

PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK DAUN JERUJU (*Acanthus ilicifolius*) DENGAN DOSIS BERBEDA PADA PAKAN TERHADAP SISTEM IMUN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG DIINFEKSI *Vibrio parahaemolyticus*

EFFECT OF ADDITIONAL LEAF EXTRACT OF JERUJU (*Acanthus ilicifolius*) WITH DIFFERENT DOSAGE IN FEED ON IMMUNE SYSTEM OF VANAME SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) INFECTED WITH *Vibrio parahaemolyticus*

Rizka Abdi^{1*}, Dewi Nur'aeni Setyowati¹ dan Alis Mukhlis¹

¹Prodi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram
Jl. Pendidikan No.32 Mataram 83115 Nusa Tenggara Barat

*Korespondensi email: rizkaabdi11@gmail.com

(Received 12 Januari 2022; Accepted 31 Maret 2022)

ABSTRAK

Pemberian pakan buatan berimunostimulan menggunakan penambahan ekstrak daun jeruju merupakan salah satu upaya pencegahan serangan penyakit oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas pemberian imunostimulan berbahan ekstrak daun jeruju terhadap peningkatan respon imun non spesifik udang vaname seperti parameter THC, DHC dan AF serta peningkatan *survival rate* pasca infeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan RAL, 6 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang diberikan terdiri dari kontrol kualitas air, kontrol -, kontrol +, penambahan ekstrak 5 g/kg pakan, penambahan ekstrak 10 g/kg pakan dan penambahan ekstrak 20 g/kg pakan. Parameter penelitian yang diuji meliputi perhitungan THC, DHC, AF, SR, TVC, dan TBC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak daun jeruju pada pakan dengan dosis berbeda memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan nilai *survival rate* dan respon imun non spesifik udang vaname (THC, DHC dan AF) pada udang yang mendapatkan perlakuan penambahan ekstrak. Dosis terbaik dari penambahan ekstrak daun jeruju adalah 20 g/kg pakan yang memiliki nilai tertinggi pada THC, DHC, AF, dan SR.

Kata Kunci: Daun Jeruju, Ekstrak, *Vibrio parahaemolyticus*, Udang vaname, Imunostimulan

ABSTRACT

Provision of artificial immunostimulant feed using the addition of jeruju leaf extract is one of the efforts to prevent disease attacks by *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The purpose of this study was to determine the effectiveness of giving immunostimulants made from jeruju leaf extract to increase the non-specific immune response of white vaname shrimp such as THC, DHC and AF parameters as well as to increase survival

rate after infection with *Vibrio parahaemolyticus* bacteria. The research was conducted by experimental method using RAL, 6 treatments and 3 replications. The treatment consisted of water quality control, - control, + control, addition of extract 5 g/kg feed, addition of extract 10 g/kg feed and addition of extract 20 g/kg feed. The research parameters tested included the calculation of THC, DHC, AF, SR, TVC, and TBC. The results showed that the addition of jeruju leaf extract to feed with different doses had a significant effect on increasing the survival rate and non-specific immune response of white vaname shrimp (THC, DHC and AF) in shrimp that received additional extract treatment. The best dose of adding jeruju leaf extract was 20 g/kg of feed which had the highest values on THC, DHC, AF, and SR.

Key words: Jeruju Leaf, Extract, *Vibrio parahaemolyticus*, White Shrimp, Immunostimulant.

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaus vannamei*) merupakan salah satu komoditas air payau unggulan yang sering dibudidayakan. Hal ini dikarenakan keunggulan yang dimiliki udang vaname seperti padat tebar yang tinggi mencapai 810 ekor/m² dengan luasan kolam 271 m² menggunakan sistem raceways yang dikembangkan di South Carolina, USA (Venero et al., 2009). Berdasarkan volume produksi nasional dalam kurun waktu 5 tahun terakhir (2013 – 2017), terjadi peningkatan produksi udang vaname rata-rata 15,7 % per tahun dengan nilai ekspor mencapai 147.000 ton di tahun 2017 (Perikanan, 2018).

Salah satu spesies dari genus *Vibrio* yang sangat mematikan dan merugikan para petambak udang di Indonesia adalah *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio parahaemolyticus* menyerang bagian hepatopankreas dan menyebabkan penyakit Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) atau Early Mortality Syndrome (EMS) pada udang dan menyebabkan kerugian besar di industri udang. Udang yang terinfeksi AHPND menunjukkan serangkaian gejala klinis seperti lesu, cangkang melunak, otot yang memutih, usus dan lambung kosong, pertumbuhan lambat, dan hepatopankreas atrofi pucat yang sering memiliki garis-garis hitam (Praja & Dwi, 2018).

Metode yang biasa digunakan untuk penanggulangan serangan penyakit adalah dengan menggunakan bahan kimia dan antibiotik. Namun, penggunaan metode ini dapat mengakibatkan bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik. (S., 2008) melaporkan bahwa di tahun 2001 telah terjadi kegagalan ekspor udang asal Indonesia ke Negara-negara tujuan ekspor di Eropa, Amerika maupun Asia akibat penerapan zero tolerance terhadap residu kloramfenikol dan nitrofurantoin yang berakhir dengan dimusnahkannya puluhan kontainer udang asal Indonesia tersebut.

