

Rika Wulandari¹

¹Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Maritim Raja Ali Haji

INFO NASKAH

Kata Kunci:

Probiotik,
Imunologi ikan,
Imunitas selular

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas letupan respirasi leukosit dalam darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menggunakan uji *nitroblue tetrazolium* (NBT) sebagai tolak ukur produksi radikal oksigen (reactive oxygen species / ROS). Penelitian dirancang dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu, kemudian diberi perlakuan pakan yang ditambah probiotik dalam kurun waktu yang sama, dengan ikan tanpa perlakuan sebagai kontrol. Aktivitas letupan respirasi tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan B (12×10^8 CFU/mL). Berdasarkan hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ikan nila yang diberi perlakuan probiotik melalui pakan efektif meningkatkan laju aktivitas imunogenik letupan respirasi.

Gedung FIKP Lt. II Jl. Politeknik Senggarang, 29115, Tanjungpinang, Telp : (0771-8041766, Fax. 0771-7004642. Email: rika.wulandaridwan@yahoo.com

The Effect of Probiotic Treatment to Leukocyte Respiratory Burst Activity in Nile Tilapia's Blood (*Oreochromis niloticus*)

Rika Wulandari¹

¹Department of Aquaculture, Faculty of Marine Science and Fisheries, Raja Ali Haji Maritime University

ARTICLE INFO

Keywords

probiotic,
fish immunologi, cellular
immunity

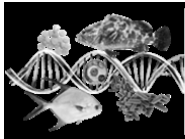
ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the respiratory burst activity of leukocytes in the blood of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using nitroblue tetrazolium test (NBT) as a measure of the reactive oxygen species production (ROS). The study was designed with 4 treatments and 3 times of evaluation to review the result of the test. Some fishes acclimatized for two weeks, then three groups of fish were treated with probiotics feed and one fish group without treatment as a control. The highest respiratory burst activity shown by the B treatment (12×10^8 CFU/mL). Based on the results showed that nile tilapia who treated through probiotics feed effectively increase the rate of respiratory burst as an immunogenic activity.*

Gedung FIKP Lt. II Jl. Politeknik Senggarang, 29115, Tanjungpinang, Telp : (0771-8041766, Fax. 0771-7004642. Email: rika.wulandaridwan@yahoo.com

PENDAHULUAN

Sistem pertahanan tubuh non spesifik memiliki peranan penting pada mekanisme pertahanan tubuh ikan. Menurut Misra *dkk* (2006), dalam satu dekade terakhir telah terjadi peningkatan minat penelitian terhadap sistem modulasi imun non spesifik pada ikan, baik sebagai tindakan pencegahan terhadap penyakit maupun pengobatannya.



Intek Akuakultur. Volume 1. Nomor 1. Tahun 2017. Halaman 71-76

Kegiatan budidaya perikanan saat ini rentan akan ancaman penyakit. Timbulnya penyakit yang timbul akibat agen penyakit dapat berasal dari lingkungan maupun akibat tindakan rekayasa pada fase pembesaran ikan secara intensif. Selain itu, sistem kekebalan tubuh ikan juga erat kaitannya dengan kualitas air. Kondisi perairan yang buruk akan berakibat kronis dan menekan kesehatan ikan, mengubah parameter biokimia, serta menekan respon imun bawaan dan adaptif ikan.

Penggunaan antibiotik terhadap ikan sakit sering menimbulkan efek resistensi, meningkatkan virulensi bakteri, menimbulkan residu pada daging dan mencemari lingkungan. Untuk mengurangi ketergantungan penggunaan antibiotik, penggunaan probiotik sebagai imunomodulator perlu dikembangkan. Beberapa jenis bakteri, mikroalga dan ragi telah diteliti potensinya sebagai probiotik, seperti *Tetraselmis*, *Debaryomyces*, *Phaffia*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Carnobacterium*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* dan *Vibrio* (Gastesoupe, 1999., Villamil *dkk*, 2002., Rusmiati *dkk*, 2008., dan Naim dan Ahmed, 2012).

Aktivitas letupan respirasi dalam leukosit merupakan parameter pertama yang pernah diteliti sebagai indikator imunitas selular. Zat yang disekresi fagolisosom seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), anion superoksida (O_2^-) dan nitrit oksida (NO) memicu penghancuran antigen dalam darah menggunakan oksigen. Menurut Baldrige dan Gerard (1933) dalam Rieger *dkk* (2010), sistem fagosit antigen dalam leukosit berhubungan dengan tinggi rendahnya konsumsi oksigen oleh sel. Produksi oksigen radikal akibat proses letupan respirasi tersebut diukur menggunakan *nitroblue tetrazolium* (NBT).

