

**KINERJA PERTUMBUHAN, RESPONS IMUN DAN RESISTANSI
LARVA UDANG VANAME YANG DIBERI *Pseudoalteromonas piscicida*
DAN MANNANOLIGOSAKARIDA MELALUI BIOENKAPSULASI *Artemia* sp.**

HAMSAH



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2017**

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul Kinerja Pertumbuhan, Respons Imun dan Resistansi Larva Udang Vaname yang Diberi *Pseudoalteromonas piscicida* dan Mannanoligosakarida melalui Bioenkapsulasi *Artemia* sp. adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2017

Hamsah
NIM C161130011

RINGKASAN

HAMSAH. Kinerja Pertumbuhan, Respons Imun dan Resistansi Larva Udang Vaname yang Diberi *Pseudoalteromonas piscicida* dan Mannan oligosakarida melalui Bioenkapsulasi *Artemia* sp. Dibimbing oleh WIDANARNI, ALIMUDDIN, MUNTI YUHANA, dan MUHAMMAD ZAIRIN JUNIOR.

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan Indonesia di sektor perikanan budidaya. Perkembangan produksi udang vaname harus didukung oleh ketersediaan benih udang yang berkualitas baik dalam jumlah dan waktu yang tepat. Namun demikian, serangan penyakit masih menjadi salah satu kendala utama dalam usaha pembenihan udang vaname, yang menyebabkan rendahnya kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang. Salah satu jenis penyakit yang menyerang udang vaname adalah vibriosis yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*, yang dapat menyebabkan kematian pada seluruh stadia udang, mulai dari stadia nauplius, zoea, mysis dan pascalarva sampai pada udang dewasa di tambak pembesaran.

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik (kombinasi probiotik dengan prebiotik) merupakan salah satu alternatif pengendalian penyakit yang ramah lingkungan karena dapat meningkatkan pertumbuhan, respons imun, dan resistansi udang terhadap serangan penyakit.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi probiotik *Pseudoalteromonas piscicida*, prebiotik mannan oligosakarida (MOS), dan gabungan keduanya (sinbiotik) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. terhadap infeksi bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Secara garis besar untuk menjawab tujuan tersebut, penelitian dibagi dalam empat tahap, yaitu: 1. Evaluasi potensi bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya memanfaatkan prebiotik MOS; 2. Populasi bakteri dan kandungan nutrisi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik; 3. Kinerja pertumbuhan dan sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.; 4. Respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

Penelitian tahap pertama bertujuan untuk mengevaluasi potensi bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya dalam memanfaatkan prebiotik mannan oligosakarida (MOS). Hasil uji pertumbuhan bakteri berdasarkan densitas optikal (OD) dan jumlah koloni bakteri (TPC) diperoleh pertumbuhan maksimal bakteri *P. piscicida* (1Ub) dicapai setelah 18 jam inkubasi dengan kepadatan rata-rata bakteri sebanyak 10^9 CFU/mL. Bakteri *P. piscicida* 1Ub juga menunjukkan toleransi yang baik dan mampu bertahan hidup dalam kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) selama periode pengamatan. Hasil uji penempelan menunjukkan bakteri *P. piscicida* 1Ub memiliki kemampuan menempel dan membentuk biofilm pada permukaan lempeng *stainless steel* dengan kepadatan bakteri sebesar $7.91 \log$ CFU/cm². Bakteri *P. piscicida* 1Ub mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease (0.031 ± 0.030 U/mL/menit), lipase (0.198 ± 0.058 U/mL/menit), amilase (0.008 ± 0.003 U/mL/menit), dan mananase (0.019 ± 0.004 U/mL/menit) serta berpotensi

menghambat bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Bakteri *P. piscicida* 1Ub juga mampu memanfaatkan mannanoligosakarida sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan yang ditunjukkan dengan kepadatan bakteri *P. piscicida* 1Ub yang tumbuh pada media SWC-cair yang ditambahkan 0.2 g MOS selama masa inkubasi 16-20 jam berkisar 11.2–11.8 log CFU/mL, sedangkan yang tumbuh pada media SWC-cair tanpa penambahan MOS hanya berkisar 9.2–9.5 log CFU/mL.

Penelitian tahap kedua bertujuan mengevaluasi populasi bakteri dan kandungan nutrisi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan gabungan keduanya (sinbiotik). Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dilakukan pada stadia instar 2 menggunakan wadah masing-masing bervolume 1 liter air laut dengan kepadatan *Artemia* sp. sebanyak 100 individu/mL dan dilengkapi dengan jaringan aerasi. Bioenkapsulasi dilakukan dengan cara pada setiap media pemeliharaan *Artemia* sp. ditambahkan masing-masing bakteri *P. piscicida* (1Ub) konsentrasi 10^6 CFU/mL untuk perlakuan probiotik, 12 mg/L MOS untuk perlakuan prebiotik, dan kombinasi bakteri *P. piscicida* (1Ub) konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan 12 mg/L MOS untuk perlakuan sinbiotik. Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dilakukan selama 4 jam, selanjutnya dilakukan pengukuran parameter meliputi populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp. dan kandungan nutrisi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi. Populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi probiotik (8.0 log CFU/0.1 g *Artemia*), prebiotik (7.7 log CFU/0.1 g *Artemia*), dan sinbiotik (8.6 log CFU/0.1 g *Artemia*) lebih tinggi dibanding kontrol (6.8 log CFU/0.1 g *Artemia*). Probiotik *P. piscicida* 1Ub juga mampu hidup dan berkolonisasi dalam tubuh *Artemia* sp. masing-masing sebanyak 6.9 log CFU/0.1 g *Artemia* pada perlakuan sinbiotik dan sebanyak 6.4 log CFU/0.1 g *Artemia* pada perlakuan probiotik. Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* 1Ub dan MOS) juga mampu meningkatkan nilai nutrisi *Artemia* sp. terutama kadar protein, kadar lemak, dan profil asam lemak.

Penelitian tahap ketiga bertujuan mengevaluasi kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, populasi bakteri, dan sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan gabungan keduanya (sinbiotik) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. Larva udang vaname dipelihara dalam akuarium berisi air laut sebanyak 10 L dengan kepadatan 20 ekor/L dan dilengkapi jaringan aerasi. Prosedur bioenkapsulasi *Artemia* sp. dilakukan sama seperti pada penelitian tahap kedua. *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi selanjutnya diberikan ke larva udang vaname (Mysis 3 sampai pascalarva 12) sebanyak 8-10 individu/larva setiap kali pemberian dengan frekuensi pemberian lima kali sehari. Hasil penelitian menunjukkan pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap *daily growth rate* (DGR), panjang mutlak dan tingkat kelangsungan hidup, namun terhadap rasio RNA/DNA hanya pemberian probiotik dan sinbiotik yang berpengaruh nyata ($P < 0.05$). Nilai DGR, panjang mutlak, rasio RNA/DNA, dan SR tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik. Aktivitas enzim larva udang vaname pada perlakuan sinbiotik juga lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol dan perlakuan lainnya. Demikian pula total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol

yaitu masing-masing sebanyak 6.7×10^7 CFU/0.1 g larva dan 4.75×10^6 CFU/0.1 g larva.

Penelitian tahap keempat bertujuan mengevaluasi respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. serta diinfeksi *V. harveyi*. Masing-masing sebanyak 30 ekor PL13 udang vaname yang sebelumnya telah diberi perlakuan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik dipelihara dalam wadah bervolume 1 liter air laut steril dan dilengkapi sistem aerasi. Selanjutnya dilakukan ujiantang dengan cara menambahkan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 konsentrasi 3×10^7 CFU/mL dalam masing-masing wadah pemeliharaan postlarva udang vaname pada perlakuan probiotik, prebiotik, sinbiotik, dan kontrol (+). Sementara untuk perlakuan kontrol (-) ditambahkan 30 mL media SWC-cair. Ujiantang dilakukan selama 5 hari. Hasil penelitian menunjukkan nilai *total hemosit count* (THC) dan aktivitas *phenoloxidase* (PO) larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah ujiantang. Aktivitas *respiratory burst* (RB) larva udang vaname yang diberi sinbiotik sebelum dan setelah ujiantang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol, namun tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan yang diberi probiotik dan prebiotik. Peningkatan imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik juga terlihat dari hasil pengukuran ekspresi gen imun larva udang. Ekspresi gen *serine protein* (SP) larva udang yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya. Ekspresi gen *peroxinectin* (PE) larva udang yang diberi sinbiotik dan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun keduanya menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan prebiotik dan kontrol. Ekspresi gen *lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein* (LGBP) larva udang vaname yang diberi sinbiotik juga lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol dan perlakuan lainnya. Pascaujiantang, SR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih tinggi (81.7 - 90.0%) dibandingkan kontrol positif (68.3%) atau terjadi peningkatan SR sebesar 19 - 32%.

Berdasarkan hasil dari seluruh tahap penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan gabungan keduanya (sinbiotik) mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri patogen *V. harveyi* dengan hasil terbaik diperoleh pada pemberian sinbiotik.

Kata kunci: *P. piscicida* 1Ub, MOS, sinbiotik, larva udang vaname, *V. harveyi*

SUMMARY

HAMSAH. Growth Performance, Immune Response and Resistance of Pacific White Shrimp Larvae Administered *Pseudoalteromonas piscicida* and Mannanligosaccharide through *Artemia* sp. Bio-encapsulation. Supervised by WIDANARNI, ALIMUDDIN, MUNTI YUHANA, and MUHAMMAD ZAIRIN JUNIOR.

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is one of Indonesia's major export commodities in aquaculture sector. The development on the production of Pacific white shrimp has to be supported by the availability of the good quality shrimp larvae in the right quantity and time. Nevertheless, disease outbreaks still become one of the main obstacles in Pacific white shrimp hatcheries, causing a low survival and growth of the shrimp larvae. One of diseases that attacks Pacific white shrimp is vibriosis caused by *Vibrio harveyi*, which can cause mortality in all shrimp stadia, from nauplius, zoea, mysis and post-larva to adult shrimp in grow out ponds.

The application of probiotics, prebiotics, and synbiotics is one of environmentally friendly alternative disease controls because they can improved the growth, increase immune responses and disease resistance of shrimps

The objective of this study was to evaluate growth performance, immune response and resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic *Pseudoalteromonas piscicida*, prebiotic mannanligosaccharide, and a combination of the two (synbiotic) through *Artemia* sp. bio-encapsulation against the infection of *Vibrio harveyi*. To answer that objective, the study was divided into four stages, that were: 1. The evaluation of the potency of *P. piscicida* (1Ub) as probiotic and its ability to utilize prebiotic MOS; 2. The bacterial population and the nutritional content of *Artemia* sp. encapsulated with probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and synbiotic; 3. The growth performance and the survival of Pacific white shrimp larvae administered probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and synbiotic through *Artemia* sp. bio-encapsulation; 4. The immune response and the resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and synbiotic through *Artemia* sp. bio-encapsulation.

The first stage experiment aimed to evaluate the potency of *P. piscicida* (1Ub) as probiotic and its ability in utilizing prebiotic mannanligosaccharide (MOS). The result of the bacterial growth based on optical density (OD) and the number of bacterial colonies (TPC) was obtained the maximum growth of *P. piscicida* (1Ub) reached after 18 hours of incubation with an average bacterial density of 10^9 CFU/mL. *P. piscicida* 1Ub also demonstrated a good tolerance and was able to survive in acid (pH 4) and alkaline (pH 8.5) conditions during the observation period. The result of the attachment test indicated that *P. piscicida* 1Ub had an attachment ability and formed biofilm on a stainless steel plate surface with a bacterial density of $7.91 \log$ CFU/cm². *P. piscicida* 1Ub was able to secrete several exogeneous enzymes, such as protease (0.031 ± 0.030 U/mL/minute), lipase (0.198 ± 0.058 U/mL/minute), amylase (0.008 ± 0.003 U/mL/minute), and mannanase (0.019 ± 0.004 U/mL/minute) and potentially inhibited *Vibrio harveyi*. *P. piscicida* 1Ub was also able to utilize mannanligosaccharide as a nutrition

source for its growth indicated by the density of *P. piscicida* 1Ub that grew in SWC-broth added 0.2 g MOS during an incubation period of 16-20 hours ranged 11.2-11.8 log CFU/mL, while that growing in SWC-broth without the addition of MOS only ranged 9.2-9.5 log CFU/mL.

The second stage experiment aimed to evaluate the bacterial population and the nutritional content of *Artemia* sp. encapsulated with probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and a combination of the two (synbiotic). *Artemia* sp. bio-encapsulation was conducted on instar 2 stadia using containers with a volume of 1 liter sea water with an *Artemia* sp. density in each container of 100 individuals/mL and equipped with an aeration system. Bio-encapsulation was performed by adding *P. piscicida* (1Ub) at a concentration of 10^6 CFU/mL for probiotic treatment, 12 mg/L MOS for prebiotic treatment, and a combination of *P. piscicida* (1Ub) at a concentration of 10^6 CFU/mL and 12 mg/L MOS for synbiotic treatment in each rearing medium. *Artemia* sp. bio-encapsulation was conducted for 4 hours, then conducted the measurements of parameters including the bacterial population in the *Artemia* sp. body and the nutritional content of the bio-encapsulated *Artemia* sp. The bacterial populations in the *Artemia* sp. body administered probiotic (8.0 log CFU/0.1 g *Artemia*), prebiotic (7.7 log CFU/0.1 g *Artemia*), and synbiotic (8.6 log CFU/0.1 g *Artemia*) were higher compared to control (6.8 log CFU/0.1 g *Artemia*). *P. piscicida* 1Ub was also able to live and colonize in the *Artemia* sp. body at values of 6.9 log CFU/0.1 g *Artemia* in synbiotic treatment and 6.4 log CFU/0.1 g *Artemia* in probiotic treatment. *Artemia* sp. bio-encapsulation with probiotic *P. piscicida* 1Ub, prebiotic MOS, and synbiotic (a combination of *P. piscicida* 1Ub and MOS) was also able to increase the nutritional value of *Artemia* sp. especially protein level, fat level, and fatty acid profile.

The third stage experiment aimed to evaluate growth performance, enzymes activities, bacterial population, and survival of Pacific white shrimp administered probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and a combination of the two (synbiotic) through *Artemia* sp. bio-encapsulation. Pacific white shrimps were reared in aquariums filling 10 L sea water with a stocking density of 20 individuals/L and equipped with an aeration system. *Artemia* sp. bio-encapsulation procedure was performed as same as on the second stage experiment. The bio-encapsulated *Artemia* sp. were then administered to Pacific white shrimp larvae (Mysis 3 to post-larvae 12) at a range of 8-10 individuals/larvae every administration with a frequency of five times a day. The experimental results demonstrated that the administration of probiotic, prebiotic, and synbiotic gave significant effects ($P < 0.05$) on daily growth rate (DGR), absolute length growth and survival, but on RNA/DNA ratio only the administration of probiotic and synbiotic significantly affected ($P < 0.05$). The highest DGR, absolute length, RNA/DNA ratio, and SR values ($P < 0.05$) were obtained in synbiotic treatment. Enzymes activities of Pacific white shrimp larvae on synbiotic treatment were also higher ($P < 0.05$) compared to control and other treatments. Similarly, total bacteria and total probiotic *P. piscicida* 1Ub in the Pacific white shrimp larvae body administered synbiotic were higher ($P < 0.05$) compared to other treatments and control that were 6.7×10^7 CFU/larvae and 4.75×10^6 CFU/larvae, respectively.

The fourth stage experiment aimed to evaluate immune response, genes expressions related to immunity, and resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, and synbiotic through *Artemia* sp. bio-encapsulation and infected by *V. harveyi*. The PL13 Pacific white shrimps at a number of 30 individuals in each treatment that were previously treated by probiotic, prebiotic, and synbiotic were reared in containers with a volume of 1 liter sterile sea water and equipped with an aeration system. Therefore, the challenge test was performed by adding *V. harveyi* MR5339 at a concentration of 3×10^7 CFU/mL into each rearing container of Pacific white shrimp post-larvae in probiotic, prebiotic, synbiotic, and control (+) treatments. For control (-) treatment, it was added 30 mL SWC-broth medium. The challenge test was conducted for 5 days. Experimental results demonstrated that total hemocyte count (THC) and phenoloxydase (PO) activity values of Pacific white shrimp larvae administered synbiotic were higher ($P < 0.05$) compared to other treatments, both before and after the challenge test. The respiratory burst (RB) activities of Pacific white shrimp larvae administered synbiotic before and after the challenge test were significantly different ($P < 0.05$) from control, but it was not significantly different ($P > 0.05$) than those administered probiotic and prebiotic. The increasing of the immunity of Pacific white shrimp larvae administered probiotic, prebiotic, and synbiotic were indicated from results of immune genes expressions measurements of the shrimp larvae. The serine protein (SP) gene expression of the shrimp larvae administered synbiotic demonstrated the highest value ($P < 0.05$) compared to other treatments. The peroxinectin (PE) gene expressions of the shrimp larvae administered synbiotic and probiotic were not significantly different ($P > 0.05$), but those showed higher values ($P < 0.05$) compared to prebiotic and control treatments. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) gene expression of Pacific white shrimp larvae administered synbiotic was also higher ($P < 0.05$) compared to control and other treatments. On post-challenge test period, Pacific white shrimp SR administered probiotic, prebiotic, and synbiotic were higher (81.7-90.0%) compared to positive control (68.3%) or there was an increase in SR about 19-32%.

Based on results of all stages in this study, it could be concluded that probiotic *P. piscicida* 1Ub, prebiotic MOS, and a combination of the two (synbiotic) could improve growth performance, immune response and resistance of Pacific white shrimp against the infection of *V. harveyi* with the best results obtained in the administration of synbiotic.

Keywords: *P. piscicida* 1Ub, MOS, synbiotic, Pacific white shrimp larvae, *V. harveyi*

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2017
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

**KINERJA PERTUMBUHAN, RESPONS IMUN DAN RESISTANSI LARVA
UDANG VANAME YANG DIBERI *Pseudoalteromonas piscicida* DAN
MANNANOLIGOSAKARIDA MELALUI BIOENKAPSULASI *Artemia* sp.**

HAMSAH

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor
pada
Program Studi Ilmu Akuakultur

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2017**

Penguji pada Ujian Tertutup : 1. Dr Ir Nur Bambang Priyo Utomo, MSi
(Staf Pengajar Departemen Budidaya Perairan,
FPIK IPB)
2. Ir Heny Budi Utari, PhD
(Staf Animal Health Service PT. Central Proteina
Prima)

Penguji pada Sidang Promosi : 1. Dr Ir Nur Bambang Priyo Utomo, MSi
(Staf Pengajar Departemen Budidaya Perairan,
FPIK IPB)
2. Ir Heny Budi Utari, PhD
(Staf Animal Health Service PT. Central Proteina
Prima)

Judul Disertasi : Kinerja Pertumbuhan, Respons Imun dan Resistansi Larva Udang Vaname yang Diberi *Pseudoalteromonas piscicida* dan Mannanoglikosakarida Melalui Bioenkapsulasi *Artemia* sp.
Nama : Hamsah
NIM : C161130011

Disetujui oleh
Komisi Pembimbing

Prof Dr Ir Widanarni, MSi
Ketua

Dr Alimuddin, SPi MSc
Anggota

Dr Munti Yuhana, SPi, MSi
Anggota

Prof Dr Ir Muhammad Zairin Jr., MSc
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi
Ilmu Akuakultur

Prof Dr Ir Widanarni, MSi



Dekan Sekolah Pascasarjana

Dr Ir Dahrul Syah, MScAgr

Tanggal Ujian Tertutup: 20 Juli 2017
Tanggal Sidang Promosi: 10 Agustus 2017

Tanggal Lulus: 10 AUG 2017

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, tauhid, dan karunia-Nya, sehingga penyusunan laporan Disertasi dengan judul “ **Kinerja Pertumbuhan, Respons Imun dan Resistansi Larva Udang Vaname yang diberi *Pseudoalteromonas piscicida* dan Mannan oligosakarida melalui Bioenkapsulasi *Artemia* sp.** “ dapat diselesaikan.

Laporan Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi mahasiswa untuk menyelesaikan studi Doktor di Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Penelitian disertasi ini didanai oleh proyek Penelitian Strategis Unggulan (PSU), tahun 2016 atas nama Prof Dr Ir Widanarni, MSi, Dr Munti Yuhana, SPi MSi, dan Prof Dr Ir Muhammad Zairin Junior, MSc sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian Nomor: 079/SP2H/LT/DRPM/II/2016 tanggal 17 Februari 2016, dan dana Penelitian Disertasi Doktor dari Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM), Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi tahun 2017.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada Prof Dr Ir Widanarni, MSi selaku ketua komisi pembimbing, Dr Alimuddin, SPi MSc, Dr Munti Yuhana, SPi MSi, dan Prof Dr Ir Muhammad Zairin Junior, MSc masing-masing sebagai anggota komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan, masukan, saran dan arahan mulai dari penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai pada penyusunan laporan disertasi ini. Terima kasih juga penulis sampaikan pada pimpinan PT. Suri Tani Pamuka yang memfasilitasi pengadaan larva udang pada penelitian ini dan pimpinan dan staf Laboratorium Genetika Ikan, Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi yang memfasilitasi analisa ekspresi gen imun larva udang pada penelitian ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan pada Bapak Dr Ir Nur Bambang Priyo Utomo, MSi dan Ibu Ir Heny Budi Utari, PhD masing-masing sebagai penguji luar komisi. Demikian pula pada Prof Dr Ir Widanarni, MSi selaku ketua program studi ilmu akuakultur, dosen dan semua staf program studi atas segala bantuan dan pelayanan akademik selama penulis menempuh pendidikan program doktor.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada teman mahasiswa program doktor ilmu akuakultur (AKU) angkatan 2013 semoga persahabatan tetap terjalin dengan baik, kepada saudara Dendi Hidayatullah, SPi MSi dan Hasan Nasrullah, SPi terima kasih atas segala bantuan selama pelaksanaan penelitian. Buat semua rekan-rekan mahasiswa S2 dan S3 Ilmu Akuakultur, terima kasih atas kebersamaan dan kerjasamanya.

Ungkapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga disampaikan kepada kedua orang tua tercinta Bapak Hadali dan Ibu Wa Ode Muzunia, bapak mertua H. Syaiful Lompeng dan ibu mertua Hj. Rahmawati serta seluruh keluarga atas do'a, bantuan dan dukungannya selama penulis menempuh pendidikan doktor. Buat istri tercinta Hajrawati, SPt MSi dan putri tersayang Nurul Hafidzah terima kasih atas do'a, pengertian dan motivasi selama penulis menempuh studi dan kebersamaan dalam kehidupan selama ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan hidayah dan rahmat-Nya kepada kita sekeluarga.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca sekalian.

Bogor, Agustus 2017

Hamsah

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
1. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	3
Tujuan Penelitian	3
Manfaat Penelitian	4
Hipotesis	4
Tingkat Kebaruan (<i>Novelty</i>)	4
2. EVALUASI POTENSI BAKTERI <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (1Ub) SEBAGAI PROBIOTIK DAN KEMAMPUANNYA MEMANFAATKAN PREBIOTIK MANNANOLIGOSAKARIDA	6
Pendahuluan	7
Bahan dan Metode	8
Hasil	12
Pembahasan	16
Simpulan	18
3. POPULASI BAKTERI DAN KANDUNGAN NUTRISI <i>Artemia</i> sp. HASIL BIOENKAPSULASI DENGAN PROBIOTIK 1Ub, PREBIOTIK MOS, DAN SINBIOTIK	19
Pendahuluan	21
Bahan dan Metode	22
Hasil	23
Pembahasan	25
Simpulan	27
4. KINERJA PERTUMBUHAN DAN SINTASAN LARVA UDANG VANAME YANG DIBERI PROBIOTIK 1Ub, PREBIOTIK MOS, DAN SINBIOTIK MELALUI BIOENKAPSULASI <i>Artemia</i> sp.	28
Pendahuluan	29
Bahan dan Metode	30
Hasil	34
Pembahasan	37
Simpulan	40

5. RESPONS IMUN DAN RESISTANSI LARVA UDANG VANAME YANG DIBERI PROBIOTIK 1Ub, PREBIOTIK MOS, DAN SINBIOTIK MELALUI BIOENKAPSULASI <i>Artemia</i> sp.	41
Pendahuluan	42
Bahan dan Metode	43
Hasil	45
Pembahasan	48
Simpulan	51
6. PEMBAHASAN UMUM	52
7. SIMPULAN DAN SARAN UMUM	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	71
RIWAYAT HIDUP	85

DAFTAR TABEL

1. Aktivitas amilolitik, proteolitik, mananolitik, dan lipolitik bakteri <i>P. piscicida</i>	14
2. Aktivitas enzim protease, lipase, amilase, dan mananase bakteri <i>P. piscicida</i> (1Ub)	14
3. Aktivitas penghambatan bakteri <i>P. piscicida</i> (1Ub) terhadap bakteri patogen <i>V. harveyi</i> dengan metode Kirby-Bauer	15
4. Aktivitas penghambatan bakteri <i>P. piscicida</i> (1Ub) terhadap bakteri patogen <i>V. harveyi</i> dengan metode kultur bersama	15
5. Hasil analisis proksimat <i>Artemia</i> sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik	24
6. Kadar asam lemak (% total lemak) <i>Artemia</i> sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik	24
7. Kadar asam amino (ppt) <i>Artemia</i> sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik	25
8. Total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi <i>Artemia</i> sp.	34
9. Aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi <i>Artemia</i> sp.	35
10. Kinerja pertumbuhan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi <i>Artemia</i> sp.	35
11. <i>Total hemocyte count</i> (THC), aktivitas <i>phenoloxidase</i> (PO), aktivitas <i>respiratory burst</i> (RB) larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sebelum dan setelah uji tantang dengan <i>V. harveyi</i> MR5339 Rf ^R	45
12. Ekspresi gen terkait imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik setelah diuji tantang dengan <i>V. harveyi</i> MR5339 Rf ^R	46

DAFTAR GAMBAR

1. Kerangka pemikiran dan tahapan penelitian kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> dan mannanoligosakarida melalui bioenkapsulasi <i>Artemia</i> sp.	5
2. Pola pertumbuhan bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub selama 24 jam pengamatan berdasarkan densitas optikal (OD) (grafik kiri) dan berdasarkan jumlah koloni bakteri (grafik kanan)	12
3. Jumlah sel bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub yang tumbuh pada media dengan pH 4 (asam), pH 8.5 (basa) dan media kontrol (pH 7)	13
4. Jumlah bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub yang tumbuh pada permukaan lempeng <i>stainless steel</i> (Menempel) dan pada media SWC-cair (Planktonik).	13
5. Kemampuan bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub menghidrolisis pati (A), susu skim (B), MOS (C), dan minyak zaitun (D)	14
6. Jumlah sel bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub yang tumbuh pada media SWC dan media SWC+MOS	16
7. Total bakteri dan probiotik <i>P. piscicida</i> 1Ub Rf ^R di tubuh <i>Artemia</i> sp.	23
8. Sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik 1Ub, prebiotik MOS dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dan MOS) melalui bioenkapsulasi <i>Artemia</i> sp. mulai mysis3 sampai PL12.	36
9. Sintasan (SR) larva vaname yang diberi probiotik, prebiotik, sinbiotik, kontrol (-), dan kontrol (+) setelah uji tantang dengan <i>V. harveyi</i> MR5339 Rf ^R .	46
10. Pola kematian dan jumlah sel <i>Vibrio</i> dalam tubuh larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, sinbiotik, kontrol (+), dan kontrol (-) setelah diuji tantang dengan bakteri patogen <i>V.harveyi</i> MR5339 Rf ^R	47
11. Histologi hepatopankreas pascalarva udang vaname pascauji tantang dengan bakteri <i>V.harveyi</i> MR5339 Rf ^R , A. perlakuan kontrol (-) (TB = tubulus, L = lumen, S = sinus), B. perlakuan kontrol (+), C. perlakuan probiotik, D. perlakuan prebiotik, E. perlakuan sinbiotik	48
12. Mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh <i>Artemia</i> sp. dalam merangsang pertumbuhan larva udang vaname (modifikasi dari Lazado <i>et al.</i> 2015)	57
13. Mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh <i>Artemia</i> sp. dalam merangsang respons imun dan ekspresi gen imun larva udang vaname (modifikasi dari Lazado <i>et al.</i> 2015)	59

DAFTAR LAMPIRAN

1. Media <i>sea water complete</i> (SWC)	72
2. Prosedur uji hidrolisis pati, susu, minyak, dan MOS	72
3. Prosedur analisis proksimat	74
4. Prosedur analisis aktivitas enzim	77
5. Pembuatan mutan rifampisin resisten pada isolat bakteri <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (1Ub)	79
6. Metode pengukuran respons imun larva udang	79
7. Analisis ekspresi gen imunitas udang vaname	81
8. Prosedur pembuatan preparat histologi	84

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan Indonesia di sektor perikanan budidaya. Selama tahun 2016, Indonesia merupakan negara pengekspor udang terbesar keempat di dunia setelah India, Vietnam, dan Ekuador dengan volume ekspor sebesar 220.000 ton atau naik sebesar 21% dibandingkan volume ekspor tahun 2015 (FAO 2017).

Perkembangan produksi udang vaname harus didukung oleh ketersediaan benih udang yang berkualitas baik dalam jumlah dan waktu yang tepat. Namun demikian, berbagai masalah seperti serangan penyakit masih merupakan kendala utama dalam usaha pembenihan udang vaname, yang menyebabkan rendahnya kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang.

Beberapa jenis penyakit yang menyerang udang vaname antara lain vibriosis yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* (Phuoc *et al.* 2009), yang dapat menyebabkan kematian larva udang di *hatchery* (Chrisolite *et al.* 2008) serta seluruh stadia udang, mulai dari stadia nauplius, zoea, mysis dan postlarva sampai pada udang dewasa di tambak pembesaran (Saulnier *et al.* 2000). Selain vibriosis, udang vaname juga dapat terserang berbagai penyakit viral seperti TSV (*taura syndrome virus*), WSSV (*white spot syndrome virus*), YHV (*yellow head virus*), IHNV (*infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*) dan IMNV (*infectious myonecrosis virus*). Serangan patogen penyebab penyakit tersebut dapat menyerang udang sebagai infeksi tunggal maupun secara bersamaan (ko-infeksi).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit tersebut antara lain dengan antibiotik, vaksin, imunostimulan dan probiotik. Pencegahan penyakit dengan menggunakan antibiotik telah dilarang, karena dapat menyebabkan resistansi patogen terhadap antibiotik tersebut (Haryanti *et al.* 2000). Oleh karena itu, saat ini telah banyak dikembangkan metode pengendalian secara biologis yang lebih aman dan efektif sebagai agen biokontrol, salah satunya adalah penggunaan probiotik. Probiotik memberikan pengaruh menguntungkan pada organisme budidaya karena dapat memodifikasi komunitas mikroba, memperbaiki nilai nutrisi, memperbaiki respons inang terhadap penyakit, memperbaiki kualitas lingkungan (Verschuere *et al.* 2000), serta dapat meningkatkan respons imun (Nayak 2010). Beberapa hasil penelitian telah membuktikan keberhasilan probiotik dalam meningkatkan pertumbuhan, sintasan, respons imun dan resistansi udang (Chiu *et al.* 2007; Widanarni *et al.* 2010; Nimrat *et al.* 2012; Widanarni *et al.* 2013). Probiotik juga mampu meningkatkan ekspresi gen imun pada larva dan juvenil udang vaname (Liu *et al.* 2010; Zokaeifar *et al.* 2012). Pada penelitian ini digunakan probiotik *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) yang telah diuji mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* dan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu (Widanarni *et al.* 2009).

Peran bakteri probiotik dapat ditingkatkan melalui aplikasi prebiotik, yaitu bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Beberapa hasil penelitian menunjukkan prebiotik dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi

mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen dan meningkatkan sistem imunitas udang (Li *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2012; Aktas *et al.* 2014), maupun imunitas ikan (Merrifield *et al.* 2010; Akrami *et al.* 2013). Prebiotik yang digunakan pada penelitian ini adalah Mannan oligosakarida (MOS) yang telah diuji mampu meningkatkan pertumbuhan dan sintasan juvenil udang vaname (Zhang *et al.* 2012).