Salah satu alternatif penanggulangan dan pencegahan serangan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dapat dilakukan dengan memberikan penambahan imunostimulan pada pakan udang vaname. Imunostimulan yang berasal dari bahan alami dapat meningkatkan sistem pertahanan non spesifik udang vaname. Salah satu bahan bioaktif alami yang dapat dimanfaatkan adalah ekstrak daun jeruju. Tumbuhan jeruju (*Acanthus ilicifolius*) adalah tanaman vegetasi mangrove yang dapat ditemukan di daerah tropis seperti Asia dan Afrika, dari Malaya sampai Polinesia (Kovendan, 2011). Berdasarkan uji kandungan, ekstrak daun jeruju mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, feniletanoid glikosida dan kumarin (Suryati, 2018). (Aonullah et al., 2013), melaporkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju sebanyak 5g/kg pakan menunjukkan adanya pengaruh terhadap jumlah total leukosit serta aktifitas fagositik ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) pascainfeksi *V. alginolyticus*. Berdasarkan tinjauan literatur tersebut, kandungan bahan fitokimia dari ekstrak daun jeruju berpotensi untuk dijadikan bahan imunostimulan. Untuk itulah penelitian ini dilakukan dengan

tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahn ekstrak daun jeruk pada pakan udang vaname dengan dosis berbeda terhadap peningkatan respon imun non spesifik dan udang vaname.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan selama 70 hari yang dimulai pada tanggal 8 Juli 2021 sampai dengan 15 September 2021. Penelitian utama dilakukan di Laboratorium Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram dan penelitian pendukung dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram.

Alat dan Bahan

Bak kontainer 40 L, aerator, refraktometer, DO meter, Ph meter, serok udang, effendorp, cawan petri, tabung reaksi, selang siphon, autoklaf, Erlenmeyer, evaporator, oven, blender, kertas saring, jarum ose, timbangan, kamera, syringe, cool box, haemocytometer, kaca preparat, cover glass, mikroskop, hot plate dan bunsen. Udang vaname, daun jeruk, etanol 96%, pakan udang, larutan PBS, media TCBS, media TSA, media NA, air laut, isolate bakteri *V. parahaemolyticus*, aquades dan air tawar.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Daun Jeruju

Daun jeruk yang digunakan diperoleh dari daerah pesisir Desa Cemara, Kabupaten Lombok Barat. Daun jeruk yang dikumpulkan sebanyak 5 kg dijemur di bawah sinar matahari selama 4 x 24 jam, dioven selama 4 jam dengan suhu 70oC (Fadillah et al., 2019). Daun jeruk kering kemudian digiling menjadi bubuk halus, dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:3. Dilakukan pengadukan setiap 2 jam selama 4 x 24 jam agar bahan tercampur merata dan disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak daun jeruk cair kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dengan suhu 50oC (Nuria, 2009).

Uji Fitokimia Ekstrak Daun Jeruju

Uji fitokimia dilakukan dengan mengikuti standar operasional Lab Kimia Dasar, FMIPA, Universitas Mataram. Sebanyak 1 mL ekstrak daun jeruk dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan etanol absolut. Dimasukkan 1 mL sampel ekstrak ke dalam tabung reaksi yang telah diberikan penanda. Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan NaOH encer, asam asetat pekat (CH₃COOH) dan asam sulfat (H₂SO₄). Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan asam sulfat (H₂SO₄) ke masing-masing 1 mL sampel ekstrak. Masing-masing sampel dimasukkan pereaksi mayer, wagner dan dragendrof. Uji saponin dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes air ke dalam 1 mL sampel ekstrak dan dikocok hingga muncul busa yang bertahan selama 5 menit. Uji fenol dilakukan dengan menambahkan 3-4 tetes larutan FeCl₃. Uji steroid dilakukan dengan menambahkan 2 mL kloroform ke dalam 1 mL sampel ekstrak dan dikocok. Larutan kemudian ditambahkan 2 tetes asam asetat dan 2 tetes asam sulfat. Uji tanin dilakukan dengan menambahkan 3-4 tetes larutan FeCl₃ ke dalam 1 mL sampel ekstrak.

Persiapan Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan Uji Tantang

Isolat murni bakteri *V. parahaemolyticus* yang digunakan diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Kemudian dilakukan rekarakterisasi dan peremajaan bakteri untuk memperoleh bakteri yang lebih virulen dengan menggunakan media TCBS (Thiosulfat Citrate BieSalt Sucrose) sebagai media hidup bakteri. Peremajaan dilakukan dengan memasukkan bahan TCBS sebanyak 8,8 g ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan ke

dalam 100 mL aquades steril. Bahan yang sudah tercampur dipanaskan di atas hot plate hingga larut. Bahan yang telah siap dituang ke dalam cawan petri dan bakteri dikultur dengan menggoreskan 1 ose. Bakteri yang telah digores diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam (Manguntungi, 2016). Pada hari ke-21 dilakukan ujiantang dengan menambahkan isolate bakteri *V. parahaemolyticus* dengan konsentrasi 10⁷ CFU/ml sebanyak 1,2 ml ke dalam air pemeliharaan. Infeksi bakteri ini diberikan untuk perlakuan C (kontrol +/-infeksi bakteri), D (5 g/kg pakan), E (10 g/kg pakan) dan F (20 g/kg pakan).

