

PENINGKATAN PERTUMBUHAN DAN IMUNITAS BENIH TERIPANG PASIR, *Holothuria scabra* DENGAN MELALUI PEMBERIAN PROBIOTIK DALAM PAKAN

*Improvement of Growth and Immunity of Sandfish, *Holothuria scabra* Juvenile Through the use of Probiotics in Feed*

Sari Budi Moria Sembiring¹, Zeny W. Astuti, Nyoman Adiasmara Giri dan Haryanti
¹Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan Gondol, Bali
Jalan Singaraja-Gilimanuk, Banjar Dinas Gondol, Penyabangan, Gerokgak,
Kabupaten Buleleng, Bali. 81155
Email : moriasembiring@yahoo.co.id

Diserahkan tanggal 15 Agustus 2019, Diterima tanggal 07 Maret 2020

ABSTRAK

Probiotik sebagai suplemen pakan yang mengandung mikroorganisme untuk mengendalikan patogen, meningkatkan pertumbuhan dan kekebalan/respon imun. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh probiotik terhadap pertumbuhan, kekebalan dan kerentanan terhadap *Vibrio* sp pada teripang pasir. Metoda penelitian ini diawali dengan mengkultur probiotik *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1 dan *Bacillus* sp strain E-2 dengan kepadatan 10^{8-9} CFU/mL, pencampuran dalam pakan dan aplikasi probiotik untuk pemeliharaan benih teripang pasir. Pemeliharaan benih teripang pasir dengan ukuran bobot tubuh $6,0 \pm 1,4$ g dan panjang total $4,3 \pm 0,6$ cm dalam bak beton volume $1m^3$ sebanyak 12 buah. Jumlah benih yang ditebar sebanyak 100 ekor/bak dan penelitian berlangsung selama 4 bulan. Perlakuan adalah penggunaan pakan buatan dengan penambahan probiotik (A) dan tanpa penambahan probiotik sebagai kontrol (B). Dosis pemberian pakan sebanyak 3% dari bobot tubuh dan frekuensi pemberian 1 kali. Parameter yang diamati adalah performa pertumbuhan dan tingkat imunitas setelah diuji tantang dengan *V. azureus* strain 4C-1. Tingkat imunitas dianalisis melalui ekspresi gen menggunakan RT-qPCR pada target gen: SOD, LZM dan CAT. Hasil yang diperoleh menunjukkan penggunaan kombinasi probiotik yang dicampur pada pakan pellet memberikan sintasan (95,3%) dan bobot akhir (10,3 g) lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol (88,8% dan 8,1 g). Respon imunitas pada benih juga menunjukkan peningkatan. 19 - 21 kali lebih tinggi setelah diuji tantang dengan *V. azureus*, terutama pada target gen LZM dan SOD. Sebagai kesimpulan, penggunaan probiotik strain bakteri *Gamma proteobacterium*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus* sp. dapat meningkatkan pertumbuhan dan imunitas benih teripang pasir.

Kata kunci: Imunitas; pertumbuhan; probiotik; benih; teripang pasir.

ABSTRACT

Probiotics as feed supplements to control pathogens and to promote growth and immune / immune responses. The study was to determine the effect of probiotics on growth, immunity and susceptibility to the pathogen *Vibrio* sp. Research method begins with culturing probiotics *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1 and *Bacillus* sp strain E-2 each to a density of 10^{8-9} CFU/mL, mixed with the feed and applied probiotics for rearing of sand fish juvenile. Sandfish juvenile with body weight of 6.0 ± 1.4 g and total length of 4.3 ± 0.6 cm were reared in 12 concrete tanks, each $1m^3$ in volume. The number of juvenile stocked was 100 individual/tank and conducted in four months. Treatments were the use of artificial feed with the addition of probiotics (A) and without the addition of probiotics as control (B). Feeding rate applied was 3 % of total biomass and fed once per day. The parameters observed were growth performance and level of immunity after being challenged with *V. azureus* strain 4C-1. The immunity rate analyzed were gene expression using RT-qPCR and gene target were SOD, LZM and CAT. The results obtained showed that the use of combination of probiotics and mixed in pellet feed gave a higher survival rate (95.3%) and a higher final weight (10.3 g) ($P < 0.05$) compared to control pellet feed (88.8% and 8.1 g respectively). The immune response of juvenile was also improved 19-21 times higher after being tested with *V. azureus*, especially in the LZM and SOD gene targets. In conclusion, the role of the use of probiotics *Gamma proteobacterium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. were able to increase the growth and immunity of sandfish juvenile.

