

## **Prebiotik, probiotik, dan sinbiotik untuk mengendalikan koinfeksi *Vibrio harveyi* dan IMNV pada udang vaname**

### **Prebiotic, probiotic, and synbiotic to control *Vibrio harveyi* and IMNV co-infection in *Litopenaeus vannamei***

**Widanarni\*, Jeanni Indah Noermala, Sukenda**

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

\*Surel: widanarni@yahoo.com

#### **ABSTRACT**

This study aimed to examine the effects of prebiotic, probiotic, and synbiotic in survival and immune response of white shrimp against co-infection of *Vibrio harveyi* and infectious myonecrosis virus (IMNV). The shrimps used had a body weight of  $2.04 \pm 0.20$  g/individual, the shrimps were reared at a density of 20 shrimps in  $60 \times 30 \times 35$  cm<sup>3</sup> sized aquarium. The study was conducted with five treatments consisting K(+) (without the addition of prebiotic, probiotic, and synbiotic with co-infection), K(-) (without the addition of prebiotic, probiotic and synbiotic, and without co-infection), P1 (the addition of prebiotic with co-infection), P2 (the addition of probiotic with co-infection), and P3 (the addition of synbiotic with co-infection). The results showed that the addition of prebiotic, probiotic and synbiotic could increase survival and immune response of white shrimp towards co-infection of *Vibrio harveyi* and IMNV. The best survival was obtained in probiotic treatment (79.17%), followed by prebiotic treatment (75%), synbiotic treatment (70.83%), while the positive control was only 50%.

Keywords: white shrimp, prebiotic, probiotic, synbiotic, IMNV, *Vibrio harveyi*

#### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik terhadap sintasan dan respons imun udang vaname dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan IMNV (*infectious myonecrosis virus*). Udang yang digunakan memiliki bobot  $2,04 \pm 0,20$  g/ekor, dipelihara sebanyak 20 ekor dalam akuarium berukuran  $60 \times 30 \times 35$  cm<sup>3</sup>. Penelitian dilakukan dengan lima perlakuan yaitu K(+) (tanpa pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik dengan ko-infeksi), K(-) (tanpa pemberian prebiotik, probiotik dan sinbiotik tanpa ko-infeksi), P1 (pemberian prebiotik dengan ko-infeksi), P2 (pemberian probiotik dengan ko-infeksi), dan P3 (pemberian sinbiotik dengan ko-infeksi). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik mampu meningkatkan sintasan dan respons imun udang vaname terhadap ko-infeksi *V. harveyi* dan IMNV. Sintasan terbaik diperoleh pada perlakuan probiotik sebesar 79,17%, diikuti perlakuan prebiotik sebesar 75%, perlakuan sinbiotik sebesar 70,83%, sedangkan pada kontrol positif hanya mencapai 50%.

Kata kunci: udang vaname, prebiotik, probiotik, sinbiotik, IMNV, *Vibrio harveyi*

#### **PENDAHULUAN**

Penyakit yang sering menjadi masalah utama dalam budidaya udang vaname salah satunya disebabkan oleh infeksi IMNV (*infectious myonecrosis virus*; Costa *et al.*, 2009). Gejala klinis yang umum terjadi pada udang yang terserang IMNV adalah munculnya warna putih pada distal abdomen dan hilangnya transparansi pada permukaan tubuhnya. Mortalitas udang yang disebabkan oleh IMNV mencapai 40–60% di tambak (Tang *et al.*, 2005).

Selain IMNV, penyakit yang sering menyerang udang vaname adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi*. Bakteri *V. harveyi* adalah salah satu agen penyakit vibriosis yang menyebabkan penyakit udang berpendar serta merupakan patogen oportunistik yang umum dijumpai di lingkungan pemeliharaan udang atau ikan laut. Jika kondisi kesehatan udang menurun, maka bakteri ini akan bersifat patogen (Li *et al.*, 2008). Tingkat kematian udang vaname yang diinfeksi *V. harveyi* dengan dosis  $10^6$  cfu/mL mencapai 31,67% (Widanarni *et al.*, 2012).

Banyak kasus patogen tidak hanya menyerang udang sebagai infeksi tunggal. Kejadian ko-infeksi pada udang vaname yang sudah dilaporkan antara lain ko-infeksi beberapa virus seperti WSSV (*white spot syndrome virus*)-TSV (*taura syndrome virus*) (Tan *et al.*, 2009), WSSV-IHHNV (*infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*) (Chen *et al.*, 2012), TSV-IHHNV, TSV-IHHNV-WSSV (Tan *et al.*, 2009), dan ko-infeksi virus dengan bakteri seperti WSSV-*Vibrio campbelli*, WSSV-*V. harveyi* (Phuoc *et al.*, 2009), serta IMNV-*V. harveyi* (Vieria-Girao, *et al.*, 2012). Kejadian ko-infeksi dapat mempercepat dan meningkatkan mortalitas serta menyulitkan dalam pengendalian.

Salah satu alternatif pengendalian untuk mengatasi serangan penyakit tersebut adalah penggunaan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik. Bakteri probiotik memberikan pengaruh baik 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). Pada penelitian ini digunakan bakteri probiotik *Vibrio alginolyticus* SKT-b yang telah diuji efektif menghambat serangan bakteri *V. harveyi* dan meningkatkan sintasan hingga 30% (Widanarni *et al.*, 2003).

Prebiotik merupakan bahan pangan dengan kandungan oligosakarida yang tidak dapat dicerna oleh inang tetapi memberikan efek menguntungkan bagi inang dengan cara merangsang pertumbuhan mikroflora saluran pencernaan. Prebiotik yang digunakan adalah hasil ekstraksi dari ubi jalar varietas sukuk yang telah diuji dapat mendukung pertumbuhan dan aktivitas bakteri probiotik *Bacillus* NP5 pada ikan nila (Putra, 2010). Sinbiotik merupakan kombinasi seimbang probiotik dan prebiotik dalam mendukung sintasan dan pertumbuhan bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan makhluk hidup (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik terhadap sintasan dan respons imun udang vaname dengan ko-infeksi bakteri *V. harveyi* dan IMNV.