Parameter Penelitian

Pengamatan Total Haemocyte Count (THC)

Sampel haemolymph yang telah berada pada syringe dan tercampur antikoagulan, diletakkan pada permukaan hemocytometer sebanyak 0,1 ml dan ditutup menggunakan cover glass. Sampel haemolymph selanjutnya diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali. Diamati jumlah sel pada 5 bidang hemocytometer. Data yang didapatkan dicatat untuk digunakan dalam perhitungan THC (Jannah, 2018). Rumus perhitungan THC:

$$\text{THC} = \frac{\sum \text{sel teramati}}{\sum \text{kotak diamati}} \times 25 \times \frac{1}{\text{vol Haemocytometer}} \times \text{FP}$$

Keterangan:

FP : Faktor pengencer

Pengamatan Differential Haemocyte Count (DHC)

Sampel haemolymph yang telah diambil dari udang uji ditetaskan pada gelas objek sebanyak 0,1 dan dibuat ulas, kemudian dikeringkan di udara dan difiksasi dengan methanol 100% selama 10 menit. Preparat dikeringkan kembali di udara setelah difiksasi menggunakan methanol 100% dan diwarnai dengan cara direndam di larutan giemsa 10% selama 15 menit. Preparat dikeringkan di udara, dicuci dalam air mengalir selama 30 detik dan dibiarkan kering. Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali dan dibedakan menurut jenisnya yaitu sel hialin, semi granular dan granular (Rahayu, 2018). Rumus perhitungan DHC:

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

Pengamatan Aktifitas Fagositosis (AF)

Sampel hemolymph udang dimasukkan ke dalam effendorp sebanyak 0,1 ml dan dicampur secara merata dengan 1 ose bakteri *Stapylococcus aureus* dan diinkubasi selama 20 menit. Haemolymph yang telah bercampur dengan bakteri *Stapylococcus aureus* ditetaskan pada kaca preparat dan dibuat preparat ulas. Preparat ulas difiksasi dengan methanol 100% selama 10 menit dan diwarnai menggunakan giemsa 10% selama 15 menit. Selanjutnya, preparat yang telah diwarnai menggunakan giemsa 10% dialiri air secara perlahan selama 30-60 detik untuk membuang sisa warna giemsa. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali. Sel-sel yang melakukan aktifitas fagositosis dihitung dan dicatat untuk digunakan dalam perhitungan aktifitas fagositosis (Suleman, Sri & Ating, 2019).

$$\text{aktivitas fagositosis} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit yang melakukan fagositosis}}{\text{Jumlah Sel Fagosit}} \times 100\%$$

Perhitungan Nilai Survival Rate (SR)

Tingkat kelulusan hidup merupakan gambaran kemampuan biota yang dibudidayakan untuk bertahan hidup selama proses budidaya. Nilai kelulusan hidup adalah perbandingan antara jumlah total biota yang bertahan hidup dibagi dengan jumlah total biota yang ditebar di

awal. Data SR yang digunakan dalam perhitungan adalah data yang dikumpulkan selama penelitian berlangsung. Rumus yang digunakan untuk menghitung nilai SR mengacu pada (Effendi, 2004):

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Kelulusan hidup

Nt : Jumlah benur yang hidup di akhir penelitian (ekor)

No : Jumlah total benur awal penebaran (ekor)

Perhitungan Total Vibrio Count (TVC) dan Total Bacterial Count (TBC)

Perhitungan TBC dan TVC dilakukan di akhir penelitian (hari ke 25). Sampel yang digunakan adalah air media budidaya untuk perhitungan TBC. Sampel air diambil sebanyak 0,1 mL dan dilarutkan pada 0,9 mL larutan PBS dan dilakukan seri pengenceran sampai 10⁻⁸ cfu/ml. Perhitungan total bakteri dilakukan dengan metode TPC (Total Plate Count). Analisis TPC menggunakan media TSA (Thiosulfat Sodium Agar) dengan menyebarkan 0,1 ml sampel dari pengenceran ke dalam cawan petri, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Hasil perhitungan koloni berupa (cfu) per ml/g. Perhitungan koloni dilakukan pada seri pengenceran 10⁻⁶ cfu/ml, 10⁻⁷ cfu/ml, dan 10⁻⁸ cfu/ml. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter dan dicatat untuk digunakan dalam perhitungan TBC Nufus (2016).

