

Diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam Formula Pakan Meningkatkan Respon Imun Seluler Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Arning Wilujeng Ekawati^{1*}, Happy Nursyam², Edi Widjayanto³, Marsoedi²

¹Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya

²Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya

³Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan dosis yang terbaik pada pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan terhadap peningkatan respon imun seluler udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Sebagai perlakuan adalah pemanfaatan *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan iso protein 39,02% dan iso energy 3,58 kkal/g pakan dengan dosis yang berbeda yaitu: A (0%), B (3,04%), C (6,08%) dan D (9,12%). Parameter yang diamati adalah total hemosit, total diferensial hemosit (hyaline, semi granular dan granular), dan aktivitas *vibriocidal*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan dapat meningkatkan respon imun seluler, dan dosis terbaik berkisar 5,15% - 6,51%.

Kata kunci: *Chaetoceros ceratosporum*, respon imun seluler, udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Abstract

The aims of the experiment is to assess the effect and the best dose of *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula on cellular immune response of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). This research applied Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatments and 3 replications. The treatment was the use of *Chaetoceros ceratosporum* diatomae in feed formula (iso protein, 39.02% and iso energy 3.58 kcal/g diet) with different numbers, i.e. treatment A=0%; B=3.04%; C=6.08%; D=9.12%. The observed parameters were Total Haemocyte Count (THC), Total Hyaline Cells (H), Total Semi Granular cells (SG), Total Granular Cells (G), Total Plasma Protein (TPP), protease enzymes activity, superoxide anions and vibriocidal activity. The result showed that *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula affect the increase of cellular immune response of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). The best dose ranged from 5.15 % - 6.51% in feed formula.

Key words: *Chaetoceros ceratosporum*, cellular immune response, *Penaeus monodon* Fab.

PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) adalah termasuk krustase yang hanya memiliki sistem imun nonspesifik dalam mempertahankan tubuhnya terhadap

serangan patogen. Komponen sistem imun non spesifik pada udang windu meliputi fisik, seluler dan humoral [1]. Selanjutnya dijelaskan bahwa pertahanan fisik yang berperan sebagai pertahanan terluar pada udang adalah kulit, sedangkan sistem imun seluler terdiri dari Hemosit dan *fixed phagocytes* (sel yang tidak bergerak yang tersebar pada insang, jantung, dan jaringan pengikat). Faktor pertahanan humoral seperti protein penggumpalan, aglutinin (seperti

* Alamat korespondensi:

Arning Wilujeng Ekawati

Email: ar_ning2000@yahoo.com

Alamat : Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

lektin), enzim hidrolitik dan peptide antimikroba yang dihasilkan oleh dan akibat aksi sel imun [2].

Hemosit memegang peranan penting dalam respon seluler pertahanan tubuh udang yang meliputi fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, cytotoksitas dan komunikasi antar sel. Berdasarkan ada tidaknya granula sitoplasma, hemosit dibagi menjadi 3 jenis yaitu sel hyalin, sel semi granular dan sel granular [2,3,4].

Peningkatan pertahanan tubuh terhadap serangan penyakit tidak hanya dapat dilakukan dengan pemberian pakan dengan komposisi nutrisi yang seimbang, melainkan dapat juga disertai pemberian imunostimulan dalam pakan. Imunostimulan berhubungan langsung dengan sel sistem imun yang membuat sel tersebut lebih aktif. Pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) dengan pemberian imunostimulan *bacterin vibrio* dan *glucan* dari *yeast* dapat meningkatkan aktifitas sistem pro-phenoloxidase (pro-PO) pada udang [5]. Pemberian pakan alami diatomae *Chaetoceros ceratosporum* juga dapat meningkatkan daya tahan larva udang windu terhadap paparan bakteri *Vibrio harveyi* [6,7], namun perandiatomae ini sebagai imunostimulan masih perlu diteliti lebih lanjut. Diduga *C. ceratosporum* mengandung β -(1-3)-glucan yang dapat berperan sebagai imunostimulan. Storshet *et al.* [8,9] telah membuktikan adanya struktur β -D-(1-3)-glucan pada *Chaetoceros mulleri*. Selanjutnya Storshet *et al.* [10] juga membuktikan struktur β -D-(1-3,1-6)-glucan pada *Chaetoceros debilis*. Penelitian-penelitian tersebut membuktikan bahwa berbagai jenis diatomae mengandung glucan dengan struktur yang berbeda, dimana glucan ini dapat berperan sebagai imunostimulan. Oleh karena pengukuran respon imun dapat dilakukan dengan mengambil hemolim udang, dimana pada penelitian ini dilakukan pada tingkat pasca larva.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan dosis yang terbaik pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan terhadap peningkatan respon