Aplikasi *P. piscicida* (1Ub) yang telah diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* dan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu masih memerlukan pemahaman dan pengujian mengenai kriteria yang harus dimiliki sebagai probiotik. Suatu jenis bakteri dapat digolongkan sebagai probiotik jika bakteri tersebut memenuhi beberapa kriteria diantaranya adalah kemampuan berkolonisasi, tumbuh dan berkembang di dalam saluran pencernaan inang, dan dapat memproduksi enzim pencernaan ekstraseluler (Merrifield *et al.* 2010). Selain pengujian sebagai probiotik ideal juga penting dilakukan evaluasi terhadap kemampuan suatu jenis probiotik dalam memanfaatkan prebiotik sebagai sumber energi dan nutrisi tambahan untuk merangsang pertumbuhan dan aktivitas probiotik tersebut. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini diawali dengan pengujian bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya dalam memanfaatkan prebiotik mannan oligosakarida (MOS) secara *in vitro*.

Bila probiotik dan prebiotik digabung dalam suatu produk tunggal dinamakan sinbiotik maka manfaatnya menjadi meningkat (Lisal 2005). Penggunaan sinbiotik telah diuji dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun, dan resistansi terhadap organisme akuatik antara lain pada larva lobster Eropa, *Homarus gammarus* L. (Daniels *et al.* 2010; Daniels *et al.* 2013), juvenil *Carassius auratus* (Mahghani *et al.* 2014), dan udang putih, *L. vannamei* (Li *et al.* 2009; Widanarni *et al.* 2012; Arangure *et al.* 2013; Oktaviana *et al.* 2014; Nurhayati *et al.* 2015).

Hingga saat ini aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih banyak diberikan pada juvenil dan udang dewasa melalui pakan buatan (Mahghani *et al.* 2014; Li *et al.* 2009; Widanarni *et al.* 2012; Arangure *et al.* 2013; Oktaviana *et al.* 2014; Nurhayati *et al.* 2015). Sementara pada larva baru dilakukan untuk larva *H. gammarus* L. (Daniels *et al.* 2010; Daniels *et al.* 2013) dan larva *L. vannamei* dengan probiotik SKT-b Rf^R dan prebiotik oligosakarida dari ekstrak ubi sukuk (Widanarni *et al.* 2015). Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sejak stadia larva penting dilakukan untuk menghasilkan benih udang yang berkualitas dengan tingkat kelangsungan hidup dan pertumbuhan yang baik serta memiliki daya tahan terhadap penyakit (*specific pathogen resistance*) sehingga saat benih udang ditebar di tambak pembesaran telah memiliki respons pertumbuhan dan sistem imun yang lebih baik untuk menghadapi serangan berbagai patogen yang terdapat pada kondisi lapangan di tambak.

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname pada penelitian ini dilakukan melalui metode bioenkapsulasi atau pengkayaan *Artemia* sp. yang merupakan pakan utama bagi larva udang karena memiliki ukuran yang sesuai untuk larva, nilai nutrisi yang tinggi, serta mudah dicerna. Sejauh mana efektivitas pengkayaan *Artemia* sp. dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada penelitian ini dievaluasi berdasarkan akumulasi probiotik dalam tubuh *Artemia* sp., peningkatan populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp., dan peningkatan kandungan nutrisi *Artemia* sp. setelah dilakukan pengkayaan. Penelitian ini dilanjutkan dengan

evaluasi terhadap kinerja pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun dan ekspresi gen imun serta resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri patogen *V. harveyi* setelah larva tersebut diberi pakan *Artemia* sp. hasil pengkayaan dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik.

Perumusan Masalah

Ketersediaan benih udang yang berkualitas baik dalam jumlah dan waktu yang tepat merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan produksi budidaya udang. Namun demikian, berbagai masalah seperti serangan penyakit masih merupakan kendala utama dalam usaha pembenihan udang vaname, yang menyebabkan rendahnya kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang. Salah satu jenis penyakit bakteri yang menyerang udang vaname dan menyebabkan kematian masal adalah vibriosis yang disebabkan oleh bakteri patogen *Vibrio harveyi* (Phuoc *et al.* 2009). Bakteri ini merupakan salah satu penyebab kegagalan dalam budidaya udang akibat adanya kematian masal larva udang di *hatchery* (Chrisolite *et al.* 2008) dan semua stadia udang mulai stadia *nauplius*, *zoea*, *mysis*, dan *postlarva* sampai udang dewasa di tambak pembesaran (Saulnier *et al.* 2000).

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik merupakan alternatif teknologi yang dapat membantu mengatasi masalah tersebut dengan memperbaiki respons imun dan respons pertumbuhan larva udang vaname. Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname dapat dilakukan melalui bioenkapsulasi atau pengkayaan *Artemia* sp. yang merupakan pakan utama bagi larva udang karena memiliki ukuran yang sesuai untuk larva, nilai nutrisi yang tinggi, serta mudah dicerna sehingga diharapkan dapat menghasilkan benih udang vaname yang berkualitas baik dengan tingkat pertumbuhan yang baik dan memiliki daya tahan terhadap penyakit.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengevaluasi kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* (1Ub), mannanoligosakarida, dan gabungan keduanya melalui bioenkapsulasi *Artemia*. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengevaluasi potensi bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya dalam memanfaatkan prebiotik mannanoligosakarida (MOS).
2. Mengevaluasi pemberian *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungannya terhadap populasi bakteri dan kandungan nutrisi *Artemia*.
3. Mengevaluasi pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungannya terhadap kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, total bakteri dan sintasan larva udang vaname.
4. Mengevaluasi pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungannya terhadap respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diinfeksi *V. harveyi*.

Manfaat Penelitian

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva dapat memberikan manfaat bagi pengembangan pembenihan udang vaname untuk meningkatkan produksi benih udang yang berkualitas yang memiliki tingkat pertumbuhan dan daya tahan terhadap penyakit yang baik.

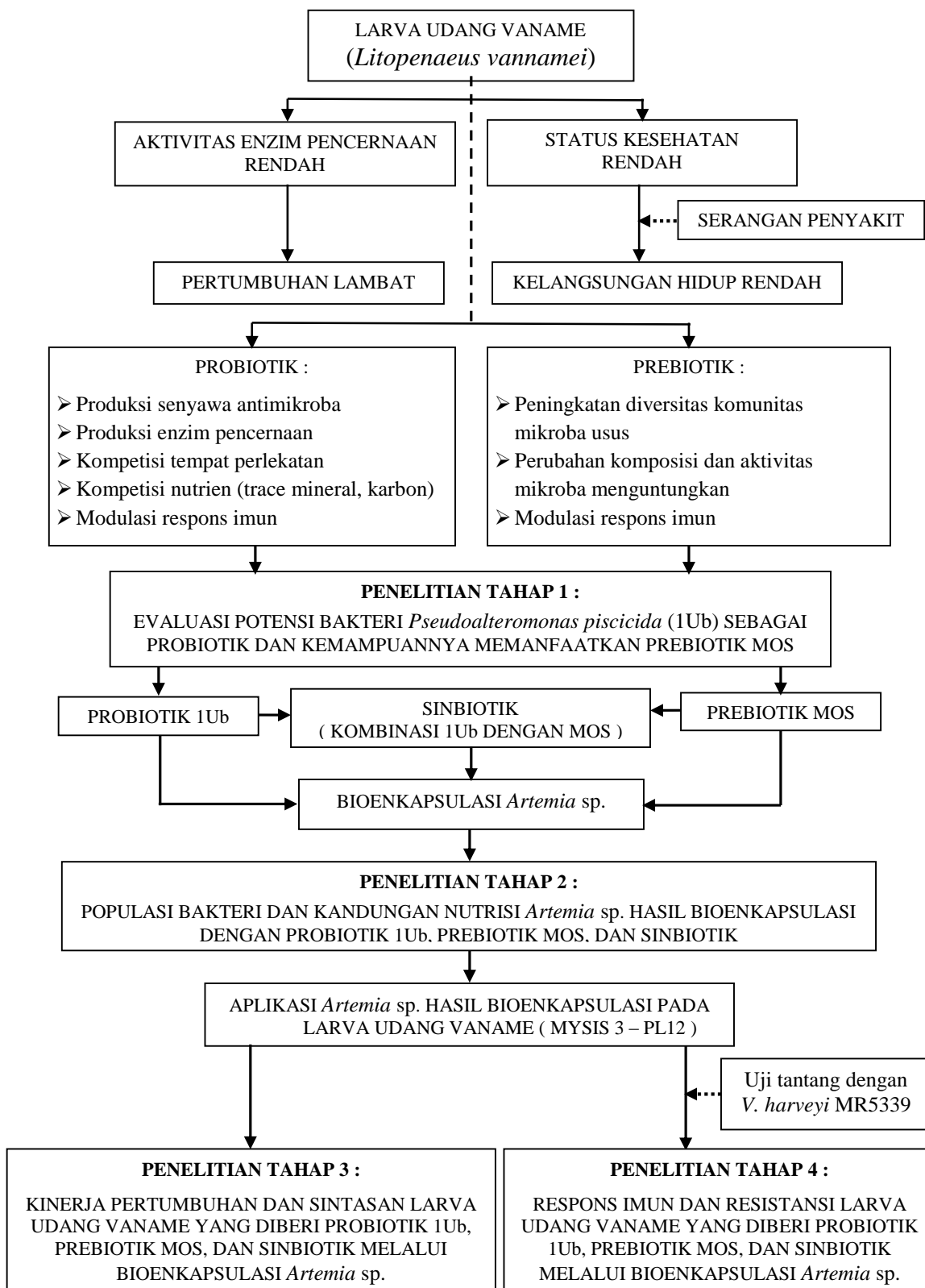
Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. Bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki potensi sebagai probiotik dan mampu memanfaatkan prebiotik MOS.
2. Probiotik *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungan keduanya (sinbiotik) mampu meningkatkan populasi bakteri dan kandungan nutrisi *Artemia* sp.
3. *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungan keduanya (sinbiotik) mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, total bakteri dan sintasan larva udang vaname.
4. *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan *P. piscicida* (1Ub), MOS dan gabungan keduanya (sinbiotik) mampu meningkatkan respons imun dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi *V. harveyi*

Tingkat Kebaruan (Novelty)

1. Strategi baru perbaikan produksi larva udang vaname melalui aplikasi probiotik *P. piscicida* (1Ub) dan prebiotik mannanoligosakarida (MOS).
2. Bahan penyusunan SOP aplikasi probiotik dan prebiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada produksi larva udang vaname.



Gambar 1. Kerangka pemikiran dan tahapan penelitian kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi *Pseudoalteromonas piscicida* dan mannanoligosakarida melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

**EVALUASI POTENSI BAKTERI *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub)
SEBAGAI PROBIOTIK DAN KEMAMPUANNYA MEMANFAATKAN
PREBIOTIK MANNANOLIGOSAKARIDA**

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya memanfaatkan prebiotik mannanoligosakarida secara *in vitro*. Potensi bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya memanfaatkan prebiotik mannanoligosakarida (MOS) dievaluasi berdasarkan serangkaian uji *in vitro* meliputi uji fase pertumbuhan bakteri, uji ketahanan terhadap kondisi asam dan basa, uji penempelan, uji aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik dan manolitik, uji aktivitas enzim bakteri *P. piscicida* (1Ub), uji penghambatan terhadap bakteri patogen, serta uji kemampuan MOS dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub). Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) berdasarkan densitas optikal (OD) dan jumlah koloni bakteri (TPC) diperoleh puncak pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terjadi pada jam ke-18 setelah inkubasi dengan konsentarsi bakteri sebesar 9.75 log CFU/mL. Bakteri *P. piscicida* 1Ub menunjukkan toleransi yang baik dan mampu bertahan hidup dalam kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5). Bakteri *P. piscicida* 1Ub memiliki kemampuan menempel dan membentuk biofilm pada permukaan lempeng *stainless steel* dengan kepadatan bakteri sebanyak 7.91 log CFU/cm². Bakteri *P. piscicida* 1Ub memiliki aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan mananolitik serta mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *V. harveyi* melalui metode Kirby-Bauer dengan nilai indeks penghambatan sebesar 1.5±0.28 serta mampu mereduksi patogen tersebut sehingga tidak dapat tumbuh melalui metode kultur bersama. Prebiotik mannanoligosakarida (MOS) mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) rata-rata sebesar 2 log CFU/mL. Berdasarkan serangkain uji tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa bakteri *P. piscicida* (1Ub) berpotensi sebagai probiotik dan mampu memanfaatkan prebiotik MOS untuk menstimulasi pertumbuhannya.

Kata kunci : bakteri *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, uji penempelan, uji penghambatan bakteri patogen, aktivitas enzim.

**EVALUATION OF THE POTENCY OF *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub)
AS PROBIOTIC AND ITS ABILITY TO UTILIZE
MANNANOLIGOSACCHARIDE**

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potency of *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) as probiotic and its ability in utilizing prebiotic mannanoligosaccharide (MOS). The potency of *P. piscicida* (1Ub) as probiotic and its ability to utilize prebiotic mannanoligosaccharide (MOS) were evaluated based on *in vitro* tests

including bacterial growth test, resistance on acid and alkaline conditions test, amylolytic, proteolytic, lipolytic and mannolytic activities test, enzymes activities of *P. piscicida* (1Ub) test, inhibition test on pathogenic bacteria, and the test on the ability of MOS in stimulating the growth of *P. piscicida* (1Ub). The result of the observation of the growth of *P. piscicida* (1Ub) based on optical density (OD) and the number of bacterial colonies (TPC) was obtained the peak of the growth of *P. piscicida* (1Ub) occurred on hour 18 after incubation with a bacterial concentration of $9.75 \log \text{CFU/mL}$. *P. piscicida* 1Ub demonstrated a good tolerance and was able to survive in acid (pH 4) and alkaline (pH 8.5) conditions. *P. piscicida* 1Ub had an attachment ability and formed biofilm on a stainless steel plate surface with a bacterial density of $7.91 \log \text{CFU/cm}^2$. *P. piscicida* 1Ub had amylolytic, proteolytic, lipolytic, and mannolytic activities and was able to secrete several exogeneous enzymes, such as protease, lipase, amylase, and mannanase. *P. piscicida* (1Ub) had an inhibitory activity against *V. harveyi* through Kirby-Bauer method with an inhibitory index value of 1.5 ± 0.28 and was able to reduce that pathogen so it could not grow through co-culture method. Prebiotic mannanoligosaccharide (MOS) was able to stimulate the growth of *P. piscicida* (1Ub) with an average value of $2 \log \text{CFU/mL}$. Based on a series of such tests above, it could be concluded that *P. piscicida* (1Ub) had a potency as probiotic and was able to utilize prebiotic MOS to stimulate its growth.

Keywords: *P. piscicida* (1Ub), prebiotic MOS, attachment test, pathogenic bacteria inhibition test, enzymes activities.

PENDAHULUAN

Probiotik merupakan mikroba tambahan yang memberikan pengaruh menguntungkan pada organisme budidaya karena dapat memodifikasi komunitas mikroba, memperbaiki nilai nutrisi, memperbaiki respons inang terhadap penyakit, memperbaiki kualitas lingkungan (Verschuere *et al.* 2000), serta dapat meningkatkan respons imun (Nayak 2010).

Suatu jenis bakteri dapat digolongkan sebagai probiotik jika bakteri tersebut memenuhi beberapa kriteria diantaranya adalah kemampuan berkolonisasi, tumbuh dan berkembang di dalam saluran pencernaan inang, dan dapat memproduksi enzim pencernaan ekstraseluler (Merrifield *et al.* 2010). Kemampuan suatu jenis bakteri probiotik untuk berkolonisasi, tumbuh dan berkembang di dalam saluran pencernaan serta kemampuan memproduksi enzim pencernaan ekstraseluler dapat dievaluasi melalui beberapa jenis pengujian baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Probiotik *endogenous* merupakan bagian dari sistem mikroflora yang secara alamiah menghuni saluran pencernaan makhluk hidup. Mikroba dalam saluran pencernaan memainkan peranan yang penting dalam memelihara integritas usus, meningkatkan imunitas dan resistansi terhadap penyakit, serta berkontribusi dalam proses pencernaan (Silva *et al.* 2011). Dalam penelitian ini digunakan bakteri probiotik *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009).

Peran bakteri probiotik dapat ditingkatkan melalui aplikasi prebiotik, yaitu bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri

tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Selanjutnya dijelaskan bahwa mekanisme potensi prebiotik mencakup meningkatkan/menurunkan bakteri usus tertentu yang secara selektif memodulasi sitokin dan produksi antibodi, meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek pada usus dan meningkatkan pengikatan asam lemak pada reseptor protein *G-coupled* pada *leucocytes*, peningkatan interaksi reseptor karbohidrat pada sel epitel usus dan sel imun.

Gibson *et al.* (2004) menyatakan beberapa persyaratan bahan yang dapat dijadikan sebagai prebiotik adalah: (a) tahan terhadap keasaman lambung, mampu dihidrolisis oleh enzim-enzim pencernaan dan penyerapan pada saluran gastrointestinal, (b) dapat difermentasi oleh mikrobiota intestinal, dan (c) secara selektif merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri probiotik. Jenis prebiotik yang telah diteliti dan diaplikasikan dalam akuakultur antara lain *fructooligosaccharides* (FOS), *short-chain fructooligosaccharides* (scFOS), *mannanooligosaccharides* (MOS), *galactooligosaccharides* (GOS), *xylooligosaccharides* (XOS), *trans-galactooligosaccharides* (TOS), dan *isomaltooligosaccharides* (IMO) dan inulin (Ringo *et al.* 2010). Prebiotik yang digunakan pada penelitian ini adalah *mannanooligosakarida* (MOS) yang telah diuji mampu meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup juvenil udang vaname (Zhang *et al.* 2012).

Sebelum diaplikasikan sebagai probiotik pada organisme budidaya, suatu jenis bakteri perlu dikaji potensinya sebagai probiotik seperti kemampuan berkolonisasi, tumbuh dan berkembang di dalam saluran pencernaan inang, kemampuan memproduksi enzim pencernaan ekstraseluler, dan kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen. Selain pengujian sebagai probiotik ideal juga penting dilakukan evaluasi terhadap kemampuan suatu jenis probiotik dalam memanfaatkan prebiotik sebagai sumber energi dan nutrisi tambahan untuk merangsang pertumbuhan dan aktivitas probiotik tersebut. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi bakteri *P. piscicida* (1Ub) sebagai probiotik dan kemampuannya memanfaatkan prebiotik *mannanooligosakarida* (MOS) secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian tahap I dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Juni 2015. Penyiapan probiotik dan prebiotik serta pengujian probiotik secara *in vitro* dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Analisis aktivitas enzim bakteri probiotik dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Hewan PAU IPB.

Prosedur Penelitian

Penyiapan probiotik dan prebiotik

Probiotik yang digunakan adalah bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub, hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009). Isolat bakteri *P. piscicida* 1Ub dibuat resistan terhadap antibiotik rifampisin (1Ub Rf^R) sebagai

penanda (Lampiran 5). Bakteri 1Ub Rf^R dikultur pada media *sea water complete* (SWC)-agar miring (0.5 g bacto pepton, 0.1 g ekstrak ragi, 0.3 mL gliserol, 1.5 g bacto agar, 75 mL air laut, dan 25 mL akuades) dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri diinokulasikan ke media SWC-*broth* dan diinkubasi di *waterbath shaker* dengan suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 24 jam.

Prebiotik yang digunakan adalah Bio-MOS (Alltech Inc., KY USA) mengandung mannanoligosakarida (MOS) yang berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* dengan komposisi minimal 30% protein kasar, minimal 1.4% lemak kasar dan maksimum 13% serat kasar.

Penentuan fase pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Penentuan fase pertumbuhan bakteri berguna untuk menentukan bentuk kurva pertumbuhan bakteri sehingga dapat digunakan untuk menentukan kecepatan pencapaian fase eksponensial dan waktu generasi bakteri. Sediaan kultur segar bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R diambil 1 mL dan diinokulasi ke dalam 100 mL media SWC-*broth* dan diinkubasi pada suhu 29°C. Pertumbuhan bakteri diamati setiap 2 jam selama 24 jam dengan mengukur nilai kerapatan atau densitas optikal (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm (Hadioetomo 1993). Bersamaan dengan pengukuran fase pertumbuhan, dilakukan juga pengukuran populasi bakteri setiap 2 jam dengan metode hitungan cawan. Populasi bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R yang tumbuh ditentukan dalam *Colony Forming Unit* (CFU) dan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$PM = \frac{K}{A \times B}$$

Keterangan :

PM = populasi mikrob (CFU/mL)

K = jumlah koloni

A = volume inokulasi dari media pengencer ke media padat (mL)

B = pada pengenceran seberapa koloni mikrobnnya dihitung

Uji Ketahanan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap Kondisi Asam dan Basa

Pengujian ketahanan bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R terhadap kondisi asam dan basa dilakukan menurut Ngatirah *et al.* (2000). Pengujian ini dilakukan dengan menginokulasi 1 mL isolat bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R ke dalam satu seri tabung yang berisi 9 mL larutan media SWC-*broth* pada pH 4 (pH diatur dengan penambahan HCl) dan pH 8.5 (pH diatur dengan penambahan NaOH) serta pH 7.0 sebagai kontrol, kemudian diinkubasi pada suhu 29°C. Pengamatan dilakukan pada jam ke- 2, 4, 6, dan 8 setelah inokulasi dengan metode hitungan cawan. Semakin kecil selisih jumlah koloni yang tumbuh pada kontrol dan perlakuan semakin tahan bakteri yang diuji terhadap kondisi asam lambung dan garam empedu (basa).

Uji kemampuan penempelan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Uji penempelan atau adhesi dilakukan menggunakan lempeng *stainless steel* yang telah dibersihkan dan disterilisasi dengan autoklaf (Dewanti dan Wong 1995). Lempeng *stainless steel* diletakkan di dalam 25 mL media SWC-*broth* yang diinokulasi dengan 1 mL kultur bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R ke dalam Erlenmeyer 100 mL, diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Densitas biofilm dianalisis setelah 24 jam dengan cara membilas lempeng dengan larutan PBS. Kemudian, dengan menggunakan *swab* permukaan lempeng diseka secara merata. *Swab* dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 10 mL PBS dan divorteks selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan kultur bakteri dan jumlah bakteri yang tumbuh dihitung dengan metode hitungan cawan dan dinyatakan dalam CFU/cm². Jumlah bakteri yang tumbuh pada fase cair juga dihitung dengan metode hitungan cawan dan dinyatakan dalam CFU/mL.

Pengujian aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan manolitik bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R ditumbuhkan pada media SWC-agar yang masing-masing telah ditambahkan pati sebanyak 2 % (w/v) untuk uji amilolitik, susu skim sebanyak 2 % (w/v) untuk uji proteolitik, minyak zaitun sebanyak 2 % (v/v) untuk uji lipolitik, dan MOS sebanyak 2 % (w/v) untuk uji manolitik. Kemampuan menghidrolisis protein ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling isolat yang ditumbuhkan pada media agar dengan penambahan susu skim. Hidrolisis lemak ditandai dengan adanya warna kehijauan pada media agar dengan penambahan minyak zaitun, setelah permukaan media digenangi *kopper sulfat* (CuSO₄) jenuh. Kemampuan menghidrolisis karbohidrat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni yang tumbuh, setelah media digenangi dengan reagen KI 1%. Sementara kemampuan menghidrolisis MOS ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni yang tumbuh, setelah media digenangi *congo red* 0.1 %. Indeks aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan manolitik bakteri *P. piscicida* (1Ub) diukur sesuai Zahidah dan Shovitri (2013).

$$\text{Indeks Aktivitas} = \frac{\text{diamater zona bening} - \text{diameter koloni bakteri}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

Pengujian Aktivitas Enzim yang dihasilkan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R diinokulasi ke dalam 10 mL media SWC-*broth*, diinkubasi dalam *shaker waterbath* pada suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 24 jam. Inokulum kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C (Irawadi 1991). Filtrat ekstrak *crude enzyme* kemudian diambil untuk uji aktivitas enzim amilase, lipase dan protease. Aktivitas amilase diukur menggunakan pati 1% sebagai substrat dalam buffer natrium fosfat 20 mM, pH 6.9 dan mengandung NaCl 6.0 mM mengikuti Worthington (1993). Aktivitas lipase dihitung dengan menggunakan emulsi minyak zaitun sebagai substrat dan Tris-HCL sebagai bufer sesuai dengan Borlongan (1990). Aktivitas

protease dihitung dengan menggunakan kasein sebagai substrat, buffer fosfat 0.05 M pH 7 dan tirosin 5 mmol/L sebagai standar sesuai dengan metode Bergmeyer *et al.* (1983).

Sementara untuk pengukuran aktivitas enzim mananase, isolat probiotik *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dikultur pada 100 mL media BSM yang mengandung 0.5% larutan manan (*locust bean gum*), diinkubasi dalam *shaker waterbath* pada suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 24 jam. Inokulum kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Filtrat ekstrak *crude enzyme* (enzim ekstrak kasar) kemudian diambil untuk uji aktivitas enzim mananase (Hossain *et al.* 1996).

Uji penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap bakteri patogen

Uji kemampuan penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* dilakukan secara *in vitro* dengan metode Kirby-Bauer dan metode kultur bersama. Uji penghambatan dengan metode Kirby-Bauer dilakukan menggunakan kertas cakram dengan mengukur zona hambatnya. Inokulum bakteri *V. harveyi* 10³ CFU/mL sebanyak 100 µL disebar merata pada media SWC-agar, selanjutnya kertas cakram dengan diameter 0.5 cm direndam dalam inokulum bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dengan kepadatan 10⁶ CFU/mL lalu diletakkan di atas media SWC-agar dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong. Indeks penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) diukur menurut Zahidah dan Shovitri (2013).

Uji penghambatan dengan metode kultur bersama dilakukan dengan cara inokulum bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dengan kepadatan 10⁶ CFU/mL dan *V. harveyi* 10³ CFU/mL masing-masing 100 µL dimasukkan ke dalam 10 mL media SWC-broth dan diinkubasi selama 24 jam pada *shaker waterbath* dengan suhu 29°C dan kecepatan 140 rpm. Sebagai kontrol digunakan bakteri *V. harveyi* ditambah larutan fisiologis steril (NaCl 0.85%) dan ditumbuhkan pada media SWC-broth. Inokulum hasil kultur bersama (*P. piscicida* + *V. harveyi*) dan inokulum bakteri *V. harveyi* (kontrol) masing-masing ditumbuhkan pada media TCBS. Hasil penghambatan dengan metode kultur bersama diketahui dengan membandingkan jumlah koloni bakteri *V. harveyi* yang tumbuh pada media TCBS dari kedua inokulum tersebut.

Uji kemampuan MOS dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Uji ini dilakukan secara *in vitro* pada 50 mL media SWC-broth yang dikurangi 50% nutrisinya dan ditambahkan MOS sebanyak 0.2 g sebagai sumber gula. Bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dikultur pada media tersebut dan diinkubasi dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 140 rpm pada suhu 29°C selama 16, 18, dan 20 jam. Selanjutnya kultur probiotik *P. piscicida* (1Ub) Rf^R tersebut ditumbuhkan pada media SWC-agar dengan metode hitungan cawan. Kemampuan MOS dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dapat diketahui dengan membandingkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media yang mengandung MOS dan pada media tanpa penambahan MOS (kontrol). Waktu generasi bakteri *P. piscicida* (1Ub) Rf^R dihitung berdasarkan Sariadji *et al.* (2015).

$$\text{Jumlah generasi} = \frac{(\log 10 \text{ jumlah sel akhir}) - (\log 10 \text{ jumlah sel awal})}{0.301}$$

$$\text{Waktu generasi} = \frac{60 \text{ menit} \times \text{jam}}{\text{Jumlah generasi}}$$

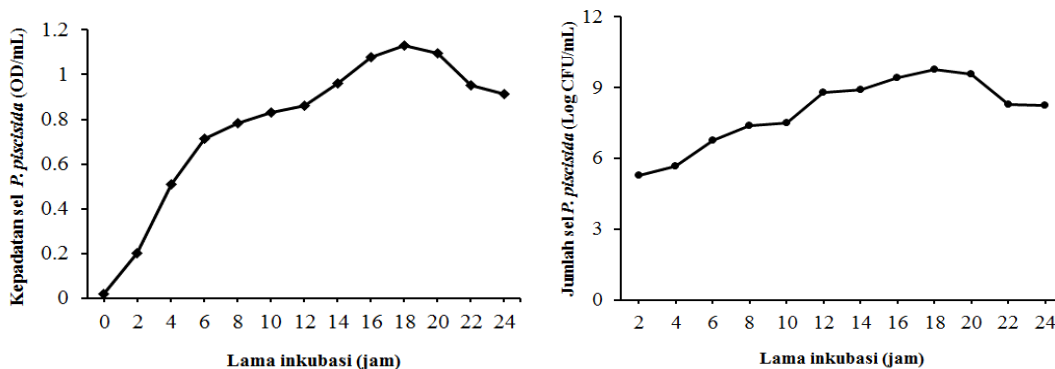
Analisis data

Data yang diperoleh pada penelitian tahap pertama akan dianalisis secara deskriptif eksploratif.

HASIL

Pertumbuhan Bakteri *P. piscicida* (1Ub)

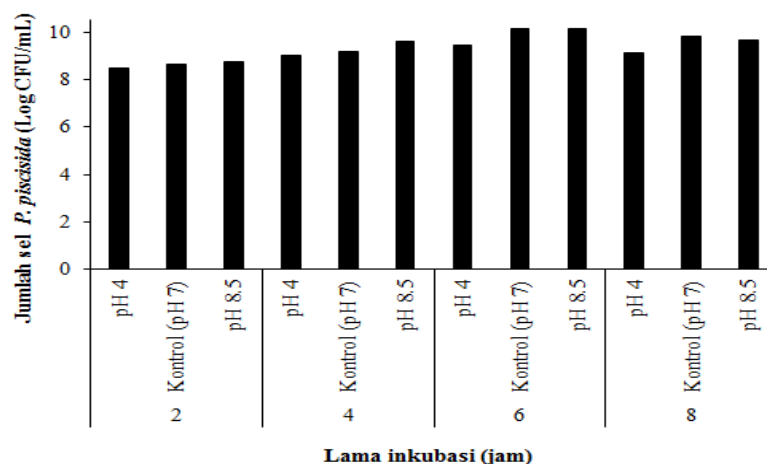
Pengamatan fase pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui fase pertumbuhan eksponensial bakteri *P. piscicida* (1Ub). Selain itu pengamatan ini juga penting untuk menentukan waktu panen sel bakteri yang tepat untuk memproduksi suatu produk atau senyawa metabolit, antara lain enzim, antimikroba, vitamin, asam organik, asam lemak, asam amino dan peptida. Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) berdasarkan densitas optikal (OD) dan jumlah koloni bakteri (CFU/mL) selama 24 jam disajikan pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Pola pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) selama 24 jam pengamatan berdasarkan densitas optikal (OD) (grafik kiri) dan berdasarkan jumlah koloni bakteri (grafik kanan)

Ketahanan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap Kondisi Asam dan Basa

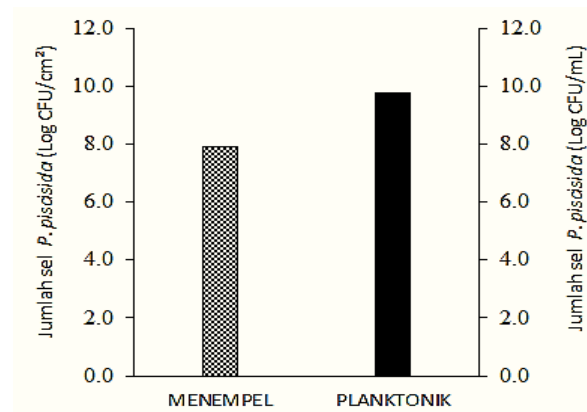
Berdasarkan hasil uji ketahanan terhadap lingkungan asam dan basa, diketahui bahwa bakteri *P. piscicida* (1Ub) menunjukkan toleransi yang baik dan mampu bertahan hidup dalam kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) selama periode pengamatan. Hal ini terlihat dari kecilnya selisih jumlah koloni bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) dibandingkan dengan kontrol (pH 7), yaitu masing-masing berkisar 0.14-0.72 CFU/mL dan 0.02-0.41 CFU/mL (Gambar 3).