Perhitungan TVC dilakukan dengan mengambil sampel hepatopankreas udang sebanyak 0.1 g. Hepatopankreas kemudian dihaluskan dan dilarutkan menggunakan larutan fisiologis 0.9 ml. Selanjutnya, sampel hepatopankreas yang telah dilarutkan diencerkan dengan seri pengenceran sampai 10⁻⁶. Perhitungan TVC menerapkan metode TPC yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Koloni bakteri yang muncul kemudian dihitung dengan colony counter dan dicatat Nufus (2016). Rumus perhitungan TVC dan TVC Damongilala (2009) :

$$\text{Total Bakteri} = \frac{\text{Jumlah koloni bakteri}}{\text{faktor pengencer}} \times 1$$

Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan uji anova single factor dengan selang kepercayaan 95% pada SPSS, dan uji lanjut untuk seluruh parameter penelitian dilakukan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

HASIL

Uji Fitokimia

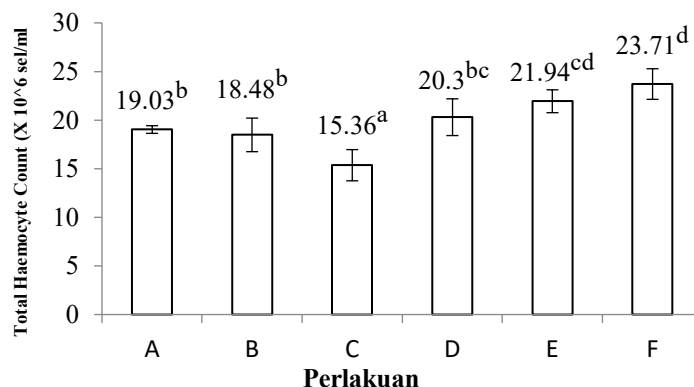
Uji fitokimia merupakan tes yang dilakukan untuk menentukan kandungan bahan kimia dari suatu bahan alami. Uji fitokimia ini dilakukan secara kualitatif menggunakan beberapa tes dan reagen. Hasil uji fitokimia disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Jeruju

Jenis Uji	Metode	Hasil
Flavonoid	1 mL sampe + NaOH, + CH ₃ COOH dan + H ₂ SO ₄	+
Alkaloid	1 mL sampel + H ₂ SO ₄ , + Mayer	+
	1 mL sampel + H ₂ SO ₄ , + Wagner	+
	1 mL sampel + H ₂ SO ₄ , + Dragendrof	+
Saponin	1 mL sampel + Kloroform, + CH ₃ COOH dan + H ₂ SO ₄	-
Fenol	1 mL sampel + FeCl ₃	+
Steroid	1 mL sampel + Kloroform, + CH ₃ COOH dan + H ₂ SO ₄	-

Total Haemocyte Count (THC)

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap peningkatan nilai THC pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan tanpa ekstrak (Gambar 1).

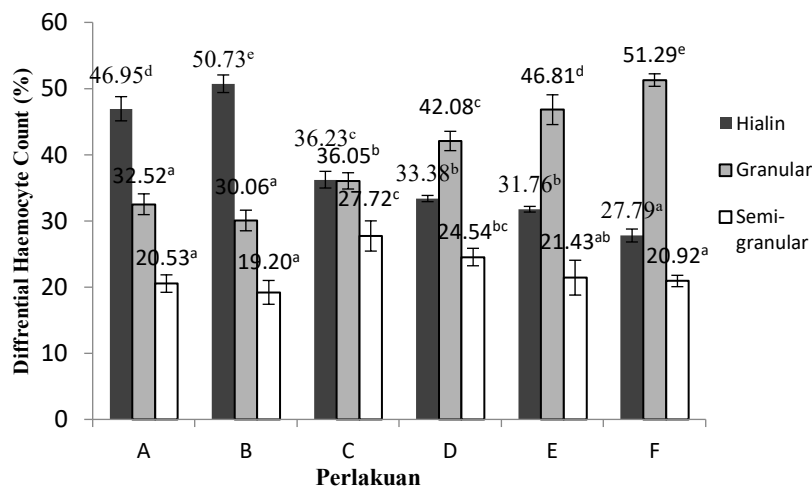


Gambar 1. Grafik Nilai Total Haemocyte Count (THC).

Keterangan: A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

Pengamatan Diffrential Haemocyte Count (THC)

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap peningkatan nilai DHC (sel granular) pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan tanpa ekstrak (Gambar 2).



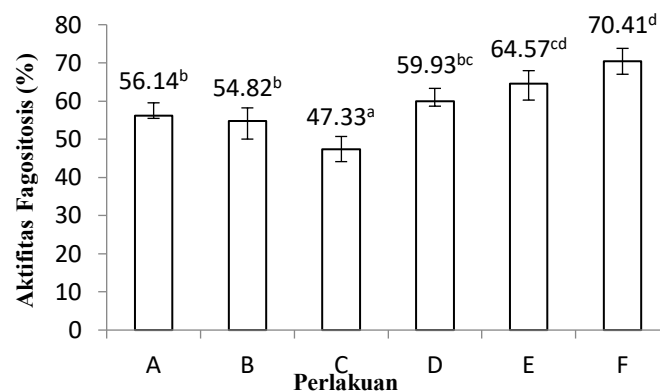
Gambar 2. Grafik Nilai Diffrential Haemocyte Count (DHC).

Keterangan: A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

Pengamatan Aktifitas Fagositosis

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap peningkatan nilai aktifitas

fagositosis pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan tanpa ekstrak (Gambar 3).