imun seluler pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: udang windu (*Penaeus monodon* Fabricus), bahan untuk formula pakan, *Chaetoceros ceratosporum* kering, bakteri *Vibrio harveyi* dan air laut bersalinitas 30 ppt untuk media pembudidayaan. Bahan-bahan kimia untuk kultur pakan alami, kultur bakteri, analisis proksimat bahan pakan dan bahan kimia untuk analisis respon imun.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak kultur makanan alami, bak pemeliharaan udang beserta perlengkapan pemeliharaan (aerasi), peralatan kultur bakteri, peralatan analisis proksimat bahan pakan, pembuatan pakan, uji kualitas air.

Sesuai dengan tujuan penelitian yang ingin dicapai maka penelitian ini dilaksanakan dalam 2 tahap, yaitu Tahap I: Evaluasi komposisi kimia bahan pakan standar (tepung rebon dan tepung tapioka) dan *Chaetoceros seratosporum* kering. Tahap ini meliputi penentuan Kadar air dengan oven, Protein dengan metode Kjeldhal, lemak dengan metode soxhlet, abu dengan metode pengabuan sampai suhu 600°C.

Formulasi pakan untuk udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) memanfaatkan *Chaetoceros seratosporum* yang telah diketahui komposisi kimianya dengan berbagai dosis. Tahap II adalah uji formula pakan skala Laboratorium untuk respon imun (*Penaeus monodon* Fab.) dengan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap.

Tahap I

Membuat formula pakan dengan kadar protein 39.02% dan kadar energi 3.58 kkalg⁻¹ pakan sesuai hasil penelitian terdahulu [11] sebagai formula pakan dasar dan memanfaatkan *Chaetoceros ceratosporum* sebagai salah satu bahan dalam formula pakan dengan jumlah yang berbeda (Tabel 1 dan 2). Analisis proksimat ulang pakan membuat ukuran pakan sesuai ukuran udang (*crumble*).

Tabel 1. Komposisi bahan pakan percobaan

Analisis	Tepung Rebon	Tepung Plankton	Tepung Tapioka
Kadar Kering (%)*	86,34	85,38	89,4
Protein (%)*	62,98	3,99	-
Lemak (%)*	1,59	0,29	-
Kadar Abu (%)*	17,05	66,84	0,59
Serat Kasar (%)*	3,01	2,61	-
BETN **	15,37	26,26	99,41
Energi (kkal/gr) **	327,69	123,65	397,64

Keterangan :

* : Hasil Analisis Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

** : BETN = 100 – Protein – Lemak - Kadar Abu - Serat Kasar.

*** : Energi = (4 x Protein) + (9 x Lemak) + (4 x BETN).

Tabel 2. Formula pakan pakan percobaan udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Bahan	Perlakuan			
	A (0%)	B (3,04%)	C (6,08)	D (9,12%)
Tepung rebon	61,96	61,96	61,96	61,96
Tepung tapioka	15,77	14,38	13,88	12,93
Tepung <i>C. ceratosporum</i>	-	3,04	6,08	9,12
Minyak ikan	3,75	3,75	3,75	3,75
Minyak jagung	6,50	6,50	6,50	6,50
Vitamin miks	2,70	2,70	2,70	2,70
Mineral miks	2,00	2,00	2,00	2,00
CMC	7,32	5,22	3,13	1,02
Total	100	100	100	100

