

LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PTUPT)



klec  
kk  
LP 42/19  
Mah  
u

UJI LAPANG PROTEIN MEMBRAN IMUNOGENIK *Zoothamnium penaei* SEBAGAI  
BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN UNTUK MENEKAN KEMATIAN  
UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) DI TAMBAK

TAHUN KE 2 DARI 2 TAHUN

OLEH :

Dr. Ir. GUNANTI MAHASRI, M.Si.	0009126004
Dr.Ir. KISMIYATI, M,Si.	0008085904
Dr. LAKSMI SULMARTIWI	0003027202

DIBIYAI OLEH :

DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA

NOVEMBER 2018

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : UJI LAPANG PROTEIN MEMBRAN IMUNOGENIK  
Zoothamnium penaei SEBAGAI BAHAN  
PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN UNTUK  
MENEKAN KEMATIAN UDANG VANAME  
(Litopenaeus vannamei) DI TAMBAK

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : Dr. Ir GUNANTI MAHASRI, M.Si  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0009126004  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Akuakultur  
Nomor HP : 08123012721  
Alamat surel (e-mail) : gunanti.m@fpk.unair.ac.id

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : Dr. Ir KISMIYATI M.Si  
NIDN : 0008085906  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : Dr LAKSMI SULMARTIWI S.Pi, M.P  
NIDN : 0003027202  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 125,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 245,000,000



(Dr. Ir GUNANTI MAHASRI, M.Si)  
NIP/NIK 196009121986032001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018  
Ketua,

(Dr. Ir GUNANTI MAHASRI, M.Si)  
NIP/NIK 196009121986032001

Menyetujui,  
Ketua LPT Unair

(Prof. H. Hery Purnobasuki, Dr., M.Si., Ph.D.)  
NIP/NIK 196705071991021001

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

## RINGKASAN

UJI LAPANG PROTEIN MEMBRAN IMUNOGENIK *Zoothamnium penaei* SEBAGAI BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN UNTUK MENEKAN KEMATIAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) DI TAMBAK

Gunanti Mahasri, Kismiyati dan Laksmi Sulmartiwi<sup>\*)</sup>

Departemen Manajemen Kesehatan Ikan dan Budidaya Perairan  
Fakultas Perikanan Dan Kelautan, Universitas Airlangga

Tingkat kematian udang vaname di tambak masih belum dapat teratasi dimana salah satu penyebab utama kematian ini adalah karena adanya serangan penyakit. Disamping itu daya tahan tubuh udang terhadap serangan penyakit masih sangat lemah. *Zoothamnium penaei* ektoparasit Protozoa masih menunjukkan nilai yang tinggi dan juga merupakan pemicu infeksi sekunder oleh bakteri, jamur maupun virus, yang dapat menyebabkan kematian hingga 100%. Tujuan dari penelitian ini adalah menguji imunostimulan dari protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di tambak yang dilaksanakan selama 2 (dua) tahun di pertambakan, di Kabupaten Sidoarjo.

Penelitian ini merupakan penelitian Tahun Kedua yaitu Evaluasi Uji Lapang Imunostimulan dari Protein Membran Imunogenik *Zoothamnium penaei* untuk Menekan Tingginya Kematian Udang Vanamei (*Litopenaeus Vannamei*) Di Tambak. Penelitian eksperimental ini diawali dengan produksi imunostimulan yang meliputi : kultivasi, preparasi sampel, isolasi protein membran *Zoothamnium* dengan SDS-PAGE, penentuan konsentrasi protein dan uji imunogenik protein dengan Western Blotting dan dilanjutkan dengan uji lapang protein tersebut di tambak, selama 3 bulan pemeliharaan. Uji lapang dilakukan dengan menggunakan 3 petak pemeliharaan yaitu : Petak K0 : pemeliharaan udang yang tidak dipapar dengan protein sebagai bahan imunostimulan , Petak K1 : pemeliharaan udang yang dipapar dengan PBS dan K3 pemeliharaan udang yang dipapar dengan protein sebagai bahan imunostimulan. Paameter yang diuji meliputi : Total aemocyte Count (THC), Differensial Haemocyte Count (DHC), Infestasi parasit, Infeksi Bakteri *Vibrio* dan Virus IMNV dan EHP. Pemeriksaan dilakukan pada hari ke 0, 30, 60 dan 90 pemeliharaan.

Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa terdapat tujuh protein membran *Zoothamnium penaei* yang ditemukan dengan berat molekul 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa melalui SDS-PAGE. Akan tetapi setelah dilanjutkan uji imunogenitas dengan ELISA dan Western Blotting hanya terdapat 3 band yang muncul yaitu berat molekul 38 kDa, 48 kDa dan 67 kDa. Hasil penentuan konsentrasi protein menunjukkan sebesar 7,86 mikro gram/liter. Hasil pemeriksaan parasit menunjukkan bahwa infestasi tertinggi terjadi pada kelompok udang yang tidak dipapar imunostimulan dari protein membran *Zoothamnium penaei* yaitu sebesar 66% pada umur 60 hari, dan terendah pada udang yang dipapar dengan protein yaitu sebesar 3% pada umur 90 hari. Respon imun udang vaname yang dipapar dengan protein juga mengalami peningkatan dengan THC dan DHC tertinggi yaitu sebesar  $15,63 \times 10^4/\text{ml}$  dan 12,72 pada umur 60 hari. Tingkat kelulushidupan tertinggi juga terjadi pada udang yg dipelihara dan dipapar dengan protein yaitu sebesar 79%.

Bahan imunostimulan tersebut dapat memberikan proteksi pada udang yang ditunjukkan dengan adanya kenaikan kelulushidupan udang vaname di tambak. Imunostimulan dari proein membran *Zoothamnium penaie* dapat diuji di tambak.



## SUMMARY

**FIELD TEST OF IMMUNOSTIMULANT FROM IMMUNOGENICK MEMBRANE  
Zoothamnium penaei FOR PRESURED OF PASIFIC WHITE SHRIMP  
(Litopenaeus vannamei) MORTALITY IN POND**

Gunanti Mahasri dan Kismiyati

Department of Fish Health Management and Aquaculture,  
Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia  
E-mail : [mahasritot@gmail.com](mailto:mahasritot@gmail.com)

White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is one of species of Crustacean import from Amerika and entry in Indonesia since 1998. After observed through any kind technology application and try out in field (pond) for 3 years. So that The government has been already done effort to change with other species that was *Litopenaeus vannamei*, to developed in Indonesia, but there is many factors to influence to develops as specially is diseases that can make 100% of the shrimp mortality in three days after infection. Zoothamniosis is one of the shrimp diseases which can cause death particularly at germ stage. Clinical symptom of infected shrimp is respiration disturbance, mobile, seeking food and moulting difficulties. So far the occumence zoothamniosis is still high in the field.

The purpose of this research as follow to find immunogenic membrane protein as immunostimulant development material for *Penaeus monodon* Fab to Zoothamniosis. The special purpose of this research are as follows: (1) Identification and cultivation of *Zoothamnium penaei*, (2) to analise immunogenic membrane protein of *Zoothamnium penaei*, which can impede pathological changes of skin and gill of *Zoothamnium penaei* from infected *Penaeus monodon* Fab (3) to find immunogenic membrane protein of *Zoothamnium penaei* which can protected and can increase survival rate (SR) of *Penaeus monodon*, (4) to find immunogenic membrane protein of *Zoothamnium penaei* which can increase immune response (Total Haemocyte/THC and Total Differential Haemocyte/DHC) and can be used for immunostimulant development material of *Penaeus monodon* Fab.

This research was designed to use explorative experiment and experimental laboratory methods which used completed random sampling design. Collected data was analyzed with analysis of variant for examination of *Survival Rate* (SR), *Total Haemocyte Count* (THC) and *Differensial Haemocyte Count* (DHC) for treatment of doses and ages. The research divided into 2 steps: (1) Identification, cultivation and determination infection level and *Penaeus monodon* Fab gill and skin histopathological appearance by zoothamniosis, Analysis of membrane protein by SDS-PAGE, (2) Immunogenic membrane protein protection test on Prevalence of ectoparasites, Survival Rate level and immune response (THC and/or DHC level) of shrimp.

The results of the interim study showed that there were seven Zoothamnium Penaei membrane proteins found with molecular weights of 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 98 kDa and 104 kDa through SDS-PAGE. However, after continued immunogenicity tests with ELISA and Western Blotting there were only 3 bands that appeared, namely molecular weight of 38 kDa, 48 kDa and 67 kDa. The results of the determination of protein concentration showed as much as 7.86 micro grams / liter. The results of the parasitic examination showed that the highest infestation occurred in the group of shrimp not exposed to immunostimulants from the Zoothamnium Penaei membrane protein which was 66% at 60 days of age, and the lowest in shrimp exposed to protein at 3% at 90 days. The immune response of vaname shrimp exposed to protein also increased with the highest THC

and DHC which was  $15.63 \times 10^4$  / ml and 12.72 at 60 days. The highest survival rate also occurs in shrimp that are maintained and exposed to protein which is equal to 79%.

The immunostimulant material can provide protection for shrimp as indicated by an increase in the survival of vaname shrimp in ponds. Immunostimulants from membrane projection *Zoothamnium penae* can be tested in ponds.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayahnya sehingga penelitian yang berjudul “Uji Lapang Protein Membran Imunogenik *Zoothamnium penaei* Sebagai Bahan Pengembangan Imunostimulan Untuk Menekan Kematian Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Di Tambak“ dapat diselesaikan.

*Zoothamnium penaei* adalah merupakan salah spesies dari protozoa yang dapat menyebabkan penyakit Zoothamniosis pada udang, dengan kejadian yang masih tinggi di lapangan mencapai 86% di tempat pembenihan. Upaya pencegahan dan penanggulangan penyakit ini masih belum dapat memenuhi target, sehingga penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi tentang imunostimulan pada udang, yang dapat digunakan untuk pencegahan dan penanggulangan penyakit tersebut .

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga,
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Universitas Airlangga,
3. Semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaannya. Akhirnya penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat dalam pengembangan budidaya udang windu dan bagi yang membacanya.

Surabaya, November 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN.....	iii
SUMMARY.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	16
3.1. Tujuan .....	16
3.2. Manfaat .....	17
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	18
BAB 5 HASIL YANG SUDAH DICAPAI.....	32
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN .....	46



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
<b>5.1 Hasil Pemeriksaan Infestasi Parasit pada Udang Vaname pada saat Akhir Uji Tantang .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Hasil Penentuan THC dan DHC Udang Vannamei yang Diimunisasi dengan Protein Membran .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Hasil Analisis Statistik Kelulushidupan Udang Vannamei yang Diimunisasi dengan Protein Membran.....</b>	<b>37</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi Umum <i>Zoothamnium penaei</i> .....	5
5.1 Gambaran Infestasi <i>Zoothamnium penaei</i> pada Beberapa Organ .....	32
5.2 Hasil Karakterisasi Protein Membran <i>Zoothamnium penaei</i> dengan SDS-PAGE 15% dengan Pewarnaan Comaisse Blue .....	33
5.3 Hasil Analisis Protein membran <i>Zoothamnium penaei</i> dengan Teknik <i>Western Blotting</i> .....	34

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	Uraian	Halaman
1.	Sertifikat dan Artikel yang Sudah Published “Effectivity of Immuno-stimulant.....” pada Prociding Terindeks Scopus dari Internasional Fisheries Symposium (IFS) Malang, Indonesia .....	46
2.	Artikel yang Sudah Published “Immune response.....” pada Prociding Terindeks Scopus dari Internasional Fisheries Symposium (IFS) Malang, Indonesia .....	49
3.	Sertifikat (Oral Presentation) dan Prociding Scopus IOP (Under Review) International Conference on Fisheries and Marine Science (INCOFIMS 2018).....	51
4.	Draft Artikel untuk Dipublikasikan pada Jurnal Internasional Terindeks Scopus Indian Veterinary Journal .....	54
5.	Letter of Acceptance dan Artikel International Fisheries Symposium 2018 Thailand.....	55
6.	Draft Buku Referensi yang Berbasis Hasil Penelitian ISBN .....	57
7.	Tersedianya Produk Bahan Imunostimulan dari Protein <i>Zoothamnium penaei</i> yang Sudah Diuji pada Udang Vaname di Tambak .....	61
8.	Draft Pengajuan Hak Paten dari Protein Membran Imunogenik <i>Zoothamnium penaei</i> .....	62



## BAB 1

### PENDAHULUAN

Sampai saat ini kasus kematian udang di tambak maupun hatchery yang terjadi sejak akhir tahun 1993 masih belum diatasi secara maksimal. Hal ini disebabkan karena penyakit sebagai faktor utama penyebab kematian ini belum dapat diatasi. Upaya pencegahan dan penanggulangan yang sudah banyak dilakukan, antara lain dengan menggunakan sistem sirkulasi, dengan formalin, dan antibiotik. Pencegahan dan Pengobatan Zoothamniosis baik di panti pembenihan maupun di tambak dengan antiseptik maupun antibiotik selama ini dapat dikatakan sudah memberikan hasil yang cukup baik, akan tetapi dapat menyebabkan patogen menjadi resisten dan juga residu yang terakumulasi pada karkas udang dapat mempengaruhi mutu udang dan membahayakan kesehatan konsumen.

Salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian udang baik di tambak maupun tempat pembenihan adalah Zoothamniosis. Penyakit ini merupakan salah satu penyakit parasiter pada udang vannamei yang disebabkan oleh *Zoothamnium penae*. Penyakit ini menyebabkan udang sulit bernafas, sulit bergerak dan tidak dapat mencari makanan (Anonimus, 1996 ; Sindermann, 2007 dan Foster *et al.*, 1998), udang sulit ganti kulit (moulting), menghambat pertumbuhan, menurunkan nilai ekonomi dan menyebabkan kematian hingga 91 % (Tonguthai, 2001). Upaya pencegahan Zoothamniosis dengan menggunakan menggunakan imunostimulan dari protein membrane belum pernah dilakukan, padahal isolasi dan identifikasi protein dari beberapa spesies *Zoothamnium* sudah pernah dilakukan, akan tetapi belum dikembangkan. Sementara pengobatan yang sudah dilakukan dengan menggunakan bahan kimia maupun antibiotic, menyebabkan adanya residu pada daging udang.

Rukyani (1996) mengatakan bahwa untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang baik di panti pembenihan maupun di tambak dapat dilakukan dengan menggunakan imunostimulan. Selanjutnya mahasri (2007) mengatakan bahwa imunisasi dengan protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* dapat meningkatkan tingkat kelulushidupan udang hingga 93%. Selanjutnya dikatakan bahwa isolasi protein membran imunogenik dapat dilakukan dengan SDS-PAGE, ELISA dan Westrn Blotting. Hasil analisis menunjukkan bahwa ditemukan 7 buah protein ditemukan dan 3 protein bersifat imunogenik, yaitu protein membrane MP38, MP48 dan MP67.

Sistem pertahanan tubuh pada invertebrata (termasuk udang) yang berperan adalah mekanisme pertahanan tubuh oleh haemosit, di mana penyebaran dan peningkatan jumlah haemosit diasumsikan sebagai bentuk dari respon imun seluler pada tubuh udang (Itami, 1994 dan Van de Braak, 2002). Untuk melakukan aktivitas fagositosis, enkapsulasi, nodulasi, pengaktifan sistem prophenoloksidase, anti mikroba maupun senyawa toksik, diperlukan pelepasan beberapa protein untuk mengatasi benda asing atau agen yang masuk tersebut (Söderhall dan Cerenius, 1992).

Van de Braak (2002) mengatakan bahwa adanya respon imun pada udang antara lain dapat dilihat dengan adanya peningkatan dan perubahan hemosit, yaitu *Total Haemocite Count* (THC) dan *Differential Haemocite Count* (DHC). Bertitik tolak dari uraian di atas, maka sangat perlu ditemukan alternatif upaya untuk mencegah tingginya kematian udang vannamei, yaitu dengan menggunakan imunostimulan dari protein membran *Zoothamnium penaei*, yang telah diuji dan siap pakai di tambak. Dan dapat diaplikasikan secara mudah dan luas.

Berdasar latar belakang penelitian maka tujuan dari penelitian ini adalah : 1) Uji lapang protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* untuk menurunkan infestasi parasit (*Zoothamnium penaei*) pada udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak, 2) Uji lapang protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* dapat meningkatkan respon imun udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak, dan 3) Uji lapang protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai bahan imunostimulan untuk menekan kematian udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak. Sedangkan Luaran penelitian ini adalah : 1) Bahan untuk imunostimulan yang sudah teruji secara laboratoris dan siap diujikan di lapang pada tahun ke dua, 2) Artikel ilmiah yang diseminarkan pada Internatinal Fisheries Symposium (IFS) dan 3) Modul Budidaya udang dengan imunostinulan.dan 4) Publikasi Ilmiah pada Journal Fish and Fish and Animal Health (Elsevier).

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

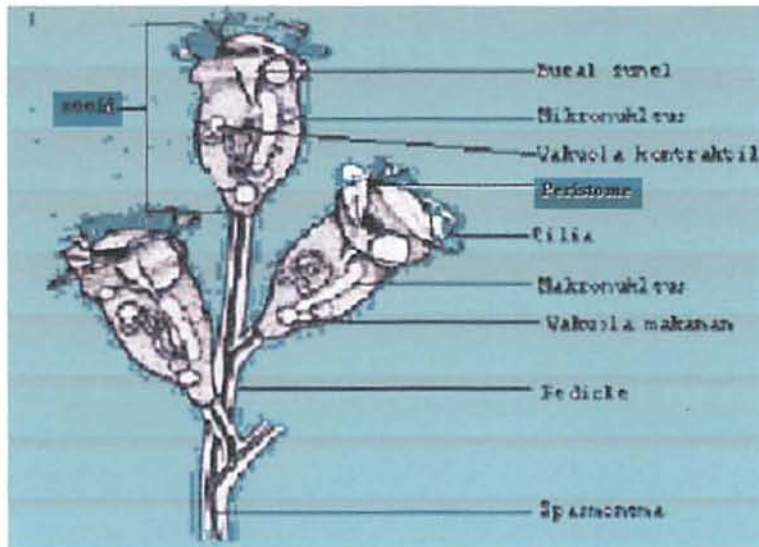
#### 2.1. *Zoothamnium penaei*

*Zoothamnium penaei*, merupakan protozoa dari kelas Ciliata, ordo Peritrica, familia *Vorticellidae*, genus *Zoothamnium*. Hidup berkoloni, mempunyai zooid bersifat dimorph, zooid yang lebih besar berbentuk globular, hasil pembelahan hanya memperbesar koloni (Ji dan Weibo, 2004). Zooid *Zoothamnium* mempunyai peristom yang berbentuk lingkaran yang dikelilingi oleh silia, bagian dalam terdapat satu vakuola kontraktil dan beberapa vakuola makanan, nukleus, dan mempunyai tangkai (*pedicle*) pada bagian posterior yang didalamnya terdapat spasmonema. Tangkai tersebut merupakan alat untuk melekat pada inang. Spasmonema selalu berhubungan satu dengan yang lain pada tiap-tiap cabang pada setiap koloni (Debauffer dan Buhse, 1998). Secara lengkap gambaran morfologi *Zoothamnium* disajikan pada Gambar 2.1.

