

Suplementasi β -glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam pakan terhadap aktivitas fagositosis, aktivitas NBT, total protein plasma dan aktivitas aglutinasi darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

*Supplementation of β -glucan from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diet on the phagocytic activity, NBT activity, total of protein plasm and agglutination activity of Nile tilapia blood (*Oreochromis niloticus*)*

Sri Dwi Hastuti

Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang Jalan Raya Tlogomas No 246, Malang 65144. *Email : hastuti@umm.ac.id

Abstract. *Tilapia is an important fisheries commodity which intensively farmed in Indonesia. However, an intensive farming system of aquatic organism often lead to disease outbreak. Once the disease emerged, it will be difficult to combat. The curing method by using antibiotics in aquatic organism will bring negative impacts, such as causing bacteria resistance and decline of aquatic environments. Therefore control of disease in aquatic organism should be done through preventive methods such as the use of β -glucan from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). It is widely known that yeast' cell wall contain of immunostimulant substance namely β -glucan. This research was aimed to find the effect of different dose of β -glucan in diet toward the phagocytic activity, respiratory burst which is indicated by Nitroblue Tetrazolium (NBT) activity, total of protein plasm and agglutination activity of tilapia blood. Method used in this study was experiment by complete random design using five treatments triplicate. Those treatments were β -glucan 0; 2,5; 5; 7,5 and 10 ppm/kg¹ diet. Result showed that the different dose of β -glucan in diet gave a significantly effect on the phagocytic activity and total of protein plasm, but not on respiratory burst (NBT activity). The highest phagocytic activity occurred in treatment E (β -glucan 10 ppm/kg¹ diet) with the value of phagocytic activity was 37,67%, whereas the highest of total of protein plasm was occurred in treatment B (β -glucan 2,5 ppm/kg¹ diet) with the value of 123,58 mg/ml¹.*

Keywords : *Baker's yeast, β -glucan, phagocytic and agglutination activity, NBT activity, total of protein plasm*

Abstrak. Ikan nila merupakan salah satu komoditas perikanan penting di Indonesia Sistem budidaya secara intensif seringkali membawa resiko munculnya berbagai penyakit infeksius. Selama ini pengobatan penyakit pada hewan akuatik yang dibudidayakan seringkali menimbulkan efek negatif seperti resistensi bakteri dan penurunan kualitas lingkungan. Oleh sebab itu pengendalian penyakit sebaiknya dilakukan lewat upaya pencegahan misalnya dengan pemanfaatan β -glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*), β -glucan diketahui merupakan salah satu immunostimulant yang bisa meningkatkan respon kekebalan nonspesifik ikan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi β -glucan pada berbagai dosis terhadap aktivitas fagositosis, ledakan pernafasan yang diindikasikan dengan aktivitas Nitroblue Tetrazolium (NBT), total protein plasma dan aktivitas aglutinasi darah ikan nila uji. Metode penelitian yang dipakai adalah eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari lima perlakuan dan tiga kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah dosis β -glucan sebanyak 0 ppm/kg pakan; 2,5 ppm/kg pakan; 5 ppm/kg pakan; 7,5 ppm/kg pakan dan 10 ppm/kg pakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan jumlah β -glucan dalam pakan berpengaruh nyata terhadap aktivitas fagositosis dan total protein plasma darah ikan nila uji, tapi tidak berpengaruh terhadap aktivitas NBT (ledakan pernafasan). Aktivitas fagositosis terbaik dicapai pada perlakuan E dengan dosis β -glucan 10 ppm/kg pakan dengan nilai aktivitas fagositosis sebesar 37,67%, sementara itu total protein plasma tertinggi didapat pada perlakuan B (2,5 ppm/kg pakan) dengan nilai total protein plasma sebesar 123,58 mg/ml.

Kata kunci: Ragi roti, β -glucan, aktivitas fagositosis dan aglutinasi, aktivitas NBT, total protein plasma