Gambar 3. Jumlah sel bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media dengan pH 4 (asam), pH 8.5 (basa) dan media kontrol (pH 7).

Kemampuan penempelan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Pengujian ini merupakan simulasi kemampuan bakteri untuk menempel pada permukaan usus. Kemampuan membentuk biofilm ditentukan oleh faktor penempelan pada permukaan padat atau substrat. Bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki kemampuan menempel dan membentuk biofilm pada permukaan lempeng *stainless steel* dengan kepadatan bakteri sebanyak $7.91 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (81.2%) dibandingkan kepadatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) pada media SWC-cair (planktonik) sebanyak $9.74 \log \text{CFU}/\text{mL}$ (Gambar 4).



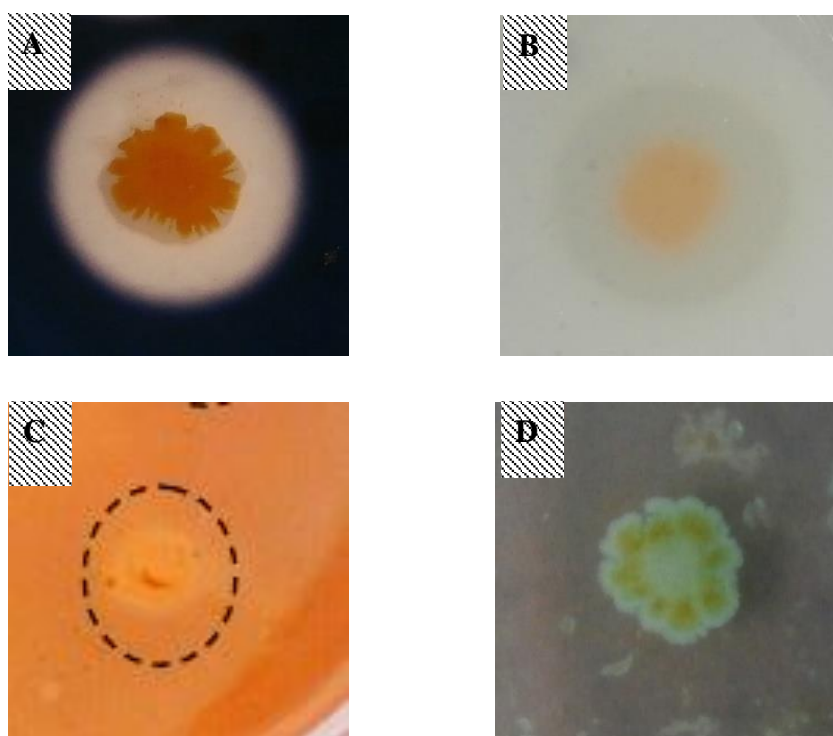
Gambar 4. Jumlah sel bakteri *P. piscicida* 1Ub yang tumbuh pada permukaan lempeng *stainless steel* (Menempel) dan pada media SWC-cair (Planktonik).

Aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan mananolitik bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan manolitik. Hal ini terlihat dari kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) menghidrolisis media dengan penambahan substrat pati, susu skim, minyak zaitun, dan MOS (Tabel 1 dan Gambar 5).

Tabel 1. Aktivitas amilolitik, proteolitik, mananolitik, dan lipolitik bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Aktivitas	Diameter zona bening (cm)	Diameter koloni bakteri (cm)	Indeks Aktivitas
Amilolitik	1.85±0.07	0.75±0.07	1.47±0.14
Proteolitik	1.70±0.14	0.80±0.04	1.19±0.08
Mananolitik	1.55±0.07	0.65±0.07	1.39±0.15
Lipolitik	dicirikan dengan koloni bakteri berwarna kehijauan		

Gambar 5. Kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) menghidrolisis pati (A), susu skim (B), MOS (C), dan minyak zaitun (D).

Aktivitas Enzim yang dihasilkan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Bakteri *P. piscicida* (1Ub) mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Hasil analisis aktivitas enzim protease, lipase, amilase, dan mananase bakteri *P. piscicida* (1Ub) disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas enzim protease, lipase, amilase, dan mananase bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Nama Isolat	Aktivitas Enzim (U/mL/menit)			
	Protease	Lipase	Amilase	Mananase
Bakteri <i>P. piscicida</i> 1Ub	0.031±0.030	0.198±0.058	0.008±0.003	0.019±0.004

Penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*

Hasil uji kemampuan penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap bakteri patogen *V. harveyi* melalui metode Kirby-Bauer dan metode kultur bersama menunjukkan bahwa bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen tersebut dengan nilai indeks penghambatan sebesar 1.5 ± 0.28 (Tabel 3) serta mampu mereduksi patogen tersebut sehingga tidak dapat tumbuh melalui metode kultur bersama (Tabel 4).

Tabel 3. Aktivitas penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dengan metode Kirby-Bauer

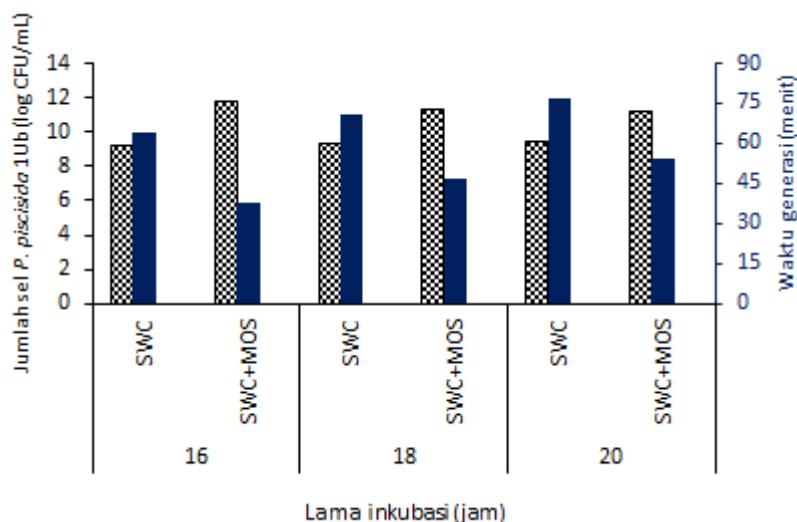
Metode Kirby-Bauer	Diameter zona bening (cm)	Diameter koloni bakteri (cm)	Indeks penghambatan
1Ub vs <i>V.harveyi</i>	2.125 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.5 ± 0.28

Tabel 4. Aktivitas penghambatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dengan metode kultur bersama

Metode Kultur Bersama	Total bakteri <i>V. harveyi</i> (Log CFU/mL)	Persentase penghambatan (%)
<i>V. harveyi</i> (Kontrol)	9.46 ± 0.15	0
1Ub dan <i>V. harveyi</i> (kultur bersama)	0	100

Kemampuan MOS dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

Prebiotik mannanoligosakarida (MOS) mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub). Hal ini terlihat dari jumlah koloni bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media SWC yang mengandung MOS lebih banyak dibandingkan pada media SWC tanpa penambahan MOS (kontrol). Kepadatan bakteri *P. piscicida* (1Ub) pada media yang mengandung MOS selama inkubasi 16 jam sampai 20 jam rata-rata sebanyak $11.47 \log \text{CFU/mL}$ sementara pada media tanpa penambahan MOS (kontrol) rata-rata sebanyak $9.33 \log \text{CFU/mL}$ atau terjadi peningkatan laju pertumbuhan sel *P. piscicida* (1Ub) rata-rata sebesar $2 \log \text{CFU/mL}$ (Gambar 6). Demikian pula rata-rata waktu generasi bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media SWC yang mengandung MOS lebih cepat (46 menit) dibandingkan pada media SWC tanpa penambahan MOS (70 menit).



Gambar 6. Jumlah sel dan waktu generasi *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media SWC dan media SWC+MOS.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) bersifat Gram negatif, berbentuk batang, motil, aerobik, dan mesofilik. Jika ditumbuhkan di media SWC, koloni bakteri ini berwarna orange cerah sedangkan pada media TCBS bakteri ini tidak dapat tumbuh karena tidak termasuk dalam genus *Vibrio*. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari periode awal yaitu fase lamban (fase lag), kemudian diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase log), lalu mendatar (fase statis) dan akhirnya diikuti oleh penurunan populasi sel-sel hidup (fase kematian) (Pelczar & Chan 1986). Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* 1Ub berdasarkan densitas optikal (OD) dan jumlah koloni bakteri (CFU/mL) selama 24 jam diperoleh puncak pertumbuhan bakteri *P. piscicida* 1Ub terjadi pada jam ke-18 setelah inkubasi dengan konsentrasi bakteri sebesar 9.75 log CFU/mL (Gambar 2).

Toleransi bakteri terhadap media hidup pada lingkungan asam dan basa mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu bertahan hidup pada lambung yang ber-pH rendah akibat sekresi asam lambung dan juga mampu bertahan dengan garam empedu yang ber-pH tinggi. Bakteri *P. piscicida* 1Ub menunjukkan toleransi yang baik dan mampu bertahan dalam kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) selama periode pengamatan. Hal ini terlihat dari kecilnya selisih jumlah sel bakteri *P. piscicida* 1Ub yang tumbuh pada kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) dibandingkan jumlah sel bakteri *P. piscicida* 1Ub pada kontrol (pH 7). Tingginya toleransi tersebut disebabkan bakteri *P. piscicida* 1Ub merupakan mikroflora normal pada saluran pencernaan yang telah memiliki kemampuan beradaptasi dengan kondisi asam lambung dan garam empedu dalam saluran pencernaan. Bakteri *P. piscicida* 1Ub yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009). Demikian juga dengan kemampuan untuk menempel pada substrat di permukaan usus. Bakteri kandidat probiotik diharapkan mampu berkompetisi pada tempat penempelan sehingga bisa menekan pertumbuhan bakteri merugikan dalam saluran pencernaan.

Merrifield *et al.* (2010) menjelaskan bahwa bakteri kandidat probiotik harus mampu menempel pada lapisan mukus usus dan memanfaatkan mukus sebagai sumber nutrisi untuk berkolonisasi, bersifat persisten dan mampu berproliferasi dalam saluran pencernaan. Secara *in vitro*, bakteri *P. piscicida* 1Ub memiliki kemampuan menempel dan membentuk biofilm pada permukaan lempeng *stainless steel* sebesar 81.2%.

Bakteri *P. piscicida* 1Ub memiliki aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan mananolitik. Hal ini terlihat dari kemampuan bakteri *P. piscicida* 1Ub menghidrolisis pati, susu skim, minyak zaitun, dan MOS (Tabel 1 dan Gambar 5). Kemampuan bakteri *P. piscicida* 1Ub menghidrolisis pati, susu skim, minyak zaitun, dan MOS sangat terkait dengan kemampuan bakteri *P. piscicida* 1Ub menghasilkan enzim eksogenus seperti amilase, protease, lipase, dan mananase (Tabel 2). Enzim eksogenus tersebut akan membantu enzim endogenus inang untuk menghidrolisis nutrisi pakan seperti memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein, dan lemak penyusun pakan serta mannanoligosakarida (MOS) yang dikandung oleh bahan pakan yang berfungsi sebagai prebiotik. Pemecahan molekul-molekul kompleks ini menjadi molekul sederhana akan mempermudah pencernaan pakan dan penyerapan nutrisi pakan dalam saluran pencernaan udang. Hal ini sejalan dengan pernyataan Wang *et al.* (2008) bahwa probiotik mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, lipase, dan selulase. Tzuc *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri *Pseudoalteromonas* sp. yang diisolasi dari lambung, usus, dan hepatopankreas udang vaname mampu menghasilkan enzim amilase, lipase, dan chitinase. Hakamada *et al.* (2014) melaporkan bahwa berbagai mikroorganisme seperti bakteri, *yeast*, dan fungi mampu memproduksi enzim mananase. Selanjutnya Ivanova *et al.* (2002) melaporkan bahwa beberapa bakteri mesofilik dan psikrofilik seperti *Pseudoalteromonas issachenkonii* diketahui mampu memanfaatkan *D-Mannose* dengan bantuan enzim mananase.

Enzim amilase dapat menghidrolisis amilum dan membantu pencernaan pada organisme. Enzim protease mampu menghidrolisis protein menjadi peptida, bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptida menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk metabolisme. Lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam menghidrolisis lemak, monogliserida, digliserida, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Falony *et al.* 2006). Fungsi utama dari enzim lipase adalah untuk mencerna lemak dan lipid, untuk mempertahankan fungsi sehat dari kantong empedu, menjaga keseimbangan elektrolit dalam tubuh, membantu dalam menjaga permeabilitas sel optimal sehingga memungkinkan nutrisi yang diperlukan masuk ke dalam sel untuk memperlancar metabolisme.

Seleksi probiotik biasanya didasarkan pada uji antagonistik secara *in vitro* (Verschuere *et al.* 2000). Penyakit vibriosis pada udang vaname diketahui sebagai salah satu penyebab rendahnya kelangsungan hidup baik pada usaha pembenihan maupun pembesaran udang vaname (Chrisolite *et al.* 2008; Saulnier *et al.* 2000). Selanjutnya Phuoc *et al.* (2009) menyatakan bahwa penyakit vibriosis yang menyerang udang vaname umumnya disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*. Hasil penelitian dengan metode Kirby-Bauer menunjukkan bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dengan nilai indeks penghambatan sebesar 1.5 ± 0.28 serta mampu mereduksi patogen tersebut

sehingga tidak dapat tumbuh melalui metode kultur bersama. Hasil penelitian serupa juga dilaporkan Widanarni *et al.* (2009) bahwa kandidat bakteri probiotik *P. piscicida* (1Ub) mampu mereduksi pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 hingga 100% melalui metode kultur bersama. Kemampuan *P. piscicida* (1Ub) dalam menghasilkan zat antimikroba atau kemampuan berkompetisi dengan bakteri patogen *V. harveyi* dalam kultur bersama, diharapkan mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut di dalam saluran pencernaan udang vaname. Menurut Kesarcodi-Watson *et al.* (2008), salah satu faktor penting dalam melakukan *screening* bakteri probiotik adalah kemampuan bakteri dalam menghasilkan zat inhibitor yang dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen.

Prebiotik mannanoligosakarida (MOS) yang digunakan pada penelitian ini mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub). Hal ini diindikasikan dengan meningkatnya pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) rata-rata sebesar 2 log CFU/mL (100 kali) pada media SWC yang mengandung MOS dibandingkan pada media SWC tanpa penambahan MOS (Gambar 6). Peningkatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) juga terlihat dari cepatnya waktu generasi bakteri tersebut pada media SWC yang mengandung MOS (46 menit) dibandingkan pada media SWC tanpa penambahan MOS (70 menit). Banyaknya sel bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media SWC yang mengandung MOS, selain karena ketersediaan MOS sebagai sumber nutrisi tambahan bagi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) juga dimungkinkan oleh kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) untuk memanfaatkan MOS dengan adanya aktivitas enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Cerezuola *et al.* (2011) menyatakan bahwa prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang. Ringo *et al.* (2010) melaporkan bahwa jenis prebiotik yang telah diteliti dan diaplikasikan dalam akuakultur antara lain inulin, *mannanooligosaccharides* (MOS), *fructooligosaccharides* (FOS), *fructooligosaccharides* rantai pendek (scFOS), *galactooligosaccharides* (GOS), *xylooligosakarides* (XOS), *trans-galaktooligosaccharides* (TOS), dan *isomaltooligosaccharides* (IMO).

SIMPULAN

Hasil evaluasi berdasarkan ketahanan terhadap kondisi asam dan basa, kemampuan penempelan, aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik dan manolitik, aktivitas enzim bakteri *P. piscicida* (1Ub), dan kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dapat disimpulkan bahwa bakteri *P. piscicida* (1Ub) berpotensi sebagai probiotik dan mampu memanfaatkan prebiotik MOS untuk menstimulasi pertumbuhannya.

POPULASI BAKTERI DAN KANDUNGAN NUTRISI *Artemia* sp. HASIL BIOENKAPSULASI DENGAN PROBIOTIK *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub), PREBIOTIK MANNANOLIGOSAKARIDA, DAN SINBIOTIK

ABSTRAK

Aplikasi probiotik dan prebiotik pada larva udang dapat dilakukan melalui metode bioenkapsulasi atau pengkayaan pakan alami *Artemia* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi total bakteri dan total probiotik dalam tubuh *Artemia* sp., serta kandungan nutrisinya setelah diperkaya dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik MOS). Bioenkapsulasi dilakukan dengan cara menambahkan probiotik 1Ub konsentrasi 10^6 CFU/mL, prebiotik MOS 12 mg/L, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan MOS konsentrasi 12 mg/L) pada masing-masing media pemeliharaan *Artemia* sp. selama 4 jam. Populasi bakteri dan probiotik 1Ub^{Rf} pada *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dihitung menggunakan media SWC-agar untuk total bakteri dan SWC-agar yang telah ditambah antibiotik rifampisin 50 ug/mL untuk total probiotik 1Ub^{Rf}. Kandungan nutrisi *Artemia* sp. ditentukan berdasarkan hasil analisis proksimat, kadar asam lemak, dan kadar asam amino. Hasil pengamatan menunjukkan populasi bakteri dan probiotik 1Ub^{Rf} dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi probiotik, prebiotik dan sinbiotik lebih tinggi dibanding kontrol. Jumlah total bakteri dan total probiotik 1Ub^{Rf} pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol yaitu masing-masing sebanyak 8.6 log CFU/0.1 g *Artemia* sp. dan 6.9 log CFU/0.1 g *Artemia* sp. Kadar protein *Artemia* sp. pada perlakuan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 52.67-53.06%, lebih tinggi dibanding kontrol (51.24±0.72%), demikian juga kadar lemak (15.33-16.98%), lebih tinggi dibanding kontrol (14.06±0.12%). Kadar asam butirat tertinggi diperoleh pada *Artemia* sp. yang diperkaya dengan prebiotik (0.0029±0.00014%). Pengkayaan *Artemia* sp. dengan sinbiotik juga menghasilkan nilai tertinggi (P<0.05) pada kadar asam linolenat (0.72±0.0023%). Kadar asam linoleat perlakuan sinbiotik tidak berbeda nyata (P>0.05) dengan perlakuan probiotik, namun keduanya berbeda nyata (P<0.05) dengan perlakuan prebiotik dan kontrol. Kadar asam linoleat *Artemia* sp. yang diperkaya dengan sinbiotik dan probiotik masing-masing sebesar 0.142±0.0009% dan 0.141±0.0018%. Demikian pula kandungan asam amino *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik menunjukkan nilai yang lebih tinggi (P<0.05) dibandingkan kontrol. Kadar asam amino tertinggi diperoleh pada asam amino leusin berkisar 4.98 - 5.19 ppt, sementara kadar asam amino terendah diperoleh pada asam amino histidin berkisar 1.77 - 1.82 ppt.

Kata kunci: probiotik, prebiotik, sinbiotik, *Artemia* sp., bioenkapsulasi.

THE BACTERIAL POPULATION AND THE NUTRITIONAL CONTENT OF *Artemia* sp. BIO-ENCAPSULATED WITH THE PROBIOTIC *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub), THE PREBIOTIC MANNAN-OLIGOSACCHARIDE AND THE SYNBIOTIC

ABSTRACT

The application of probiotic and prebiotic to shrimp larvae can be done through bio-encapsulation or enrichment of the natural feed (*Artemia* sp.). This study aimed to evaluate the total bacterial count, the total probiotic count in the body of *Artemia* sp., and the nutritional content after being enriched with the probiotic *P. piscicida* 1Ub, the prebiotic mannan-oligosaccharide (MOS) and a synbiotic (the combination between the probiotic *P. piscicida* 1Ub and the prebiotic MOS). The enrichment was done by adding the probiotic *P. piscicida* 1Ub at a concentration of 10^6 CFU mL⁻¹, 12 mg L⁻¹ prebiotic MOS, and the synbiotic (the combination between *P. piscicida* 1Ub at a concentration of 10^6 CFU mL⁻¹ and 12 mg L⁻¹ MOS) into the rearing medium of *Artemia* sp. for four hours. The bacterial count and the probiotic count in the enriched *Artemia* sp. were counted using SWC-agar medium for the total bacterial count and SWC-agar medium added with the antibiotic rifampicin 50 ug mL⁻¹ for the total probiotic count. The nutritional content of *Artemia* sp. was determined based on the results of the proximate analysis, amino acid and fatty acid levels after treatment. The results of this study revealed that the *Artemia* sp. enriched with the probiotic, prebiotic, and synbiotic had the higher values of total bacterial and probiotic count than those in the control, with the highest value obtained by the synbiotic treatment: 8.6 log CFU per 0.1 g *Artemia* for the total bacterial count and 8.6 log CFU per 0.1 g *Artemia* for the total probiotic count. The protein content of *Artemia* sp. in the probiotic, prebiotic, and synbiotic treatment ranged from 52.67 to 53.06%, which was higher than that in the control (51.24±0.72%), the fat content range in the treatment groups (15.33 to 16.98%) was also higher than that in the control (14.06±0.12%). The highest butyric acid level was obtained by *Artemia* sp. enriched with prebiotic (0.0029±0.00014%). The enrichment of *Artemia* sp. with the synbiotic resulted in the highest value (P<0.05) in linolenic acid level (0.72±0.0023%). The linoleic acid level of the synbiotic treatment was not significantly (P> 0.05) with the probiotic treatment, but both were significantly (P <0.05) with prebiotic and control treatment. The linoleic acid levels of *Artemia* sp. in the synbiotic and probiotic treatment respectively of 0.142± 0.0009% and 0.141 ± 0.0018%. The highest amino acid portion was obtained in the leucine amino acid which ranged from 4.98 to 5.19 ppt, while the lowest portion was obtained in the histidine amino acid which ranged from 1.77 to 1.82 ppt.

Keywords: probiotic, prebiotic, synbiotic, *Artemia* sp., bio-encapsulation

PENDAHULUAN

Artemia sp. merupakan pakan alami yang banyak digunakan dalam usaha pembenihan udang karena memiliki ukuran yang sesuai untuk larva, nilai nutrisi yang tinggi, serta mudah dicerna. Naupli *Artemia* sp. yang baru menetas mengandung protein 50.6%, karbohidrat 25.7%, lemak 14.2%, abu 9.4% dan nilai energi sebesar 18.97 KJ g⁻¹ (Cristopher *et al.* 2004). *Artemia* sp. dalam mengambil makanan bersifat penyaring tidak selektif (*non-selective filter feeder*), sehingga apa saja yang dapat masuk mulut *Artemia* sp. menjadi makanannya (Mohebbi *et al.* 2015). Sifat *Artemia* sp. yang *non-selective filter feeder* sangat memungkinkan dilakukan bioenkapsulasi *Artemia* dengan beberapa jenis pengkaya misalnya minyak ikan, minyak cumi, vitamin ataupun produk komersial lainnya termasuk probiotik dan prebiotik.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan berbagai bahan pengkaya secara signifikan mampu meningkatkan komposisi dan kandungan nutrisi biomassa *Artemia* sp. sehingga saat diberikan sebagai pakan hidup pada larva udang dan larva ikan mampu mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup kedua jenis larva tersebut (Sulistyowati *et al.* 2007; Widiastuti *et al.* 2012; Herawati *et al.* 2014; Jamali *et al.* 2014).

Aplikasi probiotik dan prebiotik pada larva udang melalui metode bioenkapsulasi atau pengkayaan *Artemia* merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk menghasilkan benih udang yang berkualitas dengan tingkat kelangsungan hidup dan pertumbuhan yang baik serta memiliki daya tahan terhadap penyakit (*specific pathogen resistance*) sehingga saat benih udang ditebar di tambak pembesaran telah memiliki respons pertumbuhan dan sistem imun yang lebih baik untuk menghadapi serangan berbagai patogen yang terdapat pada kondisi lapang di tambak. Beberapa hasil penelitian telah membuktikan keberhasilan probiotik dalam meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun dan resistansi udang (Nimrat *et al.* 2012; Zokaeifar *et al.* 2012; Widanarni *et al.* 2015). Demikian pula prebiotik dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, dan meningkatkan sistem imunitas udang (Li *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2012; Aktas *et al.* 2014).

Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik dan prebiotik diharapkan mampu meningkatkan akumulasi probiotik dan populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp. serta kandungan nutrisi *Artemia* sp. sehingga saat diberikan pada larva udang dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan, kelangsungan hidup, dan respon imunitas larva udang. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi total bakteri dan total probiotik dalam tubuh *Artemia* sp., serta kandungan nutrisi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P.piscicida* 1Ub, prebiotik MOS dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik MOS).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian tahap II dilaksanakan pada bulan Agustus sampai bulan Oktober 2015. Penyiapan probiotik dan prebiotik, penetasan dan bioenkapsulasi *Artemia* sp., serta pengamatan populasi bakteri pada *Artemia* sp. dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Analisis proksimat *Artemia* sp. dilakukan di Laboratorium Nutrisi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Sementara analisis profil asam lemak dan profil asam amino esensial *Artemia* sp. dilakukan di PT. Saraswanti Indogenetik (SIG) Bogor.

Prosedur Penelitian

Penyiapan Probiotik dan Prebiotik

Probiotik yang digunakan adalah bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang dibuat resisten terhadap antibiotik rifampisin 50 ug/mL (1Ub Rf^R) sebagai penanda. Bakteri 1Ub Rf^R dikultur pada media *sea water complete* (SWC)-agar miring dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri diinokulasikan ke media SWC cair dan diinkubasi di *waterbath shaker* dengan suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 18 jam.

Prebiotik yang digunakan adalah Bio-MOS (Alltech Inc., KY USA) mengandung mannanoligosakarida (MOS) yang berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* dengan komposisi minimal 30% protein kasar, minimal 1.4% lemak kasar dan maksimum 13% serat kasar.

Penetasan dan Bioenkapsulasi *Artemia* sp.

Siste *Artemia* ditetaskan sebanyak 2 g/L air laut bersalinitas 30 g/L, diaerasi kuat, dan dipanen setelah 24 jam. Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dilakukan pada stadia instar 2 (sekitar 4 jam setelah panen) menggunakan wadah plastik yang diisi air laut bersalinitas 30 g/L sebanyak 1 L. Kepadatan *Artemia* sp. pada masing-masing wadah adalah 100 individu/mL. Bioenkapsulasi dilakukan dengan cara menambahkan masing-masing probiotik 1Ub Rf^R konsentrasi 10⁶ CFU/mL, prebiotik MOS sebanyak 12 mg/L, dan kombinasi 10⁶ CFU/mL probiotik 1Ub Rf^R dengan 12 mg/L MOS (sinbiotik) pada setiap wadah pengkayaan *Artemia* sp. selama 4 jam. Penentuan konsentrasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik, *Artemia* sp. stadia instar 2 dan lama waktu bioenkapsulasi yang digunakan didasarkan pada hasil terbaik saat dilakukan optimalisasi.

Pengukuran Parameter

Populasi Bakteri pada *Artemia* sp.

Populasi bakteri pada *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi diamati menggunakan media SWC-agar untuk total bakteri dan SWC-agar yang telah ditambah antibiotik rifampisin 50 ug/ml untuk probiotik *P. piscicida* (1Ub). Populasi bakteri dihitung menggunakan metode hitungan cawan.

Kandungan nutrisi *Artemia* sp.

Kandungan nutrisi *Artemia* sp. diukur berdasarkan analisis proksimat, kadar asam lemak, dan kadar asam amino yang dilakukan pada *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, sinbiotik, dan *Artemia* sp. tanpa pengkayaan (kontrol). Analisis proksimat mengikuti Takeuchi (1988), meliputi kadar protein, lemak, serat kasar, abu, dan bahan ekstrak tanpa nitrogen (BETN) (Lampiran 3). Pengujian asam amino dilakukan dengan metode *ultrahigh performance liquid chromatography* (UPLC), sementara uji profil asam lemak dilakukan dengan gas kromatografi (GC).

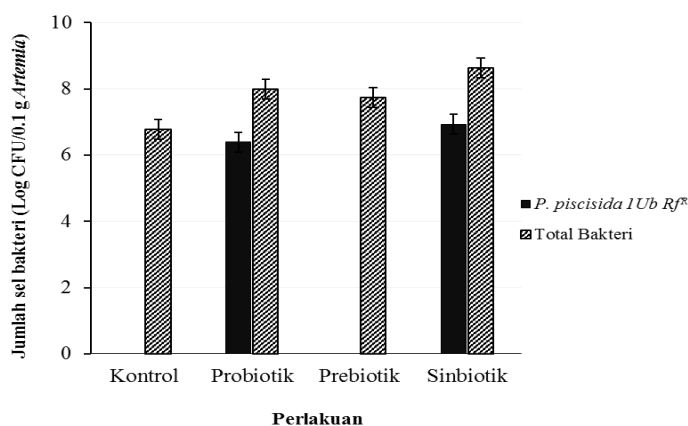
Analisis Data

Kandungan nutrisi *Artemia* sp. pada masing-masing perlakuan dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan uji Duncan pada selang kepercayaan 95% menggunakan program SPSS 20. Sementara data populasi bakteri pada *Artemia* sp. dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Populasi Bakteri pada *Artemia* sp.

Pemberian probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* 1Ub dengan MOS) pada *Artemia* sp. mampu memodulasi pertumbuhan mikroflora di dalam tubuh *Artemia* sp., sehingga jumlah populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi probiotik, prebiotik dan sinbiotik lebih tinggi dibanding kontrol. Jumlah total bakteri pada perlakuan sinbiotik sebanyak 8.6 log CFU/0.1 g *Artemia* sp., perlakuan probiotik sebanyak 8.0 log CFU/0.1 g *Artemia* sp., perlakuan prebiotik sebanyak 7.7 log CFU/0.1 g *Artemia* sp., dan perlakuan kontrol sebanyak 6.8 log CFU/0.1 g *Artemia* sp. Selain itu, bakteri probiotik *P. piscicida* 1Ub yang diberikan juga mampu hidup dan berkolonisasi dalam tubuh *Artemia* sp. Hal ini dapat diketahui karena adanya penanda resisten antibiotik rifampisin pada bakteri tersebut sehingga keberadaannya dalam tubuh *Artemia* sp. dapat dimonitor. Populasi bakteri probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi perlakuan probiotik sebanyak 6.4 log CFU/0.1 g *Artemia* sp. dan yang diberi perlakuan sinbiotik sebanyak 6.9 log CFU/0.1 g *Artemia* sp. (Gambar 7).



Gambar 7. Total bakteri dan probiotik *P. piscicida* 1Ub Rf^R di tubuh *Artemia* sp.

Kandungan Nutrisi *Artemia* sp.

Hasil analisis proksimat dan kadar asam lemak *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* 1Ub dengan MOS) disajikan pada Tabel 5 dan 6. Pengkayaan *Artemia* sp. dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap kadar protein dan lemak *Artemia* sp., namun tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap kadar serat kasar, abu, dan BETN. Kadar protein *Artemia* sp. pada perlakuan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 52.67-53.06%, sementara kadar lemak *Artemia* sp. berkisar 15.33-16.98%.

Berdasarkan kadar asam lemak *Artemia* sp. (Tabel 6), terlihat bahwa pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap kadar asam butirat, asam linoleat, dan asam linolenat *Artemia* sp. Kadar asam butirat tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada *Artemia* sp. yang diperkaya dengan prebiotik ($0.0029 \pm 0.00014\%$), disusul yang diperkaya dengan sinbiotik (0.0009 ± 0.00007), sedangkan pada perlakuan probiotik dan kontrol tidak terdeteksi adanya asam butirat. Pengkayaan *Artemia* sp. dengan sinbiotik juga memberikan nilai tertinggi ($P < 0.05$) terhadap kadar asam linolenat ($0.72 \pm 0.0023\%$). Kadar asam linoleat perlakuan sinbiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan perlakuan probiotik, namun keduanya berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan prebiotik dan kontrol. Kadar asam linoleat *Artemia* sp. yang diperkaya dengan sinbiotik dan probiotik masing-masing sebesar $0.142 \pm 0.0009\%$ dan $0.141 \pm 0.0018\%$.