Menurut Sumawidjaja (1991), *Zoothamnium sp.* hidup berkoloni dan berwarna keputih-putihan. Hidup menempel pada tubuh udang dengan bantuan semacam akar dan batang (*pedicle*) yang bercabang dua. Kadang-kadang tiga zooid atau lebih dalam satu koloni yang mempunyai bentuk dan model yang sama, tetapi sangat bervariasi dalam ukurannya. Zooid yang ditemukan pada benur udang di pantai Selatan pulau Jawa berukuran panjang  $44,35 \pm 7,391 \mu\text{m}$  ( $n = 37$ ) sedang di pantai Utara, panjang  $30,00 \pm 4,123 \mu\text{m}$  dan lebar  $22,56 \pm 3,005 \mu\text{m}$  dengan jumlah sampel sebanyak 39. Kemudian Mahasri (1996) menemukan zooid *Zoothamnium penaei* dengan ukuran panjang antara  $44,23 \pm 3,46 \mu\text{m}$  dan lebar  $27,63 \pm 4,42 \mu\text{m}$ .

Beberapa zooid terdiri dari tangkai peristomial dan silia, banyak vakuola kontraktil, ribosom bebas, mitochondria dan retikulum endoplasma kasar. (Nagasawa,

1986; Foster, *et al.*, 1998). Selanjutnya dikatakan bahwa koloni *Zoothamnium sp.* sangat cocok berbiak di daerah permukaan alat pernafasan (insang) dan periopod udang. Infeksi berat pada alat pernafasan akan menyebabkan kematian masal dan mempunyai arti penting dalam budidaya udang.



Gambar 2.1. Morfologi umum *Zoothamnium sp.* (www. digisys.net., 2004)

*Zoothamnium penaei* berkembang biak dengan pembelahan transversal dan prosesnya tergantung dari kondisi lingkungan, dapat berlangsung selama 15 menit, 30 menit, 80 menit, 4 jam bahkan dapat sampai 4 hari. Semakin optimal kondisi lingkungan bagi kehidupannya, proses pembelahan akan terjadi lebih cepat. Perkembangbiakan pada beberapa spesies terjadi hanya untuk memperbesar koloni, sehingga setelah membelah biner, akan terdapat cabang tangkai atau akar yang baru (Ji dan Weibo, 2004). Akan tetapi sebagian besar spesies dari *zoothamnium* akan menghasilkan stadia yang berenang bebas yang disebut *telothroch* (Utz, *et al.*, 2002).

Menurut Arbur dan Steve (2003), *Zoothamnium penaei* stadia dewasa (*trophozoid*) berada di permukaan tubuh dan insang udang, setelah matang akan berkembangbiak secara aseksual dengan melibatkan mikronukleus/makronukleus.

Perkembangbiakan ini diawali dengan melebarnya zooid (tubuh), sehingga nampak seperti adanya goresan secara transversal vertikal. Kemudian makronukleus akan meluas sehingga menyebabkan perubahan pada sistem silia. Dalam proses ini sel tidak mencari makanan karena sudah memiliki cadangan makanan sebagai cadangan energi. Makronukleus mengecil dan terbagi menjadi dua, memisah dari tangkai (*pedicle*) dan berkembang menjadi *telothroch*. *Telothroch* berkembang menjadi individu baru dan segera mencari inang baru serta menyempurnakan tubuhnya hingga menjadi dewasa (*thropozoid*).

## 2.2. Zoothamniosis pada Udang Penaeid

Zoothamniosis merupakan penyakit parasiter pada udang yang disebabkan oleh *Zoothamnium sp.* juga disebut dengan penyakit udang lumutan atau juga disebut dengan penyakit udang berjaket dan juga dikenal dengan dengan penyakit udang bersepatu (Rukyani, 1996).

Chamratchakool, Turnbull and Limsuwan (1996), menyatakan bahwa *Zoothamnium sp.* merupakan jenis ciliata yang menyerang seluruh permukaan tubuh, terutama pada insang, sehingga pada kondisi oksigen rendah akan meningkatkan serangannya dan udang akan lemas. Tonguthai (2001) mengatakan bahwa pada kasus infeksi berat seluruh permukaan tubuh udang tertempeli oleh parasit, sehingga mengakibatkan udang sulit bergerak, sulit bernafas dan sulit untuk ganti kulit. Hal ini akan menyebabkan udang stress dan akan mengalami kematian, terutama pada stadia larva 3 - 7 hari setelah infeksi. Saat *Zoothamnium* menyerang udang, akan mengeluarkan mucus yang spesifik yang dapat menyebabkan peradangan pada kulit dan membahayakan kesehatan udang (Routledge and Weis-Fogh, 2005).



Umumnya zoothamniosis menyerang udang mulai stadia Zoea, Mysis dan selanjutnya pada Pasca Larva. Pada Pasca Larva (PL-1) prevalensinya mencapai 80% dan juga dapat ditemukan pada semua stadia baik larva, pasca larva dan dewasa (Mahasri, 1998). Bersama-sama *Epistylis sp.* banyak menyerang udang vannamei yang menyebabkan kualitas dan harga turun. Faktor yang berpengaruh pada serangan penyakit ini adalah perairan dengan kadar oksigen rendah (< 3 ppm), bahan organik, dan padat tebar tinggi. Jumlah zooid *Zoothamnium* akan meningkat pada kondisi tersebut dan berbanding lurus dengan tingkat kematian udang, sehingga semakin besar jumlah zooid semakin tinggi tingkat kematian yang terjadi (Mahasri, 1999). Selanjutnya dikatakan bahwa semakin tinggi padat tebar semakin tinggi pula kematian udang, semakin rendah kandungan oksigen semakin meningkat serangan zoothamniosis. Selanjutnya dikatakan oleh Zaleski dan Claps (2000) bahwa serangan zoothamniosis sangat dipengaruhi oleh musim yang akan meningkat pada awal musim penghujan.

Gejala klinis dari zoothamniosis pada udang adalah terdapatnya benda asing berwarna putih kecoklatan (putih krem) yang menempel pada seluruh permukaan tubuh dan insang, udang sulit bernafas, sulit bergerak, tidak dapat ganti kulit (moulting) dan berenang ke permukaan (Chamratchakool, 1996), di panti pembenihan bila terserang zoothamniosis, maka benih akan bergerombol pada beberapa tempat di sekitar aerasi (Mahasri, 1996).

Usaha untuk mencegah Zoothamniosis pada udang sudah banyak dilakukan baik dengan antibiotik maupun bahan kimia lain (Chamratchakool, 1996), dengan petak resirkulasi (Mahasri, Kismiyati dan Hastutiek, 2001) dan dengan menggunakan filter biologis (Mahasri, Kismiyati dan Hastutiek, 2003 dan Mahasri, 2004). Petak resirkulasi

dapat menurunkan serangan zoothamniosis dari 81% hingga 21%, sedangkan dengan filter biologis dapat menurunkan serangan dari 89% menjadi 14%.

Pengobatan zoothamniosis yang dilakukan dengan formalin 30 ppm dan dengan asam asetat 2 ppt, efektif dapat membunuh *Zoothamnium*, akan tetapi pengobatan di lapangan tidak efektif dan efisien karena diperlukan obat dalam jumlah besar dan setelah udang terserang penyakit akan segera diikuti dengan kematian dalam waktu yang tidak terlalu lama (Tonguthai, 2001).

### **2.3. Karakteristik Molekuler Protein Membran Imunogenik *Zoothamnium***

Protein membran imunogenik merupakan protein yang terdapat pada spasmonema pada tangkai atau akar kontraktil (*contractile stalk*) dari berbagai spesies yang termasuk dalam familia Vorticellidae (Pylawka dan Buhse, 2002 ; Muccutcheon, *et al.*, 2002 ; Moriyama, Okamoto, Asai, 1999 ; Routledge, 2008 ; Amos, *et al.*, 2005 dan Itabashi, Mikami dan Asai, 2003).

Amos, Routledge dan Yew (2005) telah menganalisis protein dari spasmonema kontraktil dari *Zoothamnium* dan membandingkan dengan protein lain pada organ lain yang bergerak. Deteksi protein dilakukan dengan Polyacrylamide Gel, hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa hampir 60% protein di dalam Sodium Dodecyl Sulphate Gels tersebar pada pita (band) dengan berat molekul mendekati 20, 000 kDal, dan terdiri dari 2 protein yang sama besar yang disebut dengan whole protein. Komposisi asam amino dari ke dua fraksi spasmin tersebut yang dideterminasi dengan Metode Flourimetric menunjukkan kaya dengan glysin dan serin tetapi tidak mengandung cystein dan methionin.

Routledge (2008), telah melakukan isolasi protein dari spasmonema kontraktile dari *Vorticella convollaria*, *Carchesium polypinum* dan *Zoothamnium geniculatum*, yang diekstraksi dalam detergent, Sodium Dodecyl sulfate (SDS), seperti urea dan Guanidine Hydrochloride (GuCl). Setelah diekstraksi dengan SDS, distribusi berat molekuler protein yang diidentifikasi dengan SDS-PAGE, jelas tidak terdapat protein actin dan tubulin. Berat molekul dari protein organ kontraktile mendekati 20,000 kDa.

Moriyama, Okamoto dan Asai (1999), telah mengisolasi protein dari spasmonema *Zoothamnium sp.* dan menyatakan bahwa berat molekul dari rantai protein diestimasi mendekati 50 kDa dan 20 kDa hasil sintesis dari ikatan protein spasmonema oleh Mccutcheon, McLaughlin dan Buhse (2002).

Itabashi, Mikami dan Asai (2003) telah melakukan karakterisasi molekuler whole protein *Zoothamnium arbuscula*, hasil yang didapat menunjukkan bahwa 1 gen spasmin tidak mempunyai intron dan panjang genom 531 bp dan diprediksi akan menghasilkan 177 asam amino dengan berat molekuler mendekati 19659 Da (19,659 kDa). Sekuen asam mempunyai dua ikatan kalsium.

Karakterisasi whole protein zooid *Zoothamnium* banyak dilakukan dengan metode SDS-PAGE, menurut Laemmli (1970), SDS-PAGE dengan kadar gel 10% dapat digunakan untuk identifikasi berat molekul protein, hasil identifikasi berupa pita (band) dan penentuan berat molekulnya dilakukan dengan cara melihat kesetaraan dengan marker.

#### **2.4. Sistem Pertahanan Tubuh pada Udang**

Menurut Kwang (2006) bahwa sistem kekebalan tubuh udang vannamei masih primitif dan tidak memiliki sel memori, tidak seperti ikan atau vertebrata lain yang mempunyai antibodi spesifik atau komplemen. Pada invertebrata (seperti udang) tidak

mempunyai immunoglobulin yang berperan dalam mekanisme kekebalan tubuh (Söderhall, Cerenicus and Johanson, 2006).

Sistem pertahanan tubuh pada udang terutama terdiri dari dua bagian yaitu sistem pertahanan tubuh seluler dan sistem pertahanan tubuh humoral. Sistem pertahanan tubuh seluler meliputi fagosit sel-sel hemosit, nodulasi dan encapsulasi. Sistem pertahanan tubuh humoral mencakup phenoloksidase (PO), prophenoloksidase (proPO), lectin dan aglutinin. Kedua sistem pertahanan ini bekerjasama memberikan perlindungan tubuh terhadap infeksi organisme patogen dari lingkungan (Itami, 2004). ProPO diaktifkan oleh enzim prophenoloksidase activating enzyim (PPA). Sedangkan prophenoloksidase activating enzyim ini bisa diaktifkan oleh lipopolisakarida. ProPO dan PPA ini merupakan protein yang berlokasi di granular hemosit. Akibat dari pengaktifan proPO menjadi PO dihasilkan protein *Opsonin Factor* yang merangsang fagositosis sel hyalin (agranular sel) (Johanson dan Söderhall, 2009).

Faktor-faktor pertahanan seluler dan humoral sebagai pertahanan tubuh melawan serangan organisme patogen terutama hemosit merupakan faktor pertahanan yang penting. Terdapat hubungan yang erat antara aktifitas hemosit dan lingkungan yang buruk akibat tingginya polusi oleh bahan organik. Aktifitas fagosit dari udang yang terkena polusi ternyata lebih rendah daripada udang yang sehat (Itami, 2004).

Meningkatnya ketahanan tubuh dapat diketahui dari meningkatnya aktifitas sel-sel fagosit dari hemosit. Sel-sel fagositik ini berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk kedalam tubuh inang. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan non-spesifik yang secara umum mampu melindungi adanya serangan penyakit. Hemosit dikenal sebagai faktor yang sangat penting dalam sistem pertahanan seluler yang bersifat non-spesifik. Untuk mengetahui bahwa hemosit

merupakan pertahanan tubuh yang bersifat seluler, dapat dilihat dari kemampuannya dalam aktifitas fagositosis yang dapat meningkat pada kejadian infeksi. Dengan adanya infeksi akan merangsang sistem pertahanan non-spesifik seluler sehingga diharapkan dapat menangkal serangan penyakit Terdapat tiga bentuk mekanisme aktifitas hemosit yang dapat teramati, yaitu (1) mekanisme penjeratan (encapsulasi) terhadap suatu materi asing, (2) mekanisme fagositosis gabungan dari beberapa hemosit yang membentuk kumpulan lebih besar, dan (3) kumpulan dari banyak hemosit membentuk suatu lapisan terpigmentasi (Fontaine dan Lighner, 1974).

Kondo *et al* (1996) menemukan 5 tipe fagosit pada udang kuruma (*Penaeus japonicus*), dua diantaranya merupakan sel fagosit dan sisanya berupa hemosit. Kedua tipe fagosit pertama ditemukan dihati pada lamina basal yang menutupi sarkolema dari otot jantung dan sel-selnya mempunyai granula lisosom yang berdiameter 0,1  $\mu\text{m}$ , tipe sel fagosit yang kedua ditemukan di organ limfoid. Pada kelima tipe fagosit tersebut ditemukan enzim lisosom seperti acid phosphate,  $\beta$ -glukuronidase dan esterase non-spesifik. Aktifitas esterase sangat tinggi ditemukan pada sel granular. Aktifitas phenoloksidase (PO) juga ditemukan pada semua sel fagosit tapi sangat lemah, sedangkan aktifitas prophenoloksidase (proPO) hanya ditemukan pada sel granular dan sel semigranular.

## 2.5. Darah Udang

Darah udang tidak mengandung hemaglobin, sehingga darahnya tidak berwarna merah. Hemaglobin yang berfungsi untuk transpor oksigen, pada udang fungsi tersebut digantikan oleh hemosianin, suatu protein yang mengandung Cu dan bisa berikatan dengan oksigen. Dalam bentuk tereduksi tidak berwarna, jika berikatan dengan oksigen

akan berwarna biru. Hemosianin berfungsi dalam transpor oksigen, sebagai buffer dalam darah krustase dan berperan penting dalam osmotik darah (Maynard, 1960).

Menurut Frandson (1986) eritrosit merupakan sel darah berukuran kecil, tidak memiliki sitoplasma dan berfungsi untuk transpor oksigen. Pada udang vannamei ditemukan sel darah seperti itu dengan ukuran 5,6  $\mu\text{m}$ . Sel darah tersebut mungkin berfungsi sebagai transpor oksigen (Supamattaya, *et al.*, 2004).

Jumlah hemosit yang berada dalam darah crayfish (arthropoda) menentukan tingkat kekebalan tubuh udang terhadap serangan patogen. Penurunan total hemosit akan menyebabkan kerusakan pada inang yang ditandai dengan reaksi melanisasi oleh jamur *Aphanomyces astact* pada jaringan kutikula, penetrasi pada jaringan tubuh dan disusul kematian organisme (Person, *et al.*, 2007).

Maynard (1960) menyatakan bahwa korpuskel atau sel darah hemolim yang dapat disamakan dengan leukosit pada vertebrata terdiri dari granulosit dan hialosit. Sel hyalin mempunyai nukleus yang besar terletak ditengah dikelilingi oleh sitoplasma basofilik. Pada sitoplasma tidak terlihat adanya retikulum endoplasmik serta ribosom dan juga tidak ditemukan badan golgi, granul hampir tidak ada atau terlihat sangat sedikit. Secara *in vitro* sel ini memperlihatkan adanya pseudopodia (Amirante, 1986).

Martin (1985) menyatakan bahwa bentuk hemosit penacid dibedakan menjadi bentuk yang tidak bergranula (agranulocyte), granulanya sedikit (semigranulocyte) dan bergranula banyak (granulocyte).

Dari analisis Flow Cytometer oleh Owens dan O'Neill (1996) bahwa persentase hyaline udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang normal terdiri dari 60 % sampai 93 % dari total hemosit, sedangkan persentase granulosit berjumlah 17 % sampai 40 %. Berdasarkan analisis Cell-Dyn 3000 analisis total hemosit rata-rata berjumlah  $2,1 \times 10^7$ .