Pendahuluan

Sudah sejak lama ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dibudidayakan secara intensif di Indonesia. Budidaya intensif seringkali beresiko terhadap kemunculan penyakit, hal ini disebabkan pada budidaya intensif ikan nila dipelihara dengan kepadatan tebar yang tinggi dan penggunaan pakan yang intensif pula, sehingga menyebabkan penurunan kualitas air yang selanjutnya akan memicu timbulnya penyakit. Munculnya penyakit merupakan masalah serius dalam budidaya ikan. Penggunaan beberapa antibiotik, vaksin dan bahan-bahan kimia untuk pengendalian dan pengobatan penyakit ikan telah banyak dicoba, namun seringkali kurang efektif, sehingga saat ini pengendalian penyakit ikan banyak diarahkan kepada penggunaan immunostimulant untuk meningkatkan kekebalan ikan, sehingga ikan tahan terhadap serangan penyakit. Sebagaimana pada hewan tingkat tinggi lainnya, ikan memiliki mekanisme sistem kekebalan spesifik dan non spesifik untuk melindungi diri dari patogen yang masuk, salah satunya adalah mekanisme fagositosis yang dilakukan oleh sel fagosit, yang

merupakan mekanisme kekebalan non spesifik. Diketahui bahwa sistem kekebalan non spesifik ini dapat dirangsang oleh berbagai jenis imunostimulant seperti levamisole (Siwicki, 1987, 1989), glucan (Jorgensen and Robertsen, 1995; Ainsworth, 1994; Jeney *et al.*, 1997), glucan yang ditambahkan vitamin C (Verlhac *et al.*, 1996), RNA dari ragi (Sakai *et al.*, 2001), lipopolisakarida (Dalmo and Seljelid, 1995; Hastuti, 2006), zelanol (Keles *et al.*, 2002) dan kitosan (Siwicki *et al.*, 1994). Bahan tanaman obat seperti lidah buaya juga bisa dimanfaatkan sebagai imunostimulant (Hastuti, 2007). Salah satu bahan yang diketahui mempunyai aktivitas sebagai imunostimulant adalah glucan, yang diperoleh dari dinding sel ragi (*yeast*). Sebagai contoh adalah β -1,3 glucan yang banyak terkandung dalam dinding sel ragi roti dari jenis *Saccharomyces cerevisiae* (Cerenius *et al.*, 1994; Rantetondok, 2002).

Beberapa peneliti telah melakukan studi tentang pengaruh ragi roti dalam meningkatkan kekebalan pada jenis udang-udangan. Oleh karena itu penelitian ini mencoba untuk mengaplikasikan β -glucan yang diperoleh dari ragi roti terhadap ikan air tawar yang dalam hal ini adalah ikan nila untuk mengetahui efektivitasnya dalam meningkatkan kekebalan ikan nila. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi β -glucan dari ragi roti sebagai imunostimulant yang diaplikasikan lewat pakan pada berbagai dosis, terhadap aktivitas fagositosis, aktivitas NBT (ledakan pernafasan), total protein plasma dan aktivitas aglutinasi darah ikan nila uji. Manfaat penelitian ini adalah memberikan suatu alternatif metode penanggulangan penyakit ikan yang lebih aman dengan memanfaatkan β -glucan yang dapat diperoleh dari ragi roti, yang berperan sebagai imunostimulant untuk meningkatkan sistem kekebalan ikan nila terhadap berbagai patogen.

Bahan dan Metode

Ekstraksi β -glucan dari Ragi Roti

Ekstraksi β -glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam penelitian ini menggunakan metode Hunter *et al.* (2002), yaitu 100 gram ragi roti kering dengan merk dagang Mauripan ditambahkan 600 ml NaOH konsentrasi (1 M/lt), dan dicampur sampai rata. Selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan autoclave pada suhu 115 °C tekanan 0,6 kgcm⁻² selama 45 menit dan dibiarkan selama 3 jam, kemudian disentrifuse pada 2000 g selama 15 menit, disuspensikan dalam air destilasi sebanyak 600 ml, dan dicuci sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditambahkan 500 ml HCl (3 %) kemudian disentrifuse selama 15 menit dan dicuci kembali dengan menggunakan air destilasi sebanyak 3 kali. Endapan pellet yang terakhir dicuci dengan 120 ml H₂O₂ (3%) sebanyak 3 kali dengan menggunakan sentrifuse dingin pada suhu 20 °C. Selanjutnya pellet dicuci kembali menggunakan Acetone 100 % sebanyak 2 kali. Endapan terakhir dilipilisasi sampai kering dengan vacuum freeze drayer dan disimpan dalam refrigerator sampai saatnya digunakan. Sebelum digunakan β -glucan terlebih dahulu disuspensikan dalam larutan Phosfat Buffer Saline (PBS).