Tabel 5. Hasil analisis proksimat *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik

Perlakuan	Protein (%)	Lemak (%)	Serat kasar (%)	Kadar abu (%)	BETN (%)
Kontrol	51.24 \pm 0.72 ^a	14.06 \pm 0.12 ^a	1.65 \pm 0.07 ^a	20.92 \pm 2.26 ^a	12.17 \pm 1.84 ^b
Probiotik	53.06 \pm 0.23 ^b	15.77 \pm 0.64 ^{ab}	2.00 \pm 0.70 ^a	18.80 \pm 0.57 ^a	10.38 \pm 3.09 ^b
Prebiotik	52.88 \pm 0.19 ^b	16.98 \pm 0.51 ^b	2.02 \pm 1.10 ^a	23.44 \pm 3.20 ^a	4.69 \pm 2.41 ^a
Sinbiotik	52.67 \pm 0.26 ^b	15.33 \pm 0.92 ^{ab}	1.65 \pm 0.88 ^a	19.15 \pm 3.18 ^a	11.62 \pm 2.85 ^b

Nilai rata-rata pada kolom yang sama dengan huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$).

Tabel 6. Kadar asam lemak (% total lemak) *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik

Profil Asam Lemak	Perlakuan			
	Kontrol	Probiotik	Prebiotik	Sinbiotik
Asam Butirat	nd	nd	0.0029 \pm 0.00014 ^b	0.0009 \pm 0.00007 ^a
Asam Linoleat	0.117 \pm 0.0013 ^a	0.141 \pm 0.0018 ^c	0.1270 \pm 0.00090 ^b	0.1420 \pm 0.00090 ^c
Asam Linolenat	0.530 \pm 0.0023 ^a	0.650 \pm 0.0127 ^c	0.5800 \pm 0.00780 ^b	0.7200 \pm 0.00230 ^d
EPA	0.018 \pm 0.0023 ^a	0.020 \pm 0.0031 ^a	0.0230 \pm 0.00090 ^a	0.0460 \pm 0.00010 ^a
DHA	nd	nd	nd	0.0180 \pm 0.00060

Nilai rata-rata pada baris yang sama dengan huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$). nd = not detected

Sementara hasil analisis kadar asam amino *Artemia* sp. (Tabel 7), terlihat bahwa pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap kadar asam amino *Artemia* sp. Kadar asam amino tertinggi diperoleh pada asam amino leusin berkisar 4.98 - 5.19 ppt, sementara kadar asam amino terendah diperoleh pada asam amino histidin berkisar 1.77 - 1.82 ppt.

Tabel 7. Kadar asam amino (ppt) *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik

Profil Asam Amino	Perlakuan			
	Kontrol	Probiotik	Prebiotik	Sinbiotik
Histidin	1.63±0.051 ^a	1.77±0.012 ^b	1.82±0.009 ^b	1.81±0.003 ^b
Threonin	3.61±0.065 ^a	3.85±0.066 ^b	3.99±0.007 ^c	3.87±0.016 ^{bc}
Arginin	2.92±0.010 ^a	3.30±0.034 ^c	3.13±0.046 ^b	4.56±0.061 ^d
Valin	3.42±0.029 ^a	3.69±0.043 ^c	3.53±0.055 ^{ab}	3.61±0.047 ^{bc}
Phenylalanin	3.36±0.042 ^a	3.48±0.087 ^a	3.78±0.019 ^b	3.89±0.131 ^b
Isoleusin	3.19±0.056 ^a	3.54±0.065 ^c	3.40±0.027 ^b	3.42±0.018 ^{bc}
Leusin	4.84±0.161 ^a	5.19±0.078 ^b	5.02±0.043 ^{ab}	4.98±0.075 ^{ab}
Lisin	2.01±0.037 ^a	4.84±0.002 ^d	2.73±0.015 ^b	4.10±0.025 ^c

Nilai rata-rata pada baris yang sama dengan huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$).

PEMBAHASAN

Probiotik *P. piscicida* 1Ub mampu hidup dan berkolonisasi dalam tubuh *Artemia* sp. yang ditunjukkan dengan data total bakteri dan bakteri probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam tubuh *Artemia* sp. (Gambar 7). Berdasarkan rata-rata total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam tubuh *Artemia* sp., terlihat bahwa pemberian sinbiotik menghasilkan total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* 1Ub yang lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya dan kontrol. Tingginya total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi perlakuan sinbiotik sangat dimungkinkan oleh kemampuan bakteri probiotik *P. piscicida* 1Ub untuk hidup dan berkolonisasi dalam tubuh *Artemia* sp. serta kemampuan memanfaatkan mannanoligosakarida dengan adanya enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri probiotik *P. piscicida* 1Ub. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yang melaporkan bahwa pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Vibrio alginolyticus* SKT-b dan prebiotik dari ekstrak ubi jalar) menghasilkan nilai tertinggi pada total bakteri dan total probiotik di dalam tubuh larva udang vaname. Pemberian sinbiotik diketahui mampu mengoptimalkan fungsi dan meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan dalam usus inangnya (Delgado *et al.* 2011).

Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* 1Ub dengan MOS) juga mampu meningkatkan kandungan nutrisi *Artemia* sp. terutama kadar protein, kadar lemak, profil asam lemak, dan kadar asam amino *Artemia* sp. (Tabel 5, 6, dan 7).

Peningkatan kandungan nutrisi *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sangat dimungkinkan terjadi sebagai akibat dari kolonisasi sejumlah bakteri menguntungkan dalam tubuh *Artemia* sp. dan kemampuan probiotik menghasilkan beberapa enzim eksogenus seperti protease, lipase, amilase, dan mananase (Tabel 2). Hal ini sejalan dengan pernyataan Balcázar *et al.* (2006), bahwa pengaruh menguntungkan dari probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada inangnya diduga terjadi sebagai akibat dari kolonisasi sejumlah bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan inang. Probiotik juga terbukti mampu menghasilkan enzim protease, amilase, dan lipase, vitamin, asam lemak serta asam amino sebagai kofaktor pada proses pencernaan yang selanjutnya akan meningkatkan efisiensi pakan dan kinerja pertumbuhan yang ditunjukkan dengan perbaikan nilai nutrisi tubuh inangnya (Balcázar *et al.* 2006). Abdelhamid *et al.* (2009) melaporkan bahwa peningkatan dosis probiotik dapat meningkatkan kadar protein, lemak, dan energi pada tubuh ikan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa pemberian substansi yang mampu memodulasi populasi bakteri pada saluran pencernaan organisme akuatik (probiotik, prebiotik, dan sinbiotik) akan menginduksi perbaikan nilai nutrisi dari inangnya.

Kadar asam butirat, asam linoleat, asam linolenat, dan DHA *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, probiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* 1Ub dengan MOS) menunjukkan nilai yang lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol (Tabel 6). Hal ini sangat terkait dengan kemampuan prebiotik MOS dan probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam mensintesis lemak dan menstimulasi produksi asam lemak dalam tubuh *Artemia* sp. Prebiotik MOS yang digunakan berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* yang mengandung minimal 1.4% lemak kasar. Suplementasi prebiotik MOS dalam tubuh *Artemia* sp. akan meningkatkan jumlah mikroflora menguntungkan dalam tubuh *Artemia* sp. (Gambar 7). Peningkatan pertumbuhan mikroflora menguntungkan tersebut berdampak sinergis pada fermentasi oligosakarida tidak tercerna, surplus cadangan energi, sintesis vitamin B dan K, perbaikan struktur dan fungsi saluran pencernaan, reduksi kolesterol, dan produksi asam lemak rantai pendek/SCFA (Penders *et al.* 2006; Shadid *et al.* 2007). Ahmadi *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* mampu meningkatkan konsentrasi asam linoleat, asam linolenat, dan asam eikosapentaenoat (EPA) dalam tubuh *Artemia* sp. Demikian pula suplementasi probiotik *P. piscicida* 1Ub dalam tubuh *Artemia* sp. akan meningkatkan populasi dan aktivitas probiotik 1Ub dan mikroflora lain yang menguntungkan, meningkatkan sintesis enzim sehingga fermentasi nutrien pakan termasuk oligosakarida yang bersumber dari prebiotik MOS menjadi efisien. Balcázar *et al.* (2006) menyatakan bahwa probiotik terbukti mampu menghasilkan enzim protease, amilase, dan lipase, vitamin, asam lemak serta asam amino sebagai kofaktor pada proses pencernaan. Selanjutnya, Macfarlane dan Macfarlane (2002) menyatakan bahwa SCFA, terutama asetat, propionat, dan butirat adalah produk akhir yang mendominasi bakteri fermentasi di usus besar. Metabolit di atas terbentuk terutama dari polisakarida, oligosakarida, protein, peptida, dan prekursor glikoprotein.

Kadar asam butirat dan asam linolenat *Artemia* sp. tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada pemberian sinbiotik. Kadar asam linoleat pada pemberian sinbiotik dan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun keduanya berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pemberian prebiotik dan kontrol. DHA hanya terdeteksi pada

Artemia sp. yang diperkaya dengan sinbiotik, sementara pada perlakuan lainnya tidak terdeteksi. Hal ini berkaitan dengan tingginya kadar asam linolenat (C18:3n-3) dan asam linoleat (C18:2n-6) pada pemberian sinbiotik. Tocher (2003) menyatakan asam lemak DHA dan EPA biasanya disintesis dari asam lemak C-18. Hal yang sama juga dilaporkan Rani *et al.* (2006) bahwa kadar DHA tidak terdeteksi pada naupli *Artemia franciscana* tanpa pengkayaan (kontrol) dan naupli *Artemia franciscana* yang diperkaya dengan probiotik *Lactobacillus*.

Lemak dibutuhkan sebagai sumber energi metabolik dan sebagai bahan untuk pemeliharaan struktur dan integritas membran sel dalam bentuk fosfolipid. Komponen penyusun fosfolipid adalah asam lemak. Ada dua asam lemak yang menyusun lemak yaitu asam lemak non essential yang dapat disintesis oleh tubuh dan asam lemak essential yang harus diperoleh dari luar tubuh (Jobling 2002). Asam lemak yang essential bagi krustasea yaitu C18:2n-6 (linoleat), C18:3n-3 (linolenat), C20:5n-3 (*eicosapentaenoat*, EPA) dan C22:6n-3 (*docosahexanoat*, DHA) (D'Abramo 1997). EPA dan DHA memegang peran penting dalam mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup krustasea (D'Abramo & Sheen 1993; Suprayudi *et al.* 2004). EPA dan DHA dibutuhkan untuk fungsi membran sel, sedangkan DHA sangat penting untuk membran sel dari jaringan saraf dan sebagai prekursor untuk pembentukan eikosanoat yaitu beberapa macam hormon (Tocher 2003).

Kadar asam amino *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik (Tabel 7) menunjukkan nilai yang lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol. Asam amino tertinggi diperoleh pada asam amino leusin, sementara kadar asam amino terendah diperoleh pada asam amino histidin. Brown (2002) dan Herawati (2014) menyatakan bahwa leusin, isoleusin, valin dan lisin merupakan asam amino esensial yang penting untuk pertumbuhan larva ikan dan udang. Asam amino leusin berperan menjaga kesetimbangan nitrogen dan berperan dalam menjaga perombakan dan pembentukan protein. Asam amino isoleusin berfungsi sebagai penyusun protein. Fungsi asam amino valin yaitu menggantikan posisi asam glutamat yang berperan mengikat oksigen secara efektif. Sementara asam amino lisin berfungsi dalam pembentukan vitamin B1, bersifat anti virus, membantu penyerapan kalsium, pembentuk hormon dan antibodi, menstimulasi selera makan, dan memfasilitasi produksi karnitin untuk mengkonversi asam lemak menjadi energi (Herawati *et al.* 2012).

SIMPULAN

Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik mannanoligosakarida, dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik mannanoligosakarida) mampu meningkatkan populasi bakteri dan kandungan nutrisi *Artemia* sp. dengan hasil terbaik pada pemberian sinbiotik (kombinasi 10^6 CFU/mL 1Ub dengan 12 mg/L MOS).

**KINERJA PERTUMBUHAN DAN SINTASAN LARVA UDANG VANAME
YANG DIBERI PROBIOTIK 1Ub, PREBIOTIK MOS DAN SINBIOTIK
MELALUI BIOENKAPSULASI *Artemia* sp.**

ABSTRAK

Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik merupakan salah satu cara untuk meningkatkan pertumbuhan dan sintasan pada ikan, udang, dan organisme akuatik lainnya. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, populasi bakteri, dan sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub, prebiotik mannanoligosakarida (MOS), dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. Bioenkapsulasi dilakukan dengan cara menambahkan probiotik 1Ub konsentrasi 10^6 CFU/mL, prebiotik MOS 12 mg/L, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan MOS konsentrasi 12 mg/L) pada media pemeliharaan *Artemia* sp. selama 4 jam. Pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi ke larva udang dilakukan selama 13 hari (Mysis3 sampai PL12). Pertumbuhan panjang dan bobot tubuh larva udang vaname diamati pada awal dan akhir penelitian, sedangkan rasio RNA/DNA, aktivitas enzim pencernaan, sintasan dan jumlah total bakteri pada larva udang dianalisis pada akhir penelitian. Laju pertumbuhan harian (*daily growth rate*/DGR), panjang mutlak, rasio RNA/DNA, aktivitas enzim pencernaan, sintasan, dan jumlah total bakteri larva udang yang diberi prebiotik, probiotik, dan sinbiotik berbeda nyata ($P < 0.05$) dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan pemberian sinbiotik memberikan DGR ($24.39 \pm 0.31\%$ /hari), panjang mutlak (13.00 ± 0.50 mm), rasio RNA/DNA (0.6369 ± 0.0094), aktivitas enzim pencernaan (protease 0.033 ± 0.0007 ; lipase 0.047 ± 0.0010 ; amilase 0.853 ± 0.008 ; mananase 0.148 ± 0.004 U/mL/menit), sintasan ($92.67 \pm 1.26\%$), dan jumlah total bakteri (6.7×10^7 CFU/0.1 g larva) yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol. Pemberian probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. efektif meningkatkan kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, populasi bakteri, dan sintasan larva udang vaname dengan hasil terbaik pada pemberian sinbiotik.

Kata kunci: prebiotik, probiotik, sinbiotik, *Artemia* sp., udang vaname

**GROWTH PERFORMANCE AND SURVIVAL RATE OF PACIFIC
WHITE SHRIMP LARVAE SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC 1Ub,
PREBIOTIC MOS AND SINBIOTIC THROUGH
BIO-ENCAPSULATION OF *Artemia* sp.**

ABSTRACT

The application of probiotics, prebiotics and sinbiotic has been widely used as an attempt to promote the growth and the survival of fish, shrimp, and other aquatic organisms. This study aimed to evaluate growth performance, total bacteria, digestive enzyme activity and survival rate of Pacific white shrimp supplemented with *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub, mannan-oligosaccharide (MOS), and synbiotic (combination of *P. piscicida* 1Ub and MOS) through bioencapsulation of *Artemia* sp. Bioencapsulation of *Artemia* sp. was done by adding *P. piscicida* 1Ub

10^6 CFU/mL, MOS 12 mg/L, and synbiotic (*P. piscicida* 1Ub 10^6 CFU/mL and MOS 12 mg/L) to the rearing medium of *Artemia* sp. for 4 hours. The administration of the enriched *Artemia* sp. to the shrimp larvae was done from Mysis3 to PL12. The length and body weight of Pacific white shrimp larvae were observed at the beginning and the end of the study, while the RNA/DNA ratio, digestive enzyme activity, survival and total bacteria of shrimp larvae were analyzed at the end of the study. The results showed that the daily growth rate (DGR), absolute length, RNA/DNA ratio, digestive enzymes activity, survival, and the total bacteria of shrimp larvae given the probiotic, prebiotic, and synbiotic were higher ($P < 0.05$) than the control. The synbiotic treatment gave the best results in DGR ($24.39 \pm 0.31\%$ /day), absolute length (13.00 ± 0.50 mm), RNA/DNA ratio (0.6369 ± 0.0094), digestive enzyme activity (protease 0.033 ± 0.0007 ; lipase 0.047 ± 0.0010 ; amylase 0.853 ± 0.008 ; mannanase 0.148 ± 0.004 U/mL/min), survival rate ($92.67 \pm 1.26\%$), and total bacteria (6.7×10^7 CFU/0.1 g larvae). The administration of *P. piscicida* 1Ub, mannan-oligosaccharide, and synbiotic through bioencapsulation of *Artemia* sp. effectively improved the growth performance, total bacteria, digestive enzyme activity and survival rate of Pacific white shrimp larvae with the best results demonstrated by the synbiotic treatment.

Keywords: probiotic, prebiotic, synbiotic, *Artemia* sp., Pacific white shrimp

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan Indonesia di sektor perikanan budidaya. Bahkan Indonesia menjadi negara pengekspor udang terbesar keempat di dunia setelah India, Vietnam, dan Ekuador dengan volume ekspor sebesar 220.000 ton (FAO 2017). Perkembangan produksi udang vaname harus didukung oleh ketersediaan benih udang yang berkualitas baik dalam jumlah dan waktu yang tepat. Benih yang berkualitas baik akan memberikan pertumbuhan yang baik dan tingkat kelangsungan hidup yang tinggi. Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup udang.

Probiotik adalah mikroba tambahan yang memberikan pengaruh menguntungkan pada organisme budidaya karena dapat memodifikasi komunitas mikroba, memperbaiki nilai nutrisi, memperbaiki respons inang terhadap penyakit, memperbaiki kualitas lingkungan (Verschuere *et al.* 2000), serta dapat meningkatkan respons imun (Nayak 2010). Beberapa hasil penelitian telah membuktikan keberhasilan probiotik dalam meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun dan resistansi udang (Widanarni *et al.* 2010; Nimrat *et al.* 2012; Zokaefar *et al.* 2012; Widanarni *et al.* 2013). Pada penelitian ini digunakan probiotik *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub yang telah diuji mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio harveyi* dan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu (Widanarni *et al.* 2009)

Peran bakteri probiotik dapat ditingkatkan melalui aplikasi prebiotik, yaitu bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan prebiotik dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, kecernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen dan meningkatkan sistem imunitas udang (Li *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2012; Aktas *et al.* 2014). Prebiotik yang digunakan pada penelitian ini adalah *mannanooligosakarida* (MOS) yang telah diuji mampu meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup juvenil udang vaname (Zhang *et al.* 2012).

Bila probiotik dan prebiotik digabung dalam suatu produk tunggal (sinbiotik), maka manfaatnya menjadi meningkat (Lisal 2005). Penggunaan sinbiotik telah diuji dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun, dan resistansi terhadap organisme akuatik antara lain pada larva lobster Eropa, *Homarus gammarus* L. (Daniels *et al.* 2010; Daniels *et al.* 2013), dan udang putih, *L. vannamei* (Widanarni *et al.* 2012; Partida-Arangure *et al.* 2013; Nurhayati *et al.* 2015).

Sejauh ini aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih banyak diberikan pada juvenil dan udang dewasa melalui pakan buatan (Li *et al.* 2009; Widanarni *et al.* 2012; Partida-Arangure *et al.* 2013; Nurhayati *et al.* 2015), sementara pada larva baru dilakukan untuk larva *H. gammarus* L. (Daniels *et al.* 2010; Daniels *et al.* 2013) dan larva *L. vannamei* dengan probiotik SKT-b Rf^R dan prebiotik oligosakarida dari ekstrak ubi sukuh (Widanarni *et al.* 2015). Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sejak stadia larva penting dilakukan untuk menghasilkan benih udang yang berkualitas dengan tingkat pertumbuhan yang baik dan memiliki daya tahan terhadap penyakit sehingga saat benih udang ditebar di tambak pembesaran telah memiliki respons pertumbuhan dan sistem imun yang lebih baik untuk menghadapi serangan berbagai patogen yang terdapat pada kondisi lapang di tambak. Pada penelitian ini, pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname dilakukan melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. yang merupakan pakan utama bagi larva udang karena memiliki ukuran yang sesuai untuk larva, nilai nutrisi yang tinggi, serta mudah dicerna. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, populasi bakteri dan sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian tahap III dilaksanakan pada bulan Nopember sampai Desember 2015. Penyiapan probiotik dan prebiotik, penetasan dan bioenkapsulasi *Artemia* sp., pemeliharaan larva udang vaname serta pengamatan populasi bakteri pada larva udang vaname dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Analisa aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname dilakukan di Laboratorium Nutrisi Ternak, Fakultas Peternakan, IPB.

Prosedur Penelitian

Penyiapan Probiotik dan Prebiotik

Probiotik yang digunakan adalah bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang dibuat resisten terhadap antibiotik rifampisin 50 ug/mL (1Ub Rf^R) sebagai penanda.

Bakteri 1Ub Rf^R dikultur pada media *sea water complete* (SWC)-agar miring dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri diinokulasikan ke media SWC cair dan diinkubasi di *waterbath shaker* dengan suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm selama 18 jam.

Prebiotik yang digunakan adalah Bio-MOS (Alltech Inc., KY USA) mengandung mannanoligosakarida (MOS) yang berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* dengan komposisi minimal 30% protein kasar, minimal 1.4% lemak kasar dan maksimum 13% serat kasar.

Persiapan wadah, media pemeliharaan dan hewan uji

Wadah pemeliharaan larva udang vaname adalah akuarium berukuran 60x30x35 cm³ sebanyak 12 buah dan dilengkapi jaringan aerasi. Media pemeliharaan larva udang berupa air laut bersalinitas 30 g/L yang ditampung dalam tandon air dan telah didesinfeksi serta dilengkapi *heater* untuk menjaga suhu air (30±1°C). Setiap akuarium diisi air laut sebanyak 10 L dan dilengkapi aerasi. Hewan uji yang digunakan adalah larva udang vaname stadia mysis 3 dengan padat tebar 200 ekor tiap akuarium (20 ekor/L) mengacu pada penelitian Widanarni *et al.* (2010).

Penetasan Siste dan Bioenkapsulasi *Artemia* sp.

Siste *Artemia* ditetaskan sebanyak 2 g/L air laut bersalinitas 30 g/L, diaerasi kuat, dan dipanen setelah 24 jam. Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dilakukan pada stadia instar 2 (sekitar 4 jam setelah panen) menggunakan wadah plastik yang diisi air laut bersalinitas 30 g/L sebanyak 1 L. Kepadatan *Artemia* sp. pada masing-masing wadah adalah 100 individu/mL (Widanarni *et al.* 2013). Bioenkapsulasi dilakukan dengan cara menambahkan masing-masing probiotik 1Ub konsentrasi 10⁶ CFU/mL, prebiotik MOS sebanyak 12 mg/L, dan kombinasi 10⁶ CFU/mL probiotik 1Ub dengan 12 mg/L MOS (sinbiotik) pada setiap wadah bioenkapsulasi *Artemia* sp. Bioenkapsulasi dilakukan selama 4 jam (Widanarni *et al.* 2008). Selanjutnya *Artemia* sp. dipanen dengan cara disaring menggunakan plankton net dan dibilas dengan air laut steril, lalu diberikan pada larva udang vaname sebanyak 8-10 individu/larva (Nimrat *et al.* 2011) dan lebihnya disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C untuk penggunaan selanjutnya pada hari yang sama. Selama pemeliharaan dilakukan penyifonan dan pergantian air setiap 3 hari sekali sebanyak 5-10%.

Pemeliharaan Hewan Uji

Pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname dimulai pada stadia mysis 3 hingga PL12 sebanyak 8-10 individu/larva setiap kali pemberian. Pemberian *Artemia* dilakukan lima kali sehari pada pukul 06.00; 10.00; 14.00; 18.00; 22.00. Penelitian pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan tersebut adalah: (1) larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. tanpa bioenkapsulasi probiotik, prebiotik dan sinbiotik (kontrol); (2) larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik 1Ub Rf^R konsentrasi 10⁶ CFU/mL; (3) larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan prebiotik MOS sebanyak 12 mg/L; (4) larva udang vaname

yang diberi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan kombinasi probiotik 1Ub Rf^R konsentrasi 10⁶ CFU/mL dengan prebiotik MOS sebanyak 12 mg/L (sinbiotik).

Pengukuran Parameter

Populasi Bakteri pada Larva Udang Vaname

Populasi bakteri pada larva udang vaname dihitung pada akhir penelitian (PL12). Jumlah total bakteri dan populasi bakteri probiotik 1Ub pada larva udang vaname dihitung dengan menggunakan metode cawan sebar (Hadioetomo 1993). Larva udang pada setiap perlakuan dengan bobot 0.1 g digerus dan dihomogenkan dalam 0.9 mL *phosphate buffer saline* (0.8% NaCl; 0.15% K₂HPO₄; 0.02 Na₂HPO₄ dan 0.02% KCl), diencerkan secara serial (10 kali lipat pengenceran) lalu disebar pada media SWC-agar untuk menghitung total bakteri, dan pada media SWC-agar yang ditambahkan rifampisin (50 µg/mL) untuk menghitung populasi probiotik 1Ub. Selanjutnya koloni bakteri yang tumbuh dominan diidentifikasi dengan cara dilakukan sekuensing pada DNA bakteri hasil amplifikasi ke perusahaan penyedia jasa sekuensing. Hasil sekuen disejajarkan dengan *data base* di Gene Bank menggunakan program BLAST-N online *software* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Aktivitas Enzim Pencernaan

Analisis aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname meliputi enzim protease, lipase, amilase, dan mananase. Analisis ini dilakukan pada setiap perlakuan di akhir masa pemeliharaan. Prosedur analisis aktivitas enzim protease dan amilase mengacu pada Bergmeyer *et al.* (1983), prosedur analisis aktivitas enzim lipase mengacu pada Borlongan (1990) (Lampiran 4). Sementara prosedur analisis aktivitas enzim mananase mengacu pada Hossain *et al.* (1996).

Pertumbuhan Larva Udang Vaname

Panjang dan bobot tubuh larva udang vaname diukur pada awal dan akhir penelitian (PL12). Pertumbuhan larva udang vaname ditentukan berdasarkan laju pertumbuhan harian (*daily growth rate/DGR*) dan pertumbuhan panjang mutlak (L). DGR dihitung mengikuti Aalimahmoudi *et al.* (2016), dan pertumbuhan panjang mutlak (L) dihitung mengikuti Dehaghani *et al.* (2015).

$$DGR (\%/hari) = \left[\sqrt[t]{\frac{W_t}{W_o}} - 1 \right] \times 100$$

$$\text{Panjang mutlak (L)} = L_t - L_o$$

Keterangan:

- W_t = bobot rata-rata pada akhir perlakuan (mg)
- W_o = bobot rata-rata pada awal perlakuan (mg)
- t = periode pemeliharaan (hari)
- L_t = panjang rata-rata pada akhir perlakuan (mm)
- L_o = panjang rata-rata pada awal perlakuan (mm)

Sebagai pendukung parameter pertumbuhan, pada akhir penelitian dilakukan perhitungan rasio RNA/DNA larva udang menggunakan *gene quant calculator*. Ekstraksi RNA dan DNA larva udang dilakukan dengan cara memasukkan larva (n=3 ekor) dari masing-masing perlakuan ke tube 1.5 ml yang sudah berisi 200 µl isogen *on ice*, digerus sampai hancur sempurna. Setelah semua jaringan hancur, 400 µl isogen ditambahkan kemudian disimpan pada suhu ruang selama 5 menit untuk lisis, lalu ditambahkan 200 µl khloroform (CHCl₃), dihomogenkan dengan vorteks selama 15 detik kemudian disimpan pada suhu ruang selama 2-3 menit. Hasil lisis disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit, akan terbentuk 3 lapisan : supernatan (bening) pada lapisan atas adalah khloroform+RNA, lapisan kedua adalah protein, dan pelet adalah fenol+DNA (warna biru). Supernatan (khloroform+RNA) dan pelet (fenol+DNA) diambil dan masing-masing dipindahkan ke tube baru yang telah berisi 400 µl isopropanol, dihomogenkan lalu disimpan pada suhu ruang selama 5-10 menit, selanjutnya masing-masing disentrifugasi pada suhu 4°C dan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal di dasar tube ditambahkan 1 ml etanol 70% dingin. Selanjutnya disentrifugasi kembali pada suhu 4°C dan 10.000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang dan pelet dikering-udarkan. Setelah kering, pelet ditambahkan *diethylpyrocarbonate* (DEPC) 50 µl, dihomogenkan dengan vorteks dan disimpan di atas es. Selanjutnya konsentrasi RNA dan DNA genom diukur menggunakan *gene quant*. Konsentrasi RNA dan DNA adalah hasil pembacaan *gene quant* x faktor pengenceran, sedangkan rasio RNA/DNA dihitung dengan cara konsentrasi RNA total dibagi dengan konsentrasi DNA genom (Linacero *et al.* 1998).

Sintasan Larva Udang Vaname

Sintasan larva udang vaname pada setiap perlakuan dihitung pada akhir penelitian (Dehaghani *et al.* 2015) :

$$SR (\%) = \frac{Nt}{No} \times 100$$

Keterangan :

SR = sintasan (%)

Nt = jumlah udang hidup pada akhir percobaan (ekor)

No = jumlah udang pada awal percobaan (ekor)

Analisis Data

Data total bakteri tubuh, aktivitas enzim pencernaan, DGR, panjang mutlak, rasio RNA/DNA, dan sintasan larva udang vaname pada masing-masing perlakuan dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan uji Duncan pada selang kepercayaan 95% menggunakan program SPSS versi 20.

HASIL

Total Bakteri pada Larva Udang Vaname

Pemberian probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu memodulasi pertumbuhan mikroflora di dalam tubuh larva udang vaname, sehingga jumlah populasi bakteri dalam tubuh larva vaname pada perlakuan pemberian probiotik, dan sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan pemberian prebiotik dan kontrol. Jumlah total bakteri pada perlakuan sinbiotik sebanyak 6.70×10^7 CFU/0.1 g larva, perlakuan probiotik sebanyak 3.87×10^7 CFU/0.1 g larva, perlakuan prebiotik sebanyak 3.74×10^5 CFU/0.1 g larva, dan perlakuan kontrol sebanyak 2.42×10^5 CFU/0.1 g larva. Selain itu, bakteri probiotik 1Ub yang diberikan juga mampu hidup dan berkolonisasi pada saluran intestinal larva udang vaname. Hal ini dapat diketahui karena adanya penanda resisten antibiotik rifampisin pada bakteri tersebut sehingga keberadaannya dalam tubuh larva udang vaname dapat dimonitor. Populasi bakteri probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi perlakuan probiotik sebanyak 5.84×10^5 CFU/0.1 g larva, dan yang diberi perlakuan sinbiotik sebanyak 4.75×10^6 CFU/0.1 g larva.

Tabel 8. Total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

Perlakuan	Total Bakteri (CFU/0.1 g larva)	Total Probiotik 1Ub (CFU/0.1 g larva)
Kontrol	2.42×10^5 ^a	0
Probiotik	3.87×10^7 ^b	5.84×10^5 ^b
Prebiotik	3.74×10^5 ^a	0
Sinbiotik	6.70×10^7 ^c	4.75×10^6 ^c

Nilai rata-rata pada kolom yang sama diikuti huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai berbeda nyata ($P < 0.05$).

Hasil sekuensing terhadap bakteri dominan pada tubuh larva udang vaname menggunakan primer 16S rRNA diperoleh lima jenis bakteri, yaitu *Staphylococcus pasteurii*, *Tenacibaculum mesophilum*, *Pseudoalteromonas piscicida*, *Vibrio alginolyticus*, dan *Staphylococcus warneri*. Bakteri *Staphylococcus pasteurii* dominan ditemukan pada tubuh larva udang yang diberi probiotik 1Ub Rf^R dan sinbiotik. *Tenacibaculum mesophilum* dominan ditemukan pada tubuh larva udang yang diberi prebiotik MOS, probiotik 1Ub, dan kontrol. *Pseudoalteromonas piscicida* dominan ditemukan pada larva udang yang diberi probiotik 1Ub dan sinbiotik. Sementara bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Staphylococcus warneri* dominan ditemukan pada larva udang yang diberi probiotik 1Ub.

Aktivitas Enzim Pencernaan

Aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. menunjukkan nilai yang bervariasi antar perlakuan (Tabel 9). Aktivitas enzim protease pada perlakuan

sinbiotik dan probiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan prebiotik dan kontrol. Aktivitas enzim lipase dan amilase pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol. Demikian pula aktivitas enzim mananase pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol, namun perlakuan sinbiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan perlakuan probiotik dan prebiotik.