Granulosit merupakan jaringan untuk sistem pertahanan seluler melwan infeksi, sel ini akan bermigrasi ke daerah-daerah yang mengalami infeksi. Granulosit mengandung granula didalam sitoplasmanya, dan memberi warna biru dengan pewarnaan giemza (Supamattaya, *et al*, 1994). Gani (1995) menyatakan bahwa persentase granulosit pada udang vannamei yang terserang *Yellow Head Disease* (YHD) memiliki jumlah granulosit 53 – 60 %, dibanding dengan kontrol 26 – 44 %.

Johanson dan Söderhall (2009) mengatakan bahwa sel hyalin juga berperan didalam sistem pertahanan tubuh udang. Sel hyalin ini diaktifkan oleh *Opsonin Factor* yang dihasilkan dari aktifnya proPO menjadi PO pada sel granular, sehingga dapat memfagositosis materi asing baik bakteri maupun virus, tetapi yang paling berperan dalam sistem pertahanan tubuh udang adalah granulosit.

## 2.6. Imunostimulan Pada Udang

Imunostimulan, yaitu suatu bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah putih (leukosit), sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit ( Raa, 2000). Sedangkan imunisasi adalah memasukkan bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah putih (leukosit) sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit. Di dalam tubuh udang vannamei vaksin akan merangsang hemosit untuk melakukan degranulasi dan protein akan dilepaskan seperti ikatan molekul.

Anderson (1992), Imunisasi pada udang adalah suatu usaha untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang dengan jalan memasukkan antigen ke dalam tubuh, dan selanjutnya juga dikenal dengan vaksinasi (Anderson, 1992). Vaksin merupakan produk yang dihasilkan dari suspensi mikroorganisme hidup maupun mati

yang dapat menghasilkan kekebalan (Ellis, 1988), sedangkan Itami *et al.*(2006) mengatakan bahwa pemberian vaksin (vaksinasi) dapat mencegah infeksi dari penyakit, karena bisa meningkatkan aktifitas fagosit hemosit dan proPO. Disamping itu juga dapat meningkatkan jumlah granulosit. Taslihan (2001) mengatakan bahwa terdapat penyebaran hemosit pada hepatopankreas post larva udang vannamei setelah dilakukan imunisasi. Penyebaran hemosit ini dapat diasumsikan sebagai bentuk dari mekanisme respon seluler terhadap masuknya benda asing ke dalam tubuh udang.

McKay dan Jenkin (2000), mengatakan bahwa imunisasi pada crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) sebanyak 4 kali dengan endotoksin 2.5 µg dan  $2.5 \times 10^7$  vaksin dari bakteri *Pseudomonas sp.* dengan 4 kali penyuntikan menghasilkan perbedaan yang sangat nyata antara jumlah hemosit pada grup kontrol dan yang diimunisasi. Johanson dan Soderhall (2009) menyatakan bahwa imunisasi dapat merangsang hemosit untuk melepaskan sistem proPO (sistem komunikasi) dan protein probinding TGKpa (molekul sinyal) yang bertanggungjawab sebagai komunikator dan aktifator sel-sel untuk melakukan fagositosis dan enkapsulasi pada jenis crustasea. Protein yang dilepaskan pada saat vaksinasi digunakan untuk kepentingan respon imun seperti fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, koagulasi, aktivitas peroksidase, opsonisasi, aktivitas anti mikroba serta proses aktivitas humoral dan seluler lain (Van de Braak, *et al.*, 2000).

Pemberian imunostimulan yang pada crustasea disebut juga vaksinasi tidak mempunyai efek samping dan sangat baik untuk diterapkan pada organisme yang tidak mempunyai sel memori dalam sistem imunnya, sehingga dapat merangsang dan atau memaksimalkan respon imun non spesifik (Kwang, 2006). Vaksinasi dengan menggunakan bahan protein antigenik (imunogenik) masih belum banyak dilakukan. Menurut Safira (1998) pemberian Lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri



**Vibrio harveyi** secara oral pada udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei* Fab.) dalam waktu 42 hari dapat menaikkan jumlah total hemosit dan menaikkan jenis sel granulositnya, sedangkan aktifitas fagositik dari sel hemosit sudah menunjukkan kenaikan pada hari ke 28 dan lebih tinggi lagi pada hari ke 42. Terjadinya peningkatan aktifitas fagositik dari sel-sel hemosit seiring dengan meningkatnya jumlah total hemosit dan jenis sel granulositnya akibat pemberian Lipopolisakarida.

Pemberian imunostimulan tidak mempunyai efek samping dan baik untuk diterapkan pada organisme yang tidak mempunyai sel memori dalam sistem imunnya, seperti golongan Crustacea dengan cara merangsang dan atau memaksimalkan respon imun non-spesifiknya (Kwang, 2006).

## BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

## 3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai pada penelitian ini adalah :

- a. Menganalisis protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai bahan pengembangan bahan imunostimulan untuk mencegah kematian udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) akibat zoothamniosis di tambak semi intensif
- b. Uji Lapang efektifitas protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai bahan pengembangan bahan imunostimulan untuk mencegah kematian udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) akibat zoothamniosis di tambak semi intensif.
- c. Menyediakan imunostimulan dari protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* yang siap uji lapang untuk mencegah tingginya kematian udang vanamei di tambak.
- d. Publikasi ilmiah pada jurnal nasional terakreditasi.

**Jurnal yang dituju : Indian Veterinary Journal**

Tujuan Penelitian Tahun Kedua adalah sebagai berikut :

1. Uji Lapang protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai bahan pengembangan imunostimulan untuk mencegah kematian udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di tambak.
2. Publikasi ilmiah pada jurnal nasional terakreditasi.

**Jurnal yang dituju : Indian Veterinary Journal**

### **3.2. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan bahan imunostimulan dari protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* untuk mencegah kematian udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak.
2. Memberikan informasi ilmiah penggunaan imunostimulan pada udang vaname untuk meningkatkan pertahanan tubuh udang sehingga dapat tahan terhadap lingkungan terutama infeksi penyakit
3. Didapatkan metode pencegahan penyakit zoothamniosis pada udang yang mudah diterapkan dan tidak menimbulkan dampak negative
4. Hasil penelitian ini akan dapat digunakan untuk solusi pemecahan masalah utama dalam budidaya udang, yaitu serangan penyakit
5. Mendapatkan produksi udang yang berkuantitas, berkualitas, sehat dan bebas antibiotic serta berkualitas ekspor
6. Hasil penelitian ini merupakan salah satu upaya pengembangan budidaya udang untuk revitalisasi tambak *idle* yang berada di Indonesia

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

## Penelitian Tahun I (Tahap I) :

Penelitian Tahun I (tahap I) dilaksanakan mulai bulan Maret 2017 sampai dengan bulan November 2012. Tahap ini diawali dengan pengambilan sampel udang vannamei yang diduga positif zoothamniosis, dari pertambakan di Kabupaten Gresik. Kemudian dilakukan identifikasi parasit di Laboratorium Pendidikan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga. Karakterisasi protein membran dengan SDS-PAGE dan pemurnian protein membran imunogenik dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Produksi antibodi poliklonal pada kelinci terhadap protein membran dan pengukuran titer antibodi dengan ELISA dan karakterisasi protein membran dengan *Western Blotting* di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Penghitungan dan analisis total haemosit (THC) dan diferensial haemosit (DHC) dan tingkat kelangsungan hidup (*Survival Rate/SR*) udang vannamei yang diimunisasi dengan protein membran imunogenik dan diinfeksi *Zoothamnium penaei* dilakukan di Laboratorium Basah, Balai Karantina Ikan Kelas I, Juanda Surabaya.

**Penelitian Tahun II (Tahap- 2) :**

Penelitian Tahun II (tahap II) dilaksanakan mulai bulan Maret sampai dengan Bulan November 2018. Penelitian pada tahun kedua ini merupakan penelitian tentang aplikasi dan evaluasi uji lapangan dari imunostimulan yang telah ditemukan pada tahun I (tahap I). Penelitian Tahun Pertama dilakukan di Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya. Untuk Uji efektifitas protein membran sebagai bahan vaksin sub unit akan dilaksanakan pada tahun 2017.

Penelitian Tahun II (tahap - 2) dilaksanakan mulai bulan Maret 2018 sampai dengan bulan November 2018. Tahap ini diawali dengan pengambilan sampel udang vaname yang diduga positif zoothamniosis, dari pertambakan di Kabupaten Gresik. Kemudian dilakukan identifikasi parasit di Laboratorium Pendidikan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga. Kemudian dilanjutkan dengan kultivasi *Zoothamnium penaei* untuk memproduksi ulang bahan pengembangan imunostimulan, yaitu protein membran. Karakterisasi protein membran dengan SDS-PAGE dan pemurnian protein membran imunogenik dan penghitungan konsentrasi protein dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Penghitungan dan analisis total haemosit (THC) dan diferensial haemosit (DHC), tingkat infestasi parasit dan tingkat kelulushidupan (*Survival Rate/SR*) udang vaname yang diimunisasi dengan protein membran imunogenik dan diinfestasi *Zoothamnium penaei* dilakukan di Laboratorium Basah, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya.

#### **4.2. Tahapan Penelitian**

Penelitian ini dibagi dalam 2 Tahun, yaitu :

##### **Penelitian Tahun I**

Penelitian ini meliputi: isolasi dan karakterisasi protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai bahan imunostimulan dan penentuan model budidaya udang dengan menggunakan imunostimulan. Adapun tahapan Penelitian ini adalah : 1) Pengambilan sampel udang vannamei yang positif zoothamniosis dari lapangan dan identifikasi parasit, 2) Kultivasi *Zoothamnium penaei* untuk memperbanyak *Zoothamnium penaei*, 3) Isolasi protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* di Laboratorium Biologi Molekuler, dan penghitungan konsentrasi protein, 4) Karakterisasi protein membran dengan SDS-PAGE dan penghitungan konsentrasi protein 5) Uji kemampuan proteksi dari protein imunogenik *Zoothamnium penaei* terhadap infestasi *Zoothamnium penaei*, tingkat infestasi parasit, tingkat kelulushidupan (*Survival Rate*), total haemosit (THC) dan diferensial haemosit (DHC) udang vaname.

##### **Penelitian Tahun II :**

Penelitian ini melanjutkan penelitian tahun pertama, yaitu aplikasi penggunaan imunostimulan dari protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* yang dilakukan di tambak di Desa Kedung Pandan, Kecamatan Jabon. Kabupaten Sidoarjo. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai dengan November tahun 2018 dengan pemeliharaan udang selama satu periode panen yaitu 3 bulan.

### 4.3. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Zooid *Zoothamnium penaei* isolat dari Gresik dan Lamongan, Jawa Timur. Kemudian dilakukan kultivasi dengan cara kohabitasi pada Aquarium agar diperoleh jumlah zooid dalam jumlah besar.

Bahan yang digunakan untuk isolasi whole protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* antara lain adalah Acrylamide (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louise, MO 63178, USA), bis-(N,N'-Methylene-bis-Acrylamide) (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), Sodium Dodecylsulfate atau SDS (Merck, Postfach 4119, D-6100, 64271 Dannstadt 1 Germany), Ammonium Persulfate atau APS (Merck, Postfach 4119, D-6100, 64271 Dannstadt 1 Germany), Glycine (Merck, Postfach 4119, D-6100, 64271 Dannstadt 1 Germany); N,N,N',N'- Tetra-Methyl Ethylene Diamine atau TEMED (Bio-Rad Lab, 1414 Harbour Way South, 3300 Regatta Boulevard, Richmond C.A 94804, USA), Buffer sampel, Coumassie Blue (Bio-Rad Lab, 1414 Harbour Way South, 3300 Regatta Boulevard, Richmond C.A 94804, USA), Asam Asetat, metanol dan membran dialisis (Bio-Rad Lab, 1414 Harbour Way South, 3300 Regatta Boulevard, Richmond C.A 94804, USA).

Untuk *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* digunakan bahan antara lain : Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,2 ; buffer pelapis, buffer pencuci, Tween 20, Bpvine Serum Albumin atau BSA (Gibco Laboratories, PO.PO BOX 200, Chargin Falls, OH 44022, Grand Island, N.Y. 1072, USA), Ig G goat anti mouse Peroxidase Conjugate (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA) ; 2,2<sup>1</sup> – Azine- bis (3-Ethyl Benzene-Thiazoline-6-Sulfonic

Acid) atau ABTS (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), buffer subtras ABTS dan Hydrogen Peroxyda (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Untuk *immunoblotting* digunakan bahan antara lain *Tween Buffer Saline (TBS) pH 5,5* ; *buffer blotting, IgG Anti Mouse Alkaline Phosphate Conjugate* (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), *Subtrats 5-Bromo-4 Chloro-3-Indoxyl Phosphate atau BCIP* (Promega, 2800 Woods, Hollow Road Madison, WI 5399, USA), *Nitro Blue Tetrazolium atau NBT* (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA) (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), *Bovine serum albumin (BSA)*, *Tween 20 dan Membran Nitrocellulose* (Bio-Rad Lab, 1414 Harbour Way South, 3300 Regatta Boulevard, Richmond CA 94804, USA), *blocking reagen* (Boehringer Mannheim).

Untuk imunisasi digunakan bahan antara lain kelinci (Pusat Veterinaria Farma/Pusvetma, Surabaya), dengan berat 70-80 gram umur 4 – 6 bulan dan jenis kelamin jantan, Freund's complete adjuvant (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), dan *Freund's Incomplete Adjuvant* (Sigma Chemical Company 3050, PO BOX Spruce Street 14508, St Louis, MO 63178, USA), untuk uji imunogenitas.

#### 4.4. Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kromatografi Kolom, pipet mikro (Gilson), *J-6B centrifuge* (Beckman), *microfuge<sup>TM</sup>11* (Beckman), mikroskop stereo type 102 (Nixon), *DU®-65 spectrophotometer* (Beckman), *Labsonic U* (B. Braun), *Potter S* (B. Braun), *Red Rocker* (Hoefler), *water bath* (Buchii), inkubator



37°C (Leec), *orbital shaker incubator*, *microwave* (Hitachi), *gene pulser<sup>TM</sup>* (BioRad), alat untuk elektroforesis (BioRad), *blotter* (H. Holzel), *Titertek® Multiskan MCC/340* (Labsystems), dan ELISA Reader (340 ATC)..

Untuk Uji imunogenitas pada udang vannamei digunakan akuarium ukuran 40 cm x 30 cm x 40 cm sebanyak 20 buah beserta perlengkapannya.

#### **4.5. Prosedur Penelitian TAHUN I dan II**

##### **4.5.1. Kultivasi *Zoothamnium penaei* In Vitro.**

Kultur *Zoothamnium penaei* dilakukan di Akuarium sebanyak 6 buah dan dilakukan secara kohabitasi yaitu dengan cara menularkan parasit pada udang yang sehat. Disamping itu untuk mempertahankan kehidupan parasit dilakukan dengan manipulasi lingkungan agar sesuai dengan kehidupannya, agar mendapatkan zooid yang lebih banyak sesuai dengan kebutuhan.

##### **4.5.2. Isolasi Protein Membran Imunogenik *Zoothamnium penaei*.**

Sebanyak  $6 \times 10^8$  Zooid / ml hasil kultivasi in vitro diresuspensi dengan 10 mM PBS sehingga didapatkan konsentrasi akhir  $6 \times 10^8$  Zooid / ml serta ditambah dengan protease inhibitor (untuk 100 ml PBS ditambah 100  $\mu$ l 40 mM PMSF, 7,3 mg TLCK, 7 mg TPCK dan 7,5 mg EDTA). Suspensi tersebut disonikasi dengan 4 x 0,5 menit dalam es. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 1 jam. Supernatan diambil dan merupakan protein sitoplasma (soluble protein) dan pelet mengandung whole protein. Pelet selanjutnya diresuspensi dengan 0,5% Nonidet P40 dalam larutan protease inhibitor dengan komposisi sama dengan komposisi sebelumnya. Sonikasi dilakukan dengan 4 x 0,5 menit dalam es selanjutnya diinkubasi semalam pada

suhu 4°C sambil diaduk dengan stirer dengan kecepatan sedang. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada 4°C dan supernatan diambil untuk diukur konsentrasi proteinnya.

#### 4.5.3. Penentuan Konsentrasi Protein

Untuk menentukan konsentrasi whole protein yang homogen digunakan Metode Bio-Rad Protein Assay dan dibaca dengan Spektrofotometer UV-Visible dengan panjang gelombang 595 nm.

#### 4.5.4. Karakterisasi dan Purifikasi Protein Membran dengan SDS-PAGE

Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk melihat pola berat molekul dari fraksi whole protein, yaitu dengan cara: Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Susunan running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1X dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml, dan Aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sackher selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan Aquades selama 30 menit. Setelah

dicuci gel diwarnai dengan AgNO<sub>3</sub> selama 15 menit , kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehid 3,7%, zitrone 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker.

#### **4.5.7. Uji Immunostimulan pada Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)**

Pengujian imunogenisitas secara *in vivo* menggunakan udang vaname umur 1 bulan di tambak (30 hari) yang sehat dengan berat rata-rata 25 gram sejumlah 300 ekor. Tahapan uji bahan immunostimulan secara *in vivo* ini yaitu : sebagai langkah awal adalah menyiapkan bahan immunostimulan, yaitu whole protein (protein sub unit) hasil isolasi ditambah dengan *adjuvant Freund's complete* (perbandingan 3:7) lalu dicampur hingga homogen dengan memakai alat dispenser model LK-22 merk Yamato, dilakukan pada suhu dingin pada 20.000 rpm selama 10 menit. Hasilnya berupa larutan immunostimulan berwarna putih dan siap diaplikasikan pada hewan coba (udang vaname) secara oral, yaitu melalui dipping.

Kemudian hewan coba (udang) dibagi menjadi kelompok pertama sebagai kontrol (K0) yaitu Kelompok udang tanpa diberi bahan immunostimulan (Diberi PBS) dan tidak diinfeksi oleh parasit. Kelompok Perlakuan (K1) kelompok udang yang tidak diberi bahan immunostimulan dari protein (diberi PBS) dan hari ke delapan dilakukan uji tantang dengan memberikan suspensi parasit, sedangkan kelompok kedua (K2) diberi bahan immunostimulan dari protein dan pada hari ke delapan dilakukan uji

tantang dengan memberikan suspensi parasit. Adapun dosis yang diberikan adalah dosis infeksi yaitu sebanyak 80 zooid, kemudian dilakukan pemeriksaan jumlah hemosit (THC), diferensial hemosit (DHC), indek fagositik dan jumlah kematian udang pada hari ke 1, 14 dan 28.

