NCarrageenanon The Non-Specific Defense System of Carp *Cyprinus carpio*. *Fish. Science***62**, 934–938.

Holmblad, T and K. Soderhall. 1999. Cell Adhesion Molecules and Antioxidative Enzymes in acrustacean, Possible Role in Immunity. *Aquaculture***172**(1999): 111–123

Johansson, M.W, T. Holmblad, P.O Thornqvist, M. Cammarata, N.Parrinello and K. Soderhall. 2000.A Cell-Surface Superoxide Dismutase is a Binding Protein for

- Peroxinectin, a Celladhesive Peroxidase in Crayfish. Abstracts *J. Cell Sci.* **112**:917-925.
- Maftuch. 2005. *Outer Membran Protein (Omp) Vibrio alginolyticus Sebagai Vaksin Untuk Mengendalikan Penyakit Vibriosis Yang Disebabkan V. alginolyticus Pada Ikan Kerapu Tikus Di Perairan*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Wresdiyati T, Makita T. 1995. Remarkable increase of peroxisomes in the renal tubule cells of Japanese monkeys under fasting stress. *Pathophysiol* 2: 177-182
- Murjani, M. Nur'aini, Y.I dan Triastutik, G. 2003. *Hama Penyakit Ikan dan Udang Pada Usaha Pembenihan*. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Situbondo. 13 hal.
- Raa, Jan. 2006. *The Use of Immune Stimulants in Fish and Shellfish Feeds*. *Avances en Nutricion Acuicola* V. memoras del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 19-22 Nopember 2000. Merida, Yucatan. Mexico.
- Smith, V. J., JH. Brown, and C. Hautono. 2003. Immunostimulation in Crustaceans: does it really Protect Against Infection *Fish and Shellfish Immunology*. p. 71-90
- Rodriguez, J., and G. Le Moullac, 2000. State of The Art of immunological Tools and Health Control of Penaeid Shrimp. *Aquaculture* 191:109–119.
- Van de Braak, K. 2002. *Haemocytic Defence in Balck Tiger Shrimp (Penaeus monodon)*. PhD Thesis, Wageningen University. Netherland.
- Yeh, ST, Chiu S. Lee and Juann C.C. 2005. Administration of Hot Water Extract of Brown Seaweed *Sargasum duplicatum* Via Immersion and Injection Enhances The Immune Resistance of White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*(2006) : 332-345