## BAHAN DAN METODE

### Persiapan prebiotik

Ekstraksi prebiotik dilakukan menggunakan etanol 70% mengacu pada metode Park *et al.*

(2010). Tepung kukus ubi jalar disuspensikan pada etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Homogenisasi dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 jam. Pemisahan natan dan supernatan dilakukan pada sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama sepuluh menit. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *evaporator vacum* pada suhu 40 °C. Hasil pemekatan kemudian diencerkan dengan akuades steril hingga mencapai kadar total padatan terlarut (TPT) sebesar 5%.

### Persiapan probiotik

Bakteri probiotik ditumbuhkan pada media *seawater complete* (SWC; 5 g *bactopeptone*, 1 g *yeast extract*, 3 ml *glycerol*, 750 ml air laut, dan 250 mL aquades), kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* (kecepatan 140 rpm, suhu 29 °C) selama 24 jam (kepadatan yang diperoleh yaitu 10<sup>8</sup> cfu/mL). Setelah itu, dilakukan pemisahan antara sel bakteri dengan media menggunakan sentrifugasi 5.000 rpm selama sepuluh menit, dan dicuci sebanyak dua kali dengan larutan fisiologis steril (NaCl 0,85%).

### Persiapan patogen

Patogen yang digunakan pada penelitian ini adalah *V. harveyi* dan IMNV. Isolat *V. harveyi* merupakan koleksi Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor. IMNV diperoleh dari udang vaname positif IMNV dari Balai Pengembangan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur. Ekstraksi IMNV dari tubuh udang dilakukan berdasarkan prosedur Escobedo *et al.* (2006). Ekstrak IMNV yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu -70 °C.

### Pengujian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik pada udang vaname

#### *Persiapan media pemeliharaan dan hewan uji*

Wadah yang digunakan pada penelitian ini adalah 15 akuarium berukuran 60x30x35 cm<sup>3</sup>. Sebelum digunakan, akuarium disterilasi dengan cara dicuci dan didesinfeksi menggunakan kaporit 100 mg/L dan klorin 30 mg/L, kemudian dinetralkan dengan sodium tiosulfat 15 mg/L. Masing-masing akuarium dilengkapi dengan *shelter* sebagai tempat udang berlindung ketika *molting*. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah benur udang vaname yang berasal dari Labuan, Banten. Sebelum perlakuan, benur dipelihara hingga memiliki bobot rata-rata 2 g/ekor.

### Persiapan pakan uji

Pakan yang digunakan selama penelitian adalah pelet komersial dengan kandungan protein 40%. Dosis probiotik yang digunakan sebesar 1% (v/w) dari jumlah pakan yang diberikan (Wang, 2007), sedangkan dosis prebiotik yang digunakan sebesar 2% (v/w) dari jumlah pakan yang diberikan (Mahious *et al.*, 2006). Pembuatan sinbiotik dilakukan dengan mencampurkan probiotik (1% (v/w)) dan prebiotik 2% (v/w) pada pakan yang diberikan dengan menambahkan kuning telur sebanyak 2% (v/w) dari total pakan yang berfungsi sebagai perekat (Wang, 2007). Sebelum diberikan ke udang, pakan dikeringudarkan terlebih dahulu selama 10–15 menit untuk mengurangi kelembaban.

### Pengujian pakan uji pada udang vaname

Pengujian ini terdiri atas lima perlakuan dengan tiga kali ulangan. Rancangan perlakuan penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Pemberian pakan dilakukan empat kali dalam sehari pada pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB. Jumlah pakan yang diberikan didasarkan pada *feeding rate* (FR) menurut SNI 01-7246-2006 yaitu 15% menurun hingga 10%. Pengelolaan kualitas air dilakukan dengan penyiponan dan pergantian air setiap pagi hari sebanyak 10% dari total volume akuarium. Nilai kualitas air pada semua perlakuan berkisar antara: suhu 28,2–29,0 °C; pH 7,5–8,0; oksigen terlarut (DO) 4,9–7,3 ppm; salinitas 30,2–30,9 ppt; dan *total ammonia nitrogen* (TAN) 0,184–0,783 ppm. Nilai-nilai tersebut masih dalam kisaran optimal sesuai dengan SNI 01-7246-2006.

Pemeliharaan udang dengan perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik dilakukan selama 30 hari, kemudian dilakukan uji tantang dengan ko-infeksi *V. harveyi* dan IMNV.

Pemeliharaan dan pengamatan pascauji tantang dilakukan selama 14 hari.

### Uji tantang

Udang diinfeksi dengan IMNV (kecuali kontrol negatif) melalui injeksi bagian punggung antara segmen tiga dan empat sebanyak 100 µL/udang (Tang *et al.*, 2005). Setelah itu dilakukan infeksi bakteri *V. harveyi* secara imersi. Kepadatan bakteri *V. harveyi* 10<sup>6</sup> cfu/mL dan imersi dilakukan selama 30 menit di dalam wadah terpisah dengan kepadatan 20 ekor/2 L (Widanarni *et al.*, 2012).

### Parameter uji

Parameter yang diamati setelah perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik serta pascauji tantang adalah sintasan, laju pertumbuhan harian (LPH), rasio konversi pakan (RKP), respons imun, total bakteri dan total bakteri SKT-b, dan gejala klinis.