#### **4.5.8. Pemeriksaan Jumlah Hemosit (THC)**

Hemosit diambil pada bagian ventral dari segmen abdominal kedua dengan menggunakan jarum 25 G dan syringe satu ml yang telah dimasukkan 0,2 mililiter larutan modifikasi Alsever dingin (AS 19,3 mM; Na sitrat 239,8 mM, NaCl 182,5 glukosa dan 6,2 mM EDTA; pH 7,2) sebagai antikoagulan (Van de Braak, *et al.* 2000). Penghitungan jumlah haemocyte dilakukan dengan metode May Grunwald-Giemza (Romeis, 1968 yang dikutip oleh Van de Braak, *et al.* 2000) yaitu menggunakan mikroskop terang (LM) dengan pembesaran 1000 kali, kemudian dihitung dengan Coulter counter model ZM (Counter Electronic Ltd), ukuran partikel hemosit berkisar 0,4-800  $\mu\text{m}$ , sebagai data pendukung dapat juga diamati dengan mikroskop elektron (EM) dengan terlebih dahulu disentrifuse 700 X gravitasi pada suhu 4<sup>0</sup> C selama lima menit.

#### **4.5.9. Pemeriksaan Diferensial Hemosit (DHC)**

Darah diteteskan pada gelas obyek dan dibuat ulas darah dengan pewarnaan giemsa (Nash *et al.* 1993), kemudian diidentifikasi jenis selnya. Diferensial hemosit ini bertujuan untuk mengetahui jumlah, jenis dan persentase sel hemosit. Hemosit yang dianalisis digolongkan menurut petunjuk Owens dan O'Neill (1996). Jumlah hemosit

dihitung sampai 100 sel (Martin, *et al*, 1985) dan dicari persentase tiap jenisnya, dan dilakukan diawal sampai akhir penelitian.

#### **Penghitungan Tingkat Kelulushidupan / *Survival Rate* (SR)**

Penghitungan *Survival Rate* atau tingkat kelulushidupan udang vanamei dilakukan pada saat panen yaitu setelah pemeliharaan 3 bulan di tambak , yang dinyatakan dengan prosentase dari total jumlah udang yang hidup dalam suatu populasi tambak.

#### **4.6. Prosedur Penelitian**

##### **4.6.1. Penyiapan Imunostimulan Dari Protein Membran Imunogenik**

Imunostimulan yang digunakan adalah imunostimulan hasil dari uji tantang skala laboratorium dari penelitian tahap I. Imunostimulan yang dibutuhkan adalah sebanyak 1 ml dalam satu liter air dengan padat tebar 100 ekor benih udang,

##### **4.6.2. Penyiapan Udang Benih Udang Vaname Sehat**

Udang vaname sehat yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tempat pembenihan udang PPU Probolinggo. Umur udang yang digunakan adalah PL 30 dengan panjang sekitar 2-3 Cm. Benih udang yang digunakan untuk uji coba adalah sebanyak 1 rean (300 ekor). Udang dibawa ke laboratorium dengan menggunakan kantong plastik yang diberi oksigen.

#### 4.6.3. Uji Tantang Udang Vaname Yang Diberi Imunostimulan

Uji ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui dosis imunostimulan yang efektif untuk menekan kematian udang. Kemampuan proteksi protein membran imunogenik (imunostimulan) yang telah ditemukan diuji dengan menggunakan 15 bak plastik putih dengan volume 10 liter air, untuk udang umur PL-30. Padat tebar udang umur PL-30 hari adalah 20 ekor/10 liter, sedang untuk umur 60 hari 2 ekor/liter sehingga masing-masing dibutuhkan 20 ekor per akuarium. Udang yang digunakan untuk perlakuan adalah udang sehat yang direndam dahulu dalam  $\text{KMnO}_4$  0,2 ppm selama 5 menit untuk membersihkan organisme yang menempel pada permukaan tubuh udang. Dosis protein yang diberikan pada udang umur 30 hari adalah 5  $\mu\text{g/ml}$  sebanyak 600  $\mu\text{l/ekor}$  yang diberikan dengan perendaman selama 10 menit (Zang *et al*, 2002). Setelah dilakukan aklimatisasi, pada kelompok K1 (Kontrol) yaitu kelompok tanpa diimunisasi protein membran dan tanpa diinfestasi zooid *Zoothamnium penaei*, diberikan PBS dengan perendaman sebanyak 600  $\mu\text{l/ekor}$  untuk udang umur 30 hari pada tiap bak pemeliharaan. Kemudian tujuh hari berikutnya diberikan lagi PBS dengan dosis 600  $\mu\text{l/ekor}$  pada tiap bak pemeliharaan. Kelompok K2 diimunisasi imunogenik dengan dosis 5  $\mu\text{g/ml}$  sebanyak 600  $\mu\text{l/ekor}$  untuk udang umur 30 hari. Tujuh hari berikutnya diinfestasi dengan 80 zooid *Zoothamnium penaei*.

Kelompok K0 tanpa diimunisasi protein membran dan tanpa diinfestasi zooid *Zoothamnium penaei* dengan dosis 80 zooid (Fegan, *et al.*, 1993).

Pengukuran kemampuan proteksi ditentukan dengan tingkat kelulushidupan (*survival rate*) sampai dengan tujuh hari. Selama pemeliharaan udang dilakukan pemeriksaan kualitas air, sebagai data pendukung. Tingkat kelulushidupan dinyatakan

dengan persentase udang yang hidup selama tujuh hari pemeliharaan terhadap jumlah keseluruhan udang yang dipelihara.

Penentuan THC dan DHC hanya dilakukan pada udang umur 60 hari, karena udang umur 30 hari belum dapat diambil haemositnya dalam jumlah yang dapat memenuhi persyaratan untuk penghitungan. Untuk penentuan gambaran patologi kulit dan insang udang dilakukan setelah udang dipelihara tujuh hari pasca pemberian zoid *Zoothamnium penaei*. Penghitungan THC dan DHC digunakan dengan Haemositometer dan *Hand Counter*. Penentuan tingkat kelangsungan hidup, THC, DHC dan gambaran patologi kulit dan insang udang digunakan metode yang sama dengan pada penelitian sebelumnya.

#### **4.7. Uji Penggunaan Imunostimulan di Tambak**

##### **4.7.1. Persiapan Petakan Tambak (Tahun Kedua)**

Luas tambak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 200 meter persegi, dengan jumlah petakan sebanyak 4 buah, yang terdiri dari 3 buah untuk petak pemeliharaan udang dan satu petak untuk tandon. Sebelum digunakan, tambak dibersihkan, dikeringkan, dilakukan pengapuran, pemupukan dan pengairan. Sumber air yang digunakan berasal dari aliran sungai dan dari laut pada waktu pasang. Pola pengelolaan tambak . Penelitian tahun kedua ini (Tahun 2018) ini adalah uji lapang dari protein membran *Zoothamnium penaei* sebagai bahan imunostimulan untuk udang di tambak.

#### 4.7.2. Pemeliharaan Udang Vaname dengan Imunostimulan

Setelah persiapan petakan selesai maka dilakukan pemeliharaan udang. Benih yang sudah disiapkan dilakukan aklimatisasi terhadap suhu dan salinitas selama satu jam. Kemudian benih dibagi ke dalam 3 wadah untuk dilakukan imunisasi dengan imunostimulan dari protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* dengan tiga dosis yang berbeda, yaitu 1 ml/Lt, 2 ml/Lt dan yang ketiga tidak diimunisasi. Imunisasi dilakukan dengan perenadaman selama 30 menit, baru ditebar di tambak. Pemeliharaan dilakukan selama 3 bulan.

#### 4.8. Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dibedakan menjadi dua macam yaitu data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif adalah data hasil isolasi dan karakterisasi molekuler, yaitu Perotein Spasmin dengan SDS-PAGE dan Immunoblotting. Data kuantitatif yaitu data hasil ujiantang protein pada udang vaname terhadap *Zoothamnium penaei* pada waktu tertentu, meliputi : jumlah hemosit (THC), diferensial hemosit (DHC), indeks fagositik dan kelulshidupan udang vaname, dengan rumus dan cara penghitungan yang sama dengan pada tahun pertama yaitu tahun 2017.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian (imunisasi) imunostimulan protein pada udang vaname yang ditantang dengan *Zoothamnium penaei* terhadap jumlah hemosit, diferensial hemosit dan jumlah kematian udang digunakan uji Anova dengan rancangan acak kelompok (RAL) dengan dua perlakuan yaitu kelompok kontrol (K0) yang tidak diberi whole protein *Zoothamnium penaei* (tidak di imunisasi), dan kelompok yang diberi whole protein (di imunisasi). apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji berjarak Duncan. (Stell dan Torrie, 1986)

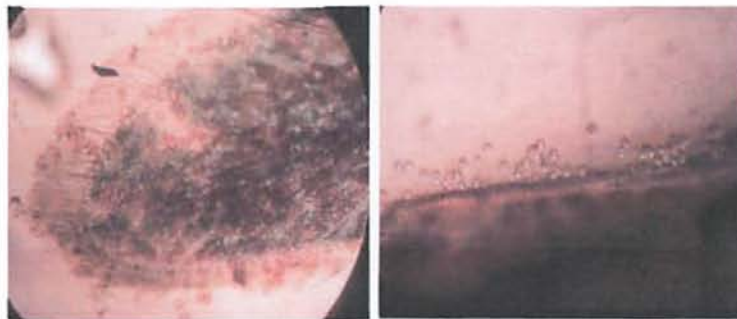


## BAB 5

## HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil Identifikasi *Zoothamnium penaei* pada udang vaname

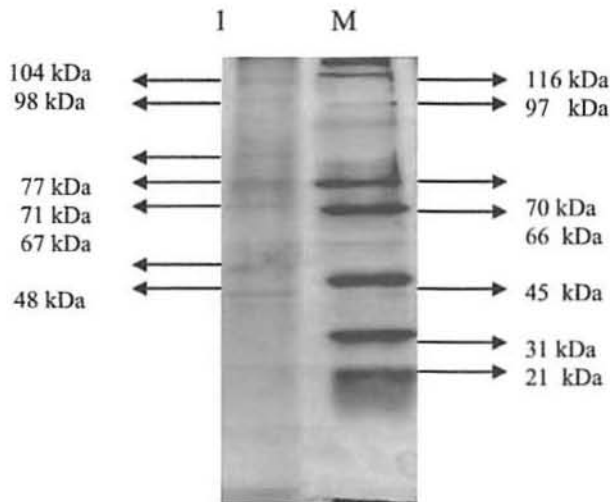
Hasil identifikasi menunjukkan bahwa seluruh sampel udang positif terserang zoothamniosis yang disebabkan oleh *Zoothamnium penaei*. Berdasarkan hasil identifikasi parasit menunjukkan bahwa 63 (51,22%) dari 123 ekor udang asal pertambakan di Gresik positif terserang *Zoothamnium penaei*. Semua Udang yang terserang zoothamniosis menunjukkan gejala klinis pada seluruh permukaan tubuh dan insang terdapat parasit yang menempel dan berwarna putih kecoklatan. Di samping itu juga nampak adanya saluran pencernaan yang kosong, permukaan tubuh dan insang keruh dan kotor. Beberapa udang menunjukkan adanya kerusakan pada organ seperti antena, rostrum, ekor dan kaki jalan maupun kaki renang. Gambaran udang yang terinfeksi *Zoothamnium penaei* disajikan pada Gambar 5.1.



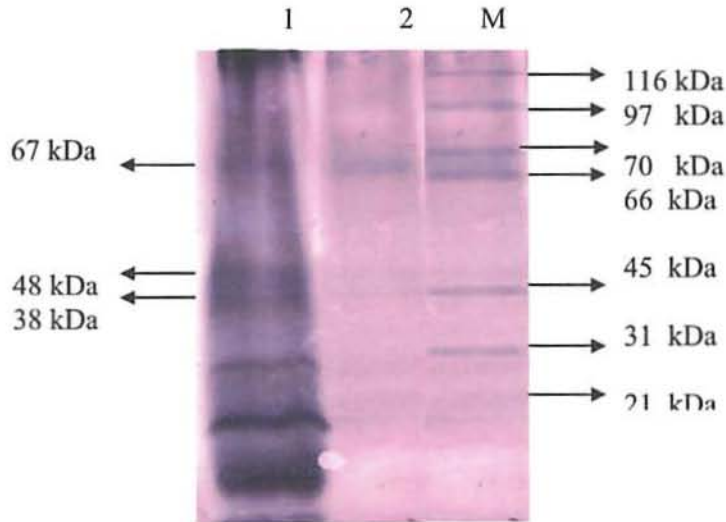
Gambar 5.1. Gambaran Infestasi *Zoothamnium penaei* pada Beberapa Organ.  
A: Ekor dan B: Punggung (Perbesaran 100x)

## 5.2. Hasil Isolasi Protein Membran dengan SDS-PAGE.

Hasil karakterisasi protein membran *Zoothamnium penaei* dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5.2, yang menunjukkan bahwa terdapat protein yang digambarkan dalam bentuk pita pada gel SDS-PAGE 15%. Pada gel SDS-PAGE ditemukan adanya 7 pita (band), yaitu protein dengan berat molekul (BM) 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa. Gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat pita protein membran MP 38 dengan Berat Molekul 38, 48 dan 67 kDa, sedangkan hasil karakterisasi protein membran imunogenik MP 38, MP48 dan MP67 dengan Western Blotting disajikan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.2. Hasil Karakterisasi Protein Membran *Zoothamnium penaei* dengan SDS-PAGE 15% dengan Pewarnaan Comaïsse Blue  
Keterangan : Lajur (1) : protein membran sampel dan lajur (M): Marker



Gambar 5.3. Hasil Analisis Protein membran *Zoothamnium penaei* dengan Teknik *Western Blotting*

Keterangan : Lajur (1) dan (2) : Protein Membran dan Lajur (3) : Marker

Hasil karakterisasi protein membran *Zoothamnium penaei* dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5.2, yang menunjukkan bahwa terdapat protein yang digambarkan dalam bentuk pita pada gel SDS-PAGE 15%. Pada gel SDS-PAGE ditemukan adanya 7 pita (band), yaitu protein dengan berat molekul (BM) 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa. Gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat pita protein membran MP 38 dengan Berat Molekul 38, 48 dan 67 kDa, sedangkan hasil karakterisasi protein membran imunogenik MP 38, MP48 dan MP67 dengan Western Blotting disajikan pada Gambar 5.3.

### 5.3. Hasil Pemeriksaan Infestasi *Zoothamnium penaei* pada Udang Vaname Pada Uji Tantang

Hasil pemeriksaan infestasi *Zoothamnium penaei* pada udang vaname pada akhir uji tantang disajikan pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Infestasi Parasit pada Udang Vaname pada saat Akir Uji Tantang**

Kelompok Perlakuan	Jumlah udang vaname yang positif (%)	Jumlah udang vaname yang negatif (%)
Kelompok Udang vaname yang dipelihara tanpa dipapar Protein (K0)	34 <sup>a</sup>	66 <sup>d</sup>
Kelompok udang yang dipelihara yang tidak dipapar dengan PBS (K1)	68 <sup>b</sup>	32 <sup>c</sup>
Kelompok Udang yang dipelihara dan dipapar dengan Protein (K2)	16 <sup>c</sup>	84 <sup>f</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada satu kolom dan baris yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Tabel 5.1. menunjukkan bahwa infestasi parasit pada udang vaname yang tertinggi terjadi pada udang yang tidak diimunisasi dan diinfestasi parasit (K1) yaitu 68% yang positif terinfestasi parasit, yang berbeda sangat nyata dengan kelompok udang yang diberi protein dan diinfestasi parasit yaitu sebesar 16%.

### 5.5. Hasil Penghitungan THC dan DHC Udang Vaname pada Uji Tantang

Hasil penghitungan THC dan DHC udang vaname dari semua perlakuan disajikan pada Tabel 5.3. Pada Tabel 5.3 menunjukkan bahwa THC dan DHC antara udang vanamei yang diimunisasi dengan protein dan yang tidak diimmunisasi terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Total haemosit tertinggi terdapat pada udang vaname yang diimmunisasi dengan protein dan diinfestasi (K2) dan berbeda nyata dengan udang yang diimmunisasi dengan protein tapi tidak diimmunisasi ( $p < 0,05$ ). Untuk total diferensial haemosit (DHC) nampak bahwa udang yang diimmunisasi dengan protein menunjukkan jumlah yang tertinggi sebanyak 59,21% yang berbeda dengan DHC pada udang yang tidak diimmunisasi dengan protein dan diinfestasi parasit yaitu 51,28% dan 25,21%) yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata (Tabel 5.2).

**Tabel 5.2. Hasil Penentuan THC dan DHC Udang Vannamei yang Diimunisasi dengan Protein Membran**

Kelompok Perlakuan	Total Haemosit (THC) ( $10^6$ sel/ml)	Total Diferensial Haemosit (DHC) (%)
Kelompok Udang vaname yang dipelihara tanpa dipapar Protein (K0)	69,24 <sup>a</sup>	31,54 <sup>d</sup>
Kelompok udang yang dipelihara yang tidak dipapar dengan PBS (K1)	49,32 <sup>b</sup>	51,28 <sup>e</sup>
Kelompok Udang yang dipelihara dan dipapar dengan Protein (K2)	41,83 <sup>c</sup>	59,21 <sup>d</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada satu kolom dan baris yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Meningkatnya differensial sel haemosit (DHC) dapat digunakan sebagai gejala atau tanda adanya infeksi patogen pada tubuh inang. Infeksi ini akan menyebabkan inflamasi, yang merupakan karakteristik pertahanan tubuh non spesifik karena adanya faktor yang mempengaruhi seperti parasit, bakteri, jamur, virus dan agen tidak hidup (Soderhall dan Cerenius, 1992 dan Rengpipat *et al.*, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan THC dan DHC terutama DHC pada semua kelompok udang K1 karena terjadi infeksi sebesar 51,28% dan K2 karena adanya bahan imunostimulan dan infestasi parasit, yaitu 59,21%.