Pembuatan pakan uji

β -glucan dalam bentuk powder disiapkan sesuai dengan dosis yang akan dikenakan pada ikan uji, masing-masing dosis β -glucan 0 ppm/kg pakan (A); 2,5 ppm/kg pakan (B); 5,0 ppm/kg pakan (C); 7,5 ppm/kg pakan (D) dan 10 ppm/kg pakan (E). β -glucan kemudian masing-masing dilarutkan dalam 10 ml PBS dan dicampur dengan 1 kg pakan pellet yang telah dihaluskan sampai benar-benar rata, kemudian dibentuk kembali menjadi pellet dengan alat penggiling daging lalu dijemur dibawah terik matahari sampai benar-benar kering. Selanjutnya pakan uji disimpan sampai saatnya digunakan (hindari tempat lembab, agar pakan uji tidak ditumbuhi jamur).

Persiapan dan pemeliharaan ikan uji

Ikan nila dengan ukuran panjang lebih kurang 22,75±2,21, berjumlah 15 ekor yang berada dalam kondisi sehat dimasukkan dalam akuarium yang telah dilengkapi filter aerasi, masing-masing tiga ekor ikan per akuarium. Ikan dipelihara selama 28 hari dan diberi pakan sebanyak 3% dari berat biomassa, pemberian pakan dilakukan dengan frekwensi 2 kali sehari pada saat pagi (pukul 07.00) dan sore (pukul 15.00). Sisa pakan dan feses setiap pagi hari dikeluarkan dengan cara penyiponan. Setelah 28 hari masa pemeliharaan dilakukan sampling darah ikan nila yang selanjutnya akan digunakan untuk pengukuran parameter uji yang meliputi aktivitas fagositosis, ledakan pernafasan (aktivitas NBT), total protein plasma dan aktivitas aglutinasi.

Pengambilan sampel darah ikan

Setelah 28 hari pemeliharaan dengan pemberian pakan yang mengandung β -glucan, ikan diambil darahnya. Sebelum sampling darah, ikan dibius dengan menggunakan minyak cengkeh dengan dosis 1 ml/ 8 liter air sampai ikan pingsan. Pengambilan darah dilakukan pada bagian dorsal ikan dengan menggunakan jarum suntik ukuran 1 ml yang sudah dibasahi dengan EDTA sebagai antikoagulan. Setelah darah diambil ikan dimasukkan dalam air mengalir sampai pulih sadar kemudian dikembalikan pada akuarium pemeliharaan, sementara darah dimasukkan dalam tabung eppendorf untuk kemudian dilakukan pengujian lebih lanjut.

Uji Aktifitas Fagositosis

Uji Aktifitas Fagositosis dilakukan berdasarkan metode Anderson and Siwicki (1995), darah dimasukkan dalam tabung hematokrit, disentrifuse pada kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Tabung hematokrit dipotong pada batas eritrosit dan leukosit dan leukosit ditampung pada tabung eppendorf. Leukosit sebanyak 100 μ l dimasukkan pada sumuran mikropate, kemudian ditambah dengan *Aeromonas hydrophila* (kepadatan 10⁸ sel/ml) dengan volume yang sama, dicampur dengan cara pipeting, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya 5 μ l sampel diambil dan diletakkan diatas obyek

glas, dibuat preparat ulas dan didiamkan hingga kering angin. Selanjutnya difiksasi dengan ethanol absolut selama 5 menit dan dikeringanginkan. Kemudian diwarnai dengan safranin (0,15%) selama 10 menit dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 X. Aktifitas fagositosis dinyatakan dengan jumlah sel yang memfagosit bakteri dibagi 100 sel fagosit yang diamati dikalikan 100%.

Pengukuran aktivitas NBT dengan spektrofotometer

Pengukuran NBT dilakukan berdasarkan metode Anderson and Siwicki (1995). Darah dari ikan sampel diambil sebanyak 100 μ l dimasukkan dalam tabung eppendorf kemudian ditambahkan 0,2% NBT (dalam 0,85 NaCl) dengan volume yang sama. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi, 50 μ l campuran tersebut diambil dan dipindahkan ke tabung reaksi gelas kemudian ditambahkan 1000 μ l N,N-dimethyl formamide (DMF), kemudian disentrifus pada 3000 g selama 5 menit. Supernatant diambil dan dipindahkan dalam tabung kaca, selanjutnya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Total protein plasma

Total protein plasma dikur berdasarkan metode Anderson and Siwicki (1995). Darah diambil dari ikan uji dengan spuit yang telah dibasahi dengan anti-koagulan (EDTA 10%) agar darah tidak membeku, kemudian disentrifus agar plasma benar-benar terpisah dengan sempurna, selanjutnya plasma dipisahkan dari sisa darah dan menempatkannya dalam mikrotube yang baru. Memasukkan 798 μ l aquabidest pada masing-masing mikrotube sesuai dengan jumlah sampel, kemudian menambahkan 2 μ l serum dan 200 μ l protein test kit (biorad) pada masing-masing mikrotube dan mencampurkannya dengan baik, selanjutnya diinkubasi selama 15 menit dan kemudian diukur absorbansinya pada λ 595-610 nm.