Tahap II

Uji *in vivo* pakan percobaan

Udang windu (rata-rata 21.51 ± 0.95 g/ekor) diperoleh dari petani tambak dusun Kepperan, Desa Pecinan, Kecamatan Mangaran Kabupaten Situbondo dan dipilih udang yang sehat. Udang windu dipelihara pada akuarium berukuran $45 \times 45 \times 45 \text{ cm}^3$ yang diisi air bersalinitas 30 ppt setinggi 30 cm. Masing-masing akuarium diisi 4 ekor udang.

Pada percobaan ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan formula pakan yang memanfaatkan *Chaetoceros seratosporum* dalam formula pakan dengan jumlah yang berbeda (Tabel 2). Perlakuan A = 0%; B = 3.04% C = 6.08%; D = 9.12%. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Jumlah pemberian pakan 3% berat badan per hari yang diberikan pada pukul 08.00 WIB, 16.00 WIB, dan 21.00 WIB, masing-masing sebanyak 30%, 30% dan 40% dari jumlah pemberian per hari. Lama pemeliharaan 30 hari. Penempatan akuarium percobaan dapat dilihat pada Gambar 1.

D	A	C	B	A	B	C	D	B	C	A	D
2	3	1	3	1	2	3	3	1	2	2	1

Gambar 1. Penempatan akuarium percobaan

Keterangan: A, B, C, D = perlakuan
1,2,3 = ulangan

Setelah *P. monodon* dipelihara selama 30 hari, dilakukan pemaparan *V. harveyi* yaitu dengan cara menginjeksikan 10^6 sel ml^{-1} bakteri sebanyak 50 μl secara intramuscular /IM pada bagian ventral di antara abdomen ke 2 dan 3. Pada akhir percobaan pada masing-masing perlakuan sebelum dan sesudah infeksi *Vibrio harveyi* dilakukan pengambilan hemolim udang menggunakan spet (1ml#26) yang telah berisi antikoagulan 10% sodium citrat, pH 7.2 dengan perbandingan hemolim dan antikoagulan 1:1 di bagian kaki jalan ketiga. Selanjutnya hemolim ini digunakan untuk pengamatan terhadap Total Hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), *Differential Haemocyte Count (DHC)* yang terdiri dari sel hyalin (H), sel semi granular (SG) dan sel granular (G); dan Aktivitas *Vibriocidal*.

Kultur Bakteri Vibrio harveyi

Sterilisasi ose lengkung dengan pemanasan di atas bunsen hingga pijar. Setelah ose dipastikan dingin diambil bakteri *Vibrio* dari stock dengan cara menyentuhkan ujung ose pada stock. Goreskan di permukaan media TCBSA, dengan metode *streaking* kuadran untuk mendapatkan koloni terpisah. Inkubasikan media 30°C selama 24 jam. Koloni murni yang tumbuh diidentifikasi ulang untuk memastikan spesies bakteri. Setelah terbukti spesies *Vibrio harveyi*, dilakukan kultur pengkayaan untuk memproduksi dalam jumlah yang besar.

Prosedur Pengkayaan

Dengan ose steril ambil koloni murni, masukkan ke dalam erlemeyer yang berisi media cair TSB+. Tutup erlemeyer kembali dengan kapas steril, masukkan ke dalam *shaker waterbath*. Inkubasikan pada suhu 30°C dengan kecepatan *shaking* 100 rpm selama 2 x 24 jam. Amati hasil kultur pastikan tidak ada kontaminasi dengan pewarnaan gram dan dilihat di bawah mikroskop. Kemudian kepadatan bakteri kultur ditera dengan Mc Farland. Dari hasil pengukuran OD (*Optical Dencity*) dilakukan pengenceran sesuai dengan kepadatan bakteri yang diinginkan.