### 5.6. Hasil Penghitungan Kelulushidupan (SR) Udang Vaname pada Uji Tantang

Hasil penghitungan kelulushidupan udang vaname setelah 30 hari pemeliharaan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kelulushidupan udang vaname yang diberi protein membran menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) Kelulushidupan udang vaname tertinggi terjadi pada udang yang diberi protein membran imunogenik MP38 yaitu sebesar 94% dan diikuti oleh MP48 dan MP67 yaitu 84% dan 72% (Tabel 5.3)

**Tabel 5.3. Hasil Analisis Statistik Kelulushidupan Udang Vanamei Yang Diimunisasi dengan Protein Membran**

Kelompok Perlakuan	Kelangsungan Hidup Udang ( % )
Kelompok Udang vaname yang dipelihara tanpa dipapar Protein (K0)	74,00 <sup>a</sup> ± 5,47
Kelompok udang yang dipelihara yang tidak dipapar dengan PBS (K1)	38,00 <sup>bc</sup> ± 8,37
Kelompok Udang yang dipelihara dan dipapar dengan Protein (K2)	86,00 <sup>d</sup> ± 4,47

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada satu kolom dan baris yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ )

### 5.7. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara infestasi parasit pada udang vaname yang diberi protein membran imunogenik MP38, 48 dan 67. Faktor utama yang mendukung perbedaan tersebut, kemungkinan adalah dosis protein membran yang masuk pada masing-masing tubuh udang berbeda – beda. Hal ini sangat tergantung dari kondisi dan kemampuan udang dalam mendapatkan pakan yang diberikan, sehingga akan berpengaruh dalam peningkatan pengaktifan sel pertahanan tubuh udang. Disamping itu kualitas air pemeliharaan juga dapat mempengaruhi tinggi rendahnya infestasi parasit tersebut. Secara umum Tabel 5.4 menunjukkan bahwa kualitas air pemeliharaan udang vaname pada udang yang tidak diinfestasi dan tidak diimunisasi lebih jelek jika dibandingkan pada dua perlakuan lainnya. Kadar oksigen terlarut, salinitas, pH dan amoniak yang rendah pada perlakuan III, menyebabkan lebih beratnya derajat infestasi dan lebih besarnya jumlah zooid yang menginfestasi. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Tonguthai (1991), Mahasri (1999) dan Zaleski dan Claps (2000), yang mengatakan bahwa serangan *Zoothamnium penaei* akan meningkat pada

perairan dengan kandungan oksigen terlarut rendah (< 3 ppm) dan pada salinitas rendah (Tompo dan Susianingsih, 2007). Hal ini didukung juga oleh hasil penelitian dari Mahasri (1996) bahwa kadar oksigen terlarut yang rendah (< 3 ppm) infestasi parasit meningkat dari 21% menjadi 89%.

Peningkatan THC dan DHC ini dapat digunakan indikasi adanya reaksi pertahanan tubuh udang terhadap infestasi *Zoothamnium penaei*. Perbedaan THC dan DHC pada antar kelompok perlakuan udang pada uji kemampuan proteksi protein ini, kemungkinan disebabkan oleh adanya tingkat imunogenitas dari protein membran MP38, MP48 dan MP67. Menurut Baratawidjaja (2004) yang mengatakan bahwa imunogenitas protein ditentukan oleh berat molekul yang besar.

Jika dilihat Tabel 1. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara THC dan DHC udang vannamei yang diimunisasi protein membran imunogenik MP38, MP48 dan MP67 dengan dosis protein dan diinfestasi dengan zooid *Zoothamnium penaei* yang sama. Udang vannamei yang diimunisasi dengan protein membran MP38 menunjukkan mempunyai nilai yang tertinggi yaitu 68,98 sel/ml dan DHC sebesar 295,58%. Nilai ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan THC udang yang diimunisasi dengan protein. Sedangkan DHC udang yang diimunisasi dengan protein membran, tertinggi terjadi pada imunisasi protein dengan nilai 27,23%. Hal ini menunjukkan bahwa semua protein membran dapat meningkatkan THC dan DHC, walaupun kemampuannya berbeda. Peningkatan ini menunjukkan adanya kekebalan tubuh udang vannamei terhadap serangan zoothamniosis.

Terjadinya peningkatan yang nyata dari DHC (sel haemosit granular), diduga karena udang tidak mempunyai sel memori pada sistem kekebalan tubuh, sehingga tidak mampu mendeteksi bahan patogen yang pernah terpapar. Dengan demikian dapat

dikemukakan bahwa imunostimulan protein membran ini dapat menginduksi mekanisme pertahanan tubuh udang. Akan tetapi membutuhkan waktu untuk merangsang organ hematopoetik agar memproduksi granulosit untuk melawan serangan zoothamniosis. Granulosit ini akan menghancurkan patogen dengan jalan menelan patogen tersebut, sehingga sel granulosit ini akan bermigrasi ke daerah-daerah yang mengalami infestasi parasit. Hasil ini diperkuat dengan pendapat Person *et al*, (1987) dan Van de Braak (2002) yang mengatakan bahwa jumlah haemosit dalam *crayfish* menentukan kekebalan tubuh udang terhadap agen patogen. Dampak terjadinya penurunan THC dan DHC tersebut menyebabkan kerusakan pada inang yang ditandai dengan terjadinya melanisasi oleh patogen pada jaringan kutikula, penetrasi pada jaringan kulit dan insang udang vannamei yang biasanya akan diikuti dengan kematian.

Kelulushidupan udang vaname terendah terjadi pada udang vannamei yang diimunisasi dengan protein membran MP67 yang hanya mencapai 72,00%, sedangkan yang tertinggi terjadi pada udang vannamei yang diimunisasi dengan protein membran MP 38 yaitu 94% dan diikuti dengan protein sebesar 88%. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan karena sifat imunogenitas dari ke tiga protein tersebut. Jika dilihat dari berat molekul protein membran MP67 mempunyai berat molekul lebih besar dari pada MP38 dan MP48. Di samping mempunyai berat molekul yang tinggi, untuk mempunyai tingkat imunogenitas yang tinggi, protein tersebut harus mempunyai struktur yang kompleks. Menurut pendapat Tizard (1988) dan Baratawidjaja (2004) protein yang bersifat imunogenik mempunyai berat molekul yang besar lebih dari 1000 Dalton dan mempunyai struktur yang kompleks. Ke tiga protein tersebut mempunyai berat molekul di atas 1000 Dalton, dengan demikian untuk menjawab perbedaan kemampuan proteksi ini masih perlu diteliti susunan asam amino yang terkandung pada masing-masing



protein. Selanjutnya oleh Tizard (1988) dikatakan bahwa asam amino aromatik mempunyai sifat antigenitas yang tinggi jika dibandingkan dengan jenis asam amino yang lain.

### **5.8. Luaran yang sudah dicapai**

Luaran yang sudah dicapai sampai dengan bulan November 2018 dari penelitian tahun pertama dan kedua, adalah sebagai berikut :

1. Sertifikat dan Artikel yang sudah published pada Prociding terindeks scopus dari Internasional Fisheries Symposium (IFS) dengan presentasi oral dan artikel sudah Published sebanyak 2 buah, dengan judul :
  - 1) Effectivity of Immunostimulant from *Zoothamnium penaei* Protein Membrane for Decreasing the Mortality Rate of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Traditional Pond “. (URL : IOP Conf. Series : Earth and Environmental Science 137 (2018)012020.
  - 2) Immune Response and Parasitic Infestation on Pacific White Shrimp (*Litopenaeus penaei*) in Immuno-Probio Circulation System (SI-PBR) in Ponds. (URL : IOP Conf. Series : Earth and Environmental Science 137 (2018)012024.
2. Sertifikat (Oral Presentation) dan Prociding Scopus IOP (Under Reviewe) International Conference on Fisheries and Marine Science (Incofims 2018)
3. Draft artikel untuk dipublikasikan pada jurnal internasional terindeks scopus Indian Veterinary Journal masih dalam proses revisi dan akan segera submit.
4. Letter of Acceptance dan artikel International Fisheries Symposium 2018 Thailand
5. Draft Buku Referensi yang berbasis hasil penelitian dan akan diajukan untuk mendapatkan ISBN masih menunggu hasil analisis data, ditargetkan selesai

**tahun 2018.**

- 6. Tersedianya Produk Bahan Imunostimulan dari Protein *Zoothamnium penai* yang sudah diuji pada udang vaname di tambak.**
- 7. Proses Penyusunan draft pengajuan hak paten sambil menunggu data hasil penelitian terkumpul semua dan selesai analisis data**

## BAB 6

## KESIMPULAN DAN SARAN

## 6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diajukan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* dapat meningkatkan pertahanan tubuh, menurunkan infestasi parasit dan meningkatkan kelulushidupan udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak.
2. Protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* dapat meningkatkan respon imun (THC dan DHC) udang vaname (*Lithopenaeus vannamei*) di Tambak tradisonal.
3. Protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* dapat meningkatkan kelulushidupan udang vaname di tambak tradisonal dari 23% menjadi 89%.

## 6.2. Saran

Saran yang dapat diajukan dari penelitian ini adalah bahwa penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengetahui efektifitasnya pada budidaya udang pola semi intensif dan intensif dan bahkan pada pola super intensif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amos WB, Routledge LM, and Yew FF, 1975. Calcium-binding proteins in a vorticellid contractile organelle. *Cell Sci J*, 19 (1) : 203-213.
- Baratawidjaja C, 2004. *Imunologi Dasar*, 4st ed. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Blaxhall, P. and K. Daisley. 1993. Some blood parameters of the Rainbow Trout I. The Kamloops variety. *J. Fish. Biol.* 5 : 1-8.
- Chamratchakool P, 1996, *Health Management in Shrimp Ponds*, Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp. 50 – 53.
- Clark, T.G., Tian-Long Lin and H.W. Dickerson, 1996. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp.6825 – 6829, June.
- Fegan, D.F. Nicles, T. Flegel, S. Rossuwan, M. Waiyakaruitata. 1993. The Development of A Method for Determining the quality of post larva of *Penaeus monodon* Fab.. *Asian Fisheries Society Conferences*. Oktober 1993. 23 hal.
- Foster CA, Sharpie TG and Hawkins WE, 1998. Fine Structure of the Peritrichous Ectocomensal *Zoothamnium Sp*, with emphasis on mode of attachment to Penaeid shrimp, *Cool Fish University Washington, Seattle, W.A*, 98195, USA, *Fish Dis.* : 1 (4) : 321 – 335.
- Haliman, R.W dan D. Adijaya, 2005. *Udang Vannamei, Penebar Swadaya*, Depok. Jawa Barat
- Itabashi T, Mikami K and Asai H, 2003. Characterization of the spasmin I gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centris. *Res. Microbiol J*, 154 ( 5 ) : 361 - 367.
- Itabashi T, Terasaki T and Asai H, 2004. Novel Nuclear and Cytoplasmic Proteins Detected by Anti-*Zoothamnium arbuscula* ( Protozoa ) Spasmin 1 Antibody In Mammalian Cells Are Dependent on the Cell Cycle, *Biochem J*, 136 (5) : 651-657.
- Itami, T, 1994. Body Defense System of Penaeid Shrimp, *Seminar on Fish Physiology and Prevention of Epizootics*, Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries, Japan, 7 : 59-65.
- Leff, A.A., T. Yoshinaga and H.W. Dickerson, 1994. Cross immunity in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against two immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet), *J. of Fish Diseases*, Vol. 17, pp. 429 – 432.
- Lin, T.L., T.G. Clark and H. Dickerson, 1996. Passive Immunization of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) against the Ciliated Protozoan Parasite *Ichthyophthirius*

- multifiliis* by Use of Murine Monoclonal Antibodies, *Infection and Immunity*, Oct, pp. 4085 – 4090.
- Mahasri G, 1996. Pengaruh manipulasi tingkat aerasi dan padat tebar terhadap Infestasi parasit protozoa kelas ciliata pada benur udang windu, Thesis, IPB, Bogor : 67 halaman.
- \_\_\_\_\_, 1999. Perkembangan Jumlah Ciliata Patogen pada Udang Windu pada Padat Tebar dan Aerasi yang Berbeda, *Media Kedokteran Hewan*, Unair, Vol. 15, No. 4.
- \_\_\_\_\_, 2007. Protein Membran Immunogenik *Zoothamnium penaei* Sebagai Bahan Pengembangan Immunostimulan pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus) Terhadap Zoothamniosis. Makalah Disampaikan pada Seminar Internasional, FKH – Unair. Surabaya.
- Maki, J.L. and H.W. Dickerson, 2003. Systemic and Cutaneous Mucus Antibody Responses of Channel Catfish Immunized against the Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 10, No. 5, pp.876 – 881.
- Pylawka, S and Buhse, Jr HE, 2003. Protein Synthesis and Telotroch Formation in *Vorticella convallaria*, *Eukaryot Microbiol J*, 198 : 45 – 52
- Person M, Cerenius L and Söderhäll K, 1987. The Influence of Haemocyte Number on the Resistance of the Freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the Parasitic fungus *Aphanomyces astaci*, *Fish Disease J*, 10 : 471-477.
- Rantam FA, 2003. *Metode Immunologi*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Routledge LM, 1978. Calcium-binding proteins in the Vorticellid spasmoneme : Extraction and Characterization by Gel Electrophoresis,, *Cell Biology J*, 77 : 358-370.
- Rukyani A, 1996. Jenis Penyakit Udang di Tambak dan Cara Pengendaliannya, Makalah Pertemuan Aplikasi Paket Teknologi Pertanian, tgl. 9 – 11 Januari di BIP Lampung.
- Scopes, R.K. 1994. *Protein Purification. Principle and Practice*. Third Edition. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg.
- Sindermann CJ, 1997, Ciliate Infestation, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 98 (1) : 136 –138.
- Söderhäll, K and Cerenius L, 1978, Crustacean Immunity, *Annual Rev. of Fish Diseases*, pp. 3 – 23.
- Steel RG. and Torrie JH, 1993. *Prinsip Prosedur Statistika*, Terjemahan oleh Bambang Sumantri, Gramedia, Jakarta, hal 425-478.
- Sumawidjaja K, 1991. Penyakit Benih Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus), Makalah Seminar hasil-hasil Penelitian, Institut Pertanian Bogor, 7 April.

- Tizard IR, 1988. Pengantar Imunologi Veteriner, (Terjemahan). Airlangga University Press, Surabaya.
- Tonguthai K, 1991. Diseases of the Freshwater Prawn, *Machrobrachium rosenbergii*, AAHRI Newsletter Article, Vol. 4 No. 2, Bangkok, Thailand.
- Van de Braak, K. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), Disertation, van Wareningen Universiteit, Germany.
- Venkatesan VB and SVC Srinivasan. 1995. Transport on the infestation of Peritrich ciliate *Zoothamnium Sp.* and *Epystylis Sp.* on pond natured tigerprawn, J. Inland. Fish Soc., India. 2 (13) : 107 – 109.
- .Zang, X; C. Huang, X. Xu; C.L. Hew. 2002. Identification and Localization of Prawn White Spot Syndrome Virus Gene that Encodes an Envelope Protein. J. of Virol. 83: 1069 – 1074.

Lampiran 1. Sertifikat dan Artikel yang sudah published pada Prociding terindeks scopus dari Internasional Fisheries Symposium (IFS) Malang, Indonesia



PAPER • OPEN ACCESS

**Effectivity of immunostimulant from *Zoothamnium penaei* protein membrane for decreasing the mortality rate of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in traditional plus pond**

To cite this article: G Mahasri et al/2018 JOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 137 012020

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Related content

- [Polyculture Engineering technology of larval red tilapia \(\*Oreochromis niloticus\*\) and white shrimp \(\*Litopenaeus vannamei\*\) based for protease enzyme](#)  
I Samiojan and D Pochimbadi
- [Effect of probiotic culture water on growth, mortality, and feed conversion ratio of Vaname shrimp \(\*Litopenaeus vannamei\* Boone\)](#)  
M Bachrudin, M Chulizah, S Isiqomah et al.
- [Immune response and parasitic infestation on Pacific white shrimp \(\*Litopenaeus vannamei\*\) in immuno-probio circulation system \(I-PRC\) in ponds](#)  
G Mahasri, P D W Sari and Prayogo



## Effectivity of immunostimulant from *Zoothamnium penaei* protein membrane for decreasing the mortality rate of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in traditional plus pond

G Mahasri<sup>1\*</sup>, R Kusdarwati<sup>1</sup>, Kusumiyati<sup>1</sup>, Roz<sup>1</sup>, H Gusrihandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Fish Health Management and Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine, Universitas Airlangga, Campus C Mulyorejo Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Fish Quarantine Center and Quality Control of Fishery Products, Class I, Surabaya, Indonesia

E-mail: mahasritot@gmail.com

**Abstract.** The purpose of this research was to analyze immunogenic membrane protein as immunostimulant development material to control the mortality of white shrimp in traditional plus pond. This research was designed to use explorative experiment and experimental laboratory methods which used completed random sampling design. Collected data was analyzed with analysis of variance for examination of survival rate (SR), total haemocyte count (THC) and differential haemocyte Count (DHC). The research divided into 2 part of rise: (1) Identification, cultivation *Zoothamnium penaei*, analyzed of membrane protein by SDS-PAGE, (2) Field test protein membrane on Survival Rate level, immune response (THC and/or DHC level) and infestation of *Zoothamnium penaei* in traditional plus pond. The result showed that there were seven bands membrane protein of *Zoothamnium penaei* with molecular weight 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa by using SDS-PAGE. Immunogenicity tested decrease by using ELISA and western blotting there are only found three bands with molecular weight 38 kDa, 48 kDa dan 67 kDa. The membrane protein could increase the immune response and decrease the mortality, by subsequently, it could increase the survival rate from 17% until 68% and pressured the parasite infestation of white shrimp.