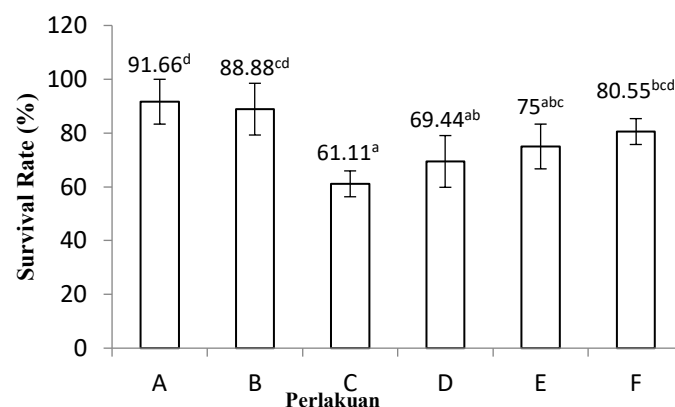


Gambar 3. Grafik Aktifitas Fagositosis.

Keterangan: A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

Perhitungan Survival Rate (SR)

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap peningkatan nilai aktifitas fagositosis pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan C (kontrol +/tanpa ekstrak) (Gambar 4).

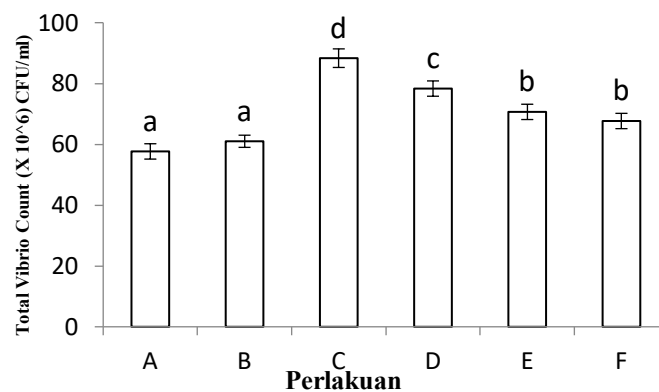


Gambar 4. Grafik Survival Rate.

Keterangan: A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

Total Vibrio Count (TVC)

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap penurunan konsentrasi bakteri vibrio pada hepatopankreas udang uji pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan C (kontrol +/tanpa ekstrak) (Gambar 6).

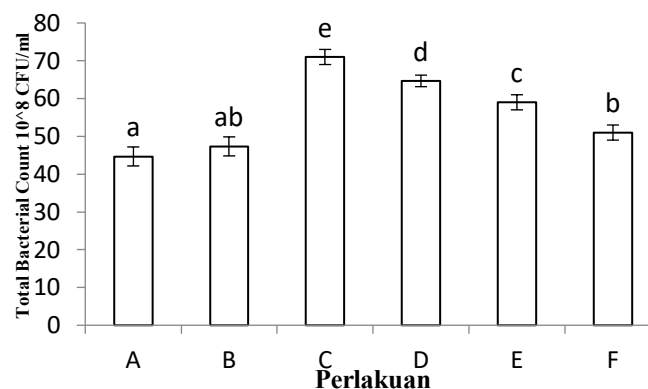


Gambar 6. Grafik Total Vibrio Count (TVC).

Keterangan: A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

Total Bacterial Count (TBC)

Hasil analisis anova single factor menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jeruju memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap penurunan konsentrasi bakteri umum pada air pemeliharaan udang uji pada perlakuan yang diberikan ekstrak dibandingkan perlakuan C (kontrol +/tanpa ekstrak) (Gambar 7).



Gambar 7. Grafik Total Bacterial Count (TBC).

Keterangan : A (Kontrol kualitas air); B (Kontrol -); C (Kontrol +); D (Ekstrak 5 g/kg pakan); E (Ekstrak 10 g/kg pakan) dan F (Ekstrak 20 g/kg pakan).

PEMBAHASAN

Berdasarkan uji fitokimia yang dilakukan diketahui bahwa ekstrak daun jeruju yang digunakan dalam penelitian ini mengandung bahan-bahan alami seperti flavonoid, alkaloid, tannin dan fenol (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan (Handayani et al., 2018) yang menyebutkan bahwa daun jeruju mengandung protein, alkaloid, resin, steroid, tanin, glikosida, karbohidrat, saponin, steroid, sterol, terpenoid, fenol, dan katalol. Penambahan bahan ekstrak dari daun jeruju ini diduga mampu meningkatkan parameter kekebalan tubuh dari crustacean seperti udang. Hal ini diperkuat oleh pendapat (Noerhartati & Rizal, 2019) yang menyebutkan bahwa kandungan bahan fitokimia yang terdiri dari alkaloid, tannin dan fenol memiliki aktifitas sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan kualitas sel imun host. Selanjutnya, (Sijuade,

2016) menjelaskan bahwa senyawa alkaloid dapat membantu sel hemosit dalam mengurangi peradangan, mengobati infeksi dan penyembuhan luka. Mulyadi (2020) juga melaporkan bahwa penyediaan bahan-bahan pemicu kekebalan alami telah terbukti mampu mengoptimalkan profil kesehatan hewan air termasuk berbagai kekebalan parameter seperti jumlah hemosit total (THC) dan aktivitas fagositik.