Tabel 9. Aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

Perlakuan	Aktivitas Enzim (U/mL/menit)			
	Protease	Lipase	Amilase	Mananase
Kontrol	0.011±0.0004 ^a	0.037±0.0015 ^a	0.576±0.004 ^a	0.070±0.001 ^a
Probiotik	0.022±0.0044 ^b	0.041±0.0005 ^c	0.788±0.006 ^c	0.119±0.052 ^{ab}
Prebiotik	0.013±0.0016 ^a	0.044±0.0005 ^b	0.613±0.008 ^b	0.109±0.004 ^{ab}
Sinbiotik	0.033±0.0007 ^c	0.047±0.0010 ^d	0.853±0.008 ^d	0.148±0.004 ^b

Nilai rata-rata pada kolom yang sama dengan huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$).

Probiotik 1Ub juga mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Hasil analisis aktivitas enzim yang dihasilkan probiotik 1Ub diperoleh enzim protease sebesar 0.0311±0.0302 U/mL/menit, enzim lipase sebesar 0.1978±0.0579 U/mL/menit, enzim amilase sebesar 0.008±0.0034 U/mL/menit, dan enzim mananase sebesar 0.0185±0.0036 U/mL/menit.

Kinerja Pertumbuhan

Hasil pengukuran kinerja pertumbuhan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. selama penelitian (mysis3 sampai PL12) disajikan pada Tabel 10. Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui *Artemia* sp. pada larva udang vaname memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap DGR dan panjang mutlak, namun terhadap rasio RNA/DNA hanya pemberian probiotik dan sinbiotik yang memberi pengaruh nyata ($P < 0.05$).

Tabel 10. Kinerja pertumbuhan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

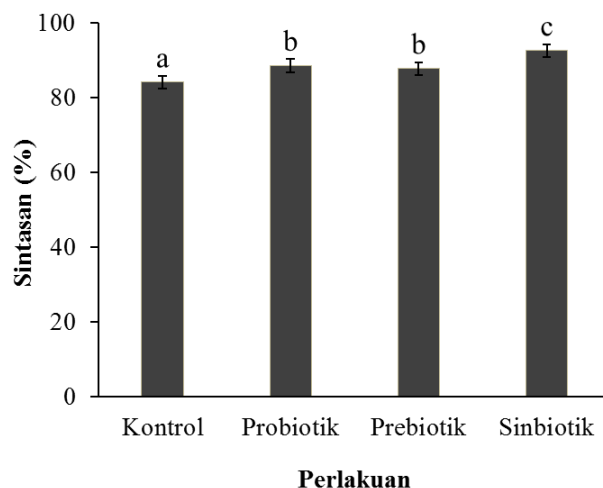
Perlakuan	DGR (%/hari)	Panjang mutlak (mm)	Rasio RNA/DNA
Kontrol	18.54±0.29 ^a	8.83±0.76 ^a	0.2834±0.0269 ^a
Probiotik	21.96±0.24 ^c	11.33±0.29 ^b	0.4207±0.0459 ^b
Prebiotik	21.30±0.39 ^b	10.83±0.58 ^b	0.3201±0.0349 ^a
Sinbiotik	24.39±0.31 ^d	13.00±0.50 ^c	0.6369±0.0094 ^c

DGR : laju pertumbuhan harian, Probiotik yang digunakan adalah 1Ub Rf^R, Prebiotik yang digunakan adalah MOS. Nilai rata-rata pada kolom yang sama diikuti dengan huruf superskrip berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$).

Nilai DGR tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik ($24.39 \pm 0.31\%$ /hari), disusul perlakuan probiotik ($21.96 \pm 0.24\%$ /hari), perlakuan prebiotik ($21.30 \pm 0.39\%$ /hari), dan terendah pada perlakuan kontrol ($18.54 \pm 0.29\%$ /hari). Demikian pula pertumbuhan panjang mutlak dan rasio RNA/DNA larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$). Pertumbuhan panjang mutlak tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik (13.00 ± 0.50 mm), disusul perlakuan probiotik (11.33 ± 0.29 mm), dan perlakuan prebiotik (10.83 ± 0.58 mm), sedangkan terendah adalah perlakuan kontrol (8.83 ± 0.76 mm). Rasio RNA/DNA larva udang vaname selama pemeliharaan berkisar $0.2834 - 0.6369$ (Tabel 10). Rasio RNA/DNA tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik (0.6369 ± 0.0094), disusul perlakuan probiotik (0.4207 ± 0.0459), sementara perlakuan prebiotik (0.3201 ± 0.0349), dan perlakuan kontrol (0.2834 ± 0.0269) tidak berbeda nyata.

Sintasan Larva Udang Vaname

Pemberian *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada larva udang vaname (mysis3 sampai PL12) mampu memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap sintasan larva udang vaname (Gambar 8). Sintasan tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik ($92.67 \pm 1.26\%$), disusul perlakuan probiotik ($88.67 \pm 1.76\%$), perlakuan prebiotik ($87.83 \pm 1.76\%$), dan terendah pada perlakuan kontrol ($84.17 \pm 1.04\%$). Sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik adalah sama dengan yang diberi prebiotik, namun keduanya berbeda nyata dengan kontrol.



Gambar 8. Sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik 1Ub, prebiotik, MOS dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mulai mysis3 sampai PL12. Huruf berbeda di atas bar menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antarperlakuan.

PEMBAHASAN

Berdasarkan rata-rata total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname (Tabel 8), terlihat bahwa pemberian sinbiotik memberikan jumlah total bakteri dan total probiotik 1Ub lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol. Tingginya total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi perlakuan sinbiotik sangat dimungkinkan oleh kemampuan bakteri probiotik 1Ub untuk hidup dan berkolonisasi pada saluran intestinal larva udang vaname karena probiotik 1Ub yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009), serta kemampuan memanfaatkan mannanoligosakarida dengan adanya enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri probiotik 1Ub. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Widanarni *et al.* (2013) bahwa pemberian berbagai dosis bakteri probiotik SKT-b (*Vibrio alginolyticus*) melalui *Artemia* mampu meningkatkan jumlah total *Vibrio* pada tubuh pascalarva udang windu, dan pemberian enkapsulasi sinbiotik (*Bacillus* NP5 Rf^R dan oligosakarida) mampu meningkatkan populasi bakteri pada usus udang vaname hingga 9 log CFU/g (Zubaidah *et al.* 2015).

Hasil sekuensing terhadap bakteri dominan pada tubuh larva udang vaname menggunakan primer 16S rRNA (Marchesi *et al.* 1998) diperoleh lima jenis bakteri yaitu *Staphylococcus pasteurii*, *Tenacibaculum mesophilum*, *Pseudoalteromonas piscicida*, *Vibrio alginolyticus*, dan *Staphylococcus warneri*. Kelima jenis bakteri tersebut merupakan jenis bakteri yang umum dijumpai pada organisme yang hidup di air laut. Bakteri *T. mesophilum* berhasil diisolasi dari spong laut dan alga hijau (Suzuki *et al.* 2001). *S. pasteurii* dan *S. warneri* potensial sebagai probiotik yang memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup *Litopenaeus vannamei* (Lakshmi *et al.* 2015). Sementara probiotik 1Ub (*P. piscicida*) dan probiotik SKT-b (*V. alginolyticus*) telah diaplikasikan untuk meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang windu dan udang vaname (Widanarni *et al.* 2009; Nurhayati *et al.* 2015).

Keberadaan bakteri probiotik yang terakumulasi dalam pakan alami *Artemia* sp. dapat meningkatkan produksi enzim eksogenus dalam tubuh larva udang vaname. Probiotik 1Ub mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Kemampuan probiotik 1Ub menghasilkan beberapa enzim eksogenus tersebut memungkinkan aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname yang diberi perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol (Tabel 9). Menurut Wang *et al.* (2008), probiotik mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, lipase, dan selulase. Tzuc *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri *Pseudoalteromonas* sp. yang diisolasi dari lambung, usus, dan hepatopankreas udang vaname mampu menghasilkan enzim amilase, lipase, dan chitinase. Enzim protease mampu menghidrolisis protein menjadi peptida, bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptida menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk metabolisme. Enzim amilase dapat menghidrolisis amilum dan membantu pencernaan pada organisme. Lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis lemak, monogliserida, digliserida, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Falony *et al.* 2006). Fungsi utama dari enzim lipase adalah untuk mencerna lemak dan lipid, untuk mempertahankan fungsi sehat dari kantong

empedu, menjaga keseimbangan elektrolit dalam tubuh, membantu dalam menjaga permeabilitas sel optimal sehingga memungkinkan nutrisi yang diperlukan masuk ke dalam sel untuk memperlancar metabolisme.

Pencernaan di lambung dan usus terjadi secara efektif karena adanya aktivitas enzim pencernaan. Probiotik 1Ub yang disuplementasikan ke dalam pakan alami *Artemia* sp. dapat berfungsi sebagai penyedia enzim eksogen dan membantu proses penyederhanaan pakan menjadi mikro molekul yang mudah diserap sehingga sistem pencernaan larva udang vaname menjadi lebih efektif dalam pembelanjaan energi (*expenditure energy*) untuk proses pencernaan. Energi yang seharusnya dikeluarkan akan menjadi lebih sedikit dan selisih energi yang ada dapat digunakan untuk pertumbuhan. Bahan pakan yang telah dirombak menjadi molekul-molekul sederhana kemudian diserap oleh usus, lalu masuk ke dalam peredaran darah, diedarkan ke seluruh jaringan tubuh dan masuk ke dalam sel (Ronnestad *et al.* 2007). Di dalam sel, glukosa akan dioksidasi untuk menghasilkan energi, sedangkan protein dan lemak diretensi di dalam jaringan tubuh, sehingga meningkatkan performa pertumbuhan. Liu *et al.* (2009) menyatakan bahwa kenaikan pertumbuhan pada hewan akuatik yang diberi pakan probiotik dapat dikaitkan dengan adanya peningkatan aktivitas pencernaan oleh aktivitas enzimatik dan sintesis vitamin sehingga dapat meningkatkan nilai kecernaan dan penambahan bobot.

Suplementasi prebiotik mannanoligosakarida pada pakan alami *Artemia* sp. tidak secara langsung menambahkan jumlah *exogenous* enzim pada tubuh larva udang vaname, tetapi memberikan tambahan energi dan nutrisi bagi bakteri alami dalam tubuh larva untuk mampu hidup lebih baik dan menghasilkan lebih banyak *exogenous* enzim, sehingga membuat pencernaan larva vaname menjadi lebih efektif. Hal ini terlihat dari tingginya total bakteri dan aktivitas enzim pencernaan pada larva udang vaname yang diberi perlakuan sinbiotik. Prebiotik mannanoligosakarida yang digunakan pada penelitian ini berasal dari dinding sel *yeast* jenis *Saccharomyces cerevisiae* dengan komposisi minimal 30% protein kasar, minimal 1,4% lemak kasar, dan maksimum 13% serat kasar.

Pemberian sinbiotik (kombinasi 1Ub dan mannanoligosakarida) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. akan menciptakan sinergi dalam tubuh larva udang vaname. Ini terlihat dari total bakteri dan aktivitas enzim pencernaan (protease, lipase, dan amilase) larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberi probiotik dan prebiotik. Prebiotik mannanoligosakarida yang diberikan bisa langsung dimanfaatkan oleh bakteri probiotik 1Ub atau digunakan oleh bakteri alami yang ada dalam tubuh larva udang vaname. Kemampuan probiotik 1Ub dalam memanfaatkan mannanoligosakarida sangat terkait dengan kemampuan probiotik 1Ub menghasilkan enzim mananase. Hal tersebut memungkinkan pemberian sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu menghasilkan aktivitas enzim pencernaan dan kinerja pertumbuhan larva udang vaname yang maksimal pada penelitian ini. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Zokaeifar *et al.* (2012) bahwa pemberian probiotik *Bacillus subtilis* mampu meningkatkan enzim pencernaan udang vaname, pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Enterococcus faecium* dan prebiotik fruktooligosakarida) mampu meningkatkan aktivitas enzim pencernaan juvenil ikan mas (Dehaghani *et al.* 2015).

Laju pertumbuhan dan sintasan larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. DGR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 21.30 – 24.39%/hari, sementara DGR larva udang pada perlakuan kontrol sebesar 18.54%/hari atau terjadi peningkatan DGR sebesar 14.9 – 31.5%/hari. SR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 87.83 – 92.67%, sementara SR pada perlakuan kontrol sebesar 84.17% atau terjadi peningkatan SR sebesar 4.3 – 10%. Tingginya laju pertumbuhan dan sintasan tersebut sangat terkait dengan kemampuan probiotik *P. piscicida* 1Ub dan prebiotik MOS dalam memodulasi pertumbuhan dan aktivitas mikroflora menguntungkan dalam saluran pencernaan larva udang vaname yang dapat membantu meningkatkan pencernaan pakan sehingga memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan sintasan larva. Ini terlihat dengan tingginya total bakteri dan jumlah bakteri probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. (Tabel 8). Bakteri endogen dan bakteri probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname secara bersama berkontribusi menghasilkan enzim yang dibutuhkan dalam pencernaan (Tabel 9) sehingga pencernaan pakan, kinerja pertumbuhan, dan sintasan larva udang vaname yang diberi perlakuan lebih baik dibandingkan dengan yang tidak diberi perlakuan (kontrol).

Probiotik merupakan agen mikroba hidup yang dapat berpengaruh terhadap sintasan dan pertumbuhan atau status kesehatan hewan akuatik. Probiotik dapat memodifikasi komunitas mikrob pada usus, memperbaiki nilai nutrisi, memperbaiki respons inang terhadap penyakit, memperbaiki kualitas lingkungan (Verschuere *et al.* 2000), serta dapat meningkatkan respons imun (Nayak 2010). Prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011). De Preter *et al.* (2011) menjelaskan bahwa kelangsungan hidup, kolonisasi, dan efek menguntungkan dari probiotik eksogen mampu ditingkatkan dan diperbanyak melalui penambahan prebiotik secara simultan yang dikenal dengan istilah sinbiotik.

Pemberian sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada larva udang vaname (Mysis3-PL12) menghasilkan DGR, panjang mutlak, dan rasio RNA/DNA terbaik dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol (Tabel 10). Hasil ini sejalan dengan yang ditunjukkan oleh mikrokapsul kombinasi *Bacillus* NP5 Rf^R dan mannanoligosakarida pada *Litopenaeus vannamei* (Febrianti *et al.* 2016), kombinasi probiotik SKT-b Rf^R dan oligosakarida dari ekstrak ubi sukuk pada larva *Litopenaeus vannamei* (Widanarni *et al.* 2015), kombinasi probiotik SKT-b Rf^R dan oligosakarida dari ekstrak ubi sukuk pada *Litopenaeus vannamei* (Nurhayati *et al.* 2015), serta kombinasi *Bacillus* spp. dan mannanoligosakarida pada larva lobster *European* (Daniels *et al.* 2013). Laju pertumbuhan harian (DGR) yang diperoleh pada penelitian ini ($24.39 \pm 0.31\%$ /hari) lebih baik dibandingkan DGR hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yaitu sebesar $17.55 \pm 0.65\%$ /hari dan DGR hasil penelitian Nurhayati *et al.* (2015) yaitu sebesar $7.45 \pm 0.16\%$ /hari. Perbedaan nilai DGR yang diperoleh sangat dimungkinkan oleh perbedaan jenis probiotik dan prebiotik yang digunakan dalam penelitian.

Pemberian sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada larva udang vaname juga menghasilkan sintasan (SR) terbaik dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol (Gambar 8). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sinbiotik mampu meningkatkan sintasan organisme akuatik seperti pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Vibrio* SKT-b dengan oligosakarida dari ekstrak ubi sukuk) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu meningkatkan kelangsungan hidup larva udang vaname (Widanarni *et al.* 2015), dan penambahan sinbiotik (kombinasi probiotik *Enterococcus faecium* dan prebiotik fruktooligosakarida) pada pakan mampu meningkatkan sintasan juvenil *Carassius auratus gibelio* (Mahghani *et al.* 2014). SR yang diperoleh pada penelitian ini ($92.67 \pm 1.26\%$) lebih tinggi dibandingkan SR hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yaitu sebesar $41.50 \pm 3.61\%$, namun lebih rendah dibandingkan SR hasil penelitian Mahghani *et al.* (2014) yaitu sebesar $97.6 \pm 2.5\%$. Perbedaan nilai SR yang diperoleh tersebut selain karena perbedaan jenis probiotik dan prebiotik yang digunakan, juga dimungkinkan oleh perbedaan jenis organisme yang digunakan dalam penelitian.

SIMPULAN

Pemberian probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik mannanoligosakarida, dan kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik mannanoligosakarida (sinbiotik) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim, populasi bakteri, dan sintasan larva udang vaname. Pemberian sinbiotik (kombinasi 10^6 CFU/mL 1Ub dengan 12 mg/L mannanoligosakarida) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan kontrol dan perlakuan lainnya.

**RESPONS IMUN DAN RESISTANSI LARVA UDANG VANAME YANG
DIBERI PROBIOTIK 1Ub, PREBIOTIK MOS, DAN SINBIOTIK
MELALUI BIOENKAPSULASI *Artemia* sp.**

ABSTRAK

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik telah diakui sebagai alternatif strategi untuk meningkatkan resistansi udang terhadap penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi respons imun dan resistansi larva udang vaname terhadap penyakit setelah pemberian probiotik *P. piscicida* 1Ub 10^6 CFU mL⁻¹, prebiotik mannanoligosakarida (MOS) 12 mg L⁻¹, dan sinbiotik (10⁶ CFU mL⁻¹ probiotik 1Ub dan 12 mg L⁻¹ prebiotik MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. Bioenkapsulasi dilakukan dalam media pemeliharaan *Artemia* sp. selama 4 jam. Pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dilakukan pada mysis 3 hingga *post larva* 12. Setelah 13 hari, dilakukan ujiantang pada larva udang ukuran PL13 dengan bakteri patogen *Vibrio harveyi* MR5339 Rf^R 3×10^7 CFU mL⁻¹ melalui metode perendaman. Ujiantang dilakukan dalam media pemeliharaan udang (30 ekor/L) selama 5 hari. Respon imun udang meliputi *total hemosit count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), dan aktivitas *respiratory burst* (RB) diukur sebelum dan tiga hari setelah ujiantang. Ekspresi gen terkait imunitas udang meliputi *serine protein* (SP), *peroxinectin* (PE), *lipopolysaccharida* dan β -1,3-*glucan-binding protein* (LGBP) diukur 24 jam setelah ujiantang, sementara sintasan larva udang diukur hingga lima hari setelah ujiantang untuk mengevaluasi resistansi larva. Secara umum hasil penelitian menunjukkan THC, aktivitas PO, aktivitas RB, ekspresi gen imun, dan sintasan larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol, baik sebelum maupun setelah ujiantang. Pemberian probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. efektif meningkatkan respons imun dan resistansi larva udang vaname dengan hasil terbaik pada pemberian sinbiotik.

Kata kunci: prebiotik, probiotik, sinbiotik, *Artemia* sp., udang vaname, *V. harveyi*

**THE IMMUNE RESPONSES AND DISEASE RESISTANCE OF PACIFIC
WHITE SHRIMP LARVAE SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC 1Ub,
PREBIOTIC MOS AND SYNBIOTIC THROUGH
BIO-ENCAPSULATION OF *Artemia* sp.**

ABSTRACT

Probiotics, prebiotics and synbiotics application have been considered as alternative strategies for improving disease resistance of shrimp. This study aimed to evaluate the immune responses and disease resistance of Pacific white shrimp larvae (*Litopenaeus vannamei*) supplemented with probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub 10^6 CFU mL⁻¹, prebiotic mannan-oligosaccharides (MOS) 12 mg L⁻¹, and its synbiotic (1Ub 10^6 CFU mL⁻¹ probiotic and 12 mg L⁻¹ prebiotic) through bioencapsulation of *Artemia* sp. The encapsulation was done in *Artemia* sp. rearing medium for four hours. The bioencapsulated *Artemia* sp. was given from mysis three to post larvae (PL) 12. After 13 days of feeding trial, PL13 were challenged

with *Vibrio harveyi* MR5339 Rf^R (3×10^7 CFU mL⁻¹) by immersion method. The challenge test was performed in the rearing medium (30 shrimps L⁻¹) for five days. Total haemocyte count (THC), phenoloxidase (PO) and respiratory burst (RB) activities were measured before and three days after the challenge test (dact), while the shrimp survival was observed until five days to evaluate the immune responses. Expression level of immune-related genes included *serine protein*, *peroxinectin*, *lipopolysaccharida* and *β -1,3-glucan-binding protein* were analyzed 24 hours after the challenge test. The results showed that THC, PO activity, RB activity, immune-related gene expression levels and shrimp survival administered probiotic, prebiotic, and synbiotic were higher ($P < 0.05$) than that of control. The administration of probiotic *P. piscicida* 1Ub, prebiotic mannan-oligosaccharides (MOS), and synbiotic through *Artemia* sp. bioencapsulation could effectively improved the immune responses and disease resistance of Pacific white shrimp larvae with the best result demonstrated by the synbiotic treatment.

Key words: probiotic, prebiotic, synbiotic, *Artemia* sp., Pacific white shrimp, *V. harveyi*

PENDAHULUAN

Serangan penyakit masih menjadi salah satu kendala utama dalam usaha budidaya udang vaname baik pada kegiatan pembenihan di *hatchery* maupun kegiatan pembesaran udang di tambak. Salah satu jenis penyakit yang menyerang udang vaname adalah vibriosis yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* (Phuoc *et al.* 2009), yang dapat menyebabkan kematian larva udang di *hatchery* (Chrisolite *et al.* 2008) serta seluruh stadia udang, mulai dari stadia nauplius, zoea, mysis dan pascalarva sampai pada udang dewasa di tambak pembesaran (Saulnier *et al.* 2000).

Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan, respons imun, dan resistansi udang terhadap serangan penyakit. Beberapa hasil penelitian telah membuktikan keberhasilan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik dalam meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, respons imun dan resistansi udang (Zokaeifar *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012, Arisa *et al.* 2015, Nurhayati *et al.* 2015, Febrianti *et al.* 2016). Pada penelitian ini digunakan probiotik *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) yang telah diuji mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* dan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu (Widanarni *et al.* 2009). Sementara prebiotik yang digunakan adalah *mannan-oligosakarida* (MOS) yang telah diuji mampu meningkatkan pertumbuhan dan sintasan juvenil udang vaname (Zhang *et al.* 2012).

Hingga saat ini aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik untuk peningkatan respons imun dan resistansi udang vaname banyak diberikan pada juvenil (Oktaviana *et al.* 2014, Arisa *et al.* 2015, Nurhayati *et al.* 2015) dan udang dewasa (Arangure *et al.* 2013, Zubaidah *et al.* 2015, Febrianti *et al.* 2016) melalui pakan buatan, sementara pada larva udang vaname belum pernah dilaporkan. Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sejak stadia larva penting dilakukan untuk menghasilkan benih udang dengan tingkat pertumbuhan yang baik dan memiliki daya tahan terhadap penyakit. Hal tersebut dimaksudkan agar pada saat benih udang

ditebar di tambak pembesaran telah memiliki respons pertumbuhan dan sistem imun yang lebih baik untuk menghadapi serangan berbagai patogen di tambak.

Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada penelitian ini dilakukan melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. yang merupakan pakan utama bagi larva udang karena memiliki ukuran yang sesuai untuk larva, nilai nutrisi yang tinggi, dan mudah dicerna. Selain itu, sifat *Artemia* sp. yang *non-selective filter feeder* sangat memungkinkan dilakukan bioenkapsulasi dengan berbagai jenis pengkaya, misalnya minyak ikan, minyak cumi, vitamin dan produk komersial lainnya termasuk probiotik dan prebiotik. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi respons imun dan resistansi larva udang vaname yang diberi probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik MOS) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian tahap IV dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2016. Penyiapan probiotik dan prebiotik, kultur bakteri patogen *V. harveyi*, penetasan dan bioenkapsulasi *Artemia* sp., pemeliharaan larva udang vaname, ujiantang larva udang dengan *V. harveyi*, pengamatan sintasan, pengukuran respons imun dan populasi bakteri *Vibrio* pada larva udang dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Sementara pengukuran ekspresi gen terkait imunitas larva udang dilakukan di Laboratorium Genetika Ikan, Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian tahap sebelumnya (tahap 3) dan merupakan suatu rangkaian tahapan penelitian yang tidak terpisahkan. Udang vaname hasil penelitian pada tahap III dijadikan hewan uji pada penelitian tahap IV untuk mengevaluasi respons imun, ekspresi gen imun dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R.

Ujiantang Larva Udang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R

Ujiantang larva udang vaname dilakukan setelah pemberian pakan perlakuan (PL13), dengan cara menambahkan isolat *V. harveyi* MR5339 Rf^R konsentrasi 3×10^7 CFU/mL dalam masing-masing wadah ujiantang bervolume satu liter air laut dengan kepadatan larva 30 ekor/liter. Ujiantang udang vaname dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan, yaitu: (1) Kontrol (-) yaitu larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. tanpa bioenkapsulasi dan ditambahkan 30 mL SWC-cair; (2) kontrol (+) yaitu larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. tanpa bioenkapsulasi dan diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R; (3) probiotik yaitu larva udang vaname yang diberi probiotik 1Ub Rf^R dan diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R; (4) prebiotik yaitu larva udang vaname yang diberi prebiotik MOS dan diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R; (5) sinbiotik yaitu larva udang vaname yang diberi sinbiotik dan diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Ujiantang dilakukan selama 5 hari dan selama ujiantang larva udang diberi pakan *Artemia* sp. tanpa bioenkapsulasi

sebanyak 8-10 individu larva⁻¹ dengan frekuensi pemberian lima kali sehari (06.00; 10.00; 14.00; 18.00; 22.00). Setiap hari selama ujiantang dilakukan pengamatan terhadap jumlah kematian larva udang dan penghitungan populasi bakteri *Vibrio* dan bakteri *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada larva udang.

Pengukuran Parameter

Respons Imun Larva Udang Vaname

Pengukuran respons imun pada larva udang vaname dilakukan pada akhir pemberian pakan perlakuan (sebelum ujiantang) yaitu pada PL13 dan pada hari ke-3 setelah ujiantang, meliputi parameter *total hemocyte count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), dan aktivitas *respiratory burst* (RB). Pengukuran THC dilakukan berdasarkan metode Chen (2000) yang dimodifikasi. Aktivitas PO diukur berdasarkan metode Liu & Chen (2004), sementara aktivitas RB diukur berdasarkan metode Song & Hsieh (1994) (Lampiran 6).

Pengukuran ekspresi gen terkait imunitas larva udang dilakukan 24 jam setelah ujiantang dengan *V. harveyi* (Zokaeifar *et al.* 2012). Ekspresi gen *peroxinectin* (Liu *et al.* 2005), *lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein* (Cheng *et al.* 2005), dan *serine protein* (Jemenez *et al.* 2005) dianalisis menggunakan real-time PCR (rt-PCR). Kuantifikasi ekspresi gen target direlatifkan dengan ekspresi gen β -aktin (Livak & Schmittgen 2001).

Resistensi Larva Udang Vaname

Resistensi larva udang vaname diukur berdasarkan sintasan (SR) setelah diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R selama 5 hari. SR dihitung pada akhir ujiantang (Dehaghani *et al.* 2015).

Populasi Bakteri *Vibrio* pada Larva Udang Vaname

Jumlah total bakteri *Vibrio* dan populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada larva udang dihitung dengan menggunakan metode cawan sebar (Hadioetomo 1993). Larva udang pada setiap perlakuan dengan bobot 0.1 g digerus dan dihomogenkan dalam 0.9 mL *phosphate buffer saline* (0.8% NaCl, 0.15% K₂HPO₄, 0.02 Na₂HPO₄ dan 0.02% KCl), diencerkan secara serial (10 kali lipat pengenceran) lalu disebar pada media TCBS-agar untuk menghitung total bakteri *Vibrio*, dan pada media TCBS-agar yang ditambahkan rifampisin (50 μ g mL⁻¹) untuk menghitung populasi bakteri *V. harveyi* MR5339 Rf^R.

Analisis Data

Data *total hemocyte count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), aktivitas *respiratory burst* (RB), *serine protein* (SP), *peroxinectin* (PE), *lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein* (LGBP), dan SR larva udang vaname pada masing-masing perlakuan dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan uji Duncan pada selang kepercayaan 95% menggunakan program SPSS versi 20. Populasi bakteri *Vibrio* dan *V. harveyi* dalam tubuh larva udang dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Respons Imun Larva Udang Vaname

Hasil pengukuran respons imun larva udang vaname meliputi *total hemocyte count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), dan aktivitas *respiratory burst* (RB) disajikan pada Tabel 11. Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada larva udang vaname selama 13 hari (mysis 3 – PL12) mampu meningkatkan THC, aktivitas PO, dan aktivitas RB. THC dan aktivitas PO larva udang yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah ujiantang. Sementara aktivitas RB larva udang vaname yang diberi sinbiotik sebelum ujiantang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol, namun tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan yang diberi probiotik dan prebiotik. Pascaujiantang, aktivitas RB larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun ketiganya berbeda nyata dengan kontrol.

Tabel 11. *Total hemocyte count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), aktivitas *respiratory burst* (RB) larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sebelum dan setelah ujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rt^R

Respons imun	Perlakuan			
	Kontrol (+)	Probiotik	Prebiotik	Sinbiotik
Sebelum ujiantang				
THC ($\times 10^6$ sel mL ⁻¹)	4.65 \pm 0.150 ^a	5.80 \pm 0.458 ^b	5.65 \pm 0.312 ^b	7.60 \pm 0.377 ^c
Aktivitas PO (100 μ L ⁻¹)	0.06 \pm 0.004 ^a	0.08 \pm 0.008 ^b	0.08 \pm 0.009 ^{ab}	0.19 \pm 0.002 ^c
Aktivitas RB (10 μ L ⁻¹)	0.55 \pm 0.033 ^a	0.63 \pm 0.023 ^{ab}	0.64 \pm 0.059 ^{ab}	0.67 \pm 0.028 ^b
Setelah ujiantang				
THC ($\times 10^6$ sel mL ⁻¹)	2.60 \pm 0.312 ^a	4.75 \pm 0.458 ^b	4.45 \pm 0.377 ^b	6.65 \pm 0.377 ^c
Aktivitas PO (100 μ L ⁻¹)	0.14 \pm 0.001 ^a	0.21 \pm 0.008 ^b	0.23 \pm 0.004 ^b	0.27 \pm 0.009 ^c
Aktivitas RB (10 μ L ⁻¹)	0.45 \pm 0.063 ^a	0.69 \pm 0.070 ^b	0.70 \pm 0.023 ^b	0.79 \pm 0.004 ^b

Huruf superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata ($P < 0.05$).

Peningkatan imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik juga terlihat dari hasil pengukuran ekspresi gen imun larva udang vaname (Tabel 12). Ekspresi gen *serine protein* (SP) dan *Lipopolysaccharida and β -1,3-glucan-binding protein* (LGBP) larva udang yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($p < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya. Ekspresi gen *peroxinectin* (PE) larva udang yang diberi sinbiotik dan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun keduanya menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan prebiotik dan kontrol.