Keywords: Growth; immunity; juvenile; probiotics; sandfish

PENDAHULUAN

Teripang telah menjadi spesies akuakultur yang penting karena mempunyai sifat anti-tumor dan nilai gizi yang tinggi (Steven *et al.*, 2012). Pada saat teripang mengalami stress, cenderung terinfeksi yang disebabkan oleh *Vibrio* sp. dan akan menginfeksi pada populasi lainnya dengan ciri-ciri adanya

ulserasi pada kulit/borok (Deng *et al.*, 2008), yang berdampak pada kematian dan penurunan produksi teripang.

Penggunaan antibiotik dan bahan kimia sintetis untuk mengobati penyakit ini akan memberikan efek negatif terhadap lingkungan, perkembangan resistensi antimikroba dan munculnya masalah keamanan pangan (Pericas *et al.*, 2011). Oleh karena itu, untuk mencegah teripang terserang penyakit

dapat dilakukan dengan meningkatkan imunitas pada teripang tersebut. Beberapa penelitian telah dilakukan dengan menggunakan probiotik dalam pakan sebagai kontrol biologis yang dapat mengendalikan patogen dan meningkatkan respon imun (Zhao *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011). Pada hewan yang dibudidayakan, probiotik juga berpotensi efektif dalam meningkatkan pertumbuhan, kekebalan, dan resistensi terhadap penyakit (Balcazar, 2006). Studi seperti diatas telah dilakukan untuk ikan (Wang dan Xu, 2006), udang (Sarlin & Philip, 2011), kepiting (Nogami dan Maeda, 1992), dan tiram (Douillet dan Langdon, 1994). Adapun untuk teripang *Aposticophus japonicus*, masih mencari probiotik yang potensial untuk mendukung pertumbuhan dan imunitas (Yan *et al.*, 2014). Demikian juga untuk teripang pasir, *H. scabra*, sampai saat ini belum ada hasil penelitian yang menggunakan probiotik dalam pemeliharaan benih.

Teripang termasuk Echinodermata, tidak memiliki respon kekebalan adaptif dan hanya mengandalkan *innate immunity* (imunitas alami) yang diproduksi dari tubuh teripang tersebut (Eliseikina dan Magarlamov, 2002). Teripang memiliki rongga tubuh yang berisi cairan coelomocytes. Coelomocytes berperan dalam respon imunitas seluler dan humoral. Secara umum klasifikasi dari coelomocytes Ada enam jenis yaitu : fagosit (*phagocytic amoebocytes*); sel morula; vibratile sel, progenitor (*lymphocyte like*) sel dan hemosit (Smith, 1981; Smith *et al.*, 2010). Peningkatan sintasan, pertumbuhan dan kesehatan teripang melalui pemberian probiotik dilakukan untuk mengeksplorasi kemungkinan adanya efek stimulasi system pencernaan, efek protektif pada benih terhadap infeksi penyakit. Dengan demikian penggunaan probiotik dalam pemeliharaan benih teripang sangat diperlukan untuk meningkatkan sintasan, pertumbuhan dan kesehatan benih teripang pasir. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan probiotik dalam pakan pada pendederan benih teripang pasir dalam meningkatkan pertumbuhan dan kekebalan terhadap pathogen *Vibrio* sp.

METODE PENELITIAN

Bakteri

Strain bakteri *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1 dan *Bacillus* sp. strain E-2 merupakan hasil isolasi dari usus teripang di alam dan mempunyai kemampuan peran menghambat pertumbuhan *Vibrio azureus* strain 4C-1 serta telah diidentifikasi melalui analisis *16S rRNA encoding gene sequence* (Sembiring *et al.*, 2018).

Pembuatan pakan pellet

Pakan pellet disiapkan dengan mencampurkan bahan berupa tepung *Sargassum* sp., tepung *Ulva* sp., tepung kedelai, tepung beras, tepung ikan, klekap, minyak ikan, vitamin mix, mineral mix serta perekat (CMC) dan kultur bakteri kandidat probiotik (Tabel 1).