Persiapan Plasma Supernatant (PS) dan Haemocyte Lysate Supernatant (HLS)

Untuk mendapatkan HLS dilakukan menggunakan metode Sahoo *et al.* [12]. Hemolim sebanyak 200 µL diambil menggunakan mikropipet kemudian masukkan ke tabung eppendorf 1,5 ml. Hemolim selanjutnya disentrifuse pada 2.300 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil sebagai plasma supernatant (PS), kemudian pelet ditambahkan 0,01 M Phosfat Buffer Saline (PBS) pH 7,0 sebanyak 100 µL dan disentrifuse kembali pada 2.300 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet yang didapatkan diresuspensi dengan 0,01 M PBS pH 7,0 sebanyak 1 ml dilanjutkan dengan homogenisasi dan sentrifuse pada 4.000 rpm suhu 4°C selama 30 menit. PS dan HLS yang

didapatkan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk uji aktivitas vibriocidal.

Hemosit

Total Haemocyte Count (THC) dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x sebagai berikut:

$$THC = \frac{\text{Jumlah sel yang dihitung}}{\text{jumlah bidang pandang}} \times 10^4 \times \text{faktor pengencer}$$

Pengamatan jumlah sel differensial hemosit (hyalin, semi granular dan granular) dalam persentase berdasarkan kriteria morfologi dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1.000 X [2].

Aktivitas Vibriocidal

Aktivitas vibriocidal diukur menurut prosedur modifikasi [13]. *Vibrio harveyi* dikultur pada *Tryptic Soy Broth* (TSB) pada suhu 30°C selama 24 jam. Bakteri disentrifuse kecepatan 4.000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C dan dicuci dengan PBS dan diresuspensi sampai volume semula. 1 µl suspensi bakteri ditambahkan ke 100 µl PS atau HLS udang kemudian diinkubasi selama 1 jam. Selanjutnya diencerkan sampai 100 kali dengan PBS dan dikultur pada media agar (TSA) setelah 24 jam pada 30°C, koloni yang tumbuh dihitung. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus:

$$= 100 - \left[\frac{\text{cfu/ml pada udang yang telah mendapat perlakuan}}{\text{cfu/ml pada udang yang tidak mendapat perlakuan}} \right] 100\%$$

Data total Hemosit, sel hyalin, sel semi granular, sel granular dan aktivitas *vibriocidal*, dianalisis menggunakan sidik ragam. Responnya diuji dengan uji F [14].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Hemosit (Total Haemocyte Count/THC)

Berdasarkan hasil pengamatan Total Hemosit udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi* adalah seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Total hemosit udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) pasca diberi pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*

Perlakuan	Total Hemosit (10^6 sel ml^{-1})	
	Sebelum infeksi <i>V. harveyi</i>	Sesudah infeksi <i>V. harveyi</i>
A	35,40 ± 4,15a	20,93 ± 2,03a
B	60,75 ± 3,030c	48,37 ± 2,36c
C	66,85 ± 0,30d	59,03 ± 0,20d
D	50,98 ± 2,30b	39,88 ± 2,39b

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar perlakuan pada taraf kepercayaan 95%.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan memberikan pengaruh terhadap total hemosit udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan, sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*. Masing-masing antar perlakuan A, B,C, dan D berbeda .

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total hemosit udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadratik dengan persamaan:

$$Y = -1,115 X^2 + 11,90 X + 35,26; R^2 = 0,95$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* yang menghasilkan total hemosit tertinggi sebesar $67,05 \times 10^6$ sel/ml pada udang windu adalah 5,34% dalam formula pakan.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total hemosit udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadratik dengan persamaan:

$$Y = -1.260 X^2 + 13.71 X + 20.28; R^2 = 0,90$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total hemosit tertinggi sebesar $57,59 \times 10^6$ sel/ml pada udang windu adalah 5.44%.