Dalam penelitian ini, didapatkan hasil bahwa penambahan ekstrak daun jeruju pada pakan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan Total Haemocyte Count (THC) pada udang yang diberikan perlakuan setelah infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* jika dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberikan ekstrak. Berdasarkan grafik pada Gambar 1, dapat diketahui bahwa perlakuan F (penambahan ekstrak 5g/kg pakan) memiliki nilai THC tertinggi yakni $23,71 \times 10^6$ sel/ml, sedangkan yang terendah adalah perlakuan C (kontrol positif/tidak ada penambahan ekstrak) dengan nilai THC $15,36 \times 10^6$ sel/ml. Selain itu, perlakuan E (penambahan ekstrak 10 g/kg pakan) dan D (penambahan ekstrak 5 g/kg pakan) juga lebih tinggi dari perlakuan C dengan nilai masing-masing sebesar $21,94 \times 10^6$ sel/ml dan $20,30 \times 10^6$ sel/ml. Hasil uji lanjut BNT juga menunjukkan bahwa perlakuan F, E dan D berbeda nyata dengan perlakuan C.

Peningkatan nilai THC setelah pemberian ekstrak daun jeruju ini diduga karena kandungan fitokimia seperti flavonoid, alkaloid, tanin dan senyawa fenol yang terdapat dalam ekstrak. (Pratama & Tarsim, 2018) juga menyebutkan bahwa kandungan alkaloid dapat meningkatkan jumlah hemosit pada organisme hidup. meningkatnya nilai THC ini kemudian dapat meningkatkan sel granular yang dapat merangsang aktivasi ProPO untuk menghasilkan aktivitas phenoloxidase, sehingga mampu bertahan terhadap serangan patogen (Rosmawaty et al., 2016).

Indikator berikutnya yang dapat menunjukkan respon imun non spesifik pada krustacea seperti udang adalah nilai Differential Haemocyte Count (DHC). (Darwanti & Romziah, 2016) menjelaskan bahwa bentuk hemosit penacid dibedakan menjadi bentuk yang tidak bergranula (agranulocyte), granularnya sedikit (semigranulocyte) dan bergranula banyak (granulocyte). Masing-masing dari jenis sel ini memiliki peranan penting dalam proses pertahanan non spesifik (Johansson et al., 2000). Salah satu metode pertahanan diri non spesifik ini adalah aktifitas fagositosis yang dilakukann oleh ke 3 jenis sel dalam hemosit tersebut. Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak daun jeruju terbukti memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai DHC udang uji yang diinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*. Pada pengamatan sel hialin, nilai sel hialin tertinggi terdapat pada perlakuan B dengan nilai 50,73%, diikuti oleh perlakuan A sebesar 46,95%, perlakuan C 36,23%, perlakuan D 33,38%, perlakuan E 31,76% dan yang terendah adalah perlakuan F sebesar 27,79%. Menurut (Owens & A, 1997) persentase hialin pada udang yang normal terdiri dari 60% sampai 93% dari total hemosit, sedangkan persentase granulosit berjumlah 17% sampai 40%. Perlakuan B dan A merupakan perlakuan dengan nilai sel hialin tertinggi. Hal ini dikarenakan, perlakuan A dan B merupakan kontrol kualitas air dan kontrol negatif yang tidak diinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*, sehingga nilai sel hialinnya berada pada kisaran normal dan lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan C yang diinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* tanpa adanya penambahan ekstrak daun jeruju. Selanjutnya, nilai sel hialin yang rendah pada perlakuan D, E dan F bukan merupakan tanda yang buruk terhadap sistem imun udang uji. Penurunan nilai sel hialin ini searah dengan peningkatan nilai sel granular sebagai bentuk respon terhadap infeksi bakteri pada tubuh udang.

Pada pengamatan sel granular, nilai sel granular tertinggi terdapat pada perlakuan F dengan nilai sebesar 51,29%, diikuti oleh perlakuan E sebesar 46,81%, perlakuan D 42,08%, perlakuan C 36,05%, perlakuan A 32,52% dan yang terendah perlakuan B sebesar 30,06%. Dalam kondisi normal, persentase sel granulosit berjumlah 17% sampai 40% (Owens & A, 1997). Namun, ketika terjadi serangan penyakit, seperti infeksi bakteri atau jamur, jumlah sel