Probiotik *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1 dan *Bacillus* sp. strain E-2 masing-masing dikultur dengan media Marine Broth pada volume 300 mL yang dilengkapi aerasi. Lama kultur 48 jam (2 hari). Penambahan kultur bakteri probiotik *Gamma proteobacterium* strain M-4 (300 mL), *Bacillus subtilis* strain Q-1(300 mL) dan *Bacillus* sp. strain E-2 (300 mL) pada pakan pellet dengan kepadatan masing-masing bakteri 10^{8-9} CFU/mL. Setelah

tercampur, bahan dicetak untuk menghasilkan pellet. Hasil pakan pellet tersebut selanjutnya dikering anginkan selama 3 jam dan disimpan di dalam lemari pendingin (5-6°C). Komposisi proksimat pakan pellet tertera pada Tabel 2. Setelah dicampur dalam pakan, juga dilakukan penghitungan kepadatan bakteri dengan cara menimbang pakan 0,1 g, digerus dengan mortar, kemudian dilarutkan pada larutan PBS 900 µL dan di osor pada media Marine Agar. Setelah 24 jam, dihitung kepadatan bakteri yang tumbuh pada media tersebut. Penghitungan kepadatan bakteri juga dilakukan pada saat persediaan pakan sudah sedikit dan pada waktu membuat pakan yang baru. Prosedur penghitungan kepadatan bakteri juga sama seperti pada saat awal pembuatan pakan. Hasil perhitungan kepatan bakteri setelah dicampur dalam pakan tertera pada Tabel 3.

Tabel 1. Komposisi Pakan Pellet untuk Pendederan Benih Teripang Pasir (g/100 g pakan) (Giri *et al.*, 2017)

Bahan	Perlakuan A	Perlakuan B
Tepung <i>Sargassum</i> sp	30	30
Tepung <i>Ulva</i> sp	35	35
Probiotik	@ 300 mL kepadatan 10^{8-9} CFU/mL	-
Tepung kedelai	4	4
Tepung beras	18	18
Tepung ikan	3	3
Klekap	6	6
Minyak Ikan	1	1
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	1	1
Perekat (CMC)	1	1

Tabel 2. Komposisi Proksimat Pakan Pellet yang digunakan untuk Pemeliharaan Benih Teripang Pasir, *H. scabra*

No	Komposisi proximat (%)	Pakan pellet dengan penambahan probiotik	Pakan pellet tanpa penambahan probiotik
1	Kadar Air	44,87	45,12
2	Kadar Abu	25,22	24,05
3	Kadar Lemak	3,26	3,45
4	Kadar Protein	11,43	11,54
5	Kadar Serat Kasar	14,38	16,15

Tabel 3. Kepadatan Sel Isolat Bakteri Sebelum dan Sesudah dicampur dalam Pakan Pellet

	Kepadatan (CFU/mL)
Isolat <i>Gamma proteobacterium</i> strain M-4	$6,9 \times 10^9$
Isolat <i>Bacillus subtilis</i> strain Q-1	$5,0 \times 10^8$
Isolat <i>Bacillus</i> sp strain E-2	$1,8 \times 10^8$
Pakan yang baru dibuat	$1,0 \times 10^7$
Pakan yang disimpan 2 minggu	$6,0 \times 10^6$

Pemeliharaan benih teripang pasir

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan benih teripang pasir dari hasil pembenihan di BBRBLPP. Ukuran benih yang digunakan mempunyai berat dan panjang rata-rata $6,0 \pm 1,4$ g & $4,3 \pm 0,6$ cm, dengan

kepadatan 100 ekor/bak (50 ekor/m²). Wadah yang digunakan berupa bak beton berukuran 2x1x0.6 m³ sebanyak 12 buah. Perlakuan dalam penelitian ini adalah : pemberian pakan pellet dengan penambahan probiotik *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1 dan *Bacillus* sp. strain E-2 dengan kepadatan masing-masing bakteri 10⁸⁻⁹ CFU/mL sebagai perlakuan A serta pemberian pakan pellet tanpa penambahan probiotik untuk perlakuan B. Rancangan penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 2 perlakuan dan 6 ulangan. Dosis pemberian pakan sebanyak 3%/BW dengan frekuensi pemberian 1 kali yaitu pada sore hari. Penelitian berlangsung selama 4 bulan dan untuk menjaga kualitas air, selama pemeliharaan dilakukan pergantian air dengan sistem sirkulasi.