Total Hemosit Differensial (Differential Haemocyte Count/DHC)

Berdasarkan hasil pengamatan Total Hemosit Differensial (sel hyalin, semi granular dan granular) pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi* adalah seperti yang tertera pada Tabel 4.

Dari Tabel 4 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan tidak memberikan pengaruh terhadap total sel hyalin udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan, sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*.

Tabel 4. Total sel Hyalin (H), Semi Granular(SG) dan Granular (G) udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) pasca diberi pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*

Hemosit Differensial	Perlakuan			
	A	B	C	D
Sebelum diinfeksi				
Total sel H (%)	30 ± 5 a	26,33 ± 3,21a	23±1,73a	26,67±1,15a
Total sel SG (%)	26,33±4,16c	13,33±5,69a	11,00±2,00a	20,00±1,73b
Total sel G (%)	43,67±3,51a	60,33±2,52a	66,00±1,00b	53,33±2,89a
Sesudah diinfeksi				
Total sel H (%)	28,67±5,03a	35,00±3,00a	32,67±2,52a	30,00±2,00a
Total sel SG (%)	35,33±5,13c	10,00±5,00a	3,00±2,65a	19,67±0,58b
Total sel G (%)	36.00±1.73a	55.00±2.00b	64,33±0,58c	50,67±1,15b

Total sel semi granular udang windu sebelum infeksi *V. harveyi* pada perlakuan A berbeda dengan B, C, dan D, namun B dan C tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel semi granular udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = 0,595 X^2 - 6,129 X + 26,36; R^2 = 0,76$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel semi granular terendah sebesar 10,58% pada udang windu adalah 5,15%.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel semi granular udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = 1,136 X^2 - 12,13 X + 35,60; R^2 = 0,76$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel semi granular terendah sebesar 3,18 % pada udang windu adalah 5,34%.

Total sel granular udang windu sebelum infeksi *V. harveyi* pada perlakuan C berbeda dengan B, C, dan D, sedangkan A, B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel granular udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -0,793 X^2 + 8,377 X + 43,3; R^2 = 0,99$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel granular tertinggi sebesar 65,41% pada udang windu adalah 5,28%.

Total sel granular udang windu sesudah infeksi *V. harveyi* pada perlakuan C berbeda dengan B, C, dan D, namun B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel granular udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -0,833 X^2 + 9,813 X + 35,33, R^2 = 0,92$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel granular tertinggi sebesar 62,58% pada udang windu adalah 5,55%.

Aktivitas *Vibriocidal*

Berdasarkan hasil uji aktivitas *vibriocidal* pada *Plasma Supernatan* (PS) dan *Haemocyte Lysate Supernatant* (HLS) udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari Tabel 5 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan memberikan pengaruh terhadap aktivitas *vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan.

Tabel 5. Aktivitas *Vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Perlakuan	Aktivitas <i>Vibriocidal</i> (%)	
	PS	HLS
A (0 %)	0a	0a
B (3,04 %)	68,12 ± 0,96b	77,71±5,79b
C (6,08 %)	84,85 ± 3,11c	88,35±1,19c
D (9,12 %)	69,39 ± 1,47c	84,14±0,72b

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar perlakuan pada taraf kepercayaan 95%.

Aktivitas *vibriocidal* pada PS udang windu menunjukkan bahwa perlakuan C berbeda dengan A dan B tetapi tidak berbeda dengan D, sedangkan pada HLS perlakuan C berbeda dengan A, B dan D, namun B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan aktivitas *vibriocidal* pada PS udang windu (Y) berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -2,263 X^2 + 28,04 X + 0,956; R^2 = 0,99$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan aktivitas *vibriocidal* tertinggi sebesar 87,85% pada PS udang windu adalah 6,20%.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan aktivitas *vibriocidal* pada HLS udang windu (Y) berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -2,216 X^2 + 28,86 X + 2,610; R^2 = 0,97$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C.ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan aktivitas *vibriocidal* tertinggi sebesar 96,60% pada HLS udang windu adalah 6,51 %.