**Lampiran 2. Artikel yang sudah published pada Prociding terindeks scopus dari Internasional Fisheries Symphosium (IFS) Malang, Indonesia**

IOP Conference Series: Earth and Environmental Science

---

**PAPER • OPEN ACCESS**

Immune response and parasitic infestation on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in immuno-probio circulation system (SI-PBR) in ponds

To cite this article: G Mahasri et al 2018 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 137 012024

View the [article online](#) for updates and enhancements.

**Related content**

- [Effectivity of immunodiluant from \*Zootrichomonium penaei\* protein membrane for decreasing the mortality rate of white shrimp \(\*Litopenaeus vannamei\*\) in traditional plus pond](#)  
G Mahasri, R Kusdirwati, Kameyati et al.
- [The effect of hydrogen peroxide on N:P ratio and phytoplankton diversity in Vannamei shrimp \(\*Litopenaeus vannamei\*\) ponds in Banyuwangi, East Java](#)  
D N Darali, Rizki and K Rafiqy
- [Content of Cr, Cu, Pb, and Zn on Pacific white shrimp cultured in modern farm at BLUPPH, Karawang, West Java](#)  
N D Taharina, A Fatman, T Sawanting et al.

## Immune response and parasitic infestation on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in immuno-probio circulation system (SI-PBR) in ponds

G Mahasri<sup>1,2</sup>, P D W Sari<sup>1</sup> and Prayogo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Fish Health Management and Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine, Universitas Airlangga, Campus C Mulyorejo 60115, Indonesia

E-mail: mahasri01@gmail.com

**Abstract.** The main causes of death of pacific white shrimp in aquaculture are diseases. One effort to control diseases by improving the defense ability of shrimp body against diseases and optimizing water quality during farming through the application of a new aquaculture technology called Immuno-Probiocirculation System (SI-PBR). This research aimed to analyze immune response on Total Haemocyte Count (THC) and Differential Haemocyte Count (DHC), parasitic infestation on pacific white shrimp in many ages, survival rate of pacific white shrimp during farming period for 90 days in SI-PBR. The results of this research showed that the lowest parasitic infestation (*Zootamnium penaei*) is 12.46 % that happened on 90-days-old shrimp in SI-PBR pond, while the highest infestation is on the shrimp not given SI-PBR, reaching 54.65 %. In addition, the immune response (THC and DHC) also increased. The highest survival rate discovered in 90 days shrimp farming is 80% using SI-PBR. This is higher than the pond without SI-PBR, which is 22 %. Therefore, SI-PBR in shrimp farming in traditional ponds is able to increase immune response, survival rate, and is also able to decrease parasitic infestation during 90 days of farming.

### 1. Introduction

Since late 1993, production of tiger shrimp has been declining drastically; only around 30 % of ponds

**Lampiran 3. Sertifikat (Oral Presentation) dan Procciding Scopus IOP (Under Review) International Conference on Fisheries and Marine Science (Incofims 2018)**





ACCEPTANCE LETTER

Surabaya, August 01, 2018

Authors : Gunanti Mahasri, Rozi, Akhmad Taufiq Mukti, WoroHastuti Saryantini  
Code : 43  
Title : CORRELATION BETWEEN ECTOPARASITE INFESTATION AND  
TOTAL PLATE COUNT OF *Vibrio* sp. ON PACIFIC WHITE SHRIMP  
(*Litopenaeus vannamei*) IN POND

We are pleased to inform you that your abstract has been accepted by scientific committee of The 1<sup>st</sup> International Conference on Fisheries and Marine Science

We encourage you to pay the submission fee before October 04, 2018 to the following bank account:

Account: Putri Desi Wulan Sari  
Bank Name: Bank MANDIRI; Swift Code: BMRIDJIA  
Account Number: 142-00-16427238 Branch Name: RS UNAIR SURABAYA

Please send your proof of your payment to email: [incofims@fpk.unair.ac.id](mailto:incofims@fpk.unair.ac.id) (cc to: [woro\\_hs@fpk.unair.ac.id](mailto:woro_hs@fpk.unair.ac.id)). Thank you.

Sincerely,



**CORRELATION BETWEEN ECTOPARASITE INFESTATION AND TOTAL PLATE COUNT OF *Vibrio* sp. ON PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) IN POND**

**Gunanti Mahesri<sup>1)</sup>, Rozi<sup>1)</sup>, Akhmad Taufiq Mukti<sup>1)</sup>, Woro Hastuti Satvanti<sup>1)</sup>**

*Departemen of Fish Health Manajemen and Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine, Universitas Ailangga, Surabaya, Indonesia*

E-Mail : mahatritot@gmail.com

Infestasi ektoparasit dan infeksi bakteri *Vibrio* sp. adalah merupakan factor utama penyebab kematian udang vaname (*Litopenaeus vannamei*), yang dapat menyebabkan kematian hingga 100% that can made 100% of shrimp were deadly, only three days after infection, especially in Hatchecry. Ektoparasit yang sering ditemukan pada budidaya udang antara lain adalah *Zoothamnium* sp. *Epistylis* sp dan *Vorticella* sp. Sedangkan bakteri vibrio yang sering ditemukan adalah *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parvulus*, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus*. The Aims of this research is to analyse the correlation between ectoparasite infestation and total plate count of *Vibrio* sp. on pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during culture until 90 days in pond. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survey dengan waktu pengambilan sampel pada hari ke 0, 30, 60 dan 90. The result of this research showed that ektoparasite yang ditemukan menginfestasi udang vaname adalah *Zoothamnium* sp. dan *Vorticella* sp. dengan jumlah ektoparasit yang terendah adalah 4 individu yang ditemukan pada hari ke 90 dan yang tertinggi 63 parasit pada hari ke 60 dengan total plate count *Vibrio* sp terendah adalah  $2.9 \times 10^4$  CFU/g dan tertinggi  $5.55 \times 10^4$  CFU/g. Semakin tinggi infestasi parasit semakin tinggi Total Plate Court (TPC) *Vibrio* sp. pada udang pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) yang dipelihara di Tambak.

Kata Kunci : *Litopenaeus vannamei*, Ectoparasite, Infestation, TPC, *Vibrio* sp.

**Lampiran 4. Draft artikel untuk dipublikasikan pada jurnal internasional  
Terindeks Scopus Indian Veterinary Journal**

**FIELD STUDY EFEKTIVITY OF IMUNOSTIMULANT FROM PROTEIN  
MEMBRAN IMMUNOGENIC *Zoothamnium penaei* FOR PRESSED  
MORTALITY OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)  
IN SEMI INTENSIVE POND**

Gunanti Mahasri, Kismiyati and Laksmi Sulmartiwi  
Department of Fish Health Manajement and Aquaculture, Faculty of Fisheries and  
Marine , Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia  
E-mail : [mahasritot@gmail.com](mailto:mahasritot@gmail.com)

White shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ) is one of species of Crustacean import from Amerika and entry in Indonesia since 1998, that was developed by cultured since 2002, but there are many factors to influence to develops as specially is diseases that can make 100% of the shrimp mortality in three days after infection. Zoothamniosis is one of the shrimp diseases which can cause death particularly at germ stage, the prevalency is still is still high in the field. The purpose of this research as follow to analysed immunogenic membrane protein as immunostimulant development material for pressed the mortality of white shrimp in traditional plus pond.

This research was designed to use explorative experiment and experimental laboratory methods which used completed random sampling design. Collected data was analyzed with analysis of variant for examination of *Survival Rate* (SR), *Total Haemocyte Count* (THC) and *Differential Haemocyte Count* (DHC). The research divided into 2 Years, The first : (1) Identification, cultivation *Zoothamnium penaei*, analysed of membrane protein by SDS-PAGE, polyclonal antibody production in rabbit, antibody titer examination by ELISA and characterization of immunogenic membrane protein by Western Blotting, (2) Immunogenic membrane protein protection test on Survival Rate level and immune response (THC and/or DHC level). The second Year will be analyse the effectivity of the immunogenic membrane protein *Zoothamnium penaei* in traditional plus pond.

The Result showed that are seven bands membrane protein of *Zoothamnium penaei* with molecular weight 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa by using SDS-PAGE. Immunogenisity Analyzed Assaay by using ELISA and Western Blotting there are only found three bands with molecular weight 38 kDa, 48 kDa dan 67 kDa. The membrane protein can increased the immun respons and pressured the mortality and parasite infestation of pacific white shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ) in traditional shrimp plus pond, so it can develop to immunostimulant.

---

**Key Word** : *Lithopenaeus vannamei*, Protein Membrane, Immunogenic, Westetrn Blott, SDS-PAGE, THC, DHC, Survival Rate

**Introduction**

Journal of Aquaculture and Fisheries  
Journal of Aquaculture and Fisheries

FIELD STUDY EFFECT OF IMMUNIZATION FROM PROTEIN  
ANTIBIOTIC ANTIGENIC KNOWLEDGE FROM FISHES  
SUSCEPTIBILITY OF BACTERIAL DISEASE (AQUACULTURE)  
IN SOUTH EAST ASIA

Gunanti Mahasri, Kurniati and Laksmi Sumartini  
Department of Field Health Management and Aquaculture, Faculty of Fisheries and  
Marine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia  
E-mail: mahasri@fkip.unma.ac.id

While shrimp farming is one of species of aquaculture that has been developed since 1950s, it has been developed in Indonesia since 1980s. In many cases, the disease that can occur in shrimp farming is bacterial disease. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes.

This research was designed to test the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes.

The result shows that the protein antigenic knowledge from fishes can be used as an immunogen. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes. The purpose of this research is to study the immunogenicity of protein antigenic knowledge from fishes.

KEY WORDS: Immunization, Protein Antigenic Knowledge, Fishes, Bacterial Disease

Introduction



## Lampiran 5. Letter of Acceptance dan artikel International Fisheries Symposium 2018 Thailand



MOR 0121.2.05.044

Faculty of Science and Technology  
Prince of Songkla University  
Mueang Pattani 94000 THAILAND  
Tel: 66-73-311103  
Fax: 66-73-331130  
E-mail: ifs2018thailand@gmail.com

July 31, 2018

### LETTER OF ACCEPTANCE

Dear Gunanti Mahasri

Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University (PSU), together with the ASEAN Fisheries Education Network (ASEAN-FEN) is holding the 8<sup>th</sup> International Fisheries Symposium (IFS2018) with the theme "Sustainable Fisheries and Aquaculture for the benefits of Mankind" which will be held during November 18-21, 2018 at Hansa IR Hotel, Hatyai, Thailand.

On behalf of PSU, ASEAN-FEN and the organizing committee, we are glad to inform you that your abstract has been **ACCEPTED** as detailed follows:


Title : PROTECTION CAPACITY OF WHOLE PROTEIN *Zootherisma penaei* AS DEVELOPMENT MATERIALS FOR IMMUNOSTIMULANT ON PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) IN POND  
Type : Oral Presentation

For more information on registration, program and related activities, kindly visit our website at <http://ifs2018.sat.psu.ac.th>. If you require additional documents for visa, please contact us at [ifs2018thailand@gmail.com](mailto:ifs2018thailand@gmail.com).

Please be informed that the deadline of full paper submission is on December 31, 2018. 30 selected papers will be published in Songklanakarin Journal of Science and Technology ([www.sjst.psu.ac.th](http://www.sjst.psu.ac.th)). Others will be published as proceeding for IFS2018.

We are looking forward to welcoming you in Hatyai, Thailand.

Sincerely yours,

  
Assoc. Prof. Dr. Sukree Hajjamatun  
Chairperson of the Organizing Committee,  
Dean of Faculty of Science and Technology  
Prince of Songkla University



IFS 2018  
8<sup>th</sup> International Fisheries Symposium 2018

The 8<sup>th</sup> International Fisheries Symposium  
November 18 - 21, 2018  
Hatyai, Thailand

**PROTECTION CAPACITY OF WHOLE PROTEIN *Zootecumium pernai*  
AS DEVELOPMENT MATERIALS FOR IMMUNOSTIMULANT ON  
PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus setiferus*) IN POND**

Maharsi<sup>1</sup>; Gunanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Fish Health Management, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Corresponding author: ggnanti; maharitar@psu.ac.id

**Abstract**

The main problem on pacific white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) cultured is diseases infected that can cause mortality up to 100% after 2 to 3 days after. The purpose of this research was to analyzed the protection capacity of whole protein of *Zootecumium pernai* on pacific white shrimp in ponds. The research method used experimental to analyzed the immune response (Total Hemocyte Count and Differential Hemocyte Count), infestation of ectoparasite, Total Plate Count of *Vibrio* sp and the Survival Rate of pacific white shrimp in pond. The results showed that the immune response (THC and DHC) was increased on the shrimp that was exposed by whole protein of *Zootecumium pernai*. The Total Hemocyte Count (THC) on shrimp that was exposed by whole protein is  $48.26 \times 10^4$  cells / ml in shrimp 60 age days and the Differential Hemocyte Count (DHC) is 22.67 % was happened in 30 age days. There were 23 individual from 30 were positive infested by *Zootecumium pernai*, *Eurytemora* sp and *Parvicella* sp and infected by *Vibrio* sp. with Total Plate Count were  $14.67 \times 10^4$  cells / ml. The survival rate of shrimp that exposed by whole protein is 76% higher than the shrimp not exposed by whole protein that was 17%. Base on the research, the whole protein of *Zootecumium pernai* can be developed as an immunostimulant candidate.

---

**Keyword:** *Zootecumium pernai*, whole protein, infestation, infection, pacific white shrimp.

Lampiran 6. Draft Buku Referensi yang berbasis hasil penelitian ISBN

## LUARAN (DRAFT)

### PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PtUPT )



**BUDIDAYA UDANG VANAME (*Lithopenaeus vannamei*) POLA SEMI  
INTENSIF DENGAN MENGGUNAKAN SISTEM  
IMUNO-PROBIOSIRKULASI (SI-PBR)**

**Dr. Ir. GUNANTI MAHASRI, M.Si.**

**NIDN : 0009126004**

**Dr.Ir. KISMIYATI, M,Si.**

**NIDN : 0008085904**

DIBIYAI OLEH :  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN  
PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT, atas Inayah, Rachmat dan Hidayah-Nya sehingga BUDIDAYA UDANGVANAME (*Lithopenaeus vannamei*) POLA SEMI INTENSIF DENGAN SISTEM IMUNO-PROBIOSIRKULASI ini dapat terselesaikan. Buku referensi ini merupakan salah satu LUARAN dari Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2017..

Buku ini dibuat karena masyarakat pembudidaya udang sangat memerlukan suatu metode budidaya udang yang dapat memecahkan permasalahan pada budidaya udang. Kasus kematian udang windu yang terus menerus terutama di tambak tradisional dan semi intensif, sangat diperlukan jalan keluar untuk meningkatkan penghasilan para petambak, karena sebagian besar dari petambak sudah gulung tikar dan perlu melibatkan berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini, peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga,
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga,
3. Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
4. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan kegiatan ini.

Penulis menyadari bahwa laporan pengabdian ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaannya. Akhirnya penulis berharap semoga buku ini dapat bermanfaat dalam pengembangan budidaya perikanan dan bagi yang membacanya.

Surabaya, Oktober 2017

Penulis

**DAFTAR ISI**

HALAMAN JUDUL .....	1
KATA PENGANTAR .....	3
DAFTAR ISI .....	4
DAFTAR TABEL .....	5
DAFTAR GAMBAR .....	6
BAB I. PENDAHULUAN .....	7
BAB II. GAMBARAN METODE BUDIDAYA UDANG DENGAN SISTEMIMUNO-PROBIOSIRKULASI (SI-PBR) .....	11
BAB III. TEKNIK BUDIDAYA UDANG DENGAN SISTEM IMUNO-PROBIOSIRKULASI (SI-PBR) .....	16
A. Konstruksi Tambak .....	16
B. Persiapan Tambak .....	17
C. Pembuatan Petak Filter Biologis Ikan Bandeng .....	17
D. Penyediaan Benih .....	18
E. Sirkulasi Air .....	18
F. Pengelolaan Pakan dan Pertumbuhan Udang .....	19
G. Hasil Panen Udang dan Bandeng .....	20
BAB IV PENUTUP .....	23
DAFTAR PUSTAKA . .....	24

**DAFTAR TABEL**

Nomor Tabel		Halaman
1	Hasil Rata-rata Pemeriksaan Parameter Kualitas Air .....	19
2	Cara, Dosis dan Waktu Pemberian Pakan .....	19
3	Pertumbuhan Udang sampai Umur dua Bulan .....	20
4	Hasil Panen Udan pada Petak Pemeliharaan .....	21

**DAFTAR GAMBAR**

Nomor Gambar		Halaman
1	Desain Petak Tambak dengan SI-PBR .....	15

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

Udang windu ( *Penaeus monodon Fab* ) merupakan salah satu jenis udang laut yang mempunyai nilai ekonomis penting dan bergizi tinggi. Sampai dengan tahun 1993 udang windu merupakan primadona andalan komoditas ekspor non migas dari sektor perikanan. Akan tetapi sejak awal tahun 1994 hingga sekarang produksi udang windu mengalami penurunan yang disebabkan karena kasus kematian total yang terjadi sejak awal tahun 1994. Kematian yang terjadi secara massal di seluruh pertambakan di dunia ini terutama disebabkan oleh serangan penyakit dan kualitas air yang menurun. Dengan adanya kejadian tersebut menjadikan predikat sebagai primadona komoditas andalan sektor perikanan hanya tinggal sebuah kenangan.

Tahun 2002 Udang Vannamei yang masuk ke Indonesia dengan harapan dapat menggantikan kedudukan udang windu, namun kenyataannya masih belum dapat diharapkan. Hal ini menunjukkan bahwa usaha budidaya udang windu ini masih mempunyai prospek yang cerah dan merupakan andalan dari sektor perikanan. Nilai ekspor udang windu pada dekade sepuluh tahun yang lalu tepatnya pada tahun 1992 mencapai 1200 U\$ Dolar. Saat itu Indonesia termasuk empat besar dunia negara pengekspor udang windu. Sebagai sumber protein udang windu juga mempunyai peran yang besar dalam pemenuhan protein hewani asal ikan, karena nilai gizinya yang tinggi (Rosati, 1994).