Pengamatan Pertumbuhan

Respon teripang terhadap perlakuan dapat diketahui dengan melakukan pengukuran panjang dan bobot tubuh benih teripang setiap 2 minggu. Selanjutnya pada akhir percobaan dilakukan pengukuran laju pertumbuhan spesifik (SGR), pertambahan bobot (Wg), koefisien pakan (FCR), sintasan (SR). Nilai SGR, dan Wg dihitung berdasarkan formula :

$$SGR (\%/hari) = 100 \times (Ln Wt - Ln Wo) / t \dots\dots\dots(1)$$

$$Wg (\%) = 100 \times (Wt - Wo) / Wo \dots\dots\dots(2)$$

$$FCR = \text{Jumlah pakan} / \text{Pertambahan biomassa teripang} \dots\dots(3)$$

dimana: Wo = Bobot rata-rata teripang pada awal percobaan (g) ; Wt = Bobot rata-rata teripang pada akhir percobaan (g) ; t = lama pemeliharaan (hari)

Status Imunitas

Setelah 4 bulan pemeliharaan dengan pemberian pakan sesuai perlakuan, selanjutnya pada akhir penelitian, dilakukan uji tantangan dengan *V. azureus* strain 4C-1 dengan cara diinjeksi pada bagian dorsal. Sebanyak 8 ekor dengan berat dan panjang rata-rata (8,8 ± 2,4 g; 4,6 ± 0,8 cm) digunakan sebagai hewan uji pada uji tantangan. Dosis pemberian vibrio adalah 0,1 mL/ekor dengan kepadatan vibrio 10⁸ CFU/mL. Pengamatan status imun dilakukan dengan membandingkan tingkat ekspresi mRNA dari coelomyt benih teripang pasir pada awal dan akhir perlakuan Uji tantangan dilakukan selama 96 jam (4 hari) dan interval waktu pengambilan coelomyt setiap 24 jam.

Coelomyt diambil dari hewan uji menggunakan jarum spuit 1 mL yang terlebih dahulu pada jarum spuit tersebut diberi *anticoagulant* untuk mencegah penggumpalan cairan coelomyt tersebut. Pengambilan coelomyt dilakukan pada bagian ventral yang dekat dengan anterior. Hasil uji tantangan dianalisis dengan RT-qPCR untuk mengetahui tingkat kekebalan relatif yang dikespresikan dari gen yang terkait dengan imunitas.

Ekspresi gen terkait imunitas

a. Isolasi total RNA dan sintesa cDNA

Coelomyt yang telah di koleksi disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit, pelet

yang diperoleh dicuci satu kali dengan larutan anticoagulan dingin. Selanjutnya dilakukan ekstraksi total RNA menggunakan larutan *RNA extraction* dengan metoda IQ-2000 yang telah dimodifikasi.

Sintesa cDNA (*complementary DNA*) dilakukan dengan menggunakan *sensiFast cDNA Synthesis* kit. Volume reaksi 20 µL yang terdiri dari 4,0 µL 5x TransAmp Buffer; 1,0 µL Reverse transcriptase dan 1 µg total RNA. Larutan dalam mikrotube diinkubasi berturut-turut pada suhu 25°C selama 10 menit, 4°C (15 menit) dan 85°C selama 5 menit. Larutan cDNA selanjutnya diletakkan dalam es untuk menghentikan reaksi sintesa dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisa berikutnya.

b. Analisa RT-qPCR pada target gen yang terkait dengan imunitas

Analisis profil status imun menggunakan metoda ekspresi transkripsi gen yang terkait dengan imunitas secara kuantitatif dengan RT-qPCR dan primer spesifik mengikuti Huo *et al.*, (2018) dan Saad *et al.*, (2016). Analisis *Lysozyme* dan *Superoxide dismutase* (SOD) dengan metode Huo *et al.*, (2018), sedangkan *Catalase* (CAT) mengikuti Saad *et al.*, (2016) seperti tertera pada Tabel 4. Internal kontrol menggunakan 18SrRNA. Analisa RT-qPCR menggunakan ABI PRISM 7500 dengan kit 5x Hot Firepol Evagreen qPCR mix (ROX). Volume reaksi untuk amplifikasi sebanyak 20 µl dengan final konsentrasi 1x Hot Firepol Master mix (ROX), Primer F/R 10 pmol masing-masing 250 nM, NFW (*Nuclease Free Water*) dan konsentrasi cDNA (0,01ng /µL). Kondisi suhu cycling pada semua target gen untuk RT-qPCR terdiri dari suhu holding 50°C selama 2 menit, suhu awal denaturasi 95°C (15 menit) diikuti dengan 95°C (15 detik) dan suhu annealing 60°C (30 detik) dan suhu ekstensi 72°C selama 20 detik. *Thermal cycle* ini diulang sebanyak 40 siklus.