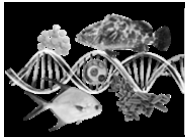
Bertitik tolak dari masih sedikitnya penelitian mengenai efek pemberian probiotik terhadap aktivitas letupan respirasi pada ikan, maka perlu dilakukan suatu penelitian untuk melihat aktivitas imunogenik tersebut.

BAHAN DAN METODE

Wadah penelitian yang digunakan berupa akuarium yang telah disterilkan berukuran 50 x 40 x 35 cm dengan kapasitas 45 L dan dilengkapi dengan aerator. Sebanyak 120 ekor ikan nila (*O. niloticus*) dengan panjang tubuh 8-14 cm dan bobot berkisar 20-41 gram didistribusikan pada dua belas akuarium (10 ekor ikan per akuarium). Ikan diaklimatisasi selama 14 hari, dengan pemberian pakan dua kali sehari secara *at satiation*.

Setelah diaklimatisasi, ikan dipuasakan selama 48 jam, kemudian di beri perlakuan pakan yang ditambah dengan probiotik jenis *Bacillus* sp selama 14 hari dengan perlakuan A sebagai kontrol (*Buffer Pepton Water* + Minyak Ikan), perlakuan B (BAL 12×10^8 CFU/mL), perlakuan C (BAL 24×10^8 CFU/mL) dan perlakuan D (BAL 30×10^8 CFU/mL). Setelah pemberian pakan berprobiotik selama 2 minggu, sampel darah pada ikan diambil dan segera diproses untuk dianalisis aktivitas letupan respirasinya.

Pengujian aktivitas letupan respirasi mengikuti metode Anderson & Siwicki (1995). 100 μ L heparin ditambahkan ke dalam 100 μ L 0,2% larutan

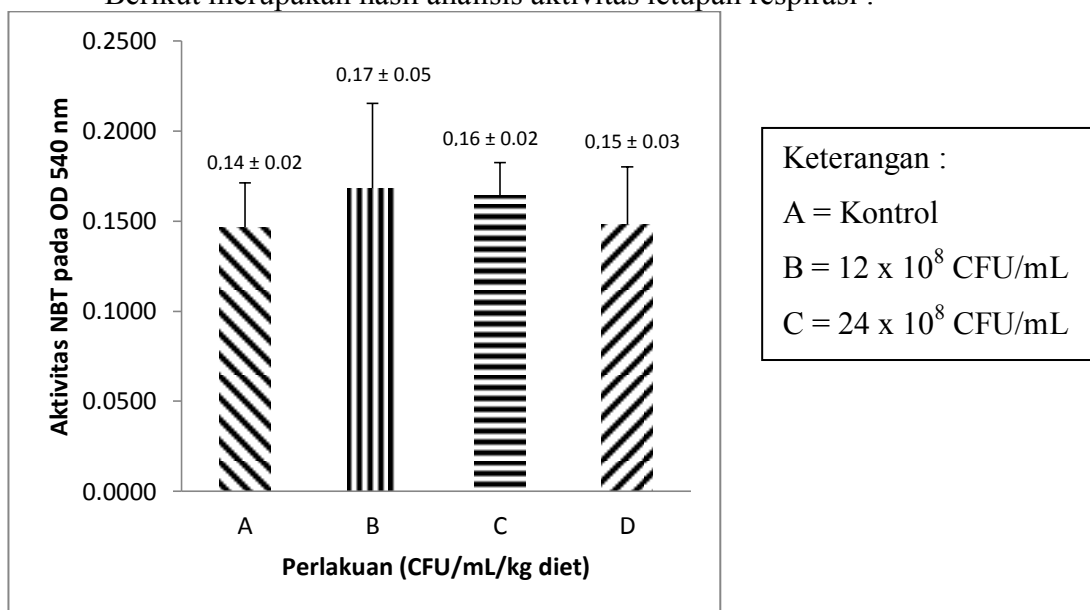


Intek Akuakultur. Volume 1. Nomor 1. Tahun 2017. Halaman 71-76

nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, St. Louis, MO, USA), kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C. Solusi NBT disiapkan di dalam phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4. Setelah inkubasi dan homogenisasi, 50 µL dari larutan ditambahkan 1 ml N, formamida N-dimetil (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) dalam tabung kaca. Solusi disentrifus pada 3000 RPM selama 5 menit. Nilai OD dari supernatan ditentukan pada spektrofotometer (Beckman DU-70S) pada 540 nm. Data dianalisis menggunakan *One Way* ANOVA untuk melihat pengaruh pemberian probiotik terhadap aktivitas letupan respirasi. Jika diperoleh nilai signifikan dengan $p < 0,05$, data diuji lanjut dengan uji LSD/Tukey.

