

PENGGUNAAN KITOSAN UNTUK PENGENDALIAN INFEKSI *Vibrio harveyi* PADA UDANG PUTIH *Litopenaeus vannamei*

Use of Chitosan to Control *Vibrio harveyi* Infection on White Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Sukenda, Y. Tri Anggoro, D. Wahyuningrum dan Rahman

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor, Kampus Dramaga, Bogor (16680), Indonesia

ABSTRACT

Immunostimulation and antibacterial effect of chitosan against vibriosis were examined in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Control shrimps were injected with 0.05 µl of sterile sea water, while experimental shrimps were injected with 2, 4 and 6 µg per g shrimp of chitosan. All shrimps were subsequently challenged by 10⁶ CFU/ml of live *Vibrio harveyi* by injection method. Survival rate of shrimps injected with chitosan were found to slightly increase in accordance with dose of chitosan, even not statistically significant. Total haemocyte count and phagocytic index at experimental shrimps were over than control shrimps up to three days post injection. Number of *V. harveyi* in the intestine of experimental shrimps were lower than control shrimps indicates an antibacterial activity of chitosan to combat infection.

Keywords: chitosan, *Vibrio harveyi*, haemocyte, phagocytic index, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRAK

Efek imunostimulasi dan antibakterial dari kitosan melawan vibriosis dilihat pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*). Udang control disuntik dengan 0,05 µl air laut steril, sedangkan udang uji disuntik dengan kitosan 2, 4 dan 6 µg per g udang. Semua udang diuji tantang dengan 10⁶ CFU/ml bakteri *Vibrio harveyi* hidup dengan metode penyuntikan. Sintasan udang yang disuntik dengan kitosan meningkat berbarengan dengan peningkatan dosis kitosan, meskipun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Jumlah total hemosit dan indeks fagositosis pada udang lebih tinggi dibandingkan kontrol sampai tiga hari pasca penyuntikan. Jumlah *V. harveyi* dalam saluran pencernaan dari udang uji lebih rendah dibandingkan udang kontrol, hal ini menunjukkan aktifitas antibakterial dari kitosan dalam melawan infeksi.

Kata kunci: kitosan, *Vibrio harveyi*, hemosit, indeks fagositosis, *Litopenaeus vannamei*

PENDAHULUAN

Udang putih (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas unggulan industri perikanan Indonesia. Udang ini memiliki produktifitas yang tinggi di tambak intensif, sehingga banyak petambak yang membudidayakannya menggantikan udang windu yang terlebih dahulu banyak dibudidayakan. Akan tetapi seiring waktu, budidaya udang inipun mulai menemui banyak masalah, terutama masalah penyakit. Penyakit yang sering menyerang spesies ini antara lain disebabkan oleh virus dan bakteri.

Penyakit udang berpendar atau vibriosis disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* yang

bisa mengakibatkan kematian pada udang hingga mencapai 80 – 100 % dari total populasi. Gejala pendaran penyakit ini terjadi saat populasi bakteri mulai melepaskan zat eksotoksin (Liu *et al.*, 1996). Keberadaan penyakit ini telah menyebabkan kerugian yang besar dalam budidaya udang putih.

Resistensi bakteri penyebab penyakit ini dimungkinkan terjadi pada pemakaian bahan antibiotik yang terus menerus dengan dosis yang tidak tepat. Selain itu, residu antibiotik dalam produk udang diyakini dapat membahayakan konsumen (Noga, 2000). Pemilihan bahan untuk menstimulasi respon imun dan bahan lainnya untuk pengganti antibiotik sudah dilakukan oleh para peneliti.

Salah satu bahan tersebut adalah kitosan yang merupakan limbah industri perikanan.

Kitosan adalah polimer alami yang memiliki berat molekul tinggi, tidak beracun, dapat mempercepat penyembuhan luka, mengurangi kadar kolesterol darah, merangsang respon imun, dapat terurai secara biologi (Sandford, 1989), dan imunostimulan bagi udang putih (Wang dan Chen, 2005). Penelitian ini untuk mengetahui potensi kitosan dalam meningkatkan respon imun udang dan efek antibakterialnya pada bakteri *V. harveyi*.