### Sintasan

Sintasan dihitung pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik serta akhir uji tantang, yang dihitung dengan rumus:

$$\text{Sintasan} = \text{Nt/No} \times 100$$

Keterangan:

Nt = jumlah ind. pada akhir perlakuan (hari ke-t)

No = jumlah ind. pada awal perlakuan (hari ke-0)

### Laju pertumbuhan harian

Bobot udang diukur setiap sepuluh hari sekali selama pemeliharaan, dan laju pertumbuhan harian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Handeland *et al.*, 2008):

$$\text{LPH} = [(\text{Wt}/\text{Wo})^t - 1] \times 100$$

Tabel 1. Rancangan perlakuan pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* (IMNV)

Perlakuan	Keterangan
K (+)	Pemberian pakan komersial tanpa penambahan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik dengan ko-infeksi <i>V. harveyi</i> dan IMNV
K (-)	Pemberian pakan komersial tanpa penambahan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik tanpa ko-infeksi <i>V. harveyi</i> dan IMNV
P1	Pemberian pakan komersial dengan penambahan prebiotik dengan ko-infeksi <i>V. harveyi</i> dan IMNV
P2	Pemberian pakan komersial dengan penambahan probiotik dengan ko-infeksi <i>V. harveyi</i> dan IMNV
P3	Pemberian pakan komersial dengan penambahan sinbiotik dengan ko-infeksi <i>V. harveyi</i> dan IMNV

Keterangan:

- LPH = laju pertumbuhan harian (%)  
 Wt = bobot rata-rata pada akhir perlakuan (g)  
 Wo = bobot rata-rata pada awal perlakuan (g)  
 t = periode pemeliharaan (hari<sup>1</sup>)

### Rasio konversi pakan

Rasio konversi pakan (RKP) selama pemeliharaan dihitung menggunakan rumus (Sawhney & Gandotra *et al.*, 2010),

$$FCR = F / (Bt + Bm - Bo)$$

Keterangan:

- FCR = konversi pakan  
 F = jumlah pakan (g)  
 Bt = biomassa udang akhir perlakuan (g)  
 Bm = biomassa udang mati selama perlakuan (g)  
 Bo = biomassa udang awal perlakuan (g)

### Respons imun

Pengamatan respons imun dilakukan pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik, serta akhir ujiantang *V. harveyi* dan IMNV. Parameter respons imun yang diamati meliputi *total haemocyte count* (THC) dan diferensial hemosit (DH).

Penghitungan THC dan DH mengacu pada metode Maftuch *et al.*, (2013). Hemolim diambil sebanyak 0,1 mL dari pangkal kaki renang pertama dengan menggunakan *syringe* 1 mL yang sudah berisi 0,3 mL antikoagulan Na-sitrat 3,8%. Jumlah sel hemosit per mL dihitung menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali.

$$THC \text{ (sel/mL)} = \text{total hemosit} \times 1/0,1 \times 2 \times 10^3$$

Penghitungan DH dilakukan dengan cara hemolim ditetaskan pada gelas objek dan dibuat preparat ulas lalu dikeringudarkan. Preparat difiksasi dengan metanol selama 5–10 menit lalu dikeringudarkan kembali. Preparat direndam dalam larutan giemsa selama 15–20 menit, kemudian dicuci air mengalir dan dibiarkan kering. Ulasan hemolim diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1.000 kali dan diidentifikasi selnya. Jumlah hemosit dihitung hingga 100 sel dan ditentukan presentase tiap jenisnya. Perhitungan DH dilakukan dengan rumus:

$$\text{Jenis sel hemosit (\%)} = \frac{\text{Jumlah tiap jenis sel hemosit}}{\text{Total sel hemosit}} \times 100$$

### Total bakteri dan total SKT-b di usus udang

Usus diambil dan ditimbang bobotnya, lalu dimasukkan ke dalam larutan PBS dengan perbandingan 1:10. Setelah itu usus digerus sampai homogen dengan larutan PBS, lalu diambil sebanyak 0,1 mL dan dilakukan pengenceran serial. Hasil pengenceran tersebut dituang pada media SWC (untuk total bakteri) dan TCBS yang mengandung Rifampisin 50 µg/mL (untuk SKT-b), kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

### Gejala klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan dengan melihat perubahan atau kelainan pada anatomi makro udang. Gejala klinis yang disebabkan oleh infeksi IMNV meliputi terbentuknya otot berwarna putih pada bagian ruas tubuh udang, dan warna kemerahan pada bagian ekor. Infeksi *V. harveyi* ditunjukkan dengan adanya pendaran dari sampel udang yang terinfeksi jika diamati di ruang gelap.

### Analisis data

Seluruh data yang diperoleh, meliputi sintasan, laju pertumbuhan harian (LPH), rasio konversi pakan (RKP), respons imun, total bakteri, dan total *Vibrio* SKT-b di usus dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### Sintasan

Nilai sintasan setelah perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik serta pascauji tantang dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1a, pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik menunjukkan bahwa nilai sintasan tertinggi terdapat pada perlakuan probiotik (88,33%), diikuti perlakuan sinbiotik (85%), perlakuan kontrol (81,67%), dan terendah pada perlakuan prebiotik yaitu 76,67%. Sementara itu, pada pascauji tantang (1b) perlakuan probiotik memiliki nilai sintasan tertinggi yaitu 79,17%, diikuti perlakuan prebiotik dan K(-) yaitu 75%, perlakuan sinbiotik yaitu 70,83%, dan terendah pada perlakuan K(+) yaitu 50%.

#### Laju pertumbuhan harian

Laju pertumbuhan harian udang vaname setelah mendapat perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik dapat dilihat pada Gambar 2. Laju pertumbuhan harian tertinggi terdapat pada

perlakuan prebiotik yaitu 6,93%, diikuti dengan perlakuan probiotik dan sinbiotik masing-masing 6,61% dan 6,56% dan terendah pada perlakuan kontrol (6,26%).

#### Rasio konversi pakan (RKP)

Pengaruh pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik melalui pakan terhadap konversi pakan (RKP) dapat dilihat pada Gambar 3. Nilai RKP terendah terdapat pada perlakuan probiotik yaitu 1,46 diikuti dengan perlakuan sinbiotik sebesar 1,68 dan prebiotik sebesar 1,86. Nilai FCR tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol yaitu 2,30.