Pembahasan

Total hemosit udang windu (Tabel 4) menunjukkan bahwa perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan lebih tinggi daripada tanpa *C. ceratosporum*. Berdasarkan hasil penelitian hemosit udang windu tertinggi sebesar $67,05 \times 10^6$ sel/ml diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan sebesar 5,34 %. Total hemosit yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan yang diperoleh van de Braak *et al.* [15] yaitu sebesar $50,9 \times 10^6 \pm 17,7 \times 10^6$ sel/ml. Hasil ini sejalan dengan penelitian Yeh *et al.* [16] yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah hemosit pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*) pasca pemberian ekstrak *Sargassum duplicatum* baik melalui perendaman maupun injeksi.

Hemosit disintesis oleh oleh jaringan *hematopoietic* yang merupakan sepasang *epigastric nodule*. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis pasca introduksi imunostimulan. Jaringan tersebut terletak tepat di bagian dorsal pada lambung bagian depan (*anterior stomach*), merupakan tempat sintesa hemocyanin. Bila imunostimulan dapat meningkatkan hemocyanin, maka secara langsung akan terjadi pula peningkatan hemosit [17].

Setelah uji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi* selama 24 jam, terjadi penurunan jumlah hemosit pada semua perlakuan dengan rerata untuk perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan lebih tinggi daripada tanpa *C. ceratosporum*. Nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan 5,44% dengan total hemosit sebesar $57,59 \times 10^6$ sel ml^{-1} . Hal ini sesuai dengan van de Braak [2] bahwa total hemosit menurun setelah diinfeksi bakteri *Vibrio anguillarum*. Selama periode pembersihan bakteri dari sirkulasi, THC lebih rendah, hal ini menandakan adanya aktivitas pertahanan.

Jumlah hemosit udang dapat menurun apabila kondisi lingkungan memburuk, misalnya rendahnya kandungan oksigen terlarut, suhu dan salinitas, atau terdapatnya serangan patogen [1]. Selanjutnya hemosit baru perlu pengganti dan diproduksi secara proporsional dan diyakini bahwa hemosit dikeluarkan secara kontinyu,

walaupun pada laju yang bervariasi, dari jaringan hematopoietik. Jaringan tersebut telah diidentifikasi pada beberapa spesies krustase.

Saat terjadinya serangan patogen, sel hemosit akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut. Dengan demikian jumlah sel hemosit yang beredar dalam hemolim akan terlihat menurun. Hasil proses degranulasi adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis [17].

Lectin atau agglutinin adalah protein pada hemolim yang memiliki peranan penting saat terdapatnya antigen yang masuk ke dalam tubuh. Komponen ini akan berikatan dengan karbohidrat yang terdapat pada dinding sel patogen atau benda asing yang disebut sebagai *agglutinas*. Reaksi akan diikuti dengan eliminasi benda asing tersebut melalui proses fagositosis, melanisasi oleh enzim phenoloksidase dan lonjakan respirasi (*respiratory burst*) [1].

Hemosit memiliki peran yang penting pada sistem pertahanan imunitas. Pertama, hemosit menghancurkan partikel/benda asing dalam *haemacoel* melalui fagositosis, enkapsulasi, agregat nodulasi, melanisasi, cytotoksitas dan komunikasi antar sel [3, 4,18]. Kedua, hemosit memiliki andil dalam penanganan luka lewat reaksi seluler dan yang mengawali proses koagulasi dengan membawa dan melepaskan sistem *prophenoloksidase* (proPO). Ketiga, hemosit terlibat dalam pembentukan dan perombakan molekul-molekul penting dalam hemolim seperti α_2 -macroglobulin (α_2M), agglutinin dan peptide antimicrobial.