Penghitungan ΔCt dari *threshold* siklus PCR (Ct) gen yang diuji dinormalisasi secara relatif terhadap Ct 18sRNA (internal kontrol) pada sampel yang sama. Nilai ΔΔCt dihitung dari ΔCt (kelompok sampel yang diuji) - ΔCt (ekspresi awal). Representasi kelipatan relatif yang berbeda terhadap ekspresi awal dapat dihitung dengan 2^{-ΔΔCt}.

Tabel 4. Sekuens Primer yang digunakan untuk Menentukan Sistem Imunitas dengan Analisis RT-qPCR pada Gen yang Terkait dengan Imunitas pada Benih Teripang pasir, *H. scabra* (Saad *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2018)

Target Gen	Sekuens Primer (5' to 3')
Superoxide dismutase (SOD)	F: TCTGAAGGAGGGCTGTCAGT
	R: AACTACGCCTTGGTGGTCAG
Lysozyme (LZM)	F: AGGCTACTGGCAGGATGCTA
	R: TTGCGTACCGTGCCATATAA
Catalase (CAT)	F: GACACATCCGGGCTCACTAT
	R: GAGCCTAAGCCTGAATGCAC

Analisa Data

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan statistik. Analisa deskriptif dilakukan untuk parameter imunitas. Selanjutnya, analisa statistik untuk parameter bobot akhir, pertambahan bobot, pertumbuhan bobot spesifik, panjang total akhir, konversi pakan dan sintasan menggunakan uji-T dengan software Excel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Performa Pertumbuhan

Performa pertumbuhan benih teripang pasir yang diberi pakan pellet dengan penambahan probiotik (perlakuan A) dan pakan tanpa probiotik (B) selama 4 bulan pemeliharaan di dalam bak disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Performa Pertumbuhan dan Sintasan Teripang Pasir yang Dipelihara dan Diberi Pakan Pellet dengan Penambahan Probiotik (A) dan Tanpa Probiotik (B) selama 4 bulan

Parameter	Perlakuan	
	A	B
Bobot awal (g)	5,9 ± 1,5	6,0 ± 1,4
Panjang awal (cm)	4,3 ± 0,6	4,3 ± 0,7
Bobot akhir (g)	10,3 ± 1,7 ^a	8,1 ± 1,4 ^b
Pertambahan bobot (%)	71,92 ± 35,85 ^a	34,64 ± 27,31 ^b
Pertumbuhan bobot spesifik (%/hari)	0,44 ± 0,18 ^a	0,24 ± 0,15 ^b
Panjang total akhir (cm)	5,10 ± 0,5 ^a	4,60 ± 0,3 ^b
Konversi pakan	1,80 ± 0,2 ^a	2,00 ± 0,2 ^a
Sintasan (%)	95,33 ± 5,33 ^a	88,83 ± 2,64 ^b

Pada Tabel 5, terlihat bahwa pertumbuhan bobot yang meliputi bobot akhir, pertambahan bobot, laju pertumbuhan

spesifik dan panjang total akhir teripang dipengaruhi oleh perlakuan ($P < 0,05$). Teripang yang diberi pakan dengan penambahan probiotik mempunyai bobot akhir ($10,3 \pm 1,7$ g), pertambahan bobot ($71,92 \pm 35,85$ %) dan laju pertumbuhan spesifik ($0,44 \pm 0,18$ %/hari) tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan tanpa penambahan probiotik. Demikian juga dengan sintasan teripang pada akhir percobaan berbeda nyata antara perlakuan A dan B ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa selama pemeliharaan benih teripang pasir dengan pemberian pakan pellet dengan penambahan probiotik memberikan pertumbuhan sintasan yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian pakan pellet tanpa probiotik.

Peningkatan Pertumbuhan yang lebih baik juga diamati pada teripang *Apostichopus japonicus* yang diberi pakan dengan penambahan probiotik *Paracoccus marcusii* DB11 (Verschuere *et al.*, 2000). Probiotik yang diberikan diduga dapat meningkatkan aktivitas enzim pencernaan dan akhirnya berdampak pada peningkatan pertumbuhan.