#### Total hemosit

Nilai total hemosit dapat dilihat pada Gambar 4. Pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik (Gambar 4a), perlakuan probiotik memiliki nilai total hemosit tertinggi ( $10,74 \times 10^7$  sel/mL), diikuti dengan perlakuan sinbiotik ( $10,03 \times 10^7$  sel/mL) dan prebiotik ( $9,56 \times 10^7$  sel/mL), dan terendah pada kontrol ( $7,27 \times 10^7$  sel/mL). Pada akhir ujiantang (4b), total hemosit

pada perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik juga bernilai lebih tinggi ( $6,02$ – $6,31 \times 10^7$  sel/mL) dibanding kontrol positif ( $4,24 \times 10^7$  sel/mL).

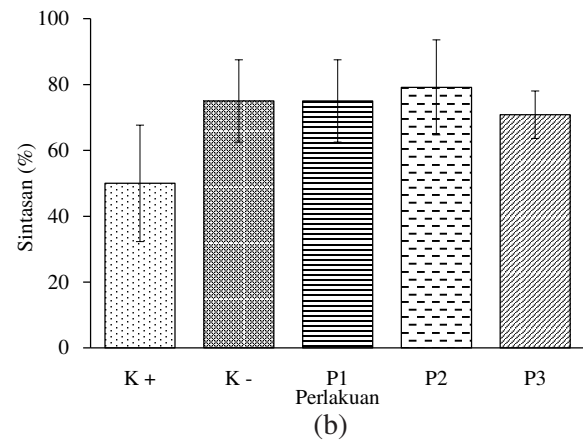
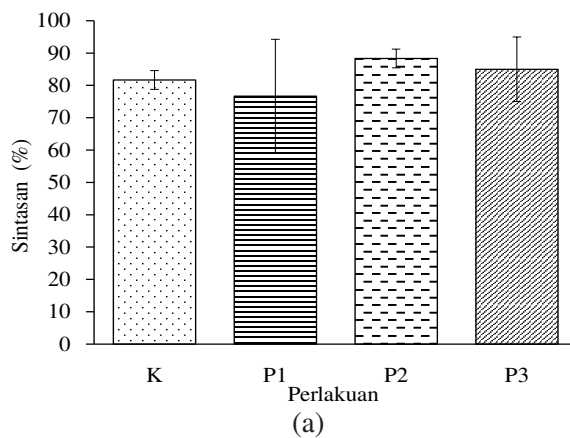
#### Diferensial hemosit (DH)

Pada penelitian ini DH dibedakan atas sel hialin dan granular. Hasil penghitungan jumlah sel hialin dan granular dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.

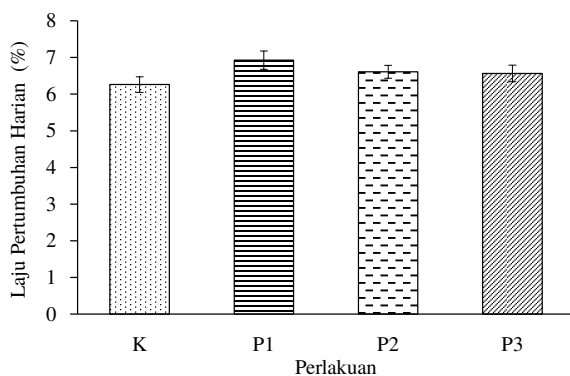
Persentase sel hialin tertinggi terdapat pada hasil perlakuan sinbiotik (40%), diikuti dengan probiotik (38,33%), prebiotik (36%), dan terendah pada kontrol (32%). Sebaliknya, persentase sel granular yang tinggi terdapat pada perlakuan kontrol yaitu 68% dan terendah pada perlakuan sinbiotik (60%). Pada akhir ujiantang, persentase sel hialin yang tinggi terdapat pada perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik, sebaliknya persentase sel granular yang tinggi terdapat pada perlakuan kontrol.

#### Total bakteri dan total SKT-b di usus

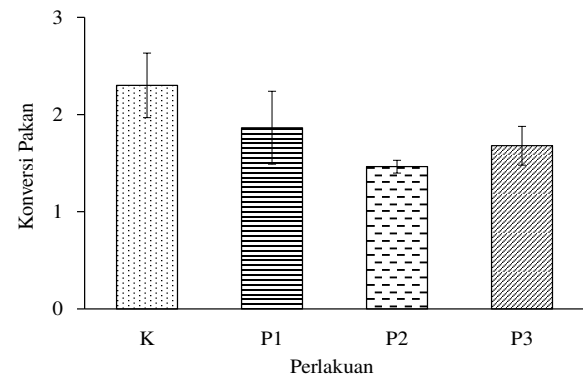
Total bakteri di usus dapat dilihat pada Gambar 7. Berdasarkan Gambar 7a, perlakuan



Gambar 1. Sintasan udang vaname pada (a) akhir perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3), kontrol positif dan negatif (K+; K-), serta (b) pascaujiantang dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* (IMNV).

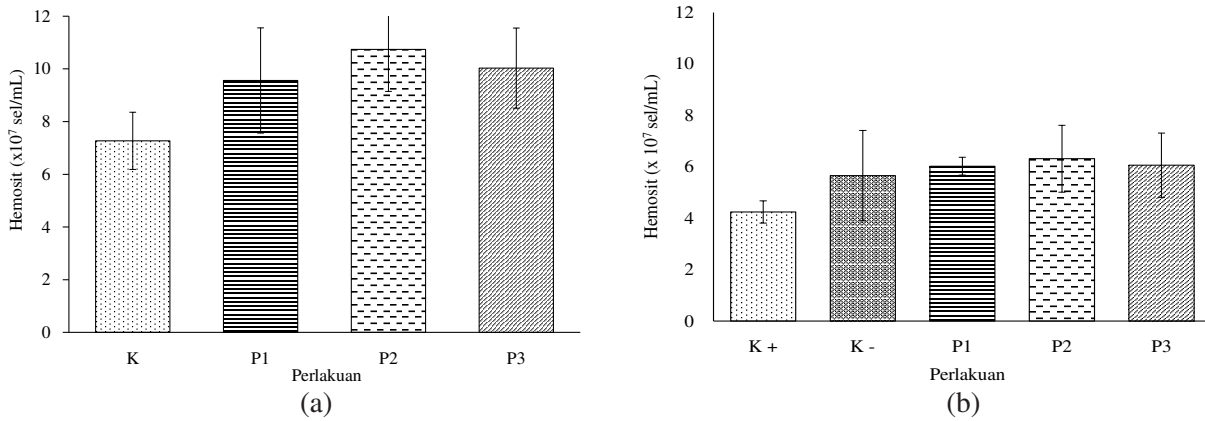


Gambar 2. Laju pertumbuhan harian (LPH) udang vaname selama perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3), dan kontrol (K).