Pada kasus ini, udang yang diberi pakan yang mengandung *C. ceratosporum* terbukti meningkatkan jumlah THC udang windu. Seiring dengan peningkatan total hemosit udang, sistem kekebalan tubuh udang juga akan meningkat sehingga tingkat serangan infeksi bakteri *V. harveyi* dapat tereduksi. Namun demikian, ketika pemberian pakan yang mengandung *C. ceratosporum* melebihi batas kemampuan tubuh untuk meresponnya justru akan menjadi imunostresor yang dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh udang.

Berdasarkan pengamatan total differensial hemosit (Tabel 5) terlihat bahwa secara keseluruhan nilai paling tinggi adalah sel granular, diikuti Sel hyalin dan sel semi granular. Total sel Hyalin untuk semua perlakuan tidak berbeda. Total sel semi granular terendah sebesar 10,58% pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,15%, sedangkan total

sel granular tertinggi sebesar 65,41% diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,34%.

Setelah 24 jam diinfeksi dengan *V. harveyi* sejalan dengan penurunan total hemosit, total differensial hemosit juga mengalami penurunan. Seperti halnya sebelum diinfeksi, total sel Hyalin untuk semua perlakuan tidak berbeda. Total sel semi granular terendah sebesar 3,18 % pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,34 %, sedangkan total sel granular tertinggi sebesar 62,58 % diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,55%.

Hal tersebut menandakan bahwa yang banyak berperan adalah sel granular dibandingkan sel hyalin dan sel semigranular. Sel semi granular merupakan pematangan dari sel hyalin yang ketika terjadi serangan patogen maka yang berperan pertama adalah sel hyalin, sehingga sel ini tidak berkembang menjadi sel semi granular dan terlihat penurunan jumlah sel semi granular yang terdapat dalam hemosit [2]. Sel semigranular berperan utama dalam proses enkapsulasi dan sedikit dalam proses fagositosis.

Sel semi granular dikarakteristikan dengan terdapatnya granula pada sitoplasma. Sel ini mampu merespon polisakarida dari dinding sel bakteri atau β -glukan yang berasal dari jamur. Sel semi granular ini dapat melakukan proses enkapsulasi dan sedikit berperan dalam proses fagositosis [3]. Enkapsulasi adalah merupakan reaksi pertahanan melawan partikel dalam jumlah yang besar dan tidak mampu difagosit oleh sel hemosit [19].

Fungsi sel granular lebih pada proses menghasilkan enzim phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan non spesifik. Supamattaya [1] menjelaskan granula pada sel granular hemosit terdiri dari propenoloksidase. Dalam aktivasi prophenoloksidase (proPO) akan membebaskan suatu enzim dari sel granular. Sistem ini juga dipacu oleh adanya komponen mikrobial seperti β -glukan.

Proses prophenoloksidase bertanggung jawab terhadap produksi dan sekresi metabolit toksik seperti *quinon*. Produk akhir dari sistem ini adalah munculnya *blackish nodules* yang biasanya berada di sekitar insang atau eksoskeleton. Saat terjadinya serangan patogen, sel granular dan semi granular akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut dengan demikian jumlah sel granular yang beredar dalam hemolim akan mengalami penurunan. Hasil proses degranulasi

adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis.