BAHAN DAN METODE

Udang yang dipakai dalam penelitian ini berasal dari tambak intensif udang putih di Desa Bakauheni, Kecamatan Panengahan, Kabupaten Lampung Selatan. Udang terpilih berbobot rata-rata $11,5 \pm 2$ g. Udang perlakuan diadaptasikan dahulu dalam akuarium ($50 \times 35 \times 40$ cm) selama dua hari dengan kepadatan 10 ekor setiap akuarium. Pakan diberikan lima kali dalam sehari dan kualitas air dijaga agar tetap dalam kisaran optimal untuk kehidupan udang.

Isolat bakteri *V. harveyi* MR 5339Rf^R dibiakkan dalam media *sea water complete* (SWC) (5 g bakto pepton, 20 g bakto agar, 1 g ekstrak khamir, 750 ml air laut, 250 ml akuades dan 3 ml gliserol) yang mengandung rifampisin 50 µg per mililiter selama 16 jam sebelum dipakai dalam penelitian. Isolat merupakan strain resisten terhadap rifampisin dan telah terbukti mampu mengakibatkan vibriosis pada udang peneid (Widanarni, 2003).

Perlakuan dalam penelitian ini adalah penyuntikan udang dengan larutan kitosan dengan konsentrasi 2, 4, dan 6 µg per gram udang, sedangkan kontrol tanpa larutan kitosan. Udang disuntik pada bagian sinus sefalotoraks (Wang dan Chen, 2005), dan setelah 24 jam pemberian kitosan, udang diuji tantang dengan penyuntikan 0,1 ml suspensi yang mengandung 10^6 CFU/ml bakteri *V. harveyi* MR5339Rf^R.

Parameter pengamatan meliputi sintasan udang, respon imun udang, dan kelimpahan bakteri *V. harveyi* MR5339Rf^R dalam usus

udang. Rentang pengamatan untuk sintasan dan respon imun adalah 4 hari setelah uji tantang. Sedangkan pengamatan kelimpahan bakteri di usus udang dilakukan hingga 6 jam setelah uji tantang.

Pengamatan parameter respon imun udang dilakukan dengan cara mengambil hemolim udang dari ventral sinus dengan memakai syringe yang telah dibilas dengan anti-koagulan. Selanjutnya jumlah total hemosit per mililiter dihitung dengan haemositometer di bawah mikroskop perbesaran 400 kali.

Pengukuran indeks fagositosis dilakukan dengan mencampurkan 0,1 ml hemolim udang dan 25 µl bakteri *Staphylococcus* sp. dalam mikroplate kemudian diinkubasi selama 20 menit. Sebanyak 5 µl suspensi dibuat preparat ulas dengan cara difiksasi dengan metanol 100% selama 5 menit, dan selanjutnya diwarnai dengan larutan Giemsa. Preparat diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000 kali (Anderson dan Siwicki, 1993). Aktivitas fagositosis dihitung berdasarkan jumlah sel hemosit yang melakukan kegiatan fagositosis berbanding dengan total sel hemosit yang diamati (Liu *et al.*, 2003).

Penghitungan kelimpahan *V. harveyi* MR5339Rf^R dalam usus udang dilakukan setiap jam selama 6 jam setelah penyuntikan bakteri. Usus udang diambil dan digerus untuk kemudian diencerkan hingga 10^{-3} . Sebanyak 0,1 ml dari hasil pengenceran disebar pada media SWC yang mengandung rifampisin 50 µg per mililiter. Biakan bakteri diinkubasi selama 24 jam dan koloni bakteri dihitung untuk mengetahui kelimpahannya. Seluruh hasil pengamatan yang menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$) antar perlakuan, diuji lanjut dengan menggunakan uji Tukey's.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintasan Udang

Semua udang yang mendapat perlakuan kitosan 0, 2, 4 dan 6 µg per gram udang memperlihatkan tingkat kelangsungan hidup yang relatif rendah, yaitu 10, 10, 13 dan 17% setelah uji tantang dengan *V. harveyi*. Walaupun perbedaan hasil tidak signifikan,

perlakuan kitosan yang berdosisi tinggi memperlihatkan nilai kelangsungan hidup yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan kitosan berdosisi rendah.