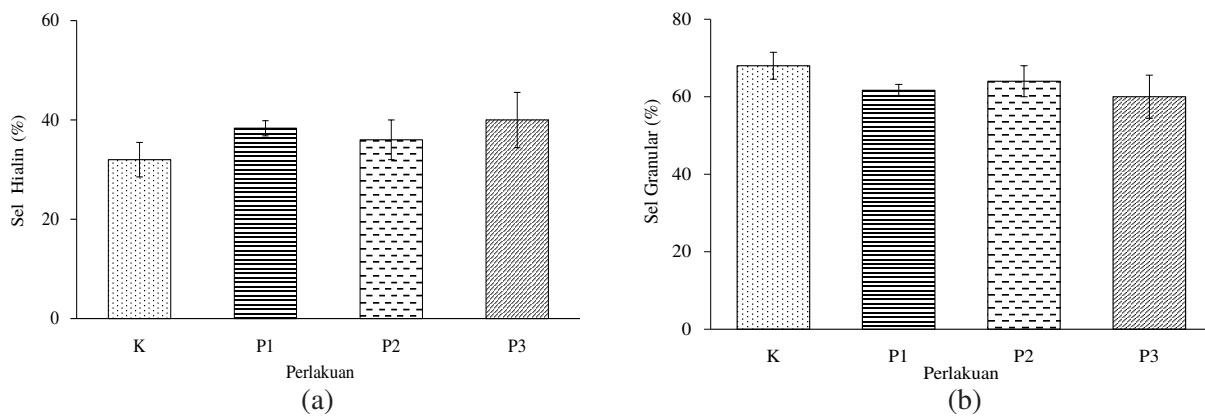


Gambar 3. Rasio konversi pakan (RKP) udang vaname selama perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3), dan kontrol (K).

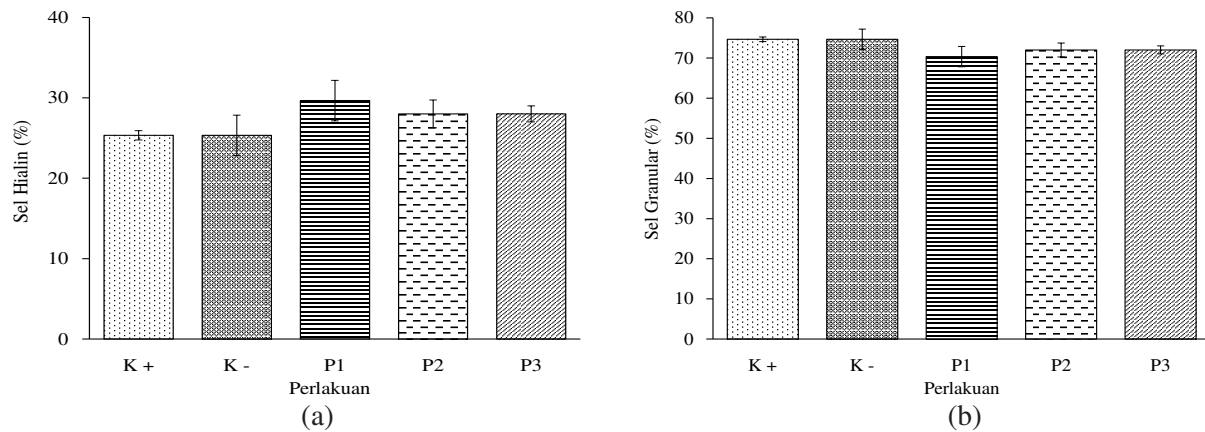




Gambar 4. Total hemosit udang vaname pada: (a) akhir perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3) dan kontrol (K), (b) pascauji tantang dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* (IMNV).



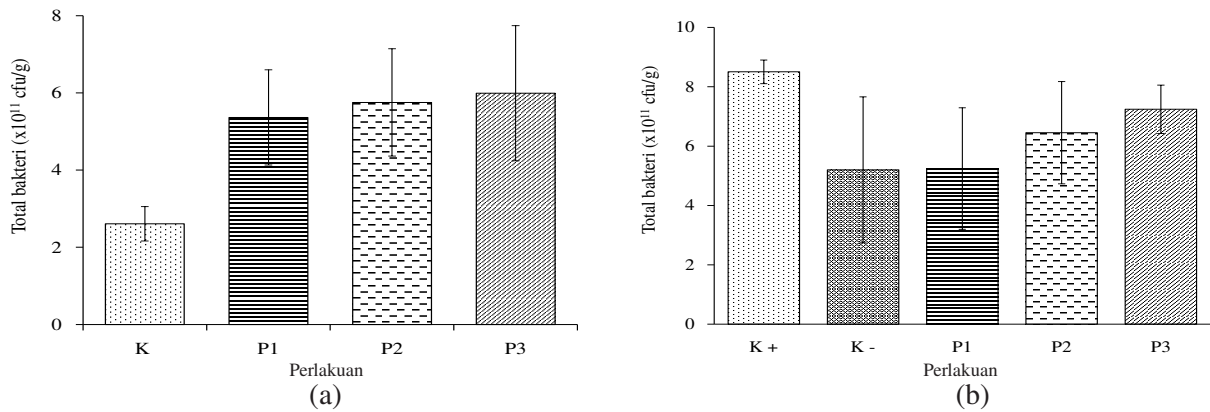
Gambar 5. Persentase (a) sel hialin dan (b) granular udang vaname selama perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3) dan kontrol (K).