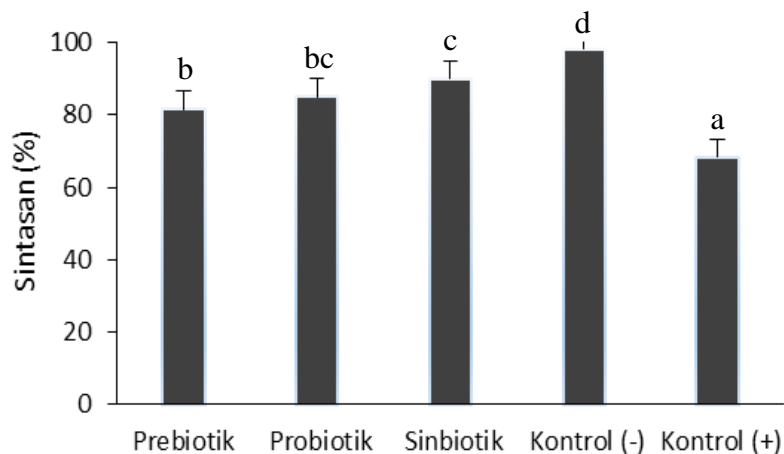
Tabel 12. Ekspresi gen terkait imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R

Ekspresi gen imun	Perlakuan			
	Kontrol (+)	Probiotik	Prebiotik	Sinbiotik
<i>Serine protein</i>	0.18±0.05 ^a	1.51±0.42 ^b	1.04±0.04 ^{ab}	3.41±0.20 ^c
<i>Peroxinectin</i>	0.40±0.10 ^a	2.09±0.02 ^{ab}	1.01±0.25 ^a	4.36±0.06 ^b
<i>Lipopolysaccharida and β-1,3-glucan-binding protein</i>	0.28±0.11 ^a	1.04±0.06 ^a	1.01±0.53 ^a	4.25±0.08 ^b

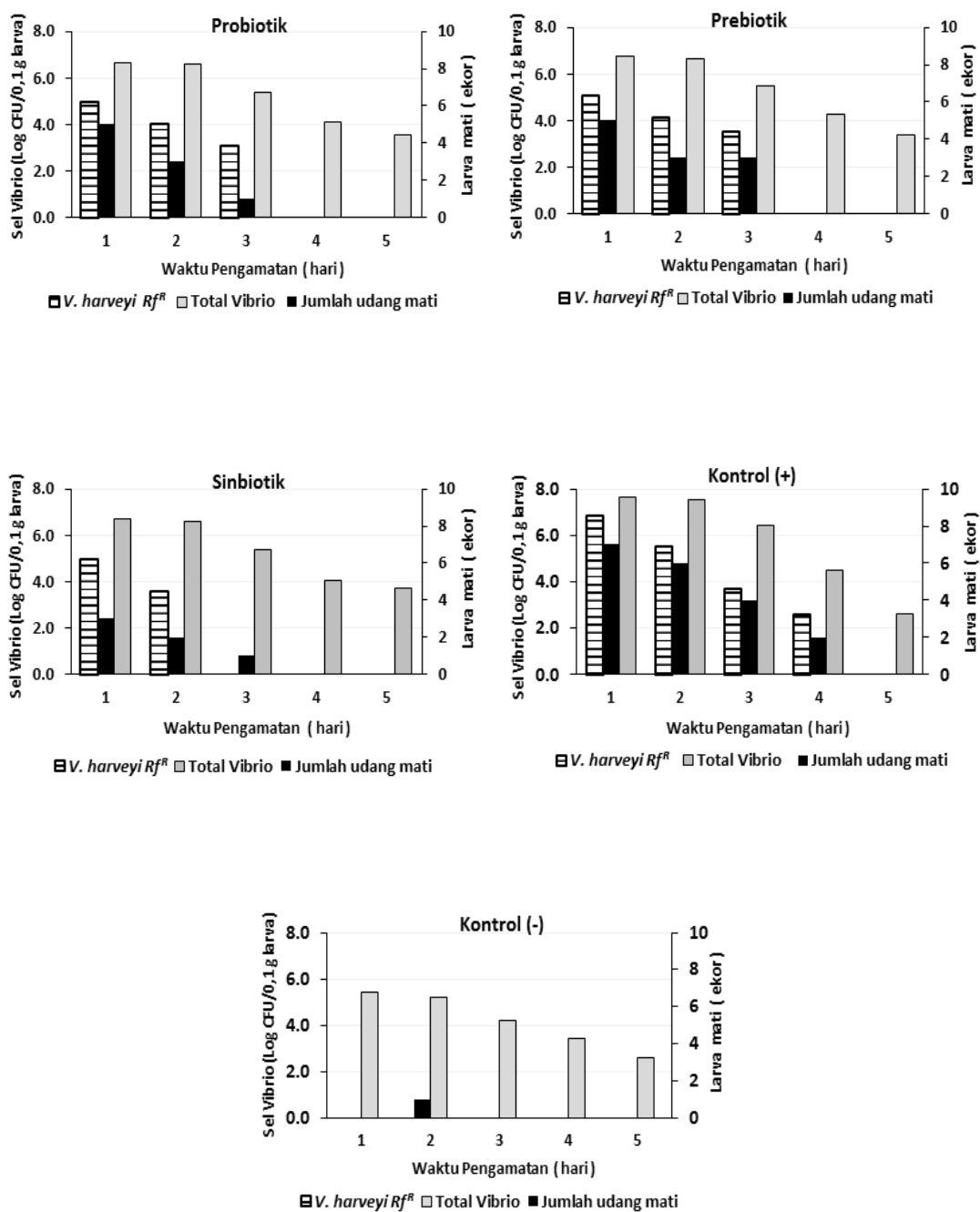
Huruf superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata ($P < 0.05$).

Resistensi Larva Udang Vaname

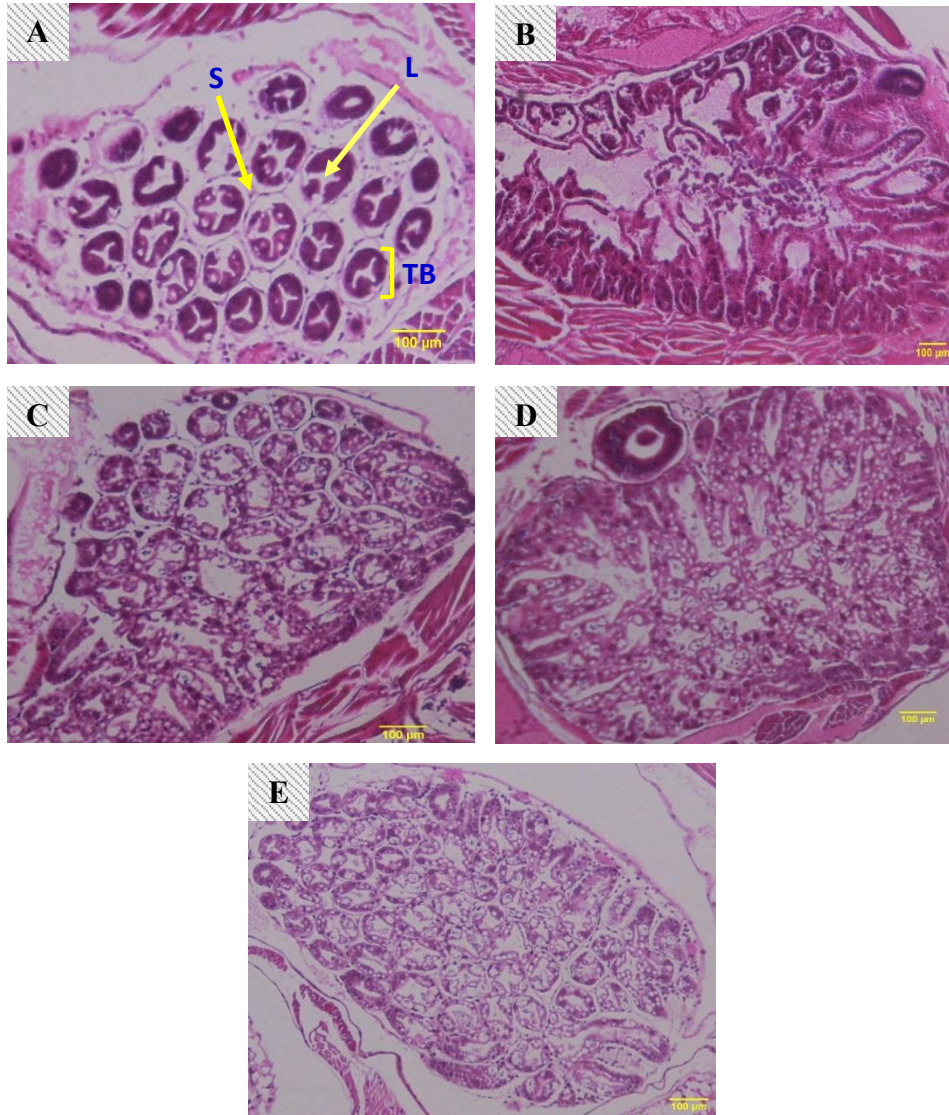
Resistensi larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik diukur berdasarkan sintasan (SR) larva udang setelah diuji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R. SR larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol positif (Gambar 9).



Gambar 9. Sintasan (SR) larva vaname yang diberi probiotik, prebiotik, sinbiotik, kontrol (-), dan kontrol (+) setelah uji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Huruf berbeda di atas bar menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$) antarperlakuan.



Gambar 10. Pola kematian dan jumlah sel *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, sinbiotik, kontrol (+), dan kontrol (-) setelah diuji tantangan dengan bakteri patogen *V.harveyi* MR5339 Rf^R.



Gambar 11. Histologi hepatopankreas pascalarva udang vaname pascauji tantang dengan bakteri *V.harveyi* MR5339 Rf^R, A. perlakuan kontrol (-) (TB = tubulus, L = lumen, S = sinus), B. perlakuan kontrol (+), C. perlakuan probiotik, D. perlakuan prebiotik, E. perlakuan sinbiotik (skala bar = 100 µm)

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada larva udang vaname mampu meningkatkan THC, aktivitas PO, dan aktivitas RB. THC larva udang vaname yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah uji tantang (Tabel 11).

Peningkatan THC pada lava udang yang diberi sinbiotik sebelum uji tantang terjadi sebagai bentuk reaksi sistem imun tubuh larva dalam merespons benda asing yang masuk, yakni sinbiotik (kombinasi probiotik dan prebiotik) yang diberikan

selama masa pemeliharaan (mysis 3 – PL12). Partikel asing yang masuk ke dalam tubuh udang akan dikenali oleh sel hemosit dan direpons melalui beberapa mekanisme seperti *intracellular signaling cascade*, fagositosis, enkapsulasi, dan adegasi nodular (Rodriguez & Moullac 2000). Oktaviana *et al.* (2014) dan Nurhayati *et al.* (2015) melaporkan bahwa pemberian sinbiotik melalui pakan buatan selama 30 hari mampu meningkatkan THC udang vaname. Pascaujiantang, THC larva vaname mengalami penurunan pada semua perlakuan. Penurunan THC pascaujiantang terjadi akibat bermingasnya sel hemosit dari sistem sirkulasi tubuh menuju jaringan di mana banyak sel yang terinfeksi (Yeh *et al.* 2009). Penurunan THC menandakan bekerjanya sistem pertahanan tubuh pada daerah terinfeksi (Smith *et al.* 2003).

Pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. pada larva udang vaname juga mampu meningkatkan aktivitas PO. Aktivitas PO larva udang yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah ujiantang (Tabel 11). Peningkatan aktivitas PO setelah pemberian sinbiotik dapat disebabkan oleh proses inisiasi pengenalan benda asing pada sel probiotik dan MOS oleh *pattern recognition protein* (PRPs) pada hemosit. Enzim PO terdapat dalam hemolim sebagai inaktif *pro-enzyme* yang disebut proPO. Pada krustasea, proPO berfungsi dalam pengenalan benda asing dan melanisasi. Transformasi proPO menjadi PO melibatkan beberapa reaksi yang diken sebagai *proPO activating system* yang diaktifkan oleh dinding sel bakteri, β -glukan, dan lipopolisarida (Amparyup *et al.* 2013). Hasil penelitian Arisa *et al.* (2015) menunjukkan hal yang sama, aktivitas PO udang vaname mengalami peningkatan setelah diberi sinbiotik (kombinasi probiotik SKT-b dan oligosakarida dari ekstrak ubi jalar) selama dua minggu. Peningkatan aktivitas PO setelah ujiantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R (Tabel 11) menandakan peningkatan transformasi proPO menjadi PO untuk penghancuran patogen (melanisasi) terhadap *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Tassanakajon & Somboonwiwat (2011) menyatakan apabila ada patogen masuk dalam tubuh udang, maka dalam hemolim akan terjadi fagositosis oleh sel hialin dan semiganular, penghancuran patogen oleh aktivitas PO dan juga pengaktifan antibakteri oleh *antimicrobial peptides* (AMPs) seperti penaidins, crustin dan *antilipopolysaccharide factors* (ALFs). Peningkatan aktivitas PO udang vaname setelah ujiantang juga dilaporkan oleh Oktaviana *et al.* (2014) dan Nurhayati *et al.* (2015).

Aktivitas RB larva udang vaname yang diberi sinbiotik sebelum ujiantang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol, namun tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan yang diberi probiotik dan prebiotik (Tabel 11). Aktivitas RB merupakan rangkaian proses pemusnahan partikel mikrob yang difagosit yang melibatkan pelepasan enzim degadatif ke dalam fagosom dan produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang kini disebut *respiratory burst* (Rodriguez & Moullac 2000). Pascaujiantang, aktivitas RB larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun ketiganya berbeda nyata dengan kontrol. Hal ini menunjukkan proses perlawanan dan pemusnahan partikel *V. harveyi* MR5339 Rf^R oleh sistem imunitas larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih efektif dibandingkan sistem imunitas larva udang pada perlakuan kontrol. Kemampuan perlawanan terhadap infeksi *V. harveyi* tersebut juga terlihat dari data SR larva udang vaname yang diberi probiotik,

prebiotik, dan sinbiotik yang lebih tinggi dibandingkan larva udang kontrol setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R (Gambar 9).

Peningkatan imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik juga terlihat dari hasil pengukuran ekspresi gen imun larva udang vaname (Tabel 12). Ekspresi gen SP larva udang yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya. Hal tersebut menandakan peningkatan regulasi gen SP dalam mentransformasi proPO menjadi PO sebagai bentuk reaksi inisiasi pengenalan dan penghancuran patogen (melanisasi) *V. harveyi* oleh PRPs pada hemosit setelah uji tantang. Soderhall & Cerenius (1998) menyatakan bahwa SP bertanggung jawab dalam mengubah ProPO menjadi PO.

Setelah uji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R, ekspresi gen PE larva udang yang diberi sinbiotik dan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun keduanya menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan prebiotik dan kontrol (Tabel 12). Saat terjadinya serangan patogen, sel hemosit akan melakukan proses deganulisasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap patogen tersebut. Hasil proses deganulisasi adalah pelepasan PE yang memicu munculnya fagositosis. Chiu *et al.* (2007) menyatakan bahwa ekspresi gen PE dapat meningkatkan aktivitas biologis sel-sel adhesi, opsonin, deganulasi, peroksidase, dan enkapsulasi pada udang.

Lipopolysaccharida dan LGBP merupakan salah satu indikator penting dari respons imun krustasea termasuk udang yang berperan penting dalam aktivasi sistem ProPO sebagai bentuk reaksi akibat masuknya benda asing dan adanya serangan patogen. Senyawa β -glukan dapat meningkatkan aktivitas PO setelah bereaksi dengan *β -glucan binding protein* (Li *et al.* 2008). Setelah berikatan maka proPO akan diaktifkan menjadi enzim PO yang selanjutnya menjalankan fungsinya dalam proses melanisasi. Pada penelitian kami ini, ekspresi gen LGBP larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol dan perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan sintasan larva udang vaname melibatkan LGBP, dan ini sejalan dengan Cheng *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa LGBP memiliki peran penting dalam pertahanan udang selama tahap awal infeksi.

Hasil penelitian menunjukkan, sintasan (SR) larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik setelah diuji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol positif (Gambar 9). SR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 81,7 – 90%, sementara SR larva udang vaname pada kontrol positif sebesar 68,3% atau terjadi peningkatan SR sebesar 19 – 32%. Hal ini menunjukkan daya tahan tubuh (resistensi) larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik terhadap infeksi *V. harveyi* MR5339 Rf^R lebih baik dibandingkan larva udang pada perlakuan kontrol positif. Tingginya resistansi tersebut sangat terkait dengan meningkatnya respons imunitas dan ekspresi gen terkait imunitas larva udang vaname setelah diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik baik sebelum uji tantang maupun setelah uji tantang (Tabel 11 dan 12).

Berdasarkan pola kematian dan jumlah sel *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname selama lima hari uji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R (Gambar 10), terlihat jumlah kematian larva udang terbanyak terjadi pada perlakuan kontrol (+). Banyaknya kematian larva udang pada kontrol (+) sangat

dimungkinkan oleh rendahnya penghambatan terhadap infeksi *V. harveyi* MR5339 Rf^R akibat rendahnya respons imunitas larva udang kontrol. Hal ini terlihat dari rendahnya THC, PO, RB (Tabel 10) dan SP, PE, LGBP (Tabel 11) serta tingginya populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang pada kontrol (+) dibandingkan perlakuan lainnya (Gambar 10). Sebaliknya, dalam tubuh larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik terjadi penghambatan dan kompetisi terhadap *V. harveyi* MR5339 Rf^R oleh bakteri probiotik dan bakteri lain yang menguntungkan sehingga jumlah (*quorum*) yang dibutuhkan untuk mengekspresikan faktor-faktor virulensi *V. harveyi* MR5339 Rf^R tidak tercapai. Hamsah *et al.* (2017) melaporkan bahwa pemberian probiotik *P. piscicida* dan sinbiotik (gabungan probiotik *P. piscicida* dan prebiotik MOS) mampu meningkatkan jumlah total bakteri dan populasi bakteri probiotik *P. piscicida* dalam tubuh larva udang vaname.

Secara keseluruhan, populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname mengalami penurunan sejak hari ke-1 hingga hari ke-5 setelah uji tantang. Penurunan populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang berkorelasi positif dengan berkurangnya jumlah kematian larva udang vaname. Pada pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik, jumlah kematian larva udang relatif sedikit dibandingkan pada perlakuan kontrol (+) dan terdeteksi hanya sampai hari ke-3 (Gambar 10). Rendahnya populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total *Vibrio* serta rendahnya jumlah kematian larva udang pada perlakuan probiotik, prebiotik dan sinbiotik menyebabkan tingginya sintasan (SR) ketiga perlakuan tersebut dibandingkan SR pada perlakuan kontrol (+) (Gambar 9).

Tingginya SR larva udang vaname pada pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik dibandingkan SR larva udang pada kontrol (+) juga terkonfirmasi dengan hasil pengamatan histologi dimana tingkat kerusakan jaringan hepatopankreas larva udang vaname pada ketiga perlakuan tersebut tidak separah kerusakan jaringan hepatopankreas larva udang vaname pada perlakuan kontrol (+) (Gambar 11). Hepatopankreas larva udang vaname pada perlakuan kontrol (+) mengalami kerusakan yang cukup parah dimana terjadi nekrosis pada tubulus (TB) dari sel-sel hepatopankreas akibat infeksi bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Tingginya tingkat kerusakan jaringan hepatopankreas udang vaname pada perlakuan kontrol (+) menyebabkan jumlah kematian udang selama uji tantang juga tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

SIMPULAN

Pemberian probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik mannanoligosakarida, dan kombinasi probiotik 1Ub dengan prebiotik mannanoligosakarida (sinbiotik) melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu meningkatkan respons imun (THC, PO, RB), ekspresi gen terkait imunitas udang (SP, PE, LGBP), dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri *V. harveyi* dengan hasil terbaik pada pemberian sinbiotik (kombinasi 10⁶ CFU/mL 1Ub dengan 12 mg/L mannanoligosakarida).

PEMBAHASAN UMUM

Bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub) yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009). Bakteri *P. piscicida* (1Ub) bersifat Gram negatif, berbentuk batang, motil, aerobik, dan mesofilik. Jika ditumbuhkan di media SWC, koloni bakteri ini berwarna oranye cerah. Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* 1Ub berdasarkan densitas optikal (OD) dan jumlah koloni bakteri (CFU/mL) selama 24 jam diperoleh puncak pertumbuhan bakteri *P. piscicida* 1Ub terjadi pada jam ke-18 setelah inkubasi dengan konsentrasi bakteri sebesar 9.75 log CFU/mL.

Bakteri *P. piscicida* (1Ub) menunjukkan toleransi yang baik dan mampu bertahan dalam kondisi asam (pH 4) dan basa (pH 8.5) selama periode pengamatan. Tingginya toleransi tersebut disebabkan bakteri *P. piscicida* (1Ub) merupakan mikroflora normal pada saluran pencernaan yang telah memiliki kemampuan beradaptasi dengan kondisi asam lambung dan garam empedu dalam saluran pencernaan mengingat bakteri *P. piscicida* (1Ub) merupakan bakteri hasil isolasi dari naupli udang vaname. Demikian juga dengan kemampuan untuk menempel pada substrat di permukaan usus. Merrifield *et al.* (2010) menjelaskan bahwa bakteri kandidat probiotik harus mampu menempel pada lapisan mukus usus dan memanfaatkan mukus sebagai sumber nutrisi untuk berkolonisasi, bersifat persisten dan mampu berproliferasi dalam saluran pencernaan. Secara *in vitro*, bakteri *P. piscicida* (1Ub) memiliki kemampuan menempel dan membentuk biofilm pada permukaan lempeng *stainless steel* sebesar 81.2%.

Selain memiliki toleransi dan kemampuan tumbuh pada kondisi asam dan basa serta kemampuan menempel pada substrat di permukaan usus, bakteri *P. piscicida* (1Ub) juga memiliki aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik, dan manolitik. Hal ini terlihat dari kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) menghidrolisis pati, susu skim, minyak zaitun, dan MOS. Kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) menghidrolisis pati, susu skim, minyak zaitun, dan MOS sangat terkait dengan kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) menghasilkan enzim eksogenus seperti amilase, protease, lipase, dan mananase. Enzim eksogenus tersebut akan membantu enzim endogenus inang untuk menghidrolisis nutrisi pakan seperti memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein, dan lemak penyusun pakan serta mannanoligosakarida (MOS) yang dikandung oleh bahan pangan yang berfungsi sebagai prebiotik. Pemecahan molekul-molekul kompleks ini menjadi molekul sederhana akan mempermudah pencernaan pakan dan penyerapan nutrisi pakan dalam saluran pencernaan udang. Tzuc *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri *Pseudoalteromonas* sp. yang diisolasi dari lambung, usus, dan hepatopankreas udang vaname mampu menghasilkan enzim amilase, lipase, dan chitinase. Hakamada *et al.* (2014) melaporkan bahwa berbagai mikroorganisme seperti bakteri, *yeast*, dan fungi mampu memproduksi enzim mananase.

Seleksi probiotik biasanya didasarkan pada uji antagonistik secara *in vitro* (Verschuere *et al.* 2000). Penyakit vibriosis pada udang vaname diketahui sebagai salah satu penyebab rendahnya kelangsungan hidup baik pada usaha pembenihan maupun pembesaran udang vaname (Chrisolite *et al.* 2008; Saulnier *et al.* 2000). Selanjutnya Phuoc *et al.* (2009) menyatakan bahwa penyakit vibriosis yang menyerang udang vaname umumnya disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*. Hasil penelitian dengan metode Kirby-Bauer menunjukkan bakteri *P. piscicida* (1Ub)

memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dengan nilai indeks penghambatan sebesar $1,5 \pm 0,28$ serta mampu mereduksi patogen tersebut sehingga tidak dapat tumbuh melalui metode kultur bersama. Kemampuan *P. piscicida* (1Ub) dalam menghasilkan zat antimikroba atau kemampuan berkompetisi dengan bakteri patogen *V. harveyi* dalam kultur bersama, diharapkan mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut di dalam saluran pencernaan udang vaname.

Berdasarkan toleransi dan kemampuan tumbuh pada kondisi asam dan basa, kemampuan penempelan, aktivitas amilolitik, proteolitik, lipolitik dan manolitik, kemampuan menghasilkan enzim eksogenus, dan kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen *V. harveyi* dapat disimpulkan bahwa bakteri *P. piscicida* (1Ub) berpotensi sebagai probiotik.

Peran bakteri probiotik dapat ditingkatkan melalui aplikasi prebiotik, yaitu bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Efek prebiotik bersifat spesifik karakter, artinya prebiotik hanya meningkatkan pertumbuhan mikroflora menguntungkan dan atau mereduksi mikroflora patogen di dalam usus inang, mengurangi pH cairan usus melalui produksi asam-asam lemak rantai pendek (SCFA), dan mengubah konsentrasi enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh probiotik (Mei *et al.* 2011).

Secara *in vitro*, prebiotik MOS yang digunakan pada penelitian ini mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub). Hal ini diindikasikan dengan peningkatan pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) rata-rata sebesar 2 log CFU/mL pada media SWC yang mengandung MOS dibandingkan pada media SWC tanpa penambahan MOS. Banyaknya koloni bakteri *P. piscicida* (1Ub) yang tumbuh pada media SWC yang mengandung MOS, selain karena ketersediaan MOS sebagai sumber nutrisi tambahan bagi pertumbuhan bakteri *P. piscicida* (1Ub) juga dimungkinkan oleh kemampuan bakteri *P. piscicida* (1Ub) untuk memanfaatkan MOS dengan adanya aktivitas enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut.

Aplikasi probiotik dan prebiotik pada larva udang dapat dilakukan melalui metode bioenkapsulasi atau pengkayaan pakan alami *Artemia* sp. Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik dan prebiotik diharapkan mampu meningkatkan akumulasi probiotik dan populasi bakteri dalam tubuh *Artemia* sp. serta kandungan nutrisi *Artemia* sp. sehingga saat diberikan pada larva udang dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan, kelangsungan hidup, dan respons imunitas larva udang.

Hasil penelitian menunjukkan, bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik *P. piscicida* (1Ub) konsentrasi 10^6 CFU/mL, prebiotik MOS sebanyak 12 mg/L, dan kombinasi 10^6 CFU/mL probiotik 1Ub dengan 12 mg/L MOS (sinbiotik) yang dilakukan selama 4 jam mampu meningkatkan total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* (1Ub) dalam tubuh *Artemia* sp. Berdasarkan rata-rata total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* dalam tubuh *Artemia* sp., terlihat bahwa pemberian sinbiotik menghasilkan total bakteri ($8.6 \log$ CFU/0.1 g *Artemia* sp.) dan total probiotik *P. piscicida* ($6.9 \log$ CFU/0.1 g *Artemia* sp.) yang lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya dan kontrol. Tingginya total bakteri dan total probiotik *P. piscicida* dalam tubuh *Artemia* sp. yang diberi perlakuan sinbiotik sangat

dimungkinkan oleh kemampuan bakteri probiotik *P. piscicida* untuk hidup dan berkolonisasi dalam tubuh *Artemia* sp. serta kemampuan memanfaatkan mannanoligosakarida dengan adanya enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri probiotik *P. piscicida*. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yang melaporkan bahwa pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Vibrio alginolyticus* SKT-b dan prebiotik dari ekstrak ubi jalar) menghasilkan nilai tertinggi pada total bakteri dan total probiotik di dalam tubuh larva udang vaname. Pemberian sinbiotik diketahui mampu mengoptimalkan fungsi dan meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan dalam usus inangnya (Delgado *et al.* 2011).

Bioenkapsulasi *Artemia* sp. dengan probiotik *P. piscicida*, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi *P. piscicida* dengan MOS) juga mampu meningkatkan kandungan nutrisi *Artemia* sp. terutama kadar protein, kadar lemak, profil asam lemak, dan profil asam amino esensial *Artemia* sp. Peningkatan kandungan nutrisi *Artemia* sp. yang diperkaya dengan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik sangat dimungkinkan terjadi sebagai akibat dari kolonisasi sejumlah bakteri menguntungkan dalam tubuh *Artemia* sp. dan kemampuan probiotik menghasilkan beberapa enzim aksogenus seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Balcázar *et al.* (2006) menyatakan bahwa pengaruh menguntungkan dari probiotik, prebiotik, dan sinbiotik pada inangnya diduga terjadi sebagai akibat dari kolonisasi sejumlah bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan inang. Selanjutnya dinyatakan bahwa probiotik juga terbukti mampu menghasilkan enzim protease, amilase, dan lipase, vitamin, asam lemak serta asam amino sebagai kofaktor pada proses pencernaan yang selanjutnya akan meningkatkan efisiensi pakan dan kinerja pertumbuhan yang ditunjukkan dengan perbaikan nilai nutrisi tubuh inangnya.

Pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P. piscicida* (10^6 CFU/mL), prebiotik MOS (12 mg/L), dan sinbiotik (kombinasi 10^6 CFU/mL probiotik *P. piscicida* dengan 12 mg/L MOS) pada larva udang vaname mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan kelangsungan hidup larva. Kinerja pertumbuhan larva udang vaname tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik meliputi DGR ($24.39 \pm 0.31\%$), panjang mutlak (13.00 ± 0.50 mm), dan rasio RNA/DNA (0.6369 ± 0.0094). Demikian pula sintasan larva udang vaname tertinggi ($P < 0.05$) diperoleh pada perlakuan sinbiotik (92.67%) atau terjadi peningkatan SR sebesar 10% dibandingkan SR larva udang kontrol (84,17%). Tingginya kinerja pertumbuhan dan sintasan larva udang vaname yang diberi perlakuan sinbiotik sangat terkait dengan kemampuan probiotik *P. piscicida* (1Ub) dan prebiotik MOS dalam memodulasi pertumbuhan dan aktivitas mikroflora menguntungkan dalam saluran pencernaan larva udang vaname yang dapat membantu meningkatkan pencernaan pakan sehingga memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan sintasan larva. Ini terlihat dengan tingginya total bakteri (6.70×10^7 CFU/0.1 g larva) dan jumlah bakteri probiotik 1Ub (4.75×10^6 CFU/0.1 g larva) dalam tubuh larva udang vaname yang diberi *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan sinbiotik dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol.

Tingginya total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname yang diberi perlakuan sinbiotik sangat dimungkinkan oleh kemampuan bakteri probiotik 1Ub yang terakumulasi dalam tubuh *Artemia* sp. untuk hidup dan berkolonisasi pada saluran intestinal larva udang vaname karena probiotik 1Ub yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri hasil isolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.* 2009), serta kemampuan memanfaatkan

mannanooligosakarida dengan adanya enzim mananase yang dihasilkan oleh bakteri probiotik 1Ub. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Widanarni *et al.* (2013) bahwa pemberian berbagai dosis bakteri probiotik SKT-b (*Vibrio alginolyticus*) melalui *Artemia* sp. mampu meningkatkan jumlah total *Vibrio* pada tubuh pascalarva udang windu, dan pemberian enkapsulasi sinbiotik (*Bacillus* NP5 Rf^R dan oligosakarida) mampu meningkatkan populasi bakteri pada usus udang vaname hingga 9 log CFU/g (Zubaidah *et al.* 2015).

Keberadaan bakteri probiotik yang terakumulasi dalam pakan alami *Artemia* sp. setelah diberikan pada larva udang vaname juga dapat meningkatkan aktivitas enzim dalam tubuh larva. Probiotik 1Ub mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus, seperti protease, lipase, amilase, dan mananase. Kemampuan probiotik 1Ub menghasilkan beberapa enzim eksogenus tersebut memungkinkan aktivitas enzim pencernaan larva udang vaname yang diberi perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Menurut Wang *et al.* (2008), probiotik mampu menghasilkan beberapa enzim eksogenus untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, lipase, dan selulase. Tzuc *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri *Pseudoalteromonas* sp. yang diisolasi dari lambung, usus, dan hepatopankreas udang vaname mampu menghasilkan enzim amilase, lipase, dan chitinase. Enzim protease mampu menghidrolisis protein menjadi peptida, bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptida menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk metabolisme. Enzim amilase dapat menghidrolisis amilum dan membantu pencernaan pada organisme. Lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis lemak, monogliserida, digliserida, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Falony *et al.* 2006). Fungsi utama dari enzim lipase adalah untuk mencerna lemak dan lipid, untuk mempertahankan fungsi sehat dari kantong empedu, menjaga keseimbangan elektrolit dalam tubuh, membantu dalam menjaga permeabilitas sel optimal sehingga memungkinkan nutrisi yang diperlukan masuk ke dalam sel untuk memperlancar metabolisme.

Pencernaan di lambung dan usus terjadi secara efektif karena adanya aktivitas enzim pencernaan. Probiotik 1Ub yang disuplementasikan ke dalam pakan alami *Artemia* sp. dapat berfungsi sebagai penyedia enzim eksogen dan membantu proses penyederhanaan pakan menjadi mikro molekul yang mudah diserap sehingga sistem pencernaan larva vaname menjadi lebih efektif dalam pembelanjaan energi (*expenditure energy*) untuk proses pencernaan. Energi yang seharusnya dikeluarkan akan menjadi lebih sedikit dan selisih energi yang ada dapat digunakan untuk pertumbuhan. Bahan pakan yang telah dirombak menjadi molekul-molekul sederhana kemudian diserap oleh usus, lalu masuk ke dalam peredaran darah, diedarkan ke seluruh jaringan tubuh dan masuk ke dalam sel (Ronnestad *et al.* 2007). Di dalam sel, glukosa akan dioksidasi untuk menghasilkan energi, sedangkan protein dan lemak diretensi di dalam jaringan tubuh, sehingga meningkatkan performa pertumbuhan. Liu *et al.* (2009) menyatakan bahwa kenaikan pertumbuhan pada hewan akuatik yang diberi pakan probiotik dapat dikaitkan dengan adanya peningkatan aktivitas pencernaan oleh aktivitas enzimatik dan sintesis vitamin sehingga dapat meningkatkan nilai kecernaan dan penambahan bobot.