Jumlah Total Hemosit dan Indeks Fagositosis

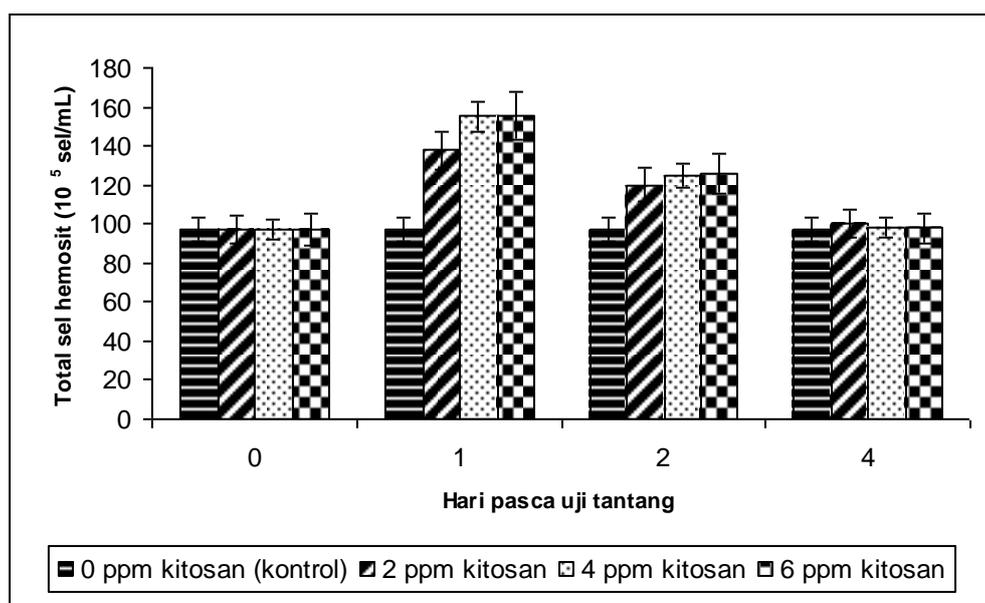
Peningkatan total haemosit terjadi seiring dengan peningkatan dosis kitosan yang diberikan, terutama terlihat pada hari pertama pada perlakuan (Gambar 1). Hemosit pada krustasea merupakan penyusun utama sistem imun yang menjalankan perannya dengan mekanisme fagositosis, enkapsulasi, nodulasi, dan sebagai media sitotoksitas terhadap material asing (Chilsom dan Smith, 1995).

Total hemosit mengindikasikan kemampuan inang dalam merespon material asing dalam tubuhnya. Semakin tinggi total hemosit, maka semakin tinggi pula aktifitas fagositosis yang diberikan inang dalam mengendalikan mikroorganisme asing. Total hemosit pada perlakuan kitosan 2, 4, dan 6 $\mu\text{g/g}$ secara statistik memberikan pengaruh berbeda nyata lebih besar dibandingkan kontrol terutama pada hari pertama dan hari kedua. Hal ini mengindikasikan kitosan dapat meningkatkan produksi sel hemosit.

Sebagai mekanisme respon utama dalam sistem imun udang, fagositosis dan indeksnya menunjukkan seberapa besar reaksi sistem imun udang terhadap mikroorganisme yang menginfeksi tubuhnya. Peningkatan indeks fagositosis tertinggi diperlihatkan oleh perlakuan 4 $\mu\text{g/g}$ pada hari pertama, ke-2, dan ke-4, dan didapatkan peningkatan aktifitas fagositosis berkisar 22 – 31% (Gambar 2).