Aktivitas aglutinasi

Aktivitas aglutinasi bakteri dalam penelitian ini adalah penggumpalan bakteri *A. hydrophila* oleh serum darah yang diambil dari ikan uji. Kultur bakteri pada media NB disentrifus pada 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Supernatant dibuang dan sel bakteri dicuci dan dilarutkan dengan PBS. Konsentrasi bakteri yang digunakan untuk uji dibuat sebanyak 1,5-2 pada OD₆₀₀.

Ikan diambil darahnya kemudian darah dibiarkan menggumpal dan serum terpisah dari sel darah merah. Pada mikroplate dimasukkan 20 μ l PBS pada 12 sumuran, kemudian ditambahkan 20 μ l serum yang tidak dinaktivasi pada sumuran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran berseri pada sumuran ke-2 dan seterusnya. Pada sumuran terakhir diambil 20 μ l suspensi dan dibuang. Kemudian ditambahkan 20 μ l suspensi bakteri yang telah dipersiapkan pada masing-masing sumuran. Plate digoyang-goyang agar tercampur secara merata dan dibiarkan selama satu jam pada suhu ruang. Titer aglutinasi dapat dibaca langsung atau jika belum terbentuk aglutinasi, diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama semalam. Titer aglutinasi positif ditandai dengan terjadinya penggumpalan yang terlihat pada dasar sumuran.

Analisa statistik

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan analisis sidik ragam (uji F). Jika dari hasil analisis sidik ragam diketahui perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk membandingkan nilai antar perlakuan.

Hasil dan Pembahasan

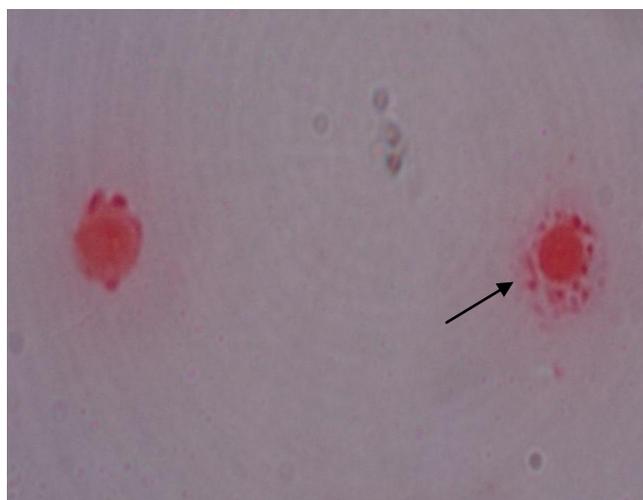
Aktivitas fagositosis

Fagositosis adalah ingesti bahan partikel terutama bakteri ke dalam sitoplasma sel darah. Pola peningkatan prosentase indeks fagositik ini merupakan fungsi dari peningkatan total leukosit maupun presentasi jenis leukosit masing-masing pada limfosit, monosit dan neutrofil (Amrullah, 2005). Aktivitas fagositosis menunjukkan jumlah total dari sel fagosit yang aktif dibandingkan dengan jumlah sel fagosit yang teramati. Hasil pengamatan aktivitas fagositosis seperti terlihat pada Gambar 1., sementara data aktivitas fagositosis pada setiap perlakuan ditunjukkan pada Gambar 2.