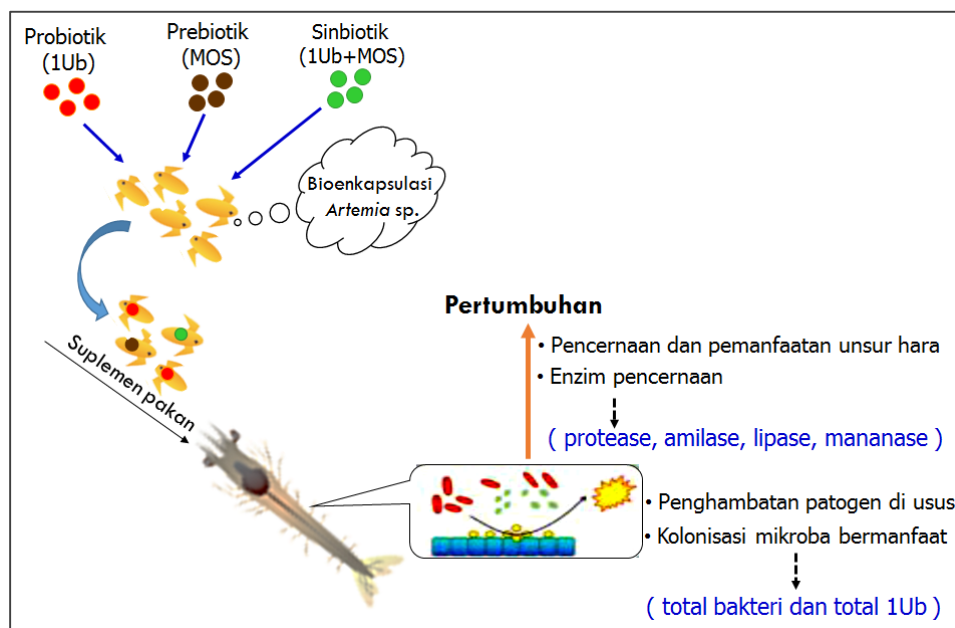
Suplementasi prebiotik mannanooligosakarida pada pakan alami *Artemia* sp. tidak secara langsung menambahkan jumlah enzim eksogenus pada tubuh larva udang vaname, tetapi memberikan tambahan energi dan nutrisi bagi bakteri

probiotik dan bakteri alami dalam tubuh larva untuk mampu hidup lebih baik dan menghasilkan lebih banyak enzim eksogenus, sehingga membuat pencernaan larva vaname menjadi lebih efektif. Hal ini terlihat dari tingginya total bakteri dan aktivitas enzim pencernaan pada larva udang vaname yang diberi perlakuan sinbiotik.

Pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik 1Ub dan prebiotik mannanoligosakarida) pada larva udang vaname melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. akan menciptakan sinergi dalam tubuh larva udang vaname. Ini terlihat dari total bakteri dan aktivitas enzim pencernaan (protease, lipase, dan amilase) larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberi probiotik dan prebiotik. Prebiotik mannanoligosakarida yang diberikan bisa langsung dimanfaatkan oleh bakteri probiotik 1Ub atau digunakan oleh bakteri alami yang ada dalam tubuh larva udang vaname. Kemampuan probiotik 1Ub dalam memanfaatkan mannanoligosakarida sangat terkait dengan kemampuan probiotik 1Ub menghasilkan enzim mananase. Hal tersebut memungkinkan pemberian sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. mampu menghasilkan aktivitas enzim pencernaan dan kinerja pertumbuhan larva udang vaname yang maksimal pada penelitian ini. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Zokaeifar *et al.* (2012) bahwa pemberian probiotik *Bacillus subtilis* mampu meningkatkan enzim pencernaan udang vaname, pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Enterococcus faecium* dan prebiotik fruktooligosakarida) mampu meningkatkan aktivitas enzim pencernaan juvenil ikan mas (Dehaghani *et al.*, 2015).

Laju pertumbuhan harian (DGR) yang diperoleh pada penelitian ini ($24.39 \pm 0.31\%$ /hari) lebih baik dibandingkan DGR hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yaitu sebesar $17.55 \pm 0.65\%$ /hari dan DGR hasil penelitian Nurhayati *et al.* (2015) yaitu sebesar $7.45 \pm 0.16\%$ /hari. Perbedaan nilai DGR yang diperoleh sangat dimungkinkan oleh perbedaan jenis probiotik dan prebiotik yang digunakan dalam penelitian. Demikian pula SR yang diperoleh pada penelitian ini ($92.67 \pm 1.26\%$) lebih tinggi dibandingkan SR hasil penelitian Widanarni *et al.* (2015) yaitu sebesar $41.50 \pm 3.61\%$, namun lebih rendah dibandingkan SR hasil penelitian Mahghani *et al.* (2014) yaitu sebesar $97.6 \pm 2.5\%$. Perbedaan nilai SR yang diperoleh tersebut selain karena perbedaan jenis probiotik dan prebiotik yang digunakan, juga dimungkinkan oleh perbedaan jenis organisme yang digunakan dalam penelitian. Mahghani *et al.* (2014) menggunakan ikan *Carassius auratus gibelio*.

Mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh *Artemia* sp. melalui proses bioenkapsulasi dalam merangsang pertumbuhan larva udang vaname secara ringkas disajikan pada Gambar 12. Probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang masuk ke dalam saluran pencernaan larva udang melalui pakan *Artemia* sp. mampu meningkatkan kolonisasi mikroba bermanfaat dalam saluran cerna larva yang terindikasi dengan peningkatan total bakteri dan total probiotik 1Ub dalam tubuh larva udang vaname. Peningkatan total bakteri bermanfaat dan total probiotik 1Ub akan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran cerna dan mampu meningkatkan aktivitas enzim pencernaan (protease, lipase, amilase, dan mananase) larva udang vaname sehingga proses pencernaan dan pemanfaatan unsur hara berlangsung optimal, selanjutnya akan mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan larva udang vaname.



Gambar 12. Mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh *Artemia* sp. dalam merangsang pertumbuhan larva udang vaname (modifikasi dari Lazado *et al.* 2015)

Pemberian *Artemia* sp. hasil bioenkapsulasi dengan probiotik *P. piscicida* 1Ub (10^6 CFU/mL), prebiotik MOS (12 mg/L), dan sinbiotik (kombinasi 10^6 CFU/mL probiotik 1Ub dengan 12 mg/L MOS) pada larva udang vaname juga mampu meningkatkan respons imun, ekspresi gen imun, dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri patogen *V. harveyi*. Hasil penelitian menunjukkan, respons imun larva udang vaname yang meliputi *total hemosit count* (THC), aktivitas *phenoloxidase* (PO), aktivitas *respiratory burst* (RB) masing-masing mengalami peningkatan setelah diberi probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik melalui bioenkapsulasi *Artemia* sp. (sebelum uji tantang) dan setelah uji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi*.

THC larva udang vaname yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah uji tantang. Peningkatan THC larva udang vaname sebelum uji tantang terjadi sebagai bentuk reaksi sistem imun tubuh larva dalam merespons benda asing yang masuk, yakni sinbiotik (kombinasi probiotik dan prebiotik) yang diberikan selama masa pemeliharaan (mysis 3 – PL12). Partikel asing yang masuk ke dalam tubuh udang akan dikenali oleh sel hemosit dan direpons melalui beberapa mekanisme seperti *intracellular signaling cascade*, fagositosis, enkapsulasi, dan agregasi nodular (Rodriguez & Moullac 2000). Oktaviana *et al.* (2014) dan Nurhayati *et al.* (2015) melaporkan bahwa pemberian sinbiotik melalui pakan buatan selama 30 hari mampu meningkatkan THC udang vaname. Pascauji tantang, THC larva udang vaname mengalami penurunan pada semua perlakuan. Penurunan THC pascauji tantang terjadi akibat bermingasnya sel hemosit dari sistem sirkulasi tubuh menuju jaringan di mana banyak sel yang terinfeksi (Yeh *et al.* 2009). Penurunan THC

menandakan bekerjanya sistem pertahanan tubuh pada daerah terinfeksi (Smith *et al.* 2003).

Aktivitas PO larva udang vaname yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya, baik sebelum maupun setelah ujiantang. Peningkatan aktivitas PO setelah pemberian sinbiotik dapat disebabkan oleh proses inisiasi pengenalan benda asing pada sel probiotik dan MOS oleh *pattern recognition protein* (PRPs) pada hemosit. Enzim PO terdapat dalam hemolim sebagai inaktif *pro-enzyme* yang disebut proPO. Pada krustasea, proPO berfungsi dalam pengenalan benda asing dan melanisasi. Transformasi proPO menjadi PO melibatkan beberapa reaksi yang dikenal sebagai *proPO activating system* yang diaktifkan oleh dinding sel bakteri, β -glukan, dan lipopolisarida (Amparyup *et al.* 2013). Hasil penelitian Arisa *et al.* (2015) menunjukkan hal yang sama, aktivitas PO udang vaname mengalami peningkatan setelah diberi sinbiotik (kombinasi probiotik SKT-b dan oligosakarida dari ekstrak ubi jalar) selama dua minggu. Peningkatan aktivitas PO setelah ujiantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 menandakan peningkatan transformasi proPO menjadi PO untuk penghancuran patogen (melanisasi) terhadap *V. harveyi* MR5339. Tassanakajon & Somboonwiwat (2011) menyatakan apabila ada patogen masuk dalam tubuh udang, maka dalam hemolim akan terjadi fagositosis oleh sel hialin dan semiganular, penghancuran patogen oleh aktivitas PO dan juga pengaktifan antibakteri oleh *antimicrobial peptides* (AMPs) seperti penaidins, crustin dan *antilipopolysaccharide factors* (ALFs). Peningkatan aktivitas PO udang vaname setelah ujiantang juga dilaporkan oleh Oktaviana *et al.* (2014) dan Nurhayati *et al.* (2015).

Aktivitas RB larva udang vaname yang diberi sinbiotik sebelum ujiantang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol, namun tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan yang diberi probiotik dan prebiotik. Aktivitas RB merupakan rangkaian proses pemusnahan partikel mikrob yang difagosit yang melibatkan pelepasan enzim degadatif ke dalam fagosom dan produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang kini disebut *respiratory burst* (Rodriguez & Moullac 2000). Pascaujiantang, aktivitas RB larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun ketiganya berbeda nyata dengan kontrol. Hal ini menunjukkan proses perlawanan dan pemusnahan partikel *V. harveyi* MR5339 oleh sistem imunitas larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik lebih efektif dibandingkan sistem imunitas larva udang pada perlakuan kontrol. Kemampuan perlawanan terhadap infeksi *V. harveyi* tersebut juga terlihat dari data SR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik yang lebih tinggi dibandingkan larva udang kontrol setelah diujiantang dengan *V. harveyi* MR5339 (Gambar 9).

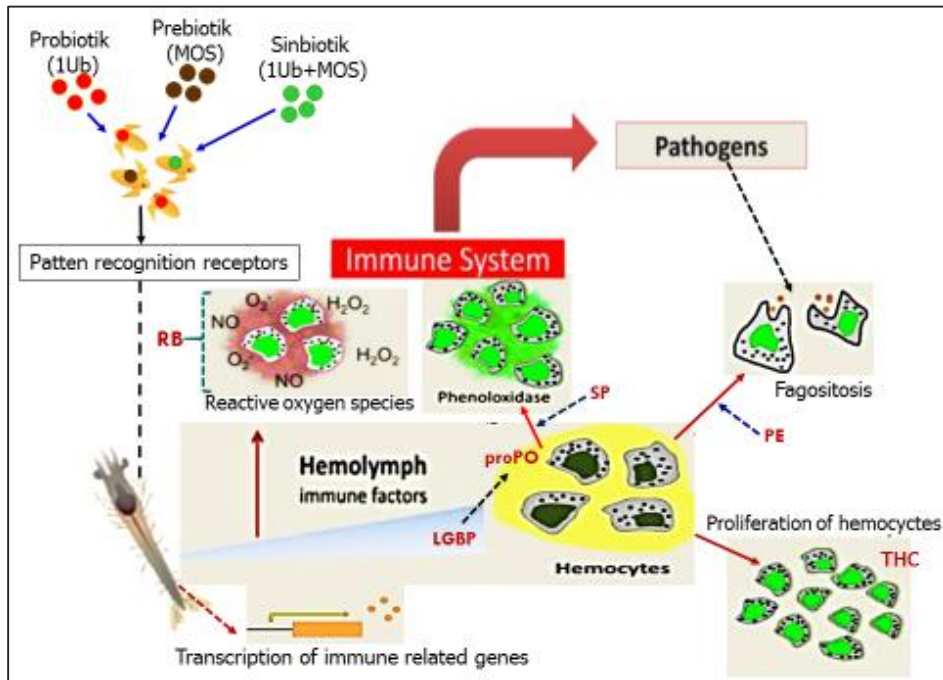
Peningkatan imunitas larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik juga terlihat dari hasil pengukuran ekspresi gen imun larva udang seperti *serine protein* (SP), *peroxinectin* (PE), dan *lipopolysaccharida and β -1,3-glucan-binding protein* (LGBP). Ekspresi gen SP larva udang vaname yang diberi sinbiotik menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 12). Hal tersebut menandakan peningkatan regulasi gen SP dalam mentransformasi proPO menjadi PO sebagai bentuk reaksi inisiasi pengenalan dan penghancuran patogen (melanisasi) *V. harveyi* oleh PRPs pada hemosit setelah uji

tantang. Soderhall & Cerenius (1998) menyatakan bahwa SP bertanggung jawab dalam mengubah ProPO menjadi PO.

Setelah uji tantang dengan *V. harveyi* MR5339, ekspresi gen PE larva udang yang diberi sinbiotik dan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun keduanya menunjukkan nilai paling tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan prebiotik dan kontrol (Tabel 12). Saat terjadinya serangan patogen, sel hemosit akan melakukan proses deganulisasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap patogen tersebut. Hasil proses deganulisasi adalah pelepasan PE yang memicu munculnya fagositosis. Chiu *et al.* (2007) menyatakan bahwa ekspresi gen PE dapat meningkatkan aktivitas biologis sel-sel adhesi, opsonin, deganulasi, peroksidase, dan enkapsulasi pada udang.

Lipopolysaccharida dan LGBP merupakan salah satu indikator penting dari respons imun krustasea termasuk udang yang berperan penting dalam aktivasi sistem ProPO sebagai bentuk reaksi akibat masuknya benda asing dan adanya serangan patogen. Senyawa β -glukan dapat meningkatkan aktivitas PO setelah bereaksi dengan *β -glucan binding protein* (Li *et al.* 2008). Setelah berikatan maka proPO akan diaktifkan menjadi enzim PO yang selanjutnya menjalankan fungsinya dalam proses melanisasi. Pada penelitian kami ini, ekspresi gen LGBP larva udang vaname yang diberi sinbiotik lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol dan perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan sintasan larva udang vaname melibatkan LGBP, dan ini sejalan dengan Cheng *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa LGBP memiliki peran penting dalam pertahanan udang selama tahap awal infeksi.

Secara ringkas mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh *Artemia* sp. melalui proses bioenkapsulasi dalam merangsang respons imun dan ekspresi gen imun larva udang vaname disajikan pada Gambar 13. Probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang masuk ke dalam tubuh larva melalui pakan *Artemia* sp. akan dikenali oleh larva udang melalui proses inisiasi pengenalan benda asing pada sel probiotik dan MOS oleh *pattern recognition receptors* sehingga larva akan mentranskripsikan gen-gen terkait imunitas (LGBP, proPO, SP, dan PE) dan peningkatan faktor-faktor imunitas dalam hemolim seperti proliferasi hemosit yang terindikasi dengan peningkatan *total hemosit count* (THC), peningkatan aktivitas *phenoloxidase* (PO), aktivitas fagositosis dan aktivitas *respiratory burst* (RB).



Gambar 13. Mekanisme kerja probiotik 1Ub, prebiotik MOS, dan sinbiotik (kombinasi 1Ub dengan MOS) yang disuplementasikan dalam tubuh *Artemia sp.* dalam merangsang respons imun dan ekspresi gen imun larva udang vaname (modifikasi dari Lazado *et al.* 2015)

Hasil penelitian menunjukkan, sintasan (SR) larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik setelah diuji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol positif (Gambar 9). SR larva udang vaname yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berkisar 81,7 – 90%, sementara SR larva udang vaname pada kontrol positif sebesar 68,3% atau terjadi peningkatan SR sebesar 20 – 32%. Hal ini menunjukkan daya tahan tubuh (resistensi) larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik terhadap infeksi *V. harveyi* MR5339 Rf^R lebih baik dibandingkan larva udang pada perlakuan kontrol positif. Tingginya resistansi tersebut sangat terkait dengan meningkatnya respons imunitas dan ekspresi gen terkait imunitas larva udang vaname setelah diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik baik sebelum uji tantang maupun setelah uji tantang (Tabel 11 dan 12).

Berdasarkan pola kematian dan jumlah sel *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname selama lima hari uji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R (Gambar 10), terlihat jumlah kematian larva udang terbanyak terjadi pada perlakuan kontrol (+). Banyaknya kematian larva udang pada kontrol (+) sangat dimungkinkan oleh rendahnya penghambatan terhadap infeksi *V. harveyi* MR5339 Rf^R akibat rendahnya respons imunitas larva udang kontrol (+). Hal ini terlihat dari rendahnya THC, PO, RB (Tabel 11) dan SP, PE, LGBP (Tabel 12) serta tingginya populasi *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang pada kontrol (+) dibandingkan perlakuan lainnya (Gambar 10). Sebaliknya, dalam tubuh larva udang yang diberi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik terjadi penghambatan dan kompetisi terhadap *V. harveyi* MR5339 Rf^R oleh bakteri probiotik dan bakteri lain yang menguntungkan sehingga jumlah (*quorum*) yang dibutuhkan untuk

mengekspresikan faktor-faktor virulensi *V. harveyi* MR5339 Rf^R tidak tercapai. Hamsah *et al.* (2017) melaporkan bahwa pemberian probiotik *P. piscicida* dan sinbiotik (gabungan probiotik *P. piscicida* dan prebiotik MOS) mampu meningkatkan jumlah total bakteri dan populasi bakteri probiotik *P. piscicida* dalam tubuh larva udang vaname.

Secara keseluruhan, populasi *V. harveyi* MR5339 dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname mengalami penurunan sejak hari ke-1 hingga hari ke-5 setelah ujiantang. Penurunan populasi *V. harveyi* MR5339 dan total *Vibrio* dalam tubuh larva udang vaname berkorelasi positif dengan berkurangnya jumlah kematian larva udang vaname. Pada pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik, jumlah kematian larva udang relatif sedikit dibandingkan pada perlakuan kontrol (+) dan terdeteksi hanya sampai hari ke-3 (Gambar 10). Rendahnya populasi *V. harveyi* MR5339 dan total *Vibrio* serta rendahnya jumlah kematian larva udang pada perlakuan probiotik, prebiotik dan sinbiotik menyebabkan tingginya sintasan (SR) ketiga perlakuan tersebut dibandingkan SR pada perlakuan kontrol (+) (Gambar 9). Tingginya SR larva udang vaname pada pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik dibandingkan SR larva udang pada kontrol (+) juga terkonfirmasi dengan hasil pengamatan histologi di mana tingkat kerusakan jaringan hepatopankreas larva udang vaname pada ketiga perlakuan tersebut tidak separah kerusakan jaringan hepatopankreas larva udang vaname pada perlakuan kontrol (+) (Gambar 11). Hepatopankreas larva udang vaname pada perlakuan kontrol (+) mengalami kerusakan yang cukup parah dimana terjadi nekrosis pada tubulus (TB) dari sel-sel hepatopankreas akibat infeksi bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Tingginya tingkat kerusakan jaringan hepatopankreas udang vaname pada perlakuan kontrol (+) menyebabkan jumlah kematian udang selama ujiantang juga tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

SIMPULAN DAN SARAN UMUM

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dari seluruh tahap penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa probiotik *P. piscicida* 1Ub, prebiotik MOS, dan gabungan keduanya (sinbiotik) mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan, respons imun, ekspresi gen imun, dan resistansi larva udang vaname terhadap infeksi bakteri patogen *V. harveyi* dengan hasil terbaik diperoleh pada pemberian sinbiotik (kombinasi 10⁶ CFU/mL 1Ub dengan 12 mg/L mannanoligosakarida).

SARAN

Perlu dilakukan evaluasi kinerja produksi dan resistansi larva udang vaname hasil aplikasi probiotik *P. piscicida* (1Ub), prebiotik MOS, dan sinbiotik pada kondisi lapangan di tambak. Selain itu perlu pula kajian penyiapan probiotik *P. piscicida* (1Ub) dalam bentuk produk mikrokapsul sinbiotik untuk kepraktisan aplikasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aalimahmoudi M, Reyshahri A, Bavarsad SS, Maniat M. 2016. Effects of feeding frequency on growth, feed conversion ratio, survival rate and water quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(3):293-297.
- Abdelhamid AM, Mehrim AI, El.barbary MI, Ibrahim SM, Abd El-wahab AI. 2009. Evaluation of a new Egyptian probiotic by African catfish fingerlings. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2(3):133-145.
- Ahmadi A, Mozanzadeh MT, Agh N, Bahabadi MN. 2017. Effects of enriched *Artemia* with *Saccharomyces cerevisiae* and *Chaetoceros gracilis* on growth performance, stress resistance and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(2):669-673.
- Aktas M, Ciger O, Genc E, Genc MA, Cavdar N. 2014. Effects of mannan oligosaccharide and serotonin on molting, growth, body composition and hepatopancreas histology of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone 1931). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14:205-211.
- Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakojan A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34:990-1001.
- Arangure BOP, Gonzales AL, Coronado JAF, Miranda MCF, Ocampo HAG. 2013. Effect of inulin and probiotik bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 12(21):3366-3375.
- Arisa II, Widanarni, Yuhana M, Muchlisin ZA, Muhammadar AA. 2015. The application of probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance the immune responses of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to *Vibrio harveyi* infection. *AAFL Bioflux*, 8(5):772-778.
- Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114:173-186.
- Bergmeyer HU, Gossi M, Walter HE. 1983. Reagents for enzymatic analysis. In: Bergmeyer HU (ed.) *Methods in enzymatic analysis vol. II*. 3rd eds . Weinheim. 274-275 pp.
- Borlongan IG. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture*. 89:315-325.
- Brown M. 2002. Preparation and assessment of microalgae concentrates as feeds for larva and juvenile pacific oyster crassostrea. *Journal of the World Aquaculture Society*, 7:189-199.
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MA. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A review. *Journal of Aquaculture Research & Development*, S1:008.
- Chen TT. 2000. Aquaculture biotechnology and fish disease. In: Hardjito, L. (Ed.). *International Symposium on Marine Biotechnology*. Center for Coastal and Marine Resources Studies, IPB, Jakarta, Indonesia, p.: 3-8.

- Cheng W, Liu CH, Tsai CH, Chen JC. 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 18:297-310.
- Chiu CH, Guu YK, Liu CH, Pan TM, Cheng W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:364-377.
- Chrisolite B, Thiyagarajan S, Alavandi SV, Abhilash EC, Kalaimani N, Vijayan KK, Santiago TC. 2008. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. *Aquaculture*, 275:13-19.
- Cristopher JAJ, Theodore JA, Peter MM. 2004. Characterization of a new parthenogenetic *Artemia* population from Thamaraiikulam, India. *Journal of Biology Research*, 2:63-74.
- Daniels CL, Merrifield DL, Boothroyd DP, Davies SJ, Factor JR, Arnold KE. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannanoligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* Linnaeus, 1758) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304(1):49-57.
- Daniels CL, Merrifield DL, Ringø E, Davies SJ. 2013. Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. *Aquaculture*, 416:396-406.
- Dehaghani PG, Baboli MJ, Moghadam AT, Nejad SZ, Pourfarhadi M. 2015. Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Czech Journal of Animal Science*. 60(5):224-232.
- Dewanti R, Wong ACL. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 67:456-459.
- De Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. 2011. The impact of pre-and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health ?. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1):46-57.
- D'Abramo LR, Sheen SS. 1993. Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, 115:63-86.
- D'Abramo LR. 1997. Triacylglycerols and fatty acids. p. 71-84. In: D'Abramo LR, Conklin DE, Akiyama DM (edit). Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Delgado GTC, Tamashiro WMSC, Junior MRM, Moreno YMF, Pastore GM. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Research International*, 44:3167-3173.
- Falony G, Armas JC, Mendoza JCD, Hernández JLM. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2): 235-240
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2017. Increased production of farmed shrimp leads to improved international trade. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/989543>. [diunduh pada 11 Juli 2017].

- Febrianti D, Yuhana M, Widanarni. 2016. Dietary synbiotic microcapsule influence the immune responses, growth performance and microbial populations to white spot syndrome virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 11(1):28-42.
- Gibson G, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17: 259–275.
- Hadioetomo R. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. PT Gamedia: Jakarta (ID).
- Hakamada Y, Ohkubo Y, Ohashi S. 2014. Purification and characterization of β -Mannanase from *Reinekea* sp. KIT-YO10 with transglycosylation activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78 (4):722–728
- Hamsah, Widanarni, Alimuddin, Yuhana M, Junior MZ. 2017. Bacterial population, activity of enzymes and growth rate of the Pacific white shrimp larvae administered *Pseudoalteromonas piscicida* and Mannan-oligosaccharides through bioencapsulation of *Artemia* sp. *Research Journal of Microbiology*, 12(2): 128-136
- Herawati VE. 2014. Transfer nutrisi dan energi larva udang vanname (*Litopennaeus vannamei*) dengan pemberian pakan *Artemia* sp. produk lokal dan impor. *Aquasains*, 2(2):177-185.
- Herawati VE, Johannes H, Budi P. 2012. The effect of essential amino acid profile, fatty acid profile and to growth of *Skeletonema costatum* using technical media culture guillard and double walne. *Journal of Coastal Development*, 10:48-54.
- Hossain MZ, Abe JI, Hizukuri S. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(2):95-98.
- Irawadi TT. 1991. Produksi enzyme ekstraselular (selulase dan xylanase) dari *Neurospora sitophila* pada substrat limbah padat kelapa sawit. Disertasi. Bogor: Prog Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Ivanova EP, Sawabe T, Alexeeva YV, Lysenko AM, Zhukova NV, Gorshkova NM, Hayashi K, Christen R, Mikhailov VV. 2002. *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga (*Fucus evanescens*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:229-234.
- Jobling M. 2002. Feed composition and analysis. p. 1-24. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M (edit). *Food Intake in Fish*. Blackwell Science, Malden, USA.
- Jimenez VF, Vargas AF, Söderhäll K. 2005. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 18:101-108.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanism of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1 – 14.
- Kwon DY, Rhee JS. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63(1):89-92.
- Lakshmi B, Viswanath B, Gopal DS. 2015. Influence of the isolated probiotic bacteria on the water quality parameters of shrimp pond and their effect on growth and survival of the shrimp. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(2):15-22.

- Lazado CC, Lacsamana JI, Caipang CMA. 2015. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines*, 2015: 89-114 ISBN: 978-81-308-0558-0.
- Linacero RJ, Rueda, Vasques AM. 1998. Quantification of DNA. In Karp AP, Isaac G, ing DS (Editors) *Molecular Tools For Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman and Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, p.18-21.
- Li CH, Yeh ST, Chen JC. 2008. The immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:853-860
- Li J, Tan B, Mai K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1):35-40.
- Lisal JS. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar. *Medical Nusantara*, 26:256-262.
- Liu CH, Chiu CS, Ho PL, Wang SW. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal Applied Microbiology*, 107(3): 1031-1041.
- Liu CH, Chen JC. 2004. Effect of ammonia on the immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16:321-334.
- Liu CH, Cheng W, Chen JC. 2005. The peroxinectin of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is synthesised in the semi-ganular and ganular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 18:431-444.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25:402-408.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 2002. Diet and metabolism of the intestinal flora. *Bioscience and Microflora*, 21(4):199-208.
- Mahghani F, Gharaei A, Ghaffari M, Akrami R. 2014. Dietary synbiotic improves the growth performance, survival and innate immune response of Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) juveniles. *International Journal of Aquatic Biology*, 2(2): 99-104.
- Marchesi JR., Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2):795-799.
- Mei G-Y, Carey CM, Tosh S, Kostrzynska M. 2011. Utilization of different types of dietary fibers by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 57:857-865.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bogwald J, Castex M, Ringo E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302:1-18.

- Mohebfi F, A. Mohsenpour Azari, R. Ahmadi, M. SeiDGR ar, B. Mostafazadeh, S. Ganji. 2015. The effects of *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis oculata* as food on the growth, survival and reproductive characteristics of *Artemia urmiana*. *Environmental Resources Research*, 3(2):111-120.
- Nasi L, Prayitno SB, Sarjito. 2007. Kajian bakteri penyebab *Vibriosis* pada udang secara biomolekuler. *J Coast Res Manag*. 3(1):123-128.
- Nayak S. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1):2-14.
- Ngatirah, Harmayanti E, Rahayu ES, Utami T. 2000. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Di dalam *Pemberdayaan industry Pangan dalam Rangka Peningkatan daya Saing Menghadapi Era Perdagangan Bebas*. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan Volume 2*; Surabaya, 10 – 11 Oktober 2000. Surabaya: Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia. hlm 63- 70.
- Nimrat S, Boonthai T, Vuthiphandchai V. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*. 169(3):244-258.
- Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T, Vuthiphandchai V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3): 443-450.
- Nurhayati D, Widanarni, Yuhana M. 2015. Dietary synbiotic influence on the growth performances and immune responses to co-infection with infectious myonecrosis virus and *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 10(1):13-23.
- Oktaviana A, Widanarni, Yuhana M. 2014. The use of synbiotic to prevent IMNV and *Vibrio harveyi* co-infection in *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 21(3):127-134.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kummeling I. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511-521.
- Phuoc LH, Corteel M, Nguyen CT, Nauwynck H, Pensaert M, Alday-Sanz V, Broeck van den W, Sorgeloos P, Bossier P. 2009. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290:61-68.
- Rani AMB, Reddy AK, Sahu NP. 2006. Growth enhancement and survival of *Macrobrachium rosenbergii* larvae fed *Artemia* nauplii enriched with cod liver oil and/or *Lactobacillus*. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 58(3):183-190.
- Ringo E, Olsen RE, Gifstad TO, Dalmo RA, Amlund H, Hemre GI. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2):117-136.
- Rodriguez L, Le Moullac G. 2000. State of the art immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191:109-119.
- Rønnestad I, Kamisaka Y, Conceicao L, Morais S, Tonheim S. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture*, 268(1):82-97.

- Sariadji K, Wati M, Syamsidar, Novi A, Sundari, Khariri, Sunarno. 2015. Waktu regenerasi bakteri *Vibrio cholerae* pada medium APW. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 43(1):35-40
- Saulnier D, Haffner P, Goarant C, Levy P, Ansquer D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: Review. *Aquaculture*. 191:133-144.
- Shadid R, Haarman M, Knol J, Theis W, Beermann C, Rjosk-Dendorfer D. 2007. Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity-a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Clinical Nutrition* 86:1426-1437.
- Silva FCP, Nicoli JR, Zambanino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ. 2011. Influence of the diet on microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2):285-296.
- Suprayudi MA, Takeuchi T, Hamasaki K. 2004. Essential fatty acid for larvae mud crad (*Scylla serrata*): implication of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acid to highly unsaturated fatty acid. *Aquaculture*, 231: 403-416.
- Sulistyowati EB, Tetri W, and Akhmad FMS. 2007. Increasing quantity and quality of *Artemia franciscana* cysts after exposing fish silage. *Bioteknologi*, 4(2):46-52.
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5):1639-1652.
- Söderhäll K, Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10:23-28.
- Song YL, Hsieh YT. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*, 18(3):201-209.
- Smith VJ, Brown JH, Hauton C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15:71-90.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2009. Produksi benih udang vaname *Litopenaeus vannamei* kelas benih sebar. Jakarta (ID): Badan Standarisasi Nasional.
- Takeuchi T. 1988. Laboratory work chemical evaluation of dietary nutrients. P:179-233. In: Watanabe (Ed.), Fish Nutrition and Mariculture. Kanagawa International Fisheries Training. Japan International Cooperation Agency (JICA), Japan.
- Tampangallo BR, Pakidi CS, Rantetondok A. 2012. Respons imun udang windu (*Penaeus monodon*) yang dipapar bakteri *Vibrio harveyi*. *Prosiding Seminar Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional*. p.265-269.