Sistem pertahanan udang terdiri dari dua bagian, yaitu selular dan humoral. Respon selular meliputi aktifitas fagositosis, nodulasi, dan enkapsulasi. Sedangkan pada respon humoral mencakup phenoloxidase (PO), prophenoloxidase (proPO), lectin, dan aglutinin (Itami, 1994). proPO diaktifkan oleh *prophenoloxidase activating enzyme* (PPA). Sedangkan PPA sendiri diaktifkan oleh lipopolisakarida atau β -glucan (Johansson dan Söderhäll, 1989).

Glukosamin merupakan turunan polimer dinding sel mikroorganisme (Presscot *et al.*, 1996) yang mirip lipopolisakarida atau β -glucan. Diduga kitosan yang komponen utamanya glukosamin telah mengaktifkan PPA yang seterusnya juga mengaktifkan proPO dan PO pada tubuh udang.



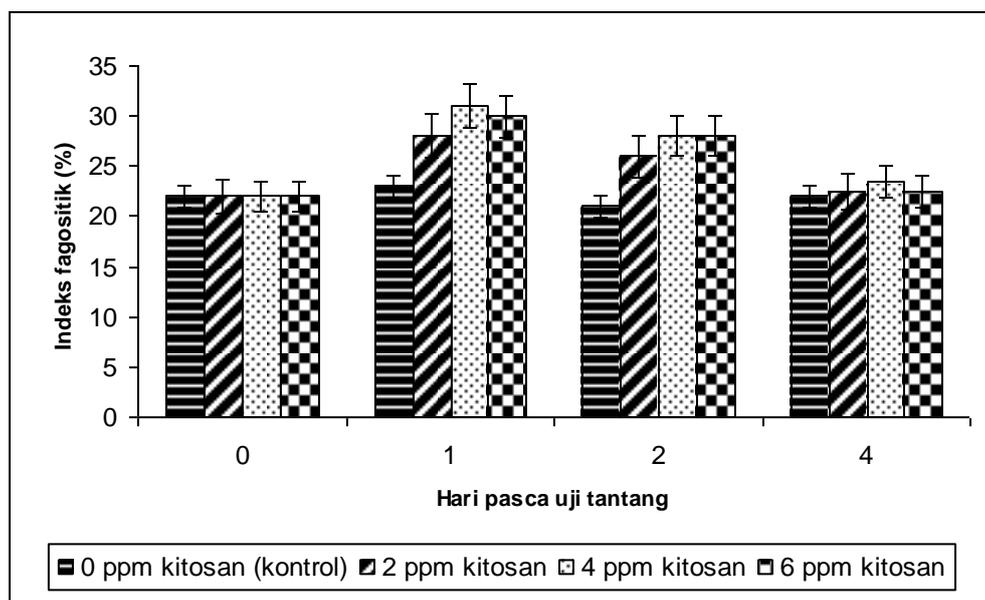
Gambar 1. Total haemosit udang putih 1, 2, dan 4 hari pasca uji tantang dengan *V. harveyi*.