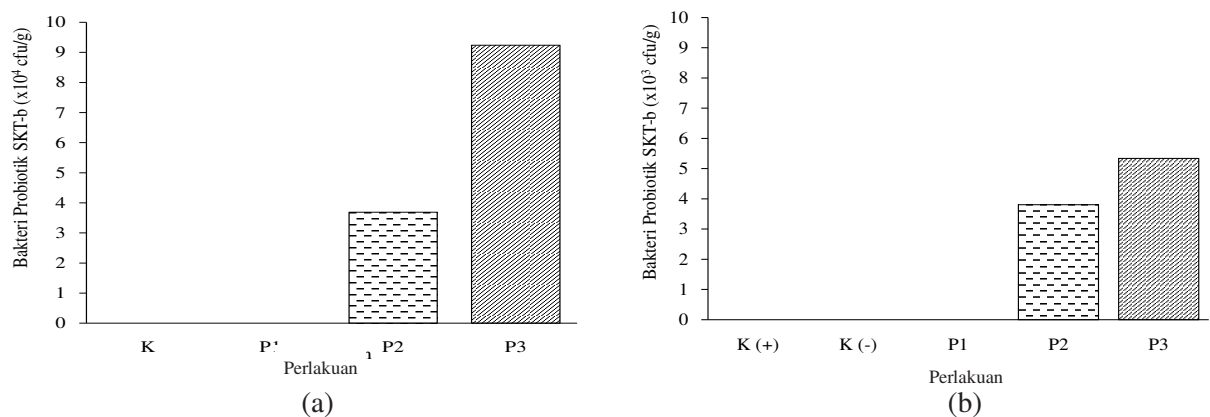
Gambar 6. Persentase (a) sel hialin dan (b) sel granular udang vaname yang diberi perlakuan prebiotik (P1), probiotik (P2), sinbiotik (P3) dan kontrol (K) pada pascauji tantang dengan ko-infeksi *V. harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* (IMNV).

prebiotik, probiotik, dan sinbiotik memiliki total bakteri yang lebih tinggi ( $5,36-5,99 \times 10^{11}$  cfu/g) dibanding kontrol ( $2,61 \times 10^{11}$  cfu/g). Pada pascauji tantang (7b), total bakteri pada perlakuan probiotik, sinbiotik, dan kontrol positif menunjukkan peningkatan dan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol positif ( $8,50 \times 10^{11}$  cfu/g). Hasil penghitungan total bakteri SKT-b dapat dilihat pada Gambar 8. Berdasarkan Gambar

8a, total bakteri SKT-b pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi ( $9,24 \times 10^4$  cfu/g) dibandingkan pada perlakuan probiotik ( $3,69 \times 10^4$  cfu/g), sedangkan pada perlakuan kontrol dan prebiotik tidak terdapat bakteri SKT-b. Total bakteri SKT-b mengalami penurunan pada akhir uji tantang, dengan nilai yang lebih tinggi tetap terdapat pada perlakuan sinbiotik yaitu  $5,34 \times 10^3$  cfu/g dibandingkan pada perlakuan probiotik yaitu  $3,81 \times 10^3$  cfu/g.



Gambar 7. Total bakteri di usus udang vaname pada: (a) akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik, dan (b) pascauji tantangan dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan IMNV.



Gambar 8. Total bakteri SKT-b di usus udang vaname pada: (a) akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik, dan (b) akhir uji tantangan dengan ko-infeksi *Vibrio harveyi* dan IMNV.

### Gejala klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan setelah udang vaname diinfeksi *V. harveyi* dan IMNV. Gejala klinis yang timbul antara lain hilangnya transparansi pada permukaan tubuh, usus udang tidak terisi penuh, dan ketika udang mengalami kematian seluruh tubuh udang berwarna putih susu yang diawali dari pangkal ekor dan kemudian berwarna kemerahan. Pada beberapa sampel udang yang mati juga tampak berpendar saat diamati di ruang gelap.

### Pembahasan

Sintasan merupakan peluang hidup suatu individu dalam waktu tertentu. Pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik, nilai sintasan tertinggi terdapat pada perlakuan probiotik, diikuti perlakuan sinbiotik, perlakuan kontrol, dan terendah pada perlakuan prebiotik (Gambar 1a). Pada akhir uji tantangan dengan *V. harveyi* dan IMNV perlakuan probiotik juga memiliki nilai sintasan tertinggi dan terendah pada perlakuan kontrol positif (Gambar 1b). Tingginya nilai sintasan pada perlakuan probiotik dibandingkan dengan perlakuan lainnya diduga

karena probiotik *Vibrio* SKT-b yang ditambahkan mampu menekan populasi *V. harveyi* dan memiliki sistem imun yang lebih baik sehingga mampu bertahan dari serangan IMNV. Hal tersebut didukung oleh hasil penelitian Widanarni et al. (2003), probiotik *Vibrio* SKT-b memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* dalam uji *in vitro* dan *in vivo*. Selanjutnya, Widanarni et al. (2010) menyatakan bahwa probiotik *Vibrio* SKT-b dapat meningkatkan respons imun udang windu.