Mulai tahun 1993 produksi udang windu di Indonesia menurun hingga sebesar 80%. Kondisi ini dikarenakan terjadinya kasus kematian udang windu baik di tambak maupun di Hatchery. Kasus ini disebabkan karena adanya serangan penyakit maupun

**Lampiran 7. Tersedianya Produk Bahan Immunostimulan dari Protein *Zoothamnium penaei* yang sudah diuji pada udang vaname di tambak.**



**Lampiran 8. Draft pengajuan hak paten dari Protein Membran Imunogenik  
*Zoothamnium penaei***



## DRAFT PENGAJUAN HAK PATEN BIASA



### IMUNOSTIMULAN DARI PROTEIN MEMBARAN *Zoothamnium penaei*

Oleh :

Dr. Ir. GUNANTI MAHASRI, M.Si.

NIDN : 0009126004

Dr.Ir. KISMIYATI, M,Si.

NIDN : 0008085904

Dr. LAKSMI SULMARTIWI , S.Pi.,M.Si.

NIDN : 0003027202

DIBIYAI OLEH :

DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN  
PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
OKTOBER  
2018

**DESKRIPSI****IMUNOSTIMULAN DARI PROTEIN MEMBRAN Imunogenik  
*Zoothamnium penaei*****5 Bidang Teknik Invensi**

Invesni ini berkaitan dengan produk imunostimulan dari protein membrane imunogenik *Zoothamnium penaei* yang sudah diuji coba baik di laboratorium dengan ujiantang maupun uji lapang untuk udang vaname (*Litopeneus vannamei*) di tambak baik tradisional plus, semi intensif maupun intensif. Hasil uji lapang menunjukkan bahwa imunostimulan ini dapat meningkatkan tingkat kelulushidupan udang vaname hingga mencapai 83%.

**15 Latar Belakang Invensi**

*Zoothamnium penaei*, merupakan protozoa dari kelas Ciliata, ordo Peritrica, familia Vorticellidae, genus *Zoothamnium*. Hidup berkoloni, mempunyai zooid bersifat dimorph, zooid yang lebih besar berbentuk globular, hasil pembelahan hanya memperbesar koloni (Ji dan Weibo, 2004). Zooid *zoothamnium* mempunyai peristom yang berbentuk lingkaran yang dikelilingi oleh silia, bagian dalam terdapat satu vakuola kontraktile dan beberapa vakuola makanan, nukleus, dan mempunyai tangkai (*pedicle*) pada bagian posterior yang didalamnya terdapat spasmonema. Tangkai tersebut merupakan alat untuk melekat pada inang. Spasmonema selalu berhubungan satu dengan yang lain pada tiap-tiap cabang pada setiap koloni (Debauffer dan Buhse, 1998). Secara lengkap gambaran morfologi *Zoothamnium* disajikan pada Gambar 2.3.

Menurut Sumawidjaja (1991), *Zoothamnium sp.* hidup berkoloni dan berwarna keputih-putihan. Hidup menempel

pada tubuh udang dengan bantuan semacam akar dan batang (*pedicle*) yang bercabang dua. Kadang-kadang tiga zooid atau lebih dalam satu koloni yang mempunyai bentuk dan model yang sama, tetapi sangat bervariasi dalam ukurannya. Zooid yang ditemukan pada benur udang di pantai Selatan pulau Jawa berukuran panjang  $44,35 \pm 7.391 \mu\text{m}$  ( $n = 37$ ) sedang di pantai Utara, panjang  $30.00 \pm 4.123 \mu\text{m}$  dan lebar  $22,56 \pm 3.005 \mu\text{m}$  dengan jumlah sampel sebanyak 39. Kemudian Mahasri (1996) menemukan zooid *Zoothamnium penaei* dengan ukuran panjang antara  $44,23 \pm 3,46\mu\text{m}$  dan lebar  $27,63 \pm 4,42 \mu\text{m}$ .

*Zoothamnium penaei* dapat Zoothamniosis merupakan yang penyakit parasiter pada udang yang disebabkan oleh *Zoothamnium penaei*. Penyakit ini juga disebut dengan penyakit udang lumutan atau penyakit udang berjaket atau udang bersepatu (Rukyani, 1996). Chamratchakool (1996), menyatakan bahwa *Zoothamnium penaei* merupakan jenis ciliata yang menyerang seluruh permukaan tubuh dan insang, sehingga pada kondisi oksigen rendah akan meningkatkan serangannya, yang menyebabkan udang akan lemas. Tonguthai (1991) mengatakan bahwa pada kasus infestasi berat seluruh permukaan tubuh udang akan tertempeli oleh parasit, sehingga mengakibatkan udang sulit bergerak, sulit bernafas dan sulit untuk ganti kulit. Hal ini akan menyebabkan udang stres dan akan mengalami kematian, terutama pada stadia larva 3 - 7 hari setelah infeksi. Saat zoothamnium menyerang udang, akan mengeluarkan mukus yang spesifik yang dapat menyebabkan peradangan pada kulit dan membahayakan kesehatan udang (Lightner, 1998).

Zoothamniosis ditemukan pada udang mulai stadia Zoea, Mysis, Pasca Larva dan dewasa. Prevalensi serangan

pada Larva (PL-1) dapat mencapai 80% (Mahasri, 1998). Faktor yang berpengaruh pada serangan penyakit ini adalah perairan dengan kadar oksigen rendah ( $< 3$  ppm), bahan organik, dan padat tebar tinggi. Jumlah zoid zoothamnium akan meningkat pada kondisi tersebut dan berbanding lurus dengan tingkat kematian udang, sehingga semakin tinggi jumlah zoid semakin tinggi tingkat kematian yang terjadi (Mahasri, 1999). Selanjutnya dikatakan bahwa semakin tinggi padat tebar semakin tinggi pula kematian udang, semakin rendah kandungan oksigen semakin meningkat serangan zoothamniosis. Zaleski dan Claps (2000) mengatakan bahwa serangan zoothamniosis sangat dipengaruhi oleh musim dan akan meningkat pada awal musim penghujan.

Gejala klinis dari zoothamniosis pada udang adalah seluruh atau sebagian permukaan tubuh dan insang akan tertempeli oleh parasit, sehingga akan tampak berwarna putih kecoklatan (putih krem). Gambaran udang yang terserang *Zoothamnium penaei* infestasi berat dan pada bagian-bagian insang, ekor, punggung dan kaki disajikan Gambar 2.4, dan 2.5.

Bila infestasi berat serangan akan menyebar hingga seluruh permukaan tubuh, insang, kaki dan rostrum. Hal ini akan mengakibatkan udang sulit bernafas, sulit bergerak, tidak dapat ganti kulit (*moulting*) dan berenang ke permukaan (Chamratchakool, 1996). Apabila menyerang di panti pembenihan, akan menyebabkan benih menjadi lemas dan bergerombol di beberapa tempat di sekitar aerasi (Mahasri, 1997).

### **Uraian Singkat Invensi Protein Membran Immunogenik.**

Diwan (1998) mengatakan bahwa secara umum fungsi protein membran adalah membantu memperkuat struktur sel yang bekerjasama dengan lapisan lipid dan jaringan microtubule, transportasi antar sel, tempat reseptor pada inang, interaksi antar sel dan membantu dalam mengenali sel yang lain.

Antigen merupakan suatu molekul yang mampu berikatan dengan antibody spesifik. Sedang antigenik adalah sifat suatu molekul atau zat yang memungkinkan untuk bereaksi dengan produk-produk dari respons imun spesifik, seperti antibodi (Tizard, 1988). Selanjutnya dikatakan bahwa terdapat dua ciri pokok antigenitas yaitu limitasi fisikokimiawi dan keasingan. Limitasi fisikokimiawi berarti bahwa agar dapat bersifat antigenik molekul harus besar, kaku dan kimiawi kompleks. Molekul kecil juga dapat berlaku sebagai antigen, akan tetapi molekul besar jauh lebih baik. Protein merupakan antigen yang baik karena merupakan makromolekul dan mempunyai struktur kimia yang kompleks. Keasingan artinya adalah sifat dasar bahan asing yang dapat dikenal sebagai bukan unsur tubuh yang normal. Protein dapat merupakan antigen yang baik bila mempunyai berat molekul lebih besar dari 1.000 Dalton dan mempunyai kerumitan struktur. Baratawidjaja (2004) mengatakan bahwa antigen yang juga disebut dengan imunogen adalah bahan yang dapat merangsang respons imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada tanpa memperhatikan kemampuannya untuk merangsang produksi antibodi.

Protein spasmin merupakan protein membran yang terdapat pada spasmonema pada tangkai (*contractile stalk*)

pada berbagai spesies dari familia Vorticellidae (Amos, et al., 1975; Routledge, 1978; Moriyama, et al., 1999; Mcutcheon, et al., 2002; Pylawka dan Buhse, 2003 dan Itabashi, et al., 2003).

5 Amos, et al., (1975) telah menganalisis protein dari spasmonema kontraktile dari *Zoothamnium arbuscula* dan membandingkan dengan protein lain pada organ lain yang berkontraksi. Deteksi protein ini dilakukan dengan Polyacrylamide Gel, hasil dari penelitian ini menunjukkan 10 bahwa hampir 60% protein di dalam Sodium Dodecyl Sulphate Gels tersebar pada pita (band) dengan berat molekul mendekati 20,000 kDa. Protein ini terdiri dari 2 protein yang sama besar yang disebut dengan protein spasmin 1 dan 2. Komposisi asam amino dari ke dua fraksi spasmin 15 tersebut yang dideterminasi dengan metode Flourimetrik menunjukkan kaya dengan gylsin dan serin tetapi tidak mengandung cystein dan methionin.

Routledge (1978), telah melakukan isolasi protein dari spasmonema kontraktile *Vorticella convollaria*, 20 *Carchesium polypinum* dan *Zoothamnium geniculatum*, yang diekstraksi dalam detergent, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), seperti urea dan Guanidine Hydrochloride (GuCl). Setelah diekstraksi dengan SDS, distribusi berat molekuler protein yang diidentifikasi dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa 25 berat molekul dari protein organ kontraktile mendekati 20,000 kDa.

Moriyama, et al. (1999), telah mengisolasi protein dari spasmonema *Zoothamnium sp.* dan menyatakan bahwa berat molekul dari rantai protein diestimasi mendekati 50 kDa dan 20 kDa, merupakan hasil sintesis dari ikatan protein 30 spasmonema oleh Mcutcheon, et al. (2002).

5 Itabashi, et al. (2003) telah melakukan karakterisasi molekuler protein spasmin *Zoothamnium arbuscula*, hasil yang didapat menunjukkan bahwa satu gen spasmin tidak mempunyai intron dan panjang genom 531 bp dan diprediksi akan menghasilkan 177 asam amino dengan berat molekul mendekati 19.659 Da (19,659 kDa). Sekuen asam mempunyai dua ikatan kalsium. Karakterisasi protein spasmin zoothamnium banyak dilakukan dengan metode SDS-PAGE dengan kadar gel 10% dapat digunakan untuk identifikasi berat molekul protein, hasil identifikasi berupa pita (*band*) dan penentuan berat molekulnya dilakukan dengan cara melihat kesetaraan dengan *marker*.

10 Itabashi, et al. (2004) menyatakan bahwa protein spasmin pada spasmonema *Zoothamnium arbuscula* sudah dapat dibuat antibodi poliklonal pada sel hela. Analisis hasil immunoblotting menunjukkan bahwa lokasi protein antigen pada berat molekul 68/71 kDa, 55 kDa dan 70 kDa. Brunk (1999) merekomendasi bahwa protein membran *Tetrahymena sp.* yang merupakan satu familia dengan *Ichthyophthyrius multifiliis* mempunyai kemungkinan besar dikembangkan sebagai bahan vaksin sub unit terhadap penyakit bintik putih (*white spot*) pada ikan. Preer (1986) menemukan protein membran antigenik pada *Paramecium* dengan SDS-PAGE dan Western Blotting, dengan berat molekul 61 kDa, 63 kDa dan 65 kDa.

20 Lin, et al. (1996) menemukan protein membran antigenik dari theront *Ichthyophthyrius multifiliis* serotype G1 berat molekul 48 kDa dan 60 kDa, dan serotype G3 dengan berat molekul 55 kDa, dengan metode standart. Sedangkan Maki dan Dickerson (2003) sudah berhasil mengekstrasi protein membran theront *Ichthyophthyrius multifiliis* serotype G5 dan mengidentifikasi SDS-PAGE 12%

serta *Western Blotting* yang dilanjutkan pemurnian dengan Kromatografi Imunoafinitas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa telah ditemukan protein membran imunogenik dengan berat molekul 55 kDa dan 35 kDa.

5           Imunostimulan yaitu suatu bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah putih (leukosit), sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit (Raa, 2000). Imunisasi adalah memasukkan bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah  
10           putih (leukosit) sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit. Di dalam tubuh udang windu, vaksin akan merangsang haemosit untuk melakukan degranulasi dan protein akan dilepaskan seperti ikatan molekul.

15           Imunisasi pada udang adalah suatu usaha untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang dengan jalan memasukkan antigen ke dalam tubuh, dan selanjutnya juga dikenal dengan vaksinasi (Anderson, 1995). Vaksin merupakan produk yang dihasilkan dari suspensi mikroorganisme hidup maupun  
20           mati yang dapat menghasilkan kekebalan (Ellis, 1988). Itami et al. (1996) mengatakan bahwa pemberian vaksin (vaksinasi) dapat mencegah infeksi penyakit, karena bisa meningkatkan aktifitas fagosit haemosit dan proPO. Di samping itu vaksinasi juga dapat meningkatkan jumlah  
25           granulosit. Taslihan (1991) mengatakan bahwa terdapat penyebaran haemosit pada hepatopankreas pasca larva udang windu setelah dilakukan imunisasi. Penyebaran haemosit ini dapat diasumsikan sebagai bentuk dari mekanisme respon seluler terhadap masuknya benda asing ke dalam tubuh  
30           udang.

          Imunostimulan yang masuk ke dalam tubuh udang windu akan merangsang haemosit untuk melakukan degranulasi dan



akan melepaskan protein seperti *binding molecule* (*B*Glucan-binding protein /  $\beta$  G-BP, Lipopolysaccharide-binding protein / LPS-BP, Peptidoglycan-binding protein / PG-BP) coagulation factors (*transglutaminase*),  
5 *prophenoloxcide related factors* (*prophenoloxide activating enzyme, prophenoloxide, peroxinectin*), *protein inhibitors* ( $\alpha_2$  *macroglobulin*) dan *anti microbial substances* (*penaedin, lectin*). Beberapa protein yang dilepas ini akan digunakan untuk kepentingan respon imun seperti : *phagocytosis, encapsulation, melanization, coagulation*, aktivitas enzim  
10 *prophenoxidase*, opsonisasi, aktivasi mikroba serta proses aktivitas humoral dan seluler lain ( Soderhall et al., 1998 ; Van de Braak et al. 2000).

McKay dan Jenkin (1970), mengatakan bahwa imunisasi  
15 pada *crayfish* (*Parachaeraps bicarinatus*) sebanyak 4 kali dengan endotoksin 2.5  $\mu$ g dan  $2.5 \times 10^7$  vaksin dari bakteri *Pseudomonas sp.* dengan 4 kali penyuntikan menghasilkan perbedaan yang sangat nyata antara jumlah haemosit pada grup kontrol dan yang diimunisasi. Johanson dan Soderhall  
20 (1989) menyatakan bahwa imunisasi dapat merangsang haemosit untuk melepaskan sistem proPO (sistem komunikasi) dan protein probinding TGKpa (molekul sinyal) yang bertanggungjawab sebagai komunikator dan aktifator sel-sel untuk melakukan fagositosis dan enkapsulasi pada jenis  
25 crustasea. Protein yang dilepaskan pada saat vaksinasi digunakan untuk kepentingan respon imun seperti fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, koagolasi, aktivitas peroksidase, opsonisasi, aktivitas anti mikroba serta proses aktivitas humoral dan seluler lain (Van de Braak,  
30 2000).

Pemberian imunostimulan pada crustasea disebut juga vaksinasi tidak mempunyai efek samping dan sangat baik

untuk diterapkan pada organisme yang tidak mempunyai sel memori dalam sistem imunnya, sehingga dapat merangsang dan atau memaksimalkan respon imun non spesifik (Kwang, 1996). Vaksinasi dengan menggunakan bahan protein antigenik (imunogenik) masih belum banyak dilakukan. Menurut Rukyani (1998) pemberian Lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyi* secara oral pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) dalam waktu 42 hari dapat meningkatkan total haemosit dan menaikkan jenis sel granulositnya, sedangkan aktifitas fagositik dari sel haemosit sudah menunjukkan kenaikan pada hari ke 28 dan lebih tinggi lagi pada hari ke 42. Terjadinya peningkatan aktifitas fagositik dari sel-sel haemosit seiring dengan meningkatnya total haemosit dan jenis sel granulositnya akibat pemberian Lipopolisakarida.

Brunk (1999) merekomendasi bahwa protein membran *Tetrahymena* yang merupakan satu famili dengan *Ichthyophthirius multifiliis* dapat dikembangkan sebagai bahan vaksin sub unit terhadap *white spot* (penyakit bintik putih) pada ikan. Selanjutnya Leff, et al. (1994) dalam hasil penelitiannya dinyatakan bahwa ikan *Channel Catfish* (*Ictalurus punctatus*) termasuk dalam ikan Cyprinidae yang diinfestasi dengan *Ichthyophthirius multifiliis* stadia theront dengan dosis 5.000 dan 10.000 sel/ekor menunjukkan adanya perbedaan infestasi pada insang dan kulit mulai hari ke 14 pasca infeksi. Selanjutnya dikatakan oleh Clark, et al. (1996) bahwa ikan *Channel Catfish* yang diimunisasi protein membran dari theront serotype G3 dan G4 dapat menekan infestasi *Ichthyophthirius multifiliis* dari 78,9% menjadi 14,2% selama 24 jam pemeliharaan.

Lin, et al. (1996) melanjutkan penelitiannya bahwa telah menemukan protein membran antigen dari theront

serotype G1 terdiri dari protein dengan berat molekul 48 kDa dan 60 kDa, sedangkan serotype G3 hanya terdapat satu jenis protein membran yaitu dengan berat molekul 55 kDa. Selanjutnya protein membran antigen tersebut diimunisasikan pada ikan *Channel Catfish* dengan dosis 2 µg dan diinfeksi dengan 5.000 theront menunjukkan bahwa 138 survive dari 140 ekor.