Uji Tantang dan Status Imunitas

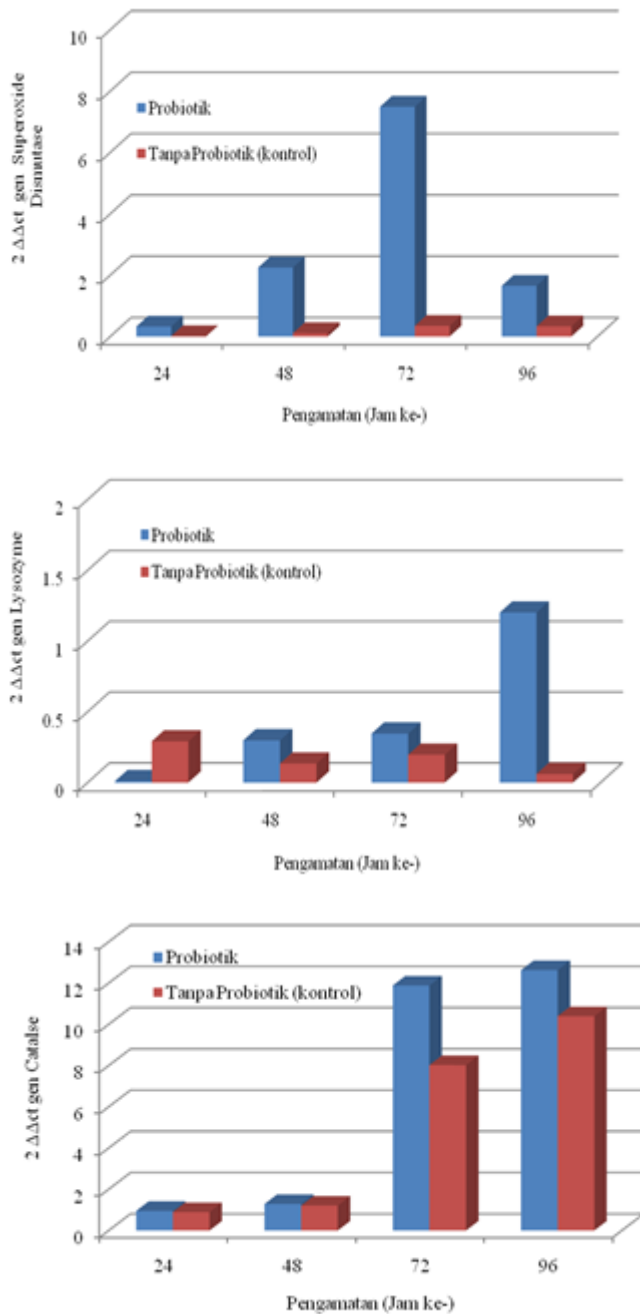
Hasil ujiantang terhadap *Vibrio azureus* strain 4C-1 menunjukkan bahwa pada perlakuan B setelah 24 jam di suntik, benih teripang sudah ada yang mengalami kematian, sedangkan pada perlakuan A benih teripang mengalami kematian setelah 72 jam pemeliharaan. Hasil analisis secara statistik, menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan terhadap ujiantang vibrio ($P < 0,05$) (Tabel 6).

Tabel 6. Uji Tantang Benih Teripang Pasir, *H. scabra* terhadap *Vibrio azureus* strain 4C-1 Pengamatan Dilakukan Selama 96 jam

Perlakuan	Ulangan	Panjang total (cm)	Bobot tubuh (g)	Jumlah Awal (ekor)	Mortalitas dalam Pengamatan (Individu)				Sintasan (%)
					24 H	48 H	72 H	96 H	
A	1	5,4 ± 0,8	12,3 ± 3,5	8	0	0	1	0	87,5
	2	4,9 ± 1,2	8,2 ± 1,0	8	0	0	0	1	87,5
	3	4,1 ± 0,4	6,8 ± 0,5	8	0	0	0	1	87,5
	4	4,8 ± 0,5	8,1 ± 0,5	8	0	0	0	0	100,0
	5	4,5 ± 0,4	8,4 ± 1,1	8	0	0	1	1	75,0
	6	4,3 ± 0,5	7,2 ± 1,5	8	0	0	0	1	87,5
Rata-rata 87,5 ± 7,9^a									
B	1	4,8 ± 0,5	9,6 ± 1,4	8	1	0	1	0	75,0
	2	4,3 ± 0,2	6,7 ± 0,7	8	0	0	1	1	75
	3	4,2 ± 0,4	8,2 ± 0,9	8	0	1	0	1	75,0
	4	4,8 ± 0,4	8,7 ± 1,8	8	0	1	1	1	62,5
	5	4,4 ± 0,2	9,0 ± 1,6	8	0	0	1	1	75,0
	6	5,1 ± 0,5	10,5 ± 1,6	8	0	0	1	1	75,0
Rata-rata 72,9 ± 5,1^b									