granulosit akan meningkat melebihi presentase normalnya sebagai bentuk respon melawan penyakit. Hal ini didukung oleh laporan dari Gani (1995) yang termuat dalam (Darwanti & Romziah, 2016) yang menyebutkan bahwa persentase granulosit pada udang windu yang terserang Yellow Head Disease (YHD) memiliki jumlah granulosit 53 – 60%, dibanding dengan kontrol 26 – 44%. Johanson dan Söderhall (1989) juga menjelaskan bahwa yang paling berperan dalam sistem pertahanan tubuh udang pada aktifitas fagositosis adalah sel granulosit ketika terjadi serangan penyakit. Saat terjadi infeksi, sel Granulosit ini akan bermigrasi ke daerah-daerah yang mengalami infeksi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktifitas fagositosis pada udang uji yang diberikan ekstrak daun jeruju sebagai imunostimulan. Dalam penelitian ini, nilai aktifitas fagositosis tertinggi terdapat pada perlakuan F yakni 70,41%, diikuti oleh perlakuan E sebesar 64,57%, perlakuan D sebesar 59,93%, perlakuan A 56,14%, perlakuan B 54,82% dan yang terendah adalah perlakuan C sebesar 47,33%. Nilai aktifitas fagositosis ini dapat menjadi salah satu indikator pertahanan tubuh udang uji. Seiring dengan terjadinya infeksi, jumlah sel fagosit dalam hemosit akan semakin tinggi, dan menandakan semakin baik pertahanan tubuh udang (Darwanti & Romziah, 2016). Berdasarkan data yang diperoleh, presentase aktifitas fagositosis pada udang uji yang diberikan ekstrak daun jeruju (Perlakuan D, E dan F) lebih tinggi jika dibandingkan perlakuan kontrol positif (C) (Gambar 3). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penambahan imunostimulan dengan ekstrak daun jeruju dalam pakan mampu merangsang atau meningkatkan sistem imun pada udang dengan merangsang peningkatan aktifitas fagositosis. Hal ini diperkuat oleh laporan dari Putri (2013) yang menyatakan bahwa mekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang sistem imun tubuh udang adalah dengan meningkatkan aktivitas sel-sel fagositosis. Selanjutnya, Gannam and schrok (2001) menjelaskan bahwa Kandungan senyawa fitokimia dapat menstimulir aktivitas sistem pertahanan seluler, dalam hal ini mengaktivasi aktivitas fagositosis, melanisasi, enkapsulasi, nodulasi dan koagulasi, dimana opsonin akan meningkatkan kemampuan fagosit sel hemosit. Beberapa senyawa fitokimia yang dapat berperan sebagai imunostimulan ini adalah senyawa fenol, flavonoid, dan metanol (Suparman & Nyi, 2019).

Survival rate (SR) merupakan persentase dari jumlah udang yang masih hidup setelah dilakukan ujiantang. Dalam penelitian ini nilai SR tertinggi terdapat pada perlakuan A sebesar 91,66% dan diikuti perlakuan B dengan nilai 88,88%, kedua perlakuan ini merupakan perlakuan kontrol tanpa penambahan ekstrak dan tanpa infeksi bakteri. Sementara itu, pada perlakuan dengan penambahan ekstrak, nilai SR tertinggi berada pada perlakuan F dengan nilai 80,55%, diikuti oleh perlakuan E dan D masing-masing sebesar 75% dan 69,44%. Dalam penelitian ini, perlakuan C yang tidak diberikan ekstrak daun jeruju dan diinfeksi bakteri memberikan hasil SR terendah dengan nilai sebesar 61,11%. Hasil SR yang rendah pada perlakuan C membuktikan bahwa telah terjadi infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* selama proses ujiantang. Hal ini juga didukung dengan parameter sistem imun lainnya seperti THC, DHC, dan AF yang juga memiliki nilai dan presentase yang rendah pada perlakuan C jika dibandingkan dengan perlakuan lain yang diberikan ekstrak daun jeruju (D, E dan F), maupun perlakuan kontrol kualitas air (A) dan kontrol negative (B). Nilai SR yang lebih tinggi pada perlakuan yang diberikan ekstrak (D, E dan F) dibandingkan perlakuan kontrol positif (C) juga menunjukkan efektifitas dari penambahan ekstrak daun jeruju terhadap peningkatan nilai SR udang vaname setelah dilakukan ujiantang dengan menambahkan bakteri *V. parahaemolyticus* pada wadah pemeliharaan. Hal ini juga didukung oleh parameter sistem imun lainnya seperti THC, DHC, dan AF yang lebih tinggi nilainya pada perlakuan dengan penambahan ekstrak daun jeruju sebagai imunostimulan dibandingkan perlakuan tanpa ekstrak.

Sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar 7, diketahui nilai total bakteri vibrio pada hepatopankreas udang vaname tertinggi terdapat pada perlakuan C dengan nilai $88,33 \times 10^6$

CFU/ml. Selanjutnya, nilai tertinggi diikuti oleh perlakuan D sebesar $78,33 \times 10^6$ CFU/ml, perlakuan E $70,67 \times 10^6$ CFU/ml, perlakuan F $67,67 \times 10^6$ CFU/ml, perlakuan B 61×10^6 CFU/ml dan yang terendah perlakuan A sebesar $57,67 \times 10^6$ CFU/ml. (Saptiani et al., 2012) menyebutkan bahwa tanaman jeruju mempunyai senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Senyawa bioaktif tersebut merupakan kandungan metabolit dengan komposisi kimia alkaloid, flavonoid, asam lemak, steroid, lignan dan komponen fenol dan terpenoid.