Kelimpahan bakteri *V. harveyi* dalam usus udang

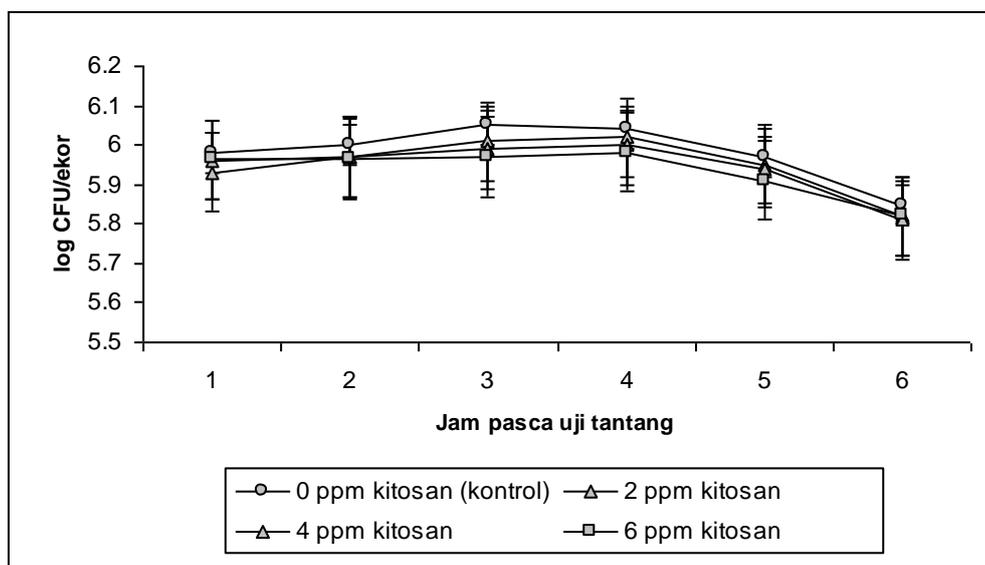
Kolonisasi bakteri *V. harveyi* terjadi khusus pada organ-organ pencernaan dan jarang ditemukan di eksoskeleton (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1992). Kelimpahan bakteri *V. harveyi* meningkat sampai 4 jam pasca ujiantang, kemudian mengalami penurunan pada jam ke 5 dan 6 pasca ujiantang. Penurunan terbesar ditunjukkan pada perlakuan 4 $\mu\text{g/g}$ yang diduga disebabkan

oleh adanya aktifitas kitosan yang menghambat pertumbuhan bakteri (Gambar 3).

Mekanisme penghambatan berupa pengikatan membran protein dan membran fosfolipid bakteri oleh kitosan menyebabkan permeabilitas inner meningkat. Adanya peningkatan permeabilitas ini, maka membran dengan mudah memberi jalan cairan sel untuk keluar (lisis) hingga tidak terjadi pembelahan sel (Simpson, 1997).



Gambar 2. Indeks Fagositosis pada udang putih pasca ujiantang dengan *V. Harveyi*



Gambar 3. Kelimpahan *V. harveyi* MR5339Rf^R dalam usus udang putih

KESIMPULAN

Udang putih yang diberi kitosan mempunyai sintasan relatif lebih tinggi pasca ujiantang dengan *V. harveyi* jika dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kitosan. Total hemosit dan indeks fagositosis juga lebih tinggi pada udang yang diberi kitosan sekurang-kurangnya sampai 3 hari pasca ujiantang. Kelimpahan bakteri *V. harveyi* pada usus udang yang diberi kitosan lebih rendah dari pada kontrol tanpa pemberian kitosan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P and Siwicki, A.K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *The Progressive Fish-Culturist* : 56:256-261.
- Chilsolm, JRS and Smith VJ. 1995. Comparison of bacterial activity in the haemocyte of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*: 110,39-45.
- Itami, T. 1994. Body defence system of penaeid. Seminar on fish physiology and prevention of epizootics. Department of Aquaculture and Biology. Shimonoze University of Fisheries, Japan. 13:567 – 585
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and proPO system. *Parasitology Today* 5, 171-176.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L.J., Paner, M.G., and Sunaz, N.A. 1992. Studies on The Resources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. In : Shariff M, Subasinghe R.P., Arthur JR, editor. *Disease in asia aquaculture I*. Fish Health Section. Asia Fisheries Society. Manila, Philippines. 57-80.
- Liu, B.C., Lee, K.K., and Chen, S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 413-416.
- Noga, E.J. 2000. *Fish Disease : Diagnostic and treatment*. Iowa State University Press: A Blackwell Publishing Company.
- Presscot, L.M., Harley, J.P. 1996. *Microbiology* vol.52. Brown Publisher, London, 505p.
- Sandford, P.A. 1989. Chitosan : Commercial uses and potential application. In chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Simpson, B.K. 1997. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. *Food Technology*, 11: 25-44.
- Wang, S.H. and Chen J.C. 2005. The Protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 191-204.
- Widanarni, 2003. Penapisan bakteri probiotik untuk biokontrol vibriosis padalarva udang windu: konstruksi penanda molekuler dan esei pelekatan. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. 74 hal.