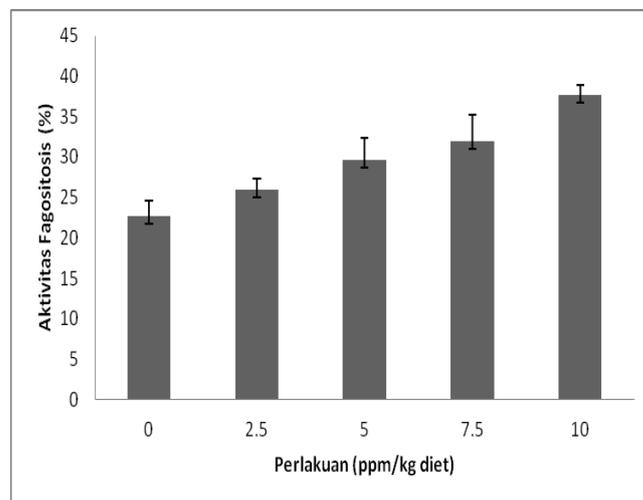
Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis β -glucan dalam pakan yang diberikan maka semakin tinggi pula aktivitas fagositosis sel darah ikan uji. Dari hasil penelitian ini tampak bahwa rata-rata aktivitas fagositosis tertinggi didapatkan pada perlakuan E dengan dosis penyuntikan sebesar 10 ppm/kg pakan yang memberikan nilai aktivitas fagositosis sebesar 37,67%. Dari hasil analisa statistik diketahui bahwa pemberian β -glucan dalam pakan dengan dosis yang berbeda berpengaruh nyata terhadap aktivitas fagositosis darah ikan uji. Semakin tinggi dosis, semakin tinggi pula aktivitas fagositosis. Meningkatnya aktivitas fagositosis menunjukkan adanya peningkatan kekebalan tubuh, sebagaimana diungkapkan Brown (2000), yang menyatakan peningkatan kekebalan tubuh dapat diketahui dari peningkatan aktivitas sel fagosit dari hemosit. Sel fagosit ini berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh inang.

Proses fagositosis menurut Spector (1993) terjadi apabila terjadi kontak antara partikel dengan permukaan sel fagosit. Membran sel kemudian mengalami invaginasi dimana dua lengan sitoplasma menelan partikel sehingga terkurung dalam sitoplasma sel, terletak dalam vakuola yang dilapisi membran (fagosom). Lisosom yang ada di dekatnya melebur ke dalam fagosom dan mengeluarkan enzim-enzim membentuk fagolisosom atau lisosom sekunder sehingga bakteri atau partikel tersebut mati dan hancur dalam sel fagosit tersebut. Sementara itu Baratawijaya (1991) menyebutkan bahwa

penghancuran kuman oleh fagositosis terjadi dalam beberapa tingkat yaitu kemotaksis dimana sel sel fagositosis mendekati mikroorganisme, kemudian menangkap, memakan (fagositosis), membunuh dan mencerna.



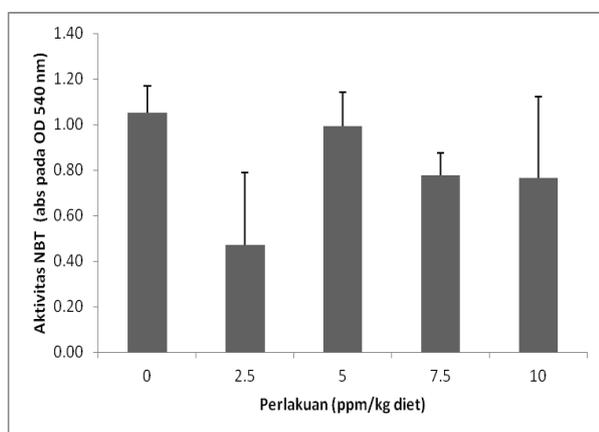
Gambar 1. Hasil pengamatan aktivitas fagositosis (perbesaran 100X). Tanda panah menunjukkan proses fagositosis dimana sel fagosit



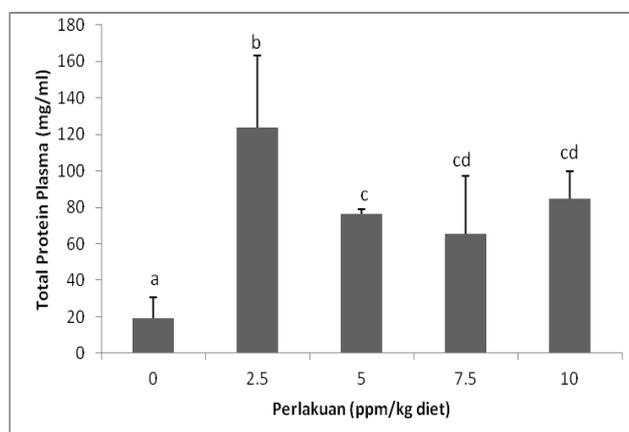
Gambar 2. Data aktivitas fagositosis ikan Uji

Aktivitas NBT (Nitroblue Tetrazolium)

Salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas ledakan pernafasan adalah melalui pengamatan terhadap aktivitas metabolisme neutrofil dengan melakukan uji NBT (Nitroblue Tetrazolium). NBT akan direduksi oleh formazan pada reaksi dengan radikal oksigen yang diproduksi dari neutrofil dan monosit. Analisa produksi radikal oksigen dengan menggunakan NBT (nitroblue tetrazolium) dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil pengamatan Aktivitas NBT dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Uji NBT darah ikan nila pada OD 540 nm



Gambar 4. Rataan total protein plasma sebagai Pengaruh β -glucan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktifitas NBT pada penelitian berfluktuasi, dimana nilai NBT tertinggi diperoleh pada perlakuan kontrol. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa β -Glucan tidak mempengaruhi besarnya absorbansi aktivitas NBT. Hasil yang tidak berpengaruh nyata ini disebabkan karena yang berperan dalam aktivitas NBT adalah netrofil, dimana kerja netrofil cepat tetapi tidak tahan lama, sedangkan fagositik mononuclear kerjanya lambat dapat memfagosit berulang-ulang dan dapat mengolah antigen untuk proses tanggap kebal (Tizard, 1988). Oleh karena sampel darah tidak dapat diukur NBT-nya dalam waktu singkat maka kemungkinan netrofil sudah menurun sehingga aktivitas NBT yang terukur tidak maksimal. Studi yang dilakukan oleh Wijendra and Pathiratne (2007) juga memberikan hasil bahwa aktivitas NBT tidak berbeda antara ikan yang diberi immunostimulant levamisol dengan yang tidak. Semakin tinggi nilai aktivitas NBT menunjukkan bahwa produksi radikal oksigen semakin besar yang digunakan untuk melawan pathogen. Sementara penurunan aktivitas NBT mengindikasikan adanya kontaminan dan infeksi yang kronis atau ikan sedang dalam

kondisi stress. Peningkatan NBT dapat mengindikasikan bahwa pemberian immunostimulant efektif merangsang sistem kekebalan tubuh ikan (Anderson and Siwicki, 1995). Hal ini karena aktivitas NBT dapat menunjukkan kemampuan sel fagosit untuk memproduksi oksigen radikal yang bertujuan untuk merusak bakteri yang berhasil masuk tubuh. Kemampuan makrofag untuk membunuh patogen merupakan salah satu mekanisme penting dalam melindungi diri terhadap penyakit (Gopalakannan and Arul, 2006).

Total protein plasma

Total protein plasma didefinisikan sebagai jumlah total protein yang terdapat dalam plasma darah meliputi albumin, fibrinogen, dan globulin. Protein plasma terdiri dari 60 % albumin, 35 % globulin, dan 4% fibrinogen. Albumin memiliki fungsi dalam transport ion, molekul, nutrisi, hormone dan sisa metabolisme, fibrinogen berfungsi untuk menggumpalkan darah saat terjadi luka, dan globulin berperan dalam sistem kekebalan (Anonymous, 2008). Dengan demikian konsentrasi protein dalam plasma dapat dijadikan acuan untuk mengukur sampai sejauh mana tingkat kekebalan pada suatu makhluk hidup, termasuk ikan. Rataan total protein plasma darah ikan nila ditampilkan pada Gambar 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total protein plasma yang tertinggi terdapat pada perlakuan B (β -Glucan sebesar 2,5 ppm/kg pakan) dengan rata-rata total protein plasma sebesar 23,58 mg/ml dan kemudian perlakuan E (β -glucan sebesar 10 ppm/kg pakan) sebesar 84,45 mg/ml, selanjutnya perlakuan C (β -glucan sebesar 5 ppm/kg pakan) sebesar 76,63 mg/ml, diikuti perlakuan D (β -glucan sebesar 7,5 ppm/kg pakan) sebesar 65,67 mg/ml sedangkan total protein plasma paling rendah terjadi pada perlakuan A (kontrol, tanpa penambahan β -glucan dalam pakan).

Berdasarkan hasil analisis variansi diperoleh hasil bahwa penambahan β -glucan dalam pakan berpengaruh sangat nyata terhadap total protein plasma. Hal ini menunjukkan bahwa β -glucan mampu berperan sebagai immunostimulant yang mampu memperbaiki dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan. Sebagaimana yang dinyatakan oleh Smith et al (2003), bahwa immunostimulant adalah suatu bahan yang digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan aktifitas sistem kekebalan dan resistensi terhadap patogen, selain itu juga meningkatkan kelulushidupan organisme ketika terserang patogen yang berbahaya.