Pada pengamatan nilai Total Bacterial Count (TBC), diketahui bahwa perlakuan C memiliki nilai TBC tertinggi dibandingkan semua perlakuan. Perlakuan C memiliki nilai TBC sebesar 71×10^8 CFU/ml. Menurut Kharisma dan Manan (2012) nilai ambang batas bakteri umum di perairan adalah 10^6 CFU/ml. Jika ambang batas ini dilampaui, kematian massal pada udang dapat terjadi. Namun, dalam penelitian ini, tidak terjadi kematian massal pada udang vaname yang dipelihara. Hal ini diduga karena nilai total bakteri vibrio yang lebih rendah dari nilai total bakteri umum, dimana bakteri vibrio merupakan penyebab utama pada kematian massal udang vaname. Sebagaimana yang dijelaskan oleh (Sari, 2016) bahwa Vibriosis merupakan penyakit yang menyebabkan kematian pada larva, post larva, juvenil, udang remaja dan udang dewasa dengan presentase 80% - 100% dari total populasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Penambahan ekstrak daun jeruju pada pakan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan respon imun non spesifik udang vaname dan kelangsungan hidupnya. Hal ini dibuktikan dengan nilai parameter imun seperti THC, DHC, AF, dan SR pada perlakuan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol positif yang tidak diberikan ekstrak daun jeruju. Perlakuan terbaik adalah perlakuan F (20 g/kg pakan) yang memiliki nilai tertinggi pada parameter THC, sel granular (DHC), aktifitas fagositosis (AF), dan SR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih Kepada Universitas Mataram yang telah memfasilitasi dan memwadahi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aonullah, A. A., Slamet, B. P., & Sarjito. (2013). Pengaruh Penggunaan Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Kelulushidupan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Diinfeksi *Vibrio Alginolyticus*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 126–135.
- Darwanti, K., & Romziah, S. (2016). Efisiensi Penggunaan Imunostimulan dalam Pakan Terhadap Laju Pertumbuhan, Respon Imun dan Kelulushidupan Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*). *Jurnal Biosains*, 18(2).
- Effendi, I. (2004). *Pengantar Akuakultur*. Penebar Swadaya. Jakarta (ID) : Penebar swadaya.
- Fadillah, N., Saptono, W., & Fariq, A. (2019). Penambahan Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora apiculata* pada Pakan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) untuk Pencegahan Vibriosis. *Journal of Aquaculture Science*, 4(2), 91–101.
- Handayani, S., Ahmad, N., & Nurul, P. W. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Daruju (*Acanthus ilicifolius* L.) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil (DPPH). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 5(2), 299–308.
- Johansson, M. W., Keyser, P., & Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. (2000). Sritunyalucksana, K., dan Söderhäll, K. (2000). Crustacean Haemocytes and Haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(3), 45–52.

- Noerhartati, & Rizal, E. M. F. (2019). Manfaat Akar Sorgum Merah (*Sorghum bicolor*) sebagai Immunostimulan pada Hewan Model Imunosupresi. *Seminar Nasional Pakar Tahun Ke 2*.
- Owens, L., & A, O. (1997). Use of Clinical Cell Flow Cytometry for Differential Counts of Prawn (*Penaeus monodon*) Haemocytes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 3(1), 147–153.
- Perikanan, K. K. K. dan. (2018). *Budidaya Udang Masih Sangat Potensial*. <https://kkp.go.id/djpb/artikel/8688-kkp-budidaya-udang-masih-sangat-potensial>
- Praja, K. R., & Dwi, P. S. (2018). The Infection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp and Human. *Oceana Biomedicina Journal*, 1(1), 44–58.
- Pratama, A. F., & Tarsim, O. S. (2018). Kajian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam) sebagai Immunostimulan untuk Meningkatkan Imunitas Non Spesifik Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Sains Teknologi Akuakultur*, 2(2), 16–21.
- Rahayu, M. (2018). *Pengaruh Pemberian Bakteri Bacillus coagulans pada Pakan terhadap Imunitas Nonspesifik Udang Vaname (Litopenaeus vannamei) [Skripsi]*. Lampung (ID) : Universitas Lampung.
- Rosmawaty, R., Rosidah., & Liviawaty, E. (2016). Pemanfaatan Ekstrak Kulit Jengkol dalam Pakan Ikan Untuk Meningkatkan Imunitas Benih Gurame (*Osphronemus gouramy*) terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Kelautan*, 7(1), 14–22.
- S., P. (2008). Peran Mutu dalam Menunjang Eks-por Udang Nasional. *Squalen*, 3(1).
- Saptiani, G., Slamet, B. P., & Sutrisno, A. (2012). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Pertumbuhan *Vibrio harveyi* Secara in vitro. *Jurnal Veteriner*, 13(3), 257–262.
- Sari, P. K. A. A. (2016). *Pengaruh Asam Salisilat dalam Memaksimalkan Penetrasi Hcl dan NaOH pada Proses Sintesis Kitosan dari Limbah Kulit Udang Vannamei (Litopenaeus Vannamei) [Skripsi]*. Denpasar (ID) : Universitas Udayana.
- Sijuade, A. O. (2016). In Vivo Evaluation of Analgesic Activities of *Phyllanthus niruri* Leaf Methanol Extract in Experimental Animal Models. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Science*, 8(3), 1–8.
- Suleman. Sri, A., & Ating, Y. (2019). Potensi Ekstrak Kasar *Ulva lactuca* dalam Meningkatkan Total Haemocyte Count (THC) dan Aktivitas Fagositosis pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmu Perikanan*, 10(1).
- Suparman, A., & Nyi, M. S. (2019). Formulasi Tablet Immunostimulan Ekstrak Daun Pepaya, Herba Meniran, Dan Rimpang Kunyit. *Farmaka*, 17(2), 111–117.