Hasil analisis ekspresi gen yang terkait dengan imunitas pada juvenile teripang pasir setelah ujiantang dengan *Vibrio azureus* 4C-1 terlihat pada Gambar 1, dari hasil analisis ekspresi gen dengan menggunakan RT-qPCR menunjukkan bahwa benih teripang pasir yang diberi pakan dengan penambahan probiotik setelah diujiantang dengan *Vibrio azureus* strain 4C-1 memberikan peningkatan respon imun yang relatif tinggi bila dibandingkan dengan kontrol, Target

gen imun SOD terlihat meningkat 21 kali pada 72 jam setelah terinfeksi *V. azureus* strain 4C-1, sedangkan kontrol hanya 0,05 - 0,2 kali. Demikian juga dengan gen imun LZM, respon imun meningkat 19,7 kali dibandingkan kontrol hanya 0,05 kali pada 96 jam, Sedangkan pada gen target imun CAT, respon imun meningkat 1,21 kali dibandingkan kontrol hanya 0,82 kali pada 96 jam.



Gambar 1. Nilai kuantitatif relatif dari gen SOD, LSZ dan CAT dalam coelom benih teripang pasir, *H. scabra* setelah diuji tantang dengan *Vibrio azureus* strain 4C-1

Gen imun Superoxide dismutase (SOD) dan Catalase (CAT) adalah indikator kesehatan yang sangat penting untuk hewan akuatik, SOD dan CAT sebagai enzim antioksidan utama dan komponen penting dari sistem pertahanan antioksidan pada teripang pasir (Smith *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011) dan terlibat dalam melindungi dan mencegah kerusakan sel dari senyawa radikal (Tacchi *et al.*, 2011). LZM merupakan parameter kekebalan yang penting terhadap bakteri atau partikel asing dalam echinodermata (Johanson, 1969). Stimulasi Aktivitas LZM telah diketahui dalam cairan coelom *A. japonicus* yang diberi pakan dengan penambahan probiotik *Metschnikowia* sp. C14 (Liu *et al.*,

2012). Selanjutnya Navinchandran *et al.*, (2014), menyatakan bahwa Lysozyme dapat membunuh mikroorganisme patogen asing melalui pelarutan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri gram positif.

Invertebrata laut termasuk teripang hanya mengandalkan *innate imun* untuk menyerang mikroba (Zhao *et al.*, 2012). Coelom merupakan sel efektor echinodermata, karena dapat mengenali, menelan atau mengenkapsulasi mikroorganisme atau partikel asing yang menyerang dan melepaskan faktor humoral (Zhou *et al.*, 2014). Meskipun banyak penelitian telah menunjukkan pengaruh probiotik pada respon imun teripang (Zhao *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014). Beberapa hasil penelitian telah membuktikan bahwa penggunaan probiotik dalam pakan dapat meningkatkan resistensi penyakit pada ikan (Sun *et al.*, 2010), udang (Wang dan Gu, 2010) dan teripang (Zhao *et al.*, 2012) melalui stimulasi sistem kekebalan tubuh. Pada penelitian ini, menunjukkan bahwa dengan pemberian kombinasi probiotik *Gamma proteobacterium* strain M-4, *Bacillus subtilis* strain Q-1, *Bacillus* sp. strain E-2 setelah diuji tantang dengan *V. azureus* strain 4C-1 dapat meningkatkan respon imun benih teripang pasir, *H. scabra*.

KESIMPULAN

Pemberian pakan pellet dengan penambahan probiotik *Gamma proteobacterium M-4*, *Bacillus subtilis Q-1* dan *Bacillus sp E-2* meningkatkan pertumbuhan, sintasan dan imunitas pada benih teripang pasir.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari APBN dalam DIPA Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan Gondol tahun 2018. Pelaksanaan penelitian dapat berlangsung dengan baik atas bantuan teknisi litkayasa Made Buda, I Nengah Gde Suparta, Ahmad Rifai, Ni Nengah Suri Adnyani dan Ni Luh Yuliani Dewi.