Wang dan Dickerson (2002) menemukan protein membran antigen dengan menggunakan SDS-PAGE dan immunoblotting dengan Western blotting dari stadia theront *Ichthyophthirius multifiliis* berada pada berat molekul 10 - 70 kDa. Kemudian penelitian ini dilanjutkan dan terbukti menemukan protein membran antigen dengan berat molekul 55 dan 46 kDa. Selanjutnya protein membran antigen ini digunakan untuk imunisasi pada ikan *Channel Catfish* dengan dosis 10 µg/ikan yang disuntikkan dengan cara intra peritoneal dan ditantang dengan 15.000 sel/ikan. Hasil imunisasi menunjukkan bahwa sampai pada hari ke 84 ikan masih survive 27%, sedang pada kelompok kontrol semua sudah mati pada hari ke 14.

## **URAIAN INVENSI**

### **Imunostimulan pada Udang.**

Imunostimulan yaitu suatu bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah putih (leukosit), sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit (Raa, 2000). Imunisasi adalah memasukkan bahan kimia yang dapat mengaktifkan sel darah putih (leukosit) sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit. Di dalam tubuh udang windu, vaksin akan merangsang haemosit untuk

melakukan degranulasi dan protein akan dilepaskan seperti ikatan molekul.

5 Imunisasi pada udang adalah suatu usaha untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang dengan jalan memasukkan antigen ke dalam tubuh, dan selanjutnya juga dikenal dengan vaksinasi (Anderson, 1995). Vaksin merupakan produk yang dihasilkan dari suspensi mikroorganisme hidup maupun mati yang dapat menghasilkan kekebalan (Ellis, 1988). Itami et al. (1996) mengatakan bahwa pemberian vaksin (vaksinasi) dapat mencegah infeksi penyakit, karena bisa meningkatkan aktifitas fagosit haemosit dan proPO. Di samping itu vaksinasi juga dapat meningkatkan jumlah granulosit. Taslihan (1991) mengatakan bahwa terdapat penyebaran haemosit pada hepatopankreas pasca larva udang 10 windu setelah dilakukan imunisasi. Penyebaran haemosit ini dapat diasumsikan sebagai bentuk dari mekanisme respon seluler terhadap masuknya benda asing ke dalam tubuh udang. 15

20 Imunostimulan yang masuk ke dalam tubuh udang windu akan merangsang haemosit untuk melakukan degranulasi dan akan melepaskan protein seperti *binding molecule* (*BGlucan-binding protein /  $\beta$  G-BP, Lipopolysaccharide-binding protein / LPS-BP, Peptidoglycan-binding protein / PG-BP*) *coagulation factors* (*transglutaminase*), 25 *prophenoloxide related factors* (*prophenoloxide activating enzyme, prophenoloxide, peroxinectin*), *protein inhibitors* ( *$\alpha_2$  macroglobulin*) dan *anti microbial substances* (*penaedin, lectin*). Beberapa protein yang dilepas ini akan digunakan untuk kepentingan respon imun seperti : *phagocytosis, encapsulation, melanization, coagulation*, aktivitas enzim 30 *prophenoxidase*, opsonisasi, aktivasi mikroba serta proses

aktivitas humoral dan seluler lain ( Soderhall et al., 1998 ; Van de Braak et al. 2000).

5 McKay dan Jenkin (1970), mengatakan bahwa imunisasi pada crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) sebanyak 4 kali dengan endotoksin 2.5 µg dan  $2.5 \times 10^7$  vaksin dari bakteri *Pseudomonas sp.* dengan 4 kali penyuntikan menghasilkan perbedaan yang sangat nyata antara jumlah haemosit pada grup kontrol dan yang diimunisasi. Johanson dan Soderhall 10 (1989) menyatakan bahwa imunisasi dapat merangsang haemosit untuk melepaskan sistem proPO (sistem komunikasi) dan protein probinding TGKpa (molekul sinyal) yang bertanggungjawab sebagai komunikator dan aktifator sel-sel untuk melakukan fagositosis dan enkapsulasi pada jenis crustasea. Protein yang dilepaskan pada saat vaksinasi 15 digunakan untuk kepentingan respon imun seperti fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, koagulasi, aktivitas peroksidase, opsonisasi, aktivitas anti mikroba serta proses aktivitas humoral dan seluler lain (Van de Braak, 2000).

20 Pemberian imunostimulan pada crustasea disebut juga vaksinasi tidak mempunyai efek samping dan sangat baik untuk diterapkan pada organisme yang tidak mempunyai sel memori dalam sistem imunnya, sehingga dapat merangsang dan atau memaksimalkan respon imun non spesifik (Kwang, 1996). 25 Vaksinasi dengan menggunakan bahan protein antigenik (imunogenik) masih belum banyak dilakukan. Menurut Rukyani (1998) pemberian Lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyi* secara oral pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) dalam waktu 42 hari dapat 30 meningkatkan total haemosit dan menaikkan jenis sel granulositnya, sedangkan aktifitas fagositik dari sel haemosit sudah menunjukkan kenaikan pada hari ke 28 dan

lebih tinggi lagi pada hari ke 42. Terjadinya peningkatan aktifitas fagositik dari sel-sel haemosit seiring dengan meningkatnya total haemosit dan jenis sel granulositnya akibat pemberian Lipopolisakarida.

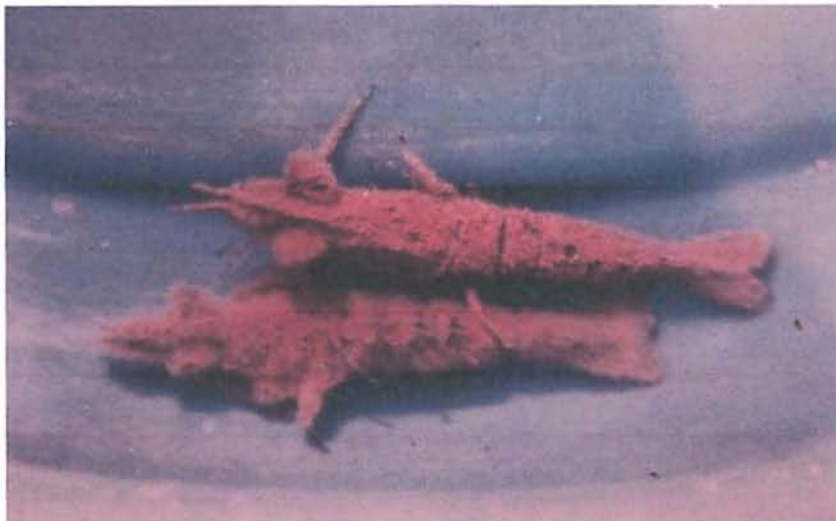
5           Brunk (1999) merekomendasi bahwa protein membran Tetrahymena yang merupakan satu famili dengan *Ichthyophthirius multifiliis* dapat dikembangkan sebagai bahan vaksin sub unit terhadap *white spot* (penyakit bintik putih) pada ikan. Selanjutnya Leff, et al. (1994) dalam  
10 hasil penelitiannya dinyatakan bahwa ikan *Channel Catfish* (*Ictalurus punctatus*) termasuk dalam ikan Cyprinidae yang diinfestasi dengan *Ichthyophthirius multifiliis* stadia theront dengan dosis 5.000 dan 10.000 sel/ekor menunjukkan adanya perbedaan infestasi pada insang dan kulit mulai  
15 hari ke 14 pasca infeksi. Selanjutnya dikatakan oleh Clark, et al. (1996) bahwa ikan *Channel Catfish* yang diimunisasi protein membran dari theront serotype G3 dan G4 dapat menekan infestasi *Ichthyophthirius multifiliis* dari 78,9% menjadi 14,2% selama 24 jam pemeliharaan.

20           Lin, et al. (1996) melanjutkan penelitiannya bahwa telah menemukan protein membran antigen dari theront serotype G1 terdiri dari protein dengan berat molekul 48 kDa dan 60 kDa, sedangkan serotype G3 hanya terdapat satu jenis protein membran yaitu dengan berat molekul 55 kDa.  
25 Selanjutnya protein membran antigen tersebut diimunisasikan pada ikan *Channel Catfish* dengan dosis 2 µg dan diinfeksi dengan 5.000 theront menunjukkan bahwa 138 survive dari 140 ekor.

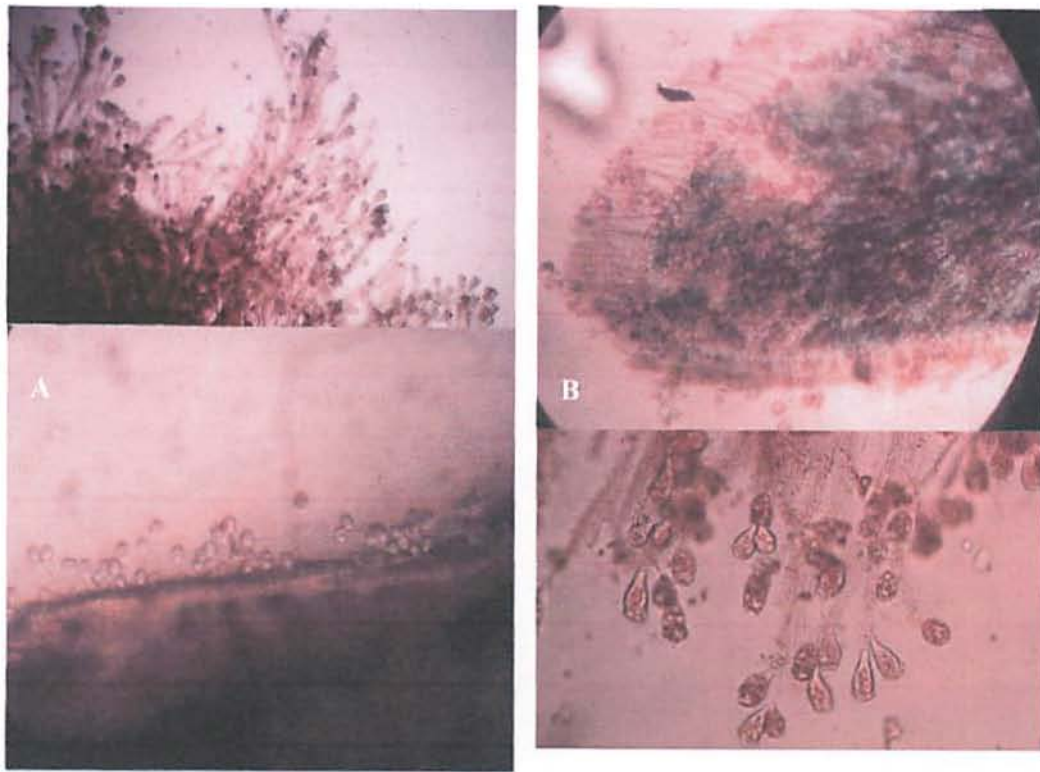
30           Wang dan Dickerson (2002) menemukan protein membran antigen dengan menggunakan SDS-PAGE dan *immunoblotting* dengan *Western blotting* dari stadia theront *Ichthyophthirius multifiliis* berada pada berat molekul 10

5 - 70 kDa. Kemudian penelitian ini dilanjutkan dan terbukti menemukan protein membran antigen dengan berat molekul 55 dan 46 kDa. Selanjutnya protein membran antigen ini digunakan untuk imunisasi pada ikan *Channel Catfish* dengan  
10 dosis 10 µg/ikan yang disuntikkan dengan cara intra peritoneal dan ditantang dengan 15.000 sel/ikan. Hasil imunisasi menunjukkan bahwa sampai pada hari ke 84 ikan masih survive 27%, sedang pada kelompok kontrol semua sudah mati pada hari ke 14.

10 Keterangan singkat gambar

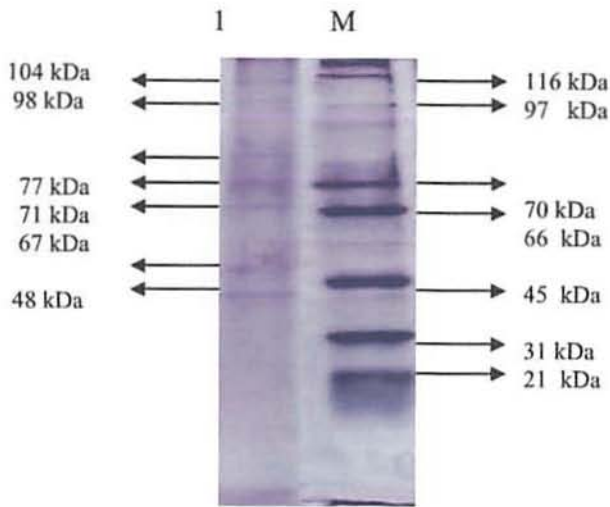


30 Gambar 1. Udang yang terserang *Zoothamnium penaei* dengan infestasi berat. ( Sumber : Lightner, 1998 ).

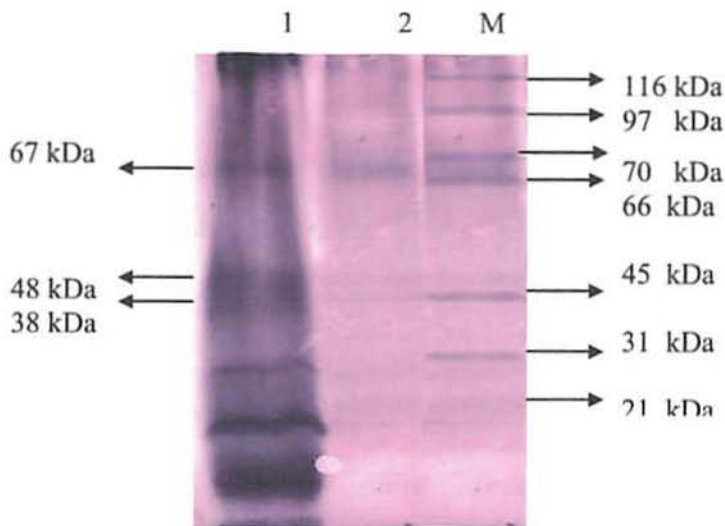


Gambar 2. Infestasi *Zoothamnium penaei* pada Beberapa Organ.  
A: Insang, B : Ekor, C: Punggung dan D: Kaki Jalan  
udang yang terserang *Zoothamnium penaei*. Perbesaran 100x  
( Sumber : Mahasri, 2005 ).





Gambar 3. Hasil Karakterisasi Protein Membran *Zoothamnium penaei* dengan SDS-PAGE 15% dengan Pewarnaan Comaisse Blue  
Keterangan : Lajur (1) : protein membran sampel dan lajur (M): Marker



Gambar 4. Hasil Analisis Protein membran *Zoothamnium penaei* dengan Teknik *Western Blotting*  
Keterangan : Lajur (1) dan (2) : Protein Membran dan Lajur (3) : Marker

Hasil karakterisasi protein membran *Zoothamnium penaei* dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5.2, yang menunjukkan bahwa terdapat protein yang digambarkan dalam bentuk pita pada gel SDS-PAGE 15%. Pada gel SDS-PAGE

ditemukan adanya 7 pita (band), yaitu protein dengan berat molekul (BM) 38 kDa, 48 kDa, 67 kDa, 71 kDa, 77 kDa, 98 kDa dan 104 kDa. Gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat pita protein membran MP 38 dengan Berat Molekul 38, 48 dan 67 kDa, sedangkan hasil karakterisasi protein membran imunogenik MP 38, MP48 dan MP67 dengan Western Blotting disajikan pada Gambar 5.3.

## **Klaim**

### **1. Suatu metode Isolasi Protein Membran *Zoothamnium penaei*:**

Sebanyak  $6 \times 10^8$  Zooid / ml hasil kultivasi in vitro diresuspensi dengan 10 mM PBS sehingga didapatkan konsentrasi akhir  $6 \times 10^8$  Zooid / ml serta ditambah dengan protease inhibitor (untuk 100 ml PBS ditambah 100  $\mu$ l 40 mM PMSF, 7,3 mg TLCK, 7 mg TPCK dan 7,5 mg EDTA). Suspensi tersebut disonikasi dengan 4 x 0,5 menit dalam es. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 1 jam. Supernatan diambil dan merupakan protein sitoplasma (soluble protein) dan pelet mengandung whole protein. Pelet selanjutnya diresuspensi dengan 0,5% Nonidet P40 dalam larutan protease inhibitor dengan komposisi sama dengan komposisi sebelumnya. Sonikasi dilakukan dengan 4 x 0,5 menit dalam es selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 4°C sambil diaduk dengan stirer dengan kecepatan sedang. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada 4°C dan supernatan diambil untuk diukur konsentrasi proteinnya.

### Penentuan Konsentrasi Protein

Untuk menentukan konsentrasi whole protein yang homogen digunakan Metode Bio-Rad Protein Assay dan dibaca dengan Spektrofotometer UV-Visible dengan panjang gelombang 595 nm.

### Karakterisasi dan Purifikasi Protein Membran dengan SDS PAGE

Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk melihat pola berat molekul dari fraksi whole protein, yaitu dengan cara: Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Susunan running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1X dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml, dan Aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sackher selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehyd 10% dan Aquades selama 30 menit. Setelah dicuci gel diwarnai dengan AgNO<sub>3</sub> selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehyd 3,7%, zitrone sauce 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein

5 terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker.

## 10 **2. Produk Immunostimulan dari Protein Membran Immunogenik dan Whole Protein**

### Abstrak

#### 15 **METODE PRODUKSI DAN PRODUK IMUNOSTIMULAN PROTEIN MEMBRAN IMUNOGENIK ZOOTHAMNIUM PENAEI**

20 Suatu metode untuk memproduksi ikan nila triploidi melalui kejutan suhu panas pada telur terfertilisasi. Telur ikan nila terfertilisasi diperlakukan setelah periode inkubasi awal dan sebelum meiosis, yaitu 4 menit setelah fertilisasi melalui perendaman (kejutan suhu panas) telur terfertilisasi dalam air bersuhu 41°C selama 3,5-4,5 menit. Inkubasi telur hasil kejutan suhu panas sampai menjadi benih ikan nila triploidi.