HASIL

Berikut merupakan hasil analisis aktivitas letupan respirasi :



Gambar 1. Aktivitas letupan respirasi leukosit pada ikan nila (*O.niloticus*)

Berdasarkan Gambar 1 di atas, tampak bahwa aktivitas NBT tertinggi ditunjukkan pada perlakuan B (12 x 10⁸ CFU/mL), kemudian perlakuan C (24 x 10⁸ CFU/mL), lalu perlakuan D (24 x 10⁸ CFU/mL). Walaupun data yang dianalisis menggunakan sidik ragam menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dimana $p > 0,05$, namun ketiga perlakuan menunjukkan nilai aktivitas NBT lebih tinggi terhadap kontrol.

PEMBAHASAN

Penelitian ini mengevaluasi efek pemberian probiotik terhadap aktivitas imunogenik letupan respirasi leukosit ikan nila (*O.niloticus*). Nilai *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terukur oleh indikator NBT dilepaskan oleh sel imun untuk merusak membran patogen yang menginfeksi ikan.



Intek Akuakultur. Volume 1. Nomor 1. Tahun 2017. Halaman 71-76

Menurut Neumann *dkk* (2000a,b) dan Mathias *dkk* (2009), sel monosit dan neutrofil adalah sel yang berperan sebagai fagosit terhadap benda asing melalui membran reseptor. Saat peradangan dan terdapat luka pada jaringan, sitokin akan dilepaskan oleh sel fagosit sebagai sinyal dari inflamasi yang akan memicu proses kemotaksis jaringan dan penyembuhan luka.

Cara kerja leukosit, baik monosit maupun neutrofil dalam darah cenderung meningkatkan konsumsi oksigen melalui proses oksidasi NADPH dan akan membentuk oksigen radikal dalam bentuk anion superoksida (O_2^-), hydroxyl radikal ($\cdot OH$), hydrogen peroksida (H_2O_2), dan lipid peroksida (ROOH). Senyawa tersebut merupakan antibakteri potensial yang akan menjaga tubuh ikan dari infeksi patogen.

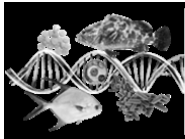
ROS dihasilkan secara intraselular sebagai suatu produk saat transpor elektron di mitokondria. Terbentuknya ROS distimulasi oleh aktivitas fagosit yang selanjutnya disebut sebagai ledakan respirasi (Irani *dkk*, 1997., Joneson dan Sagi, 1998., Arnold *dkk*, 2001). Fagosit mengekspresikan multikomponen oksidase NADPH (NOX) yang dipisahkan oleh sitosol dan membran plasma. Ketika sel-sel terstimulasi, sitosol ditranslokasi ke membran plasma, membentuk komplemen bersama flavocytochrome. Rangkaian oksidasi tersebut kemudian memanfaatkan sitosol NADPH untuk membatasi produksi O_2 menjadi O_2^- (Lassegue *dkk*, 2001., Cheng *dkk*, 2001., Arnold *dkk*, 2001). Ketika terjadi ekspresi yang berlebih, NOX mampu meningkatkan produksi O_2^- (Suh *dkk*, 1999., Lambeth *dkk*, 2000). Sebagai NADPH oksidase fagosit, NOX merupakan komponen protein yang berperan dalam membunuh mikroba dan dapat juga berperan penuh sebagai makrofag dan menjadi sumber kedua dalam menerima sinyal sel (Griendling *dkk*, 2000).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian probiotik melalui pakan pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menunjukkan hasil yang efektif meningkatkan laju aktivitas imunogenik letupan respirasi leukosit terhadap kontrol. Selain itu, ROS yang merupakan produk aktivitas letupan respirasi dapat memodulasi respon fisiologis sel imun. ROS tidak hanya berperan dalam membunuh patogen, namun juga sebagai reseptor dan penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson D.P, Siwicki A.K. 1995. Basic Haematology And Serology For Fish Health Programs. In Shariff M, Arthur Jr, Subasinghe, Rp. (Eds). Diseases In Asian Aquaculture II. Fish Health Section. Manila: Asian Fisheries Society. P. 185-202.
- Arnold R.S, Shi J, Murad E, Whalen A.M, Sun C.Q, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros J.A, Lambeth, J.D. 2001. Hydrogen Peroxide mediates the cell