Sejalan dengan tingginya total hemosit pada udang windu diikuti dengan tingginya Aktivitas *vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu (Tabel 5). Nilai tertinggi sebesar 87,85 % pada PS udang windu diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 6,20%, sedangkan Nilai tertinggi sebesar 96,60% pada HLS udang windu diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 6,51%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatnya total hemosit maka aktivitas *vibriocidal* juga meningkat. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Devaraja [5] yang membuktikan bahwa pemanfaatan 0,2% glukan dari yeast + 10% *bacterin* melalui pakan dapat meningkatkan aktivitas *vibriocidal* pada udang windu, namun pada dosis yang melebihi nilai tersebut hasilnya menurun. Pada penelitian lain diperoleh informasi bahwa penggunaan ekstrak β -glukan dari *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 dan ditambahkan ke dalam pakan dapat meningkatkan total hemosit (THC), aktivitas *vibriocidal* dan ketahanan terhadap serangan bakteri [20].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan dapat meningkatkan respon imun seluler, dan dosis terbaik berkisar 5,15%-6,51% dalam formula pakan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Supamattaya K., Chittivan N. and Boonyaratpalin M. 2000. Immunological factors in black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricus*. <http://aquafeed.com/docs/ns/Supamattayaetal.pdf>.
- [2] Van de Braak C.B.T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherland. 159pp.
- [3] Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K. and Söderhäll K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191:45–52.
- [4] Rodriguez J., and Le Moullac G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of Penaeid Shrimp. *Aquaculture*, 191: 109–119.
- [5] Devaraja T.N., Otta S.K., Shubha G., Karunasagar I., Tauro P., Karunasagar I.

1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacterin and Yeast Glucan. Flegel T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 167-170.
- [6] Kartikaningsih H., Ekawati A.W., Sukoso, Haryanti dan Zafran. 1999. Penggunaan fitoplankton *Chaetoceros ceratosporum* kering untuk menghambat perkembangan bakteri *Vibrio harveyi*. ARMP. 1998/1999.
- [7] Kartikaningsih H., Ekawati A.W., Haryanti dan Rosa. 2000. Penggunaan fitoplankton *Chaetoceros ceratosporum* kering untuk menghambat perkembangan bakteri *Vibrio harveyi*. ARMP. 1999/2000.
- [8] Storseth T.R., Hansen K., Skejermo J. and Krane J. 2004. Characterization of a β -D-(1-3)-glucan from marine diatom *Chaetoceros mulleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. *Carbohydrate Res.*, 339:421-424
- [9] Storseth T.R., Hansen K., Reitan K.I. and Skejermo J. 2005. Structural characterization of β -D-(1-3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydrate Res.*, 240: 1159-1164.
- [10] Storseth T.R., Kirkvold S., Skjermo J. and Reitan K.I. 2006. A branched β -D-(1-3,1-6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydrate Res.*, 341: 2108-2114.
- [11] Ekawati A.W. 1990. Pengaruh kadar protein pakan terhadap pertumbuhan pascalarva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Tesis. FPS, Institut Pertanian Bogor, Bogor. 71 hal.
- [12] Sahoo B., Sethi S., Mishra B.K. and Das B.K. 2005. Effects elicitors on prophenoloxidase and superoxide anion activities of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Asian Fish. Sci.*, 18:345-353.
- [13] Adams A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to vibrio species. *Fish and Shellfish Immunology*, 1: 59-70.
- [14] Snedecor G.W. and Cochran W.G. 1980. Statistical methods (7th Ed.). The Iowa State Univ. Press. Iowa. 507p.
- [15] Van de Braak K., Faber F. and Boon J.H. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comp. Haematol. Internat.*, 6: 194-203.
- [16] Yeh S.T., Chiu S., Lee C. and Jiann C. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* Via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 332-345.
- [17] Effendy S., Alexander R. dan Akbar T. 2004. Peningkatan haemosit benur udang windu (*Penaeus monodon* Fabricius) pasca perendaman ekstrak ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) pada konsentrasi yang berbeda. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 14(2): 46-53.
- [18] Sordehall K. and Cerenius L. 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.
- [19] Danwattananusorn T. 2009. Studies on peptidoglycan induced immune-related genes of Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*. PhD Thesis. Graduate School of Marine Science and Technology Tokyo University of Marine Science and Technology Doctoral Course of Applied Marine Biosciences. 7-18.
- [20] Sittipun M., Hangpongkittikul A. and Supamattaya K. 2000. Immunostimulant and vaccination in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: I. Extraction of beta-glucan from yeast and its application in *Penaeus monodon* Fabricius. *Songklanarin J. Sci. Technol.*, 22 (Suppl.): 653-662.