DAFTAR PUSTAKA

- Balcazar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., Blas, I. and I. Ruiz-Zarzuola. 2006. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish, *Microbial Ecology in Health and Disease* 18: 65–70.
- Deng, H., Zhou, Z.C., Wang, N.B., and C. Liu. 2008, The syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) infected by virus and bacteria, *Virologica Sinica* 23:63–67, DOI 10.1007/s12250-008-2863-9.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Guroy, D. and S.J. Davies. 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production-A Mediterranean perspective, *Fish & Shellfish Immunology* 30: 1–16.
- Douillet, P.A. and C.J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg), *Aquaculture* 119: 25–40.
- Eliseikina, M.G. and T.Y. Margalimov. 2002. Coelomocyte morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica*

- (Dendrochirota:Cucumariidae), *Russian Journal of Marine Biology* 28(3):197-202.
- Giri, N.A., Sembiring, S.B.M., Marzuqi, M. dan R. Andamari. 2017. Formulasi dan aplikasi pakan buatan berbasis rumput laut untuk pendederan benih teripang pasir, *Holothuria scabra*. *Jurnal Riset Akuakultur* 12(3): 263-273.
- Hao, K., Liu, J.Y., Ling, F., Liu, X.L., Lu, L. and L. Xia. 2014. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 428:141-149.
- Huo, D., Sun, L., Ru, X., Zhang, L., Lin, C., Liu, S., Xin, X. and H. Yang. 2018. Impact of hypoxia stress on the physiological responses of sea cucumber *Apostichopus japonicus*: respiration, digestion, immunity and oxidative damage. *PeerJ* 6:4651; DOI 10.7717/peerj.4651.
- Liu, Z.M., Ma, Y.X., Yang, Z.P., Li, M., Liu, J. and P.Y. Bao. 2012. Immune responses and disease resistance of the benih sea cucumber *Apostichopus japonicus* induced by *Metschnikowia* sp, C14. *Aquaculture* 368–369: 10–18.
- Miranda, C.D. and R. Zimelman. 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepcion Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin* (42): 1096–1102.
- Navinchandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S. and G. Immanuel. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish Shellfish Immunol*, 36: 38-45.
- Nogami, K. and M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can, J, Fish, Aquacult, Soc*, 49: 2373–2376.
- Pericas, C.C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J. and A. Moreno. 2011. Multi residue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation, Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control* 22 (6): 993-999, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.008>.
- Sarlin, P.J. and R. Philip. 2011. Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: a comparative study. *Aquaculture*, 321:173-178.
- Saad, D., Baiomy, A.A. and A.A. Mansour. 2016. Antiseptic effect of sea cucumber (*Holothuria atra*) against multi-organ failure induced by sepsis: Molecular and histopathological study, Experimental and Therapeutic Medicine. DOI: 10.3892/etm.2016.3321.
- Smith, V.J. 1981. The Echinoderms, in *Invertebrate Blood Cells*. London: Academic Press, 1981, pp, 513–562.
- Smith, L.C., Ghosh, J., Buckley, K.M., Clow, L.A., Dheilly, N.M. and T. Haug. 2010. Echinoderm Immunity, *Invertebr Immun*. Springer, US, pp, 260-301.
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. and W.Y. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:803-809.
- Steven, W.P., Cathy, A.H. and J.M. David. 2012. Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: progress, problems and opportunities. *Aquaculture* (368–369): 68–81.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Douglas, A., Secombes, C.J. and S.A. Martin. 2011. Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol*, 31:704-715.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol, Mol, Biol, Rev*, 64 (4): 655–671,
- Wang, Y.B. and Q. Gu. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, 6:327-332.
- Wang, Y.B. and Z.R. Xu. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim, Feed Sci, Technol*, 127: 283–292.
- Yan, F., Tian, X., Dong, S., Fang, Z. and G. Yang. 2014. Growth performance, immune response, and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in benih sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed a supplementary diet of the potential probiotic *Paracoccus marcusii* DB11. *Aquaculture* 420–421: 105–111.
- Zhao, Y., Ma, H., Zhang, W., Ai, Q., Mai, K. and W. Xu. 2011. Effects of dietary β -glucan on the growth, immune responses and resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection. *Aquaculture* 315: 269-274.
- Zhao, Y., Zhang, W., Xu, W., Mai, K., Zhang, Y. and Z. Liufu. 2012. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in benih sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 32: 750-755.
- Zhou, Z., Dong, Y., Sun, H., Yang, A., Chen, Z. and S. Gao. 2014. Transcriptome sequencing of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and the identification of gene-associated markers. *Mol, Ecol, Resour*, 14:127-138.