Beberapa bagian tubuh mikroorganisme mempunyai potensi sebagai immunostimulant misalnya, LPS dari bakteri gram negatif, peptidoglikan dari bakteri gram positif dan 1,3 β glucans dari yeast (*Ragi*). Salah satu penghasil beta 1,3 glucan adalah *Ragi* roti (*Saccharomyces cerevisiae*). Beta 1,3 glucan berhubungan erat dengan berbagai respon biologi karena kemampuannya mengaktifkan sistem imun. Beta 1,3 glucan dapat membuat sistem kekebalan pada makhluk hidup bekerja lebih baik dari semula. Matsuyama et al (1992) melaporkan bahwa penyuntikan immunostimulant schizophyllan dari *Schizophyllum commune* dan beta glucans dari derivat *Sclerotium glaucanicum* secara intraperitoneal dengan dosis 2-10 mg/kg dapat meningkatkan daya tahan ikan yellow tail terhadap infeksi *Streptococcus sp*. Pada penelitian ini dosis β -glucan yang paling baik untuk meningkatkan total protein plasma adalah pada dosis 2,5 ppm/kg pakan. Hal ini bisa saja dikarenakan β glucans yang terkandung dalam pakan B terserap sempurna oleh ikan sehingga dapat dimanfaatkan secara optimal untuk mekanisme peningkatan sistem kekebalan. Sahan and Duman (2010) menyatakan bahwa pemberian β -glucan dengan dosis yang terlalu tinggi menyebabkan over dosis dan immunosuppression pada ikan sehingga malah akan menurunkan sistem kekebalan non spesifik ikan.

Aktivitas Aglutinasi Bakteri

Aglutinasi bakteri diartikan sebagai suatu respon kekebalan tahap kedua dengan jalan menggumpalkan bakteri yang masuk dengan bantuan antiserum dalam darah. Tizard (1988), menyebutkan bahwa antibodi dapat berikatan silang dengan butiran antigen, menghasilkan gumpalan atau aglutinasi. Aglutinasi dapat dihasilkan dengan pencampuran suspensi partikel antigen, seperti bakteri dengan antiserum. Antibodi berhubungan dengan cepat dengan partikel tersebut (interaksi primer) tetapi aglutinasi adalah proses yang jauh lebih lambat, karena pelekatan partikel hanya terjadi bila masing-masing bersentuhan. Adanya aktivitas aglutinasi terhadap bakteri oleh antiserum dapat dibuktikan melalui uji aglutinasi bakteri (*Bacterial Agglutination*) secara invitro.

Hasil dari uji aktivitas aglutinasi bakteri menghasilkan data kualitatif berupa hasil positif jika terjadi aglutinasi yang ditandai dengan terjadinya penggumpalan yang dapat terlihat pada dasar tabung atau sebaliknya negatif jika tidak nampak adanya penggumpalan. Dari hasil uji aglutinasi bakteri diperoleh hasil sebagai berikut : untuk perlakuan A1, positif aglutinasi terjadi sampai pada sumuran ke-10 dan negatif aglutinasi terjadi pada sumuran ke-11 dan 12. Untuk perlakuan A2 dan A3, positif aglutinasi terjadi sampai sumuran ke-11 dan tidak terjadi aglutinasi pada sumuran ke-12. Sedangkan untuk perlakuan B1,B2,B3,C1,C2,D1,D2,E1,E2,E3, terjadi positif aglutinasi sempurna pada semua sumuran (sumuran ke-1 sampai ke-12), dan untuk perlakuan C3 dan D3 masing-masing terjadi positif aglutinasi hanya sampai pada sumuran ke-11 dan tidak terjadi aglutinasi pada sumuran terakhir yaitu sumuran ke-12. Dari data pengamatan yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan β -glucan sebagai immunostimulant dalam pakan mampu meningkatkan produksi antibodi yang ditandai dengan aktivitas antiserum dalam menggumpalkan bakteri secara invitro. Hal ini sejalan dengan penelitian Ragap et al (2012) yang menyatakan bahwa pemberian Spirulina sebagai immunostimulant pada ikan nila dapat meningkatkan aktivitas bakterisidal serum darah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla* secara in vitro.