Perlakuan sinbiotik juga memiliki nilai sintasan yang tinggi pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik. Sinbiotik merupakan kombinasi seimbang dari probiotik dan prebiotik dalam mendukung sintasan dan pertumbuhan bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan makhluk hidup (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Setelah diinfeksi *V. harveyi* dan IMNV, nilai sintasan pada perlakuan sinbiotik relatif lebih rendah dibandingkan perlakuan probiotik dan prebiotik saja. Hal ini diduga pemberian prebiotik 2% yang dikombinasikan dengan probiotik 1% bukan merupakan kombinasi optimal sehingga menyebabkan nilai

sintasan pada perlakuan sinbiotik lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan probiotik dan prebiotik. Hal yang sama juga diperoleh Li *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa pemberian bakteri probiotik *Bacillus* OJ (PB) dengan dosis  $10^{10}$  cfu/g yang dikombinasikan dengan prebiotik 0,2% isomaltooligosakarida (IMO) menghasilkan nilai sintasan dan respons imun yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian PB dengan dosis  $10^8$  cfu/g dan 0,2% IMO. Perlakuan prebiotik memiliki nilai sintasan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini diduga prebiotik yang tidak dapat dicerna oleh udang berperan memberikan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri menguntungkan di dalam usus sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Menurut Manning dan Gibson (2004), prebiotik mampu menstimulasi pertumbuhan atau aktivitas metabolik bakteri menguntungkan di dalam usus dan mampu meningkatkan respons imun.

Laju pertumbuhan harian tertinggi terdapat pada perlakuan prebiotik, diikuti dengan perlakuan probiotik, sinbiotik, dan terendah pada perlakuan kontrol (Gambar 2). Hal ini diduga pemberian prebiotik dapat memodulasi mikrobiota dalam saluran pencernaan. Penelitian Zhou *et al.* (2010) menunjukkan bahwa penambahan prebiotik GOS dan MOS dapat meningkatkan pencernaan pakan dan mampu meningkatkan pertumbuhan ikan *red drum*. Hal tersebut didukung oleh Manning dan Gibson (2004) yang menyatakan bahwa prebiotik mampu secara selektif menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas metabolik bakteri potensial yang menguntungkan. Probiotik *Vibrio* SKT-b diketahui mampu menghasilkan enzim protease dan amilase (Widanarni *et al.*, 2003) yang diduga mampu meningkatkan aktivitas enzim saluran pencernaan sehingga pada perlakuan probiotik dan sinbiotik menghasilkan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Sejalan dengan laju pertumbuhan harian, perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik juga menghasilkan nilai FCR yang lebih baik dibanding perlakuan kontrol (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa prebiotik, probiotik, dan sinbiotik yang diberikan mampu meningkatkan pemanfaatan pakan, sehingga penggunaan pakan lebih efisien dan memberikan respons lebih baik pada nilai FCR. Pada penelitian Widanarni *et al.* (2012), udang vaname yang diberi prebiotik, probiotik, dan sinbiotik menghasilkan nilai RKP yang lebih baik (berturut-turut 1,26; 1,43; dan 1,21) dibandingkan kontrol dengan nilai RKP 2,18.

Hemosit memainkan peran penting pada pertahanan tubuh krustasea yaitu dapat menghilangkan partikel asing yang masuk ke tubuh udang, meliputi tahap pengenalan, fagositosis, melanisasi, sitotoksik dan komunikasi sel (Johansson *et al.*, 2000). Hasil pengamatan nilai hemosit pada akhir perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik diketahui bahwa perlakuan probiotik memiliki nilai total hemosit tertinggi, diikuti dengan perlakuan sinbiotik dan prebiotik, dan terendah pada kontrol (Gambar 4a). Peningkatan nilai hemosit ini menunjukkan bahwa prebiotik, probiotik, dan sinbiotik yang diberikan mampu berperan dalam menstimulasi respons imun udang. Total hemosit dapat mempengaruhi kemampuan inang untuk bereaksi melawan benda asing dan berbagai respons terhadap infeksi (Johansson *et al.*, 2000). Pascauji tanggap terjadi penurunan total hemosit, namun total hemosit pada perlakuan prebiotik, probiotik dan sinbiotik masih lebih tinggi dibanding kontrol positif (Gambar 4b). Infeksi IMNV dapat menyebabkan penurunan total hemosit hingga 30% (Costa *et al.*, 2009).

Hemosit memiliki tiga tipe sel yaitu hialin, semigranulosit, dan granulosit. Sel hialin merupakan sel dengan perbandingan inti sel lebih tinggi dari sitoplasma dan memiliki sedikit granulosit yang memiliki fungsi dalam fagositosis. Semigranulosit merupakan sel dengan jumlah inti sel yang lebih rendah dibandingkan sitoplasmanya dan berperan dalam enkapsulasi, sitotoksik dan melepaskan sistem proPO (Yeh *et al.*, 2009). Sel granulosit merupakan sel dengan perbandingan inti sel lebih rendah dari sitoplasma. Sel ini berfungsi dalam menyimpan dan melepaskan sistem proPO maupun sebagai sitotoksik bersama-sama dengan sel semigranulosit (Johansson *et al.*, 2000). Hasil pengamatan DH menunjukkan persentase sel hialin tertinggi terdapat pada perlakuan sinbiotik, diikuti dengan perlakuan probiotik, perlakuan prebiotik, dan terendah pada kontrol. Sebaliknya persentase sel granular yang tinggi terdapat pada perlakuan kontrol dan terendah pada perlakuan sinbiotik (Gambar 5). Pada pascauji tanggap, persentase sel hialin mengalami penurunan dan sel granular mengalami peningkatan pada semua perlakuan (Gambar 6). Sel hialin merupakan pertahanan nonspesifik yang secara umum mampu melindungi adanya serangan penyakit dengan cara memfagositosis atau menelan sel patogen (Johansson *et al.*, 2000). Peningkatan sel hialin sebelum uji tanggap menyebabkan kemampuan fagositosis juga meningkat, sehingga pada saat



udang diuji tantang dapat bertahan dari patogen karena fungsi dari sel hialin untuk fagositosis meningkat. Penurunan sel hialin pascauji tantang merupakan implikasi dari peningkatan sel-sel granulosit sebagai respons sistem imun udang terhadap infeksi

Keberhasilan probiotik, prebiotik, dan sinbiotik dalam meningkatkan populasi bakteri di dalam saluran pencernaan udang vaname ditunjukkan dengan jumlah total bakteri di usus. Total bakteri pada perlakuan prebiotik, probiotik, dan sinbiotik lebih tinggi dibanding kontrol (Gambar 7). Tingginya total bakteri pada perlakuan prebiotik, diduga karena prebiotik yang diberikan mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri di dalam usus, sedangkan meningkatnya total bakteri pada perlakuan probiotik dan sinbiotik diduga karena *Vibrio* SKT-b yang diberikan. Pada akhir uji tantang, total bakteri pada perlakuan kontrol positif menunjukkan nilai tertinggi, diduga akibat *V. harveyi* yang diinfeksi tidak mampu ditekan oleh udang sehingga pada perlakuan ini juga dihasilkan sintasan terendah.