- Tassanakajon A, Somboonwiwat K. 2011. Antimicrobial peptides from the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)-A review. *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. p:229-240.
- Tocher DR. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*. 11(2):107-184.
- Tzuc JT, Escalante DR, Herrera RR, Cortés GG, Ortiz MLA. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). SpringerPlus, 3: 280.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4):655-671.
- Wang YB, Li JR, Lin J. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1):1-4.
- Widanarni, Elly, Soelistyowati DT, Suwanto A. 2008. Pemberian bakteri probiotik vibrio SKT-b pada larva udang windu melalui pengayaan *Artemia*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 7:129-137.
- Widanarni, Tepu I, Sekenda, Setiawati M. 2009. Seleksi bakteri probiotik untuk biokontrol vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*) menggunakan cara kultur bersama. *Jurnal Riset Akuakultur*. 4(1):95-105.
- Widanarni, Lidaenni MA, Wahjuningum D. 2010. Pengaruh pemberian bakteri probiotik *Vibrio* SKT-b dengan dosis yang berbeda terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang windu (*Penaeus monodon* Fab). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 9(1):21-29.
- Widanarni, Widagdo P, Wahjuningum D. 2012. Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui pakan pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 11(1):54-63.
- Widanarni, Hadiroseyani Y, Sutanti A. 2013. Pengaruh pemberian bakteri probiotik *Vibrio* SKT-b dengan dosis berbeda melalui *Artemia* terhadap pertumbuhan pascalava udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 12(1):86-93.
- Widanarni, Nababan YI, Yuhana M. 2015. Growth performance of Pacific white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*) larvae fed prebiotic and probiotic through *Artemia*. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 12(2):99 -104.
- Widiastuti R, Johannes H, Vivi EH. 2012. Pengaruh pemberian pakan alami berbeda (*Skeletonema costatum* dan *Chaetoceros gacilis*) terhadap pertumbuhan biomass mutlak dan kandungan nutrisi *Artemia* sp. lokal. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 1(1):236-248.
- Worthington V. 1993. Worthington Enzyme Manual. Enzymes and Related Biochemicals Worthington Chemical, New Jersey, USA.
- Yeh SP, Chen YN, Hsieh SL, Cheng W, Liu CH. 2009. Immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 26:582-588
- Zahidah D, Shovitri M. 2013. Isolasi, karakterisasi dan potensi bakteri aerob sebagai pendegradasi limbah organik. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1):12-15.

- Zhang J, Liu Y, Tian L, Yang H, Liang G, Xu D. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4):1027-1032.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4):683-689.
- Zubaidah A, Yuhana M, Widanarni. 2015. Encapsulated synbiotic dietary supplementation at different dosages to prevent vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *HAYATI Journal of Biosciences*, 22:163-168.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Media Sea Water Complete (SWC)

Media SWC Agar

Untuk membuat 100 mL media agar dibutuhkan bahan- bahan sebagai berikut :

Bacto pepton	0.5 g
Yeast ekstrak	0.1 g
Glycerol	0.3 mL
Air laut	75 mL
Akuades	25 mL
Bacto agar	1.5 – 2 g

Cara membuat :

1. Semua bahan dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan bahan terlarut secara homogen.
2. Campuran bahan yang telah dipanaskan kemudian disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
3. Setelah didinginkan sebentar, SWC agar dituang ke dalam cawan petri, didiamkan selama 1 malam sebelum digunakan untuk kultur bakteri.

Media SWC Broth

Semua bahan dan cara pembuatan sama dengan media agar, tetapi tanpa penambahan agar.

Lampiran 2. Prosedur uji hidrolisis pati, susu, minyak, dan MOS

A. Uji hidrolisis susu

1. Media SWC agar yang mengandung susu skim 2% dimasukkan ke dalam cawan petri.
2. Inokulasi isolate yang akan diuji ke dalam media agar dengan cara menempatkan 1 mata Ose biakan di bagian tengah cawan, kemudian disebarluaskan seluas 0.5 cm.
3. Diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 – 48 jam.
4. Hidrolisis susu/kasein dapat dilihat dari daerah bening di sekeliling koloni.
5. Ukur diameter wilayah yang dihidrolisis.

B. Uji hidrolisis pati

1. Media SWC agar yang mengandung pati 2% dimasukkan ke dalam cawan petri.
2. Inokulasi isolat yang akan diuji ke dalam media agar dengan cara menempatkan 1 mata Ose biakan di bagian tengah cawan, kemudian disebarkan seluas 0.5 cm.
3. Diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 – 48 jam.
4. Hidrolisis pati diukur dengan memberikan beberapa tetes reagen KI 1% di atas permukaan media agar.
5. Hidrolisis pati dapat dilihat dari daerah bening di sekeliling koloni, bila tidak terjadi hidrolisis daerah sekitar koloni tetap berwarna biru kehitaman.
6. Ukur diameter wilayah yang dihidrolisis.

C. Uji hidrolisis minyak/lemak

1. Media SWC agar yang mengandung minyak zaitun 2 % dimasukkan ke dalam cawan petri.
2. Inokulasi isolat yang akan diuji ke dalam media agar dengan cara menempatkan 1 mata Ose biakan di bagian tengah cawan, kemudian disebarkan seluas 0.5 cm.
3. Diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 – 48 jam.
4. Hidrolisis lemak diukur dengan menuangkan CuSO_4 jenuh di atas permukaan media agar.
5. Bakteri yang mampu menghidrolisis lemak, di sekitar pertumbuhan koloninya terdapat warna hijau mengkilat, sedang di daerah lain tidak.
6. Ukur diameter wilayah yang dihidrolisis.

D. Uji hidrolisis mannanoligosakarida (MOS)

1. Media SWC agar yang mengandung MOS 2 % dimasukkan ke dalam cawan petri.
2. Inokulasi isolat yang akan diuji ke dalam media agar dengan cara menempatkan 1 mata Ose biakan di bagian tengah cawan, kemudian disebarkan seluas 0.5 cm.
3. Diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 – 48 jam.
4. Hidrolisis MOS diukur dengan menuangkan *Congo red* 0.1% di atas permukaan media agar.
5. Hidrolisis MOS dapat dilihat dari daerah bening di sekeliling koloni.
6. Ukur diameter wilayah yang dihidrolisis.

Lampiran 3. Prosedur analisis proksimat

A. Kadar Protein (metode semimicro-kjedahl : Takeuchi 1988)

Tahap Oksidasi

1. Sampel ditimbang sebanyak 0.5 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl.
2. Katalis ($K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O$) dengan rasio 9:1 ditimbang sebanyak 3 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl.
3. 10 mL H_2SO_4 pekat ditambahkan ke dalam labu Kjeldahl dan kemudian labu dipanaskan dalam rak oksidasi/digestion pada suhu $400^\circ C$ selama 3 – 4 jam sampai terjadi perubahan warna cairan dalam labu menjadi hijau bening.
4. Larutan didinginkan lalu ditambahkan air destilasi 100 mL. Kemudian larutan dimasukan ke dalam labu takar dan diencerkan dengan akuades sampai volume larutan mencapai 100 mL. Larutan sampel siap untuk didestilasi.

Tahap Destilasi

1. Beberapa tetes H_2SO_4 dimasukkan ke dalam labu, sebelumnya labu diisi setengahnya dengan akuades untuk menghindari kontaminasi oleh amonia lingkungan. Kemudian dididihkan selama 10 menit.
2. Erlenmeyer diisi 10 mL H_2SO_4 0.05 N dan ditambahkan 2 tetes indikator methyl red diletakkan di bawah pipa pembuangan kondensor dengan cara dimiringkan sehingga ujung pipa tenggelam dalam cairan.
3. 5 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung destilasi melalui corong yang kemudian dibilas dengan akuades dan ditambahkan 10 mL NaOH 30 % lalu dimasukan melalui corong tersebut dan ditutup.
4. Campuran alkalin dalam labu destilasi disuling menjadi uap air selama 10 menit terjadi pengembunan pada kondensor.
5. Labu erlenmeyer diturunkan hingga ujung pipa kondensor berada di leher labu, di atas permukaan larutan. Kondensor dibilas dengan akuades selama 1 – 2 menit.

Tahap Titrasi

1. Larutan hasil destilasi dititrasi dengan larutan NaOH 0.05N.
2. Volume hasil titrasi dicatat.
3. Prosedur yang sama juga dilakukan pada blanko.

Perhitungan :

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \frac{0.0007 \times (V_b \times V_s) \times F \times 6.25 \times 20}{S} \times 100$$

Keterangan :

V_s = ml 0.05 N nitran NaOH untuk sampel;

V_b = ml 0.05 N nitran NaOH untuk blanko;

F = faktor koreksi dari 0.05 N larutan NaOH;

S = bobot sampel (g);

0.0007 = setiap ml 0.05 N NaOH ekuivalen dengan 0.0007 g nitrogen;

6.25 = faktor nitrogen

B. Kadar lemak (metode ether ekstraksi : Takeuchi 1988)

1. Labu ekstraksi dipanaskan di dalam oven (110°C) selama 1 jam kemudian didinginkan dalam eksikator selama 30 menit lalu ditimbang bobot labu tersebut (A)
2. Sampel ditimbang sebanyak 1-2 g (B) dan dimasukkan ke dalam tabung filter lalu dipanaskan pada suhu 90-100 °C selama 2-3 jam
3. Tabung filter ditempatkan ke dalam ekstrak dari alat soxlet. Kemudian disambungkan kondensor dengan labu ekstraksi yang telah diisi 100 ml petroleum eter
4. Eter dipanaskan pada labu ekstraksi dengan menggunakan water bath pada suhu 70 °C selama 16 jam
5. Labu ekstraksi dipanaskan pada suhu 100 °C kemudian ditimbang (C)

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{(C - A)}{B} \times 100$$

C. Kadar air (Takeuchi 1988)

1. Cawan dipanaskan dalam oven (110°C) selama 1 jam kemudian dimasukkan dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang (A)
2. Bahan ditimbang 2-3 gram (B)
3. Cawan dan bahan dipanaskan di dalam oven (110°C) selama 4 jam kemudian dimasukkan ke dalam eksikator selama 30 menit lalu ditimbang (C)

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{(C - A)}{B} \times 100$$

D. Kadar abu (Takeuchi 1988)

1. Cawan dipanaskan di dalam oven (110°C) selama 1 jam kemudian dimasukkan ke dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang (A)
2. Bahan ditimbang 2-3 g (B)

3. Cawan dan bahan dipanaskan dalam tanur (600°C) sampai bahan menjadi abu, kemudian dimasukkan ke dalam eksikator selama 30 menit lalu ditimbang (C)

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{(C - A)}{B} \times 100$$

E. Serat kasar (Takeuchi 1988)

1. Kertas filter dipanaskan dalam oven selama 1 jam pada suhu 110°C. Setelah itu didinginkan dalam eksikator lalu ditimbang (A)
2. Sampel ditimbang sebanyak 0.5 g (B) dan dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml
3. Sebanyak 50 ml H₂SO₄ 0.3 N dimasukkan ke dalam erlemeyer kemudian dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu dimasukan 25 ml NaOH 1.5 N ke dalam erlemeyer lagi, kemudian dipanaskan selama 30 menit
4. Larutan dan bahan yang telah dipanaskan kemudian disaring dalam corong Buchner dan dihubungkan pada *vacuum pump* untuk mempercepat filtrasi
5. Larutan dan bahan yang ada dalam corong Buchner dibilas secara berturut-turut 50 ml air panas, H₂SO₄ 0.3 N, 50 ml air panas dan 25 ml aseton
6. Kertas saring dan isinya dimasukkan ke dalam cawan porselin, kemudian dikeringkan selama 1 jam dan kemudian didinginkan dalam eksikator dan ditimbang (C)
7. Setelah itu dipanaskan dalam tanur 600°C hingga berwarna putih, kemudian didinginkan dalam eksikator dan ditimbang (D)

$$\text{Kadar serat (\%)} = \frac{(C - A - D)}{B} \times 100$$

Lampiran 4. Prosedur analisis aktivitas enzim

A. Prosedur analisis aktivitas enzim amilase (Bergmeyer *et al.* 1983)

Perlakuan	Blanko (mL)	Standar (mL)	Sampel (mL)
• Soluble starch dalam buffer sitrat (pH 5.7)	1.0	1.0	1.0
• Maltosa standar	-	1.0	-
• Ekstrak enzim	1.0	-	1.0
• Akuades	-	-	-
Dikocok dan diinkubasi dalam <i>shaker waterbath</i> pada suhu 32°C selama 30 menit			
DNS	3.0	3.0	3.0
Panaskan pada suhu 100°C selama 10 menit.			
Diencerkan dengan akuades sampai volume tertentu atau tergantung kepekatan warna			
Didiamkan selama beberapa menit pada suhu ruang, kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.			

B. Analisis aktivitas protease (Bergmeyer *et al.* 1983)

Perlakuan	Blanko (mL)	Standar (mL)	Sampel (mL)
• Buffer borat (0.01 M, pH 8.0)	1.0	1.0	1.0
• Substrat kasein (20 mg/mL pH 8.0)	1.0	1.0	1.0
• HCl (0.05 mg/mL)	0.2	0.2	0.2
• Enzim dalam CaCl ₂ (10 mmol/L)	-	-	0.2
	-	0.2	-
• Tirosin standar (5 mmol/L)	0.2	-	-
• Akuades	-	-	-
Diinkubasi dalam <i>shaker water bath</i> pada suhu 37°C selama 10 menit			
• TCA (0.1 M)	3.0	3.0	3.0
• Akuades	-	-	0.2
• Enzim dalam CaCl ₂ (10 mmol/L)	0.2	0.2	-
Didiamkan pada suhu 37°C selama 10 menit, selanjutnya sentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit.			
• Filtrat	1.5	1.5	1.5
• Na ₂ CO ₃ (0.4 M)	5.0	5.0	5.0
• Reagen Folin ciocalteau (1:2)	1.0	1.0	1.0
Didiamkan pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian dibaca absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm			

Aktivitas enzim dihitung dengan rumus :

$$\text{IU/mL} = \frac{\text{OD sampel} - \text{OD blanko}}{\text{OD standar} - \text{OD blanko}} \times \text{faktor pengenceran} \times T^{-1}$$

Dimana : IU = aktivitas enzim dalam International Unit per menit

OD = absorbansi

T = waktu (menit)

C. Analisis aktivitas lipase (Borlongan 1990)

1. Substrat lipase stabil (minyak zaitun) 1.5 mL ditambah 1 mL Tris-HCL 0.1 M sebagai BUFER dengan pH 8.0.
2. Kemudian tambahkan 1.0 mL ekstrak enzim.
3. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C
4. Reaksi dihentikan dengan menambah 3 mL etil alkohol 95 %.
5. Titrasi sampel dengan NaOH 0.01N, dengan menggunakan thymophthalein 0.9 % (w/v) dalam etanol sebagai indikator.
6. Prosedur yang sama dilakukan juga terhadap blanko
7. Satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai volume NaOH 0.05N yang dibutuhkan untuk menetralsir asam lemak yang dilepaskan selama 6 jam inkubasi dengan substrat, setelah dikoreksi dengan blanko.

D. Pembuatan ekstrak enzim dari tubuh larva udang

1. Semua prosedur penyiapan ekstrak enzim dikerjakan pada suhu 0 sampai 4°C agar enzim tidak mengalami kerusakan,
2. Larva udang dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas pengisap.
3. Larva udang dihancurkan dengan mortal sampai halus dan diambil sebanyak 1 g dan dihomogenkan dengan 10 mL akuades dingin. Disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C, supernatan diambil sebagai ekstrak enzim kasar dan digunakan sebagai sampel untuk pengujian aktivitas enzim.

E. Memperoleh ekstrak enzim dari bakteri

1. Sebanyak 0.1 mL isolate bakteri diinokulasikan ke dalam 10 mL media kultur cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C.
2. Setelah 24 jam kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 20 menit, pada suhu 4 °C, supernatannya diambil sebagai ekstrak enzim kasar dan digunakan sebagai sampel untuk pengujian degradasi substrat dan aktivitas enzim.

Lampiran 5. Pembuatan mutan rifampisin resisten pada isolat bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* (1Ub)

Berikut ini adalah tahapan dalam pembuatan bakteri menjadi resisten terhadap rifampisin (Rf^R):

1. Sebanyak 1 ml biakan cair bakteri *P. piscicida* disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit.
2. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan larutan fisiologis sebanyak supernatan yang dibuang (1 ml) lalu dihomogenasi dengan vorteks.
3. Suspensi bakteri ini disentrifugasi kembali pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit lalu supernatannya dibuang dan ditambahkan kembali larutan fisiologis sebanyak 1 ml.
4. Sebanyak 100 µl suspensi bakteri uji lalu disebar secara merata pada permukaan media *Sea Water Complete Agar* (SWC-agar) yang telah mengandung antibiotik rifampisin (50µg/ml).
5. Sebagai kontrol, sebanyak 100 µl suspensi bakteri uji hasil pengenceran serial 10⁻⁵, 10⁻⁶, dan 10⁻⁷ disebar secara merata pada permukaan media SWC-agar yang tidak mengandung antibiotik.
6. Kultur diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 29°C selama 24-48 jam.
7. Koloni bakteri yang tumbuh pada media SWC-agar + rifampisin merupakan koloni bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik rifampisin.
8. Koloni bakteri yang telah resisten diambil dengan menggunakan Ose dan dipindahkan pada agar miring sebagai stok inokulan.

Lampiran 6. Metode Pengukuran Respons Imun Larva Udang

1. Total Haemocyte Count (THC) (modifikasi metode Chen 2000)

Sebanyak 0.3 g larva udang dalam mortal ditambahkan 0.9 mL antikoagulan (1:3 w/v) lalu digerus secara perlahan hingga tubuh larva hancur (tidak perlu terlalu halus). Cairan tubuh (campuran hemolim-antikoagulan) dipipet dan dimasukkan ke dalam effendorf lalu dihomogenkan dengan cara menggoyangkan tangan membentuk angka delapan. Campuran hemolim-antikoagulan tersebut kemudian diteteskan pada *haemocytometer*. Selanjutnya THC langsung dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Berikut rumus perhitungan THC:

$$\text{Total Hemosit} = \Sigma \text{ sel terhitung} \times [1 / \text{volume kotak besar}] \times \text{FP}$$

Keterangan:

FP = Faktor pengenceran

2. Aktivitas *Phenoloxydase* (PO) (Liu dan Chen 2004)

Aktivitas PO *haemocyte* diukur berdasarkan formasi dopachrome yang dihasilkan oleh L-DOPA (*L-dihydroxyphenylalanine*).

- Sebanyak 1 mL campuran hemolim-antikoagulan disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 10 menit pada temperatur 4 °C.
- Supernatan dibuang dan pelet disuspensi kembali secara perlahan dengan menambahkan 1 mL larutan *cacodylate-citrate buffer* (0.01 M sodium *cacodylate*, 0.45 M sodium *chloride*, 0.10 M trisodium *citrate*, pH 7)
- Sentrifugasi kembali (3.500 rpm selama 10 menit pada temperatur 4 °C).
- Supernatan yang terbentuk dibuang dan ditambahkan 200 µL *cacodylate buffer*.
- Suspensi sel sebanyak 100 µL kemudian diinkubasi dengan 50 µL trypsin (1 mg/mL *cacodylate buffer*) sebagai aktivator selama 10 menit pada temperatur 25-26 °C.
- Selanjutnya ditambahkan 50 µL L-DOPA (3 mg/mL *cacodylate buffer*) didiamkan selama 5 menit lalu ditambahkan 800 µL *cacodylate buffer*.
- Sebanyak 200 µL suspensi sel dimasukkan ke dalam *microplate* untuk diukur densitas optikal (OD) dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm.
- Larutan standar digunakan untuk mengukur background aktivitas PO pada semua larutan uji mengandung : 100 µL *cacodylate buffer*, 50 µL trypsin, dan 50 µL L-DOPA. Densitas optikal (OD) dari aktivitas PO dinyatakan sebagai formasi dopachrome dalam 50 µL hemolim.

- **Pembuatan *Cacodylate-citrate buffer***

100 mL

Sodium Cacodylate	0.138 g
NaCl	2.61 g
Trisodium citrate	2.58 g

- **Pembuatan *Cacodylate buffer***

100 mL

Sodium Cacodylate	0.138 g
NaCl	2.61 g
CaCl ₂	0.147 g
MgCl ₂ (hexahidrat)	5.286 g

3. *Respiratory Burst* (RB) (Song dan Hsieh 1994)

Respiratory burst dari hemosit diukur berdasarkan reduksi NBT (*nitroblue tetrazolium*) sebagai ukuran *superoxide anion* (O_2^-).

- Sebanyak 250 μ L campuran hemolim-antikoagulan diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang.
- Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit dan supernatan dibuang.
- Ditambahkan 100 μ L NBT dalam larutan HBSS (*hank's buffered salt solution*) dengan konsentrasi 0.3 % dan didiamkan selama 2 jam pada suhu ruang.
- Kemudian disentrifugasi 3.500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan 100 μ L metanol absolut untuk selanjutnya disentrifugasi 3.500 rpm selama 10 menit (supernatan dibuang).
- Pelet yang terbentuk kemudian dibilas sebanyak 2 kali dengan metanol 70 %.
- Ditambahkan 120 μ L KOH (2M) dan 140 μ L DMSO (*dimethylsulfoxide*) untuk melarutkan pelet.
- Pelet yang larut kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* untuk diukur densitas optikal (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm.

Lampiran 7. Analisis Ekspresi Gen Imunitas Udang Vaname

A. Ekstraksi RNA

1. Sebanyak 0.1 g larva udang vaname dimasukkan ke dalam tabung mikro (1.5 mL), kemudian dilarutkan dalam 200 μ L *isogen* dalam wadah yang berisi es lalu digerus.
2. Sampel yang sudah digerus ditambahkan kembali *isogen* sampai mencapai 800 μ L, lalu diinkubasi dalam suhu ruang selama 5 menit agar sampel dapat terlisis sempurna.
3. Sampel ditambahkan dengan 200 μ L kloroform kemudian dihomogenasi dengan vortex dan dibiarkan kembali dalam suhu ruangan selama 2-3 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit dan supernatant yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro baru yang telah berisi 400 μ L iso-propanol.
4. Sampel dihomogenkan dengan membolak-balikkan tabung mikro secara perlahan kemudian disimpan dalam suhu ruangan selama 5-10 menit.

5. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% dingin dan disentrifugasi lagi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan selanjutnya tabung mikro dikering-udarkan
6. Pelet RNA dilarutkan dengan DEPC 0,1% sebanyak 50 µL dan dilanjutkan dengan sintesis cDNA. Kemurnian dan kandungan RNA total diukur dengan menggunakan alat UV-VIS spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian dihitung berdasarkan perbandingan nilai absorpsi pada panjang gelombang 260 nm dengan 280 nm, sedangkan konsentrasi DNA dapat dihitung berdasarkan nilai absorpsi pada panjang gelombang 260 nm (Linacero *et al.* 1998).

B. Sintesis cDNA dengan RT-PCR

Sintesis DNA komplementer (*complementary DNA*, cDNA) dilakukan dengan menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads* dengan teknik *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) :

1. Konsentrasi RNA 3 µg dalam 30 µL DEPC 0.1% dihomogenkan dengan vortex dalam tabung mikro, lalu dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 65 °C selama 10 menit.
2. Selanjutnya tabung mikro dimasukkan ke dalam es selama 2 menit, kemudian RNA dimasukkan ke dalam tabung *first strand reaction mix beads* yang telah berisi 2 butir bola putih. Primer oligo (dT3) (5'-gta ata cga ata act ata ggg cac gcg tgg tcg acg gcc cgg gct ggt ttt ttt ttt ttt t'3) dengan konsentrasi 1 µg/3 µL ditambahkan sebanyak 3 µL ke dalam reaksi (per sampel), kemudian dibiarkan selama 1 menit Tabung mikro diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Hasil sintesis (cDNA) diencerkan dengan menambahkan air steril sebanyak 50 µL.

C. Isolasi Gen Imunitas Udang Vaname

Isolasi gen imunitas udang vaname (*peroxinectin*, *lipopolysaccharide and β-1,3-glucan-binding protein*, dan *serine protein*) dilakukan dengan menggunakan cDNA sebagai templat DNA. Primer yang digunakan untuk masing-masing gen mengacu pada Zokaefar *et al.* (2012) yaitu seperti Tabel berikut :

Specific primers used to evaluate immune status of shrimp, *Litopenaeus vannamei*.

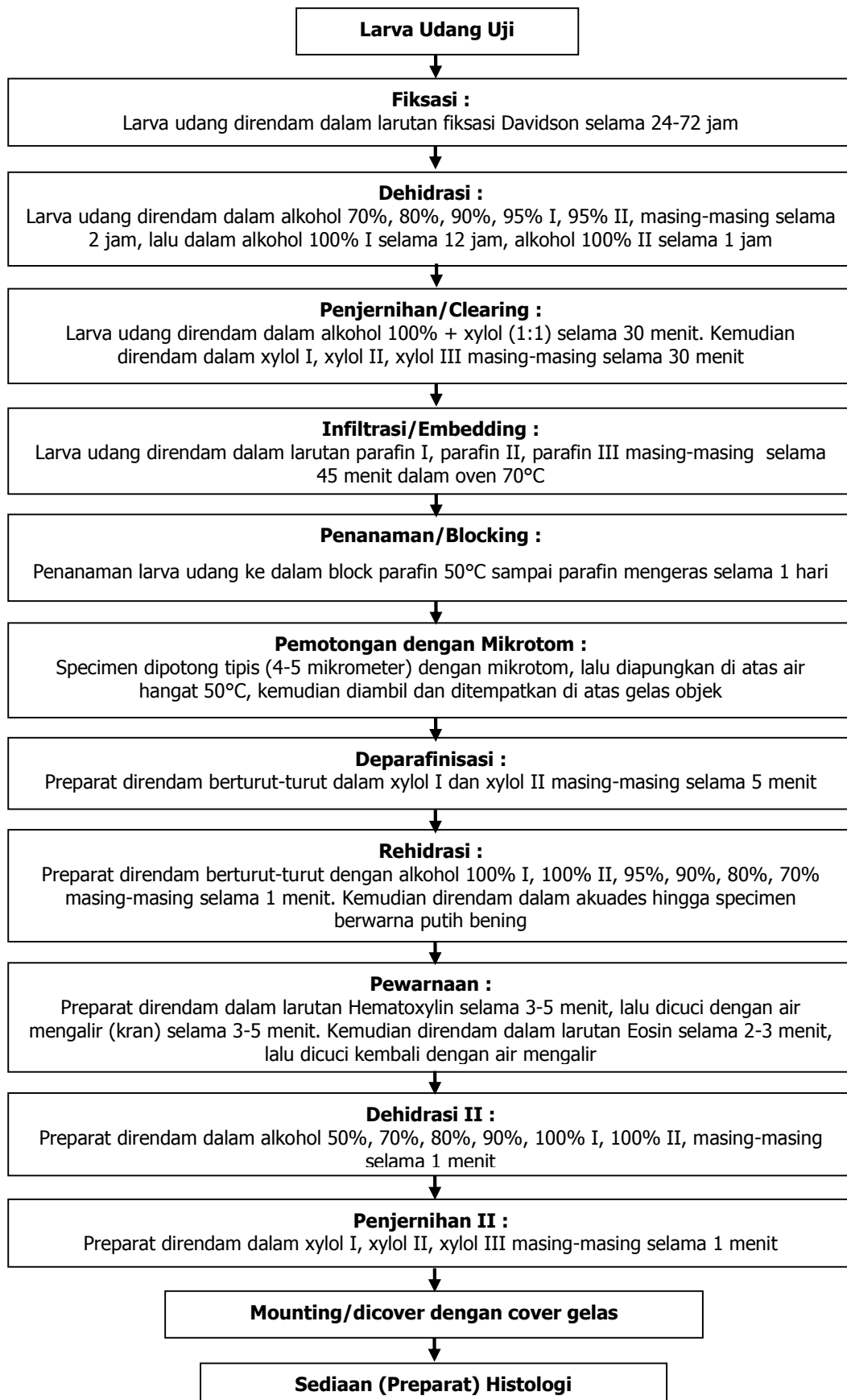
Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	References
Peroxinectin	PE-F	TGGACCTCGCGGAGAT	56	[45]
	PE-R	GACCGATAGCCACCATGCTT		
Lipopolysaccharide and β-1,3-glucan-binding protein	LGBP-F	CATGTCCAACCTTCGCTTCAGA	64	[43]
	LGBP-R	ATCACCCGCTGGCATCTT		
Serine protein	SP-F	CGTCGTTAGGTTAAGTCCGTTCT	61	[46]
	SP-R	TTTCAGCCATTAAGACGTGTT		
Housekeeping	β-actin-F	GAGCAACACGGACTTCGTTGT	68	GenBank accession no: AF300705
	β-actin-R	CATCACCAACTGGGACGACATGGA		

Ekspresi gen β -actin udang vaname digunakan sebagai kontrol. Satu (1) mg cDNA digunakan sebagai templat untuk PCR menggunakan kit *PureTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare). Kit tersebut mengandung 2.5 unit *Taq Polymerase*, 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, dan 200 μ M setiap dNTP-mix.

Amplifikasi gen-gen imunitas vaname dilakukan dengan mesin PCR GenAmp 7200 (Applied Biosystem). Proses PCR dijalankan pada pre-denaturasi 94°C selama 2 menit; 35 siklus untuk denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 45 detik; dan final ekstensi 72°C selama 7 menit.

Untuk melihat hasil amplifikasi fragmen DNA target, sebanyak 1.5 μ L hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose 1% pada tegangan 50 Volt selama 1-2 jam dan didokumentasi dengan *Gel Documentation System*. Untuk menentukan berat molekul fragmen DNA digunakan marker *VC 100 bp Plus DNA Ladder*.

Lampiran 8. Prosedur Pembuatan Preparat Histologi



RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bau-Bau pada tanggal 20 Juni 1969 sebagai anak keempat dari tujuh bersaudara dari pasangan Hadali dan Wa Ode Muzunia. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar, lulus pada tahun 1994. Pendidikan Magister ditempuh di Program Studi Ilmu Perairan, Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (PPs-IPB) lulus pada tahun 2004. Kesempatan untuk melanjutkan ke Program Doktor pada Program Studi Ilmu Akuakultur Sekolah Pascasarjana IPB diperoleh pada tahun 2013 melalui program beasiswa BPPDN-Dikti dari Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia.

Penulis bekerja sebagai staf pengajar di Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan Universitas Haluoleo Kendari sejak bulan Maret 1999 sampai Juni 2012. Pada bulan Juli 2012, penulis dimutasi ke Kopertis Wilayah 9 Sulawesi sebagai Dosen PNS DPK Kopertis Wilayah 9 dan ditugaskan pada Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Makassar hingga sekarang

Hasil penelitian disertasi penulis sebagian telah dipresentasikan pada International Conference on Aquaculture Biotechnology di IPB International Convention Center, Bogor, 12 Oktober 2016 dengan judul “ *Growth performance of Pacific white shrimp administered probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and prebiotic mannanoligosaccharide through *Artemia* sp. bioencapsulation.* Karya tulis berjudul “*The nutritional value of *Artemia* sp. enriched with the probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and the prebiotic mannan-oligosaccharide*” telah diterbitkan pada jurnal *AAFL Bioflux* 10 (1):8-17 tahun 2017. Karya tulis lainnya berjudul “*Bacterial Population, Activity of Enzymes and Growth Rate of Pacific White Shrimp Larvae Administered *Pseudoalteromonas piscicida* and Mannan-oligosaccharides through Bioencapsulation of *Artemia* sp.* telah diterbitkan oleh *Research Journal of Microbiology* 12 (2):128-136 tahun 2017.

Karya-karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari program S3 penulis.