Kesimpulan

Suplementasi β glucan dari ragi roti berpengaruh nyata terhadap aktivitas fagositosis dan sangat nyata terhadap total protein plasma, namun tidak berpengaruh terhadap aktivitas NBT. Aktivitas fagositosis terbaik dicapai pada perlakuan E dengan dosis β -glucan 10 ppm/kg pakan dengan nilai aktivitas fagositosis sebesar 37,67%, sementara itu total protein plasma tertinggi didapat pada perlakuan B (2,5 ppm/kg pakan) dengan nilai total protein plasma sebesar 123,58 mg/ml. Suplementasi β glucan dalam pakan juga memberikan pengaruh yang positif terhadap aktivitas aglutinasi serum darah ikan ketika diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophilla* yang mengindikasikan terbentuknya antibodi yang berfungsi dalam sistem kekebalan ikan. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai dasar untuk aplikasi immunostimulant berupa β -glucan yang diperoleh dari ragi roti untuk dicampurkan dengan pakan sehingga pakan tidak sekedar dapat menunjang pertumbuhan tapi juga dapat menunjang kesehatan ikan melalui peningkatan sistem kekebalan non spesifiknya.

Daftar Pustaka

- Ainsworth, A.J. 1994. A β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 141–152.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 281–307.
- Anonymous, 2008. Immunitation NSC 100. <http://www.healingedge.net/store/page251.html>. Tanggal akses 15 Agustus 2008.
- Amrullah. 2005. Penggunaan immunostimulan *Spirulina platensis* untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan koi (*Cyprinus carpio*) terhadap virus herpes. Tesis, Program Pasca Sarjana Institute Pertanian Bogor, Bogor.
- Baratawidjaya, K.G. 1991. Immunologi dasar. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Indonesia, Jakarta.
- Brown, K.M.T. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publisher, The Netherland.
- Cerenius, L., Z. Liang, B. Duvic, P. Keyser, U. Hellman, E. Tapio-Palva, S. Iwanaga, K. Soderhall. 1994. Structure and biological activity of a 1,3- β -glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.*, 269: 29462–29467.
- Dalmo, R.A., R. Seljelid. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran (1,3) β -glucan on Atlantic Salmon, *S. salar*, macrophages in vitro. *Journal of Fish Diseases*, 18: 175–185.
- Galeotti, M. 1998. Some aspect of application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. Appl. Ichthyology*, 14: 189-199.
- Gopalakannan, A., V. Arul. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255: 179–187.
- Hastuti, S.D. 2006. Evaluasi pertahanan non spesifik ikan nila gift yang diinjeksikan dengan LPS (Lypopolisakarida) bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Laporan Penelitian PBI. Universitas Muhammadiyah, Malang.
- Hastuti, S.D. 2007. Potensi ekstrak lidah buaya sebagai immunostimulant untuk meningkatkan kekebalan non spesifik pada ikan mas. Laporan Penelitian Dosen Muda DP2M-DIKTI. Universitas Muhammadiyah, Malang.
- Hunter, K. W., R. A. Gault, M. D. Berner. 2002. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett Appl Microbiol.*, 35: 267-271
- Jeney, G., M. Galeotti, D. Volpatti, Z. Jeney, D.P. Anderson. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1): 1-15.
- Jorgensen, J., B. Robertsen. 1995. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 43–57.
- Keles, O., A. Candan, T. Bakrel, S. Karatas. 2002. Anabolic efficacy and effect of zeranol on the nonspecific immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(4): 925-931.
- Matsuyama, H., E.P. Remy, T. Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Ragap, H.M., R.H. Khalil, H.H. Mutawie. 2012. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(2): 26-31.
- Rantetondok, A. 2002. Pengaruh immunostimulan β -glucan dan lipopolisakarida terhadap respons imun dan sintasan udang windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sahan, A., S. Duman. 2010. Effect of β Glucan on Haematology of common carp (*Cyprinus Carpio*) infected by ectoparasites. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 1(1): 1-7
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63–92.
- Sakai, M., K. Taniguchi, K. Mamoto, H. Ogawa, M. Tabata. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Disease*, 24: 433– 438.
- Siwicki, A. 1987. Immunomodulatory activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology* (Supp. A), 31: 242-246.
- Siwicki, A. K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.*, 13: 87-91.
- Smith V.J., J.H. Brown, C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 71–90
- Spector, W.G. 1993. An introduction to general pathology. Third Edition. Churchill Livingstone, London.

- Tizard, I. 1988. An introduction to veterinary immunology. Second Ed. WB. Saunders Company, Philadelphia.
- Verlhac V., J. Gabaudan, A. Obach, W. Schüep, R. Hole. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143: 123-133.
- Wijendra, G.D.N.P., A. Pathiratne. 2007. Evaluation of immune responses in an indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. *J. Sci. Univ. Kelaniya*, 3: 17-28.