Perlakuan sinbiotik memiliki jumlah bakteri *Vibrio* SKT-b yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan probiotik baik pada akhir perlakuan maupun pascauji tantang, sedangkan pada perlakuan kontrol dan prebiotik tidak ditemukan (Gambar 8). Pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik hanya dilakukan selama perlakuan 30 hari, dan tidak diberikan lagi pasca uji tantang. Keberadaan bakteri *Vibrio* SKT-b hingga akhir uji tantang membuktikan bahwa bakteri tersebut mampu hidup dan berkolonisasi pada usus udang vaname.

Ko-infeksi *V. harveyi* dan IMNV menunjukkan gejala klinis seperti timbulnya nekrosis dan hilangnya transparansi pada permukaan tubuh, usus udang tidak terisi penuh, dan ketika udang mengalami kematian seluruh tubuh udang berwarna putih susu yang diawali dari pangkal ekor dan akhirnya udang bewarna kemerahan. Hasil penelitian Poulos *et al.* (2006) menunjukkan udang vaname yang diinfeksi *V. harveyi* dan IMNV, memiliki gejala klinis nekrosis yang muncul pertama kali pada hari ke-3 setelah infeksi. Pada beberapa sampel udang yang terinfeksi juga tampak berpendar saat diamati diruang gelap yang menunjukkan adanya infeksi *V. harveyi*.

## KESIMPULAN

Pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik mampu meningkatkan sintasan dan respons imun

udang vaname terhadap ko-infeksi *V. harveyi* dan IMNV. Sintasan terbaik diperoleh pada perlakuan probiotik yaitu 79,17%, diikuti prebiotik sebesar 75%, sinbiotik sebesar 70,83%, sedangkan pada kontrol positif hanya mencapai 50%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chen YB, Zhou JF, Wan XH, Gao S. 2012. Establishment of a multiplex PCR and an investigation of co-infection rate of WSSV and IHNV in *Penaeus vannamei* in Northern of Jiangsu. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11: 181–185.
- Costa AM, Buglione CC, Bezerra FL, Martins PCC, Barracco MA. 2009. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture* 291: 141–146.
- Escobedo CM, Bonilla, Audoorn L, Wille M, Alday V, Sanz, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 181–188.
- Handeland SO, Imsland AK, Stefansson SO. 2008. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* 283: 36–42.
- Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Soderhall K. 2000. Crustacean haemocytes and haemotopoiesis. *Aquaculture* 191: 45–52.
- Li CC, Yeh ST, Chen JC. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish and Shellfish Immunology* 25: 853–860.
- Li J, Beijing T, Kangsen M. 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: 35–40.
- Maftuch, Prasetyo E, Sudianto A, Rozik M, Nurdiani R, Sanusi E, Nursyam H, Fariedah F, Marsoedi, Murachman. 2013. Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp *Penaeus monodon* Fab. by intramuscular administration of the outer membrane protein *Vibrio alginolyticus*. *Springer Plus* 2: 432–440.
- Mahious, Getesoupe, Hervi M, Metailler R,

- Ollevier. 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture Internasional* 14 (3): 219–229.
- Manning TS, Gibson GR. 2004. Prebiotics. *Journal Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 18: 287–298.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 2–14.
- Park KH, Kim JR, Lee JS, Lee H, Cho KH. 2010. Ethanol and water extract of purple sweet potato exhibits anti-atherosclerotic activity and inhibits protein glycation. *Journal of Medicinal Food* 13: 91–98
- 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.
- Poulos BT, Tang KF, Pantoja CR, Bonami JR, Lightner DV. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87: 987–996.
- Putra AN. 2010. Aplikasi pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik untuk meningkatkan pencernaan pakan ikan nila *Oreochromis niloticus*. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sawhney S, Gandotra R. 2010. Growth response and feed conversion efficiency of *Tor putitora* Ham. fry at varying dietary protein levels. *Pakistan Journal of Nutrition* 9: 86–90.
- Schrezenmeir J, Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotic—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361–364.
- Tang KFJ, Pantoja CR, Poulos BT, Redman RM, Lightner DV. 2005. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with *infectious myonecrosis virus* (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 261–265.
- Tan Y, Xing Y, Zhang H, Feng Y, Zhou Y, Shi ZL. 2009. Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007. *Journal of Fish Diseases* 32: 777–784.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture. *Microbiological and Molecular Biology Review* 64: 655–671.
- Vieira-Girão PRN, Rocha IRCB, Costa FHF, Rádis-Baptista G. 2012. Differential induction of HSP-70 expression in response to IHHNV in white shrimp *Litopenaeus vannamei* naturally co-infected with IHHNV and IMNV. *International Aquatic Research* 4: 17–30.
- Wang BY. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 269: 259–264.
- Widanarni, Lidaenni MA, Wahjuningrum 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: 21–29.
- Widanarni, Suwanto A, Sukenda, Lay BW. 2003. Potency of vibrio isolates for biocontrol of vibriosis in tiger shrimp *Penaeus monodon* larvae. *Biotropia* 20: 11–23.
- Widanarni, Widagdo P, Wahjuningrum D. 2012. Aplikasi probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui pakan pada udang vaname *Litopenaeus vannamei* yang diinfeksi *Vibrio harveyi*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 11: 54–63.
- Yeh SP, Chen YN, Hsieh SL, Cheng W, Liu CH. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology* 26: 582–588.
- Zhou QC, Buentello JA, Gatlin DM. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*: 253–257.