- Intek Akuakultur. Volume 1. Nomor 1. Tahun 2017. Halaman 71-76
growth And Transformation Caused By The Mitogenic Oxidase Nox1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 : 5550–5555.
- Baldrige C.W, Gerard R.W. 1933. The Extra Respiration Of Phagocytosis. American Journal Of Physiology. Vol. 103. No. 1. P. 235-6.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir E.G, Lambeth J.D. 2001. Homologs Of Gp91phox : Cloning and Tissue expression Of Nox3, Nox4, And nox5. Gene 269, 131–140.
- Gastesoupe F.J. 1999. The Use Of Probiotic In Aquaculture. Aquaculture. 180 : 147-165.
- Griendling, K.K, Sorescu D, Ushio Fukai M. 2000. NAD(P)H Oxidase: Role In Cardiovascular Biology And Disease. Circ. Res. 86, 494–501.
- Irani K, Xia Y, Zweier J.L, Sollott S.J, Der C.J, Fearon, E.R, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt Clermont P.J. 1997. Mitogenic Signaling Mediated By Oxidants In Ras Transformed Broblasts. Science 275. 1649–1652.
- Joneson T, Bar Sagi D. 1998. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. J. Biol. Chem. 273. 17991–17994.
- Lambeth J.D, Cheng G, Arnold R.S, Edens W.A. 2000. Novel Homologs Of Gp91phox. Trends Biochem. Sci. 25. 459–461.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant S.L, Lambeth J.D, Griendling K.K. 2001. Novel Gp91phox Homologues In Vascular Smooth Muscle Cells: Nox1 Mediates Angiotensin II-Induced Superoxide Formation and Redox Sensitive Signaling Pathways. Circ. Res. 88. 888–894.
- Mathias Jr, Dodd Me, Walters K.B, Yoo S.K, Ranheim EA, Huttenlocher A. 2009. Characterization Of Zebrafish Larval Inflammatory Macrophages. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 33. No. 11. P. 1212-1217.
- Misra C.K, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. 2006. Effect Of Longterm Administration Of Dietary B-Glucan On Immunity, Growth And Resistance Of Labeo Rohita Fingerlings. Aquac 255 : 82-92.
- Naim Uddin, Ahmed H. Al Harbi. 2012. Bacterial Flora Of Polycultured Common Carp (*Cyprinus Carpio*) and African Catfish (*Clarias Gariepinus*). Natural Resources And Environment Research Institute. Saudi Arabia. International Aquatic Research. 4:10.

- Neumann N.F, Barreda D.R, Belosevic M. 2000a. Generation And Functional Analysis Of Distinct Macrophage Subpopulations From Goldfish (*Carassius auratus* L.) Kidney Leukocyte Cultures. Fish And Shellfish Immunology. Vol. 10. No. 1. P. 1-20.
- Neumann N.F, Stafford J.L, Barreda D, Ainsworth A.J, Belosevic M. 2000b. Antimicrobial Mechanisms Of Fish Phagocytes And Their Role In Host Defense. Developmental And Comparative Immunology. Vol. 25. No. 8-9. P. 807-825.
- Rieger A.M, Hall Be, Barreda D.R. 2010. Macrophage Activation Differentially Modulates Particle Binding, Phagocytosis and Downstream Antimicrobial Mechanisms. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 34. No. 11. P. 1144-1159.
- Rusmiati Dewi, Sulistiyarningsih, Tiana Milanda, Sri Agung Fitri Kusuma. 2008. Penyuluhan Pentingnya Konsumsi Yoghurt Dan Metode Pembuatannya Dengan Cara Sederhana Dalam Rangka Peningkatan Derajat Kesehatan Dan Ekonomi Masyarakat Di Kelurahan Sukaluyu Kota Bandung. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Suh Y.A , Arnold R.S, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung A.B, Griendling K.K, Lambeth J.D. 1999. Cell Transformation By The Superoxide Generating Oxidase Mox1. Nature 401. 79–82.
- Villamil L, Tafalla C, Figueras A, Novoa B. 2002. Evaluation Of Immunomodulatory Effects Of Lactic Acid Bacteria In Turbot (*Scophthalmus Maximus*). Clin Diagn Lab Immunol 2002;9:1318-1323.