

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri budidaya udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) telah mengalami perkembangan pesat dalam beberapa dekade terakhir dan menjadi salah satu komoditas ekspor utama bagi banyak negara tropis (Villarreal, 2023; Tian *et al.*, 2024). Pada tahun 2020, produksi global udang vanname mencapai 4,9 juta ton, meningkat dari 3,7 juta ton pada tahun 2015 (FAO, 2022). Di Indonesia, menurut data Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP, 2022), udang vanname menyumbang sekitar 70% dari total produksi udang nasional, dengan nilai ekspor mencapai US\$ 1,7 miliar pada tahun 2021. Pertumbuhan ini menunjukkan potensi besar industri, tetapi juga diiringi dengan tantangan serius, terutama terkait kesehatan udang.

Salah satu penyakit yang paling merugikan dalam budidaya udang adalah vibriosis, yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen *Vibrio harveyi* (Raja *et al.*, 2017). Bakteri ini menyebabkan kerusakan jaringan melibatkan berbagai strategi dan faktor virulensi yang memungkinkan bakteri untuk menginfeksi, berkembang biak dan merusak sel serta jaringan inang, penurunan pertumbuhan dan bahkan kematian dengan tingkat mortalitas yang dapat mencapai 80–100% (Novriadi *et al.*, 2020). Infeksi biasanya terjadi melalui air atau pakan yang terkontaminasi dan penyebarannya sangat cepat dalam sistem tambak intensif (De Silva *et al.*, 2021).

Pengendalian penyakit udang pada umumnya dilakukan dengan penggunaan antibiotik dan bahan kimia sintetis (Luu *et al.*, 2021; Seethalakshmi *et al.*, 2021). Namun, penggunaan berlebihan dari bahan tersebut telah memicu masalah serius, seperti resistensi bakteri terhadap antibiotik, pencemaran lingkungan perairan, dan akumulasi residu kimia dalam tubuh udang yang beresiko bagi kesehatan manusia (Yulisman, 2018). Oleh karena itu, penting untuk mencari alternatif yang lebih aman dan berkelanjutan dalam mengendalikan infeksi *V. harveyi*.

Pendekatan yang umum dilakukan dengan memanfaatkan senyawa bioaktif alami sebagai agen antibakteri *V. harveyi* (Jusidin *et al.* 2021; Nguyen *et al.*, 2023). Produk alami



Optimized using
trial version
www.balesio.com

aut, seperti cangkang tiram, menjadi sumber potensial karena senyawa organik utama dalam eksoskeleton bivalvia. Kitin dapat diolah menjadi kitosan, yaitu biopolimer alami yang memiliki aktivitas antibakteri berasal dari gugus amino dan polisakarida dalam struktur kitosan dan mengganggu fungsi membran bakteri (Ningsih *et al.*, 2022). Aktivitas kitosan dapat dilakukan dengan teknologi nanopartikel (El-Naggar *et al.*, 2022). Nanopartikel perak merupakan terobosan teknologi yang dibuat untuk

menghasilkan material dalam ukuran skala kecil atau nanopartikel (Prasetyaningtyas et al., 2020). Ukuran Nanopartikel perak pada umumnya 1-200 nm yang bersifat non toksik dan sangat efektif melawan bakteri, virus dan mikroorganisme eukariotik sehingga dapat difungsikan sebagai antibakteri dengan menggunakan senyawa organik maupun anorganik (Abdassah, 2017). Ukuran nanopartikel perak dapat meningkatkan sifat aktif dari kitosan karena ukurannya sangat kecil sehingga apabila dikombinasikan pada pakan akan lebih mudah untuk masuk dalam sistem pencernaan pada udang vaname (Lembang et al., 2023). Struktur nanopartikel perak biasanya menunjukkan sifat yang berbeda dari struktur aslinya. Berbagai sifat ini dapat dimodifikasi dengan mengontrol ukuran partikel, mengontrol komposisi kimia, memodifikasi permukaan dan mengontrol interaksi antarpartikel (Fabiani et al., 2018). Keunggulan nanopartikel antara lain mampu menembus ruang antar sel yang dapat ditembus oleh ukuran partikel koloid, kemampuan menembus dinding sel yang lebih tinggi sehingga bila dikombinasikan dengan berbagai teknologi lainnya membuka berbagai kemungkinan untuk mengembangkan agar sesuai dengan kebutuhan dan tujuan yang berbeda (Martien et al., 2012). Berdasarkan penelitian Thanigaivel et al., (2021) bahwa penambahan bahan nanopartikel perak dalam pakan dapat meningkatkan pertumbuhan. Salah satu teknologi yang dapat dikombinasikan dengan nanopartikel perak yaitu kitosan.

Kitosan dapat dikombinasikan dengan ion logam perak (Ag) yang memiliki daya antibakteri kuat. Perak dalam bentuk nanopartikel (*silver nanoparticles* atau AgNPs) dapat merusak dinding sel, protein dan DNA bakteri (Haryono et al., 2008). Kombinasi antara nanopartikel perak dan kitosan dari limbah cangkang tiram dapat membentuk agen antimikroba yang sinergis, efektif terhadap berbagai bakteri patogen bahkan yang telah resisten terhadap antibiotik termasuk *V. harveyi*, (Kumar et al., 2018).

Nanopartikel kitosan dapat berperan sebagai imunostimulan, yaitu zat yang dapat meningkatkan sistem imun alami organisme budidaya udang (Camacho-Jiménez et al., 2020). Penambahan nanopartikel kitosan dalam pakan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang putih (*Penaeus indicus*) (Maqsood et al. 2021). Penambahan AgNPs dalam pakan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dapat



an, respons pertumbuhan, imunitas dan ketahanan terhadap infeksi (Maqsood et al., 2021).

ia nanopartikel kitosan mengandung senyawa-senyawa organik seperti asam benzoat, dan amodiaquine yang memiliki aktivitas antibakteri. Namun, sejauh ini belum banyak penelitian yang secara spesifik membahas kombinasi AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) dalam menghadapi infeksi *V. harveyi* pada udang vanname. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengevaluasi potensi nanopartikel

kitosan dari limbah cangkang tiram dalam meningkatkan respon imun dan performa pertumbuhan udang vanname yang diinfeksi oleh bakteri *V. harveyi*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif pengendalian penyakit yang lebih ramah lingkungan serta berkelanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah penelitian ini yaitu:

1. Berapa dosis AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan untuk meningkatkan respon imun udang vannamei yang di injeksi bakteri *V. harveyi*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan dalam meningkatkan respon imun pada udang vaname yang di injeksi bakteri *V. harveyi*?

1.3 Tujuan penelitian

Adapun tujuan penelitian ini untuk:

1. Menentukan dosis yang tepat dari AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan untuk meningkatkan respon imun udang vannamei yang di injeksi bakteri *V. harveyi*.
2. Menganalisis pengaruh pemberian AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan dalam meningkatkan respon imun udang vaname yang di injeksi bakteri *V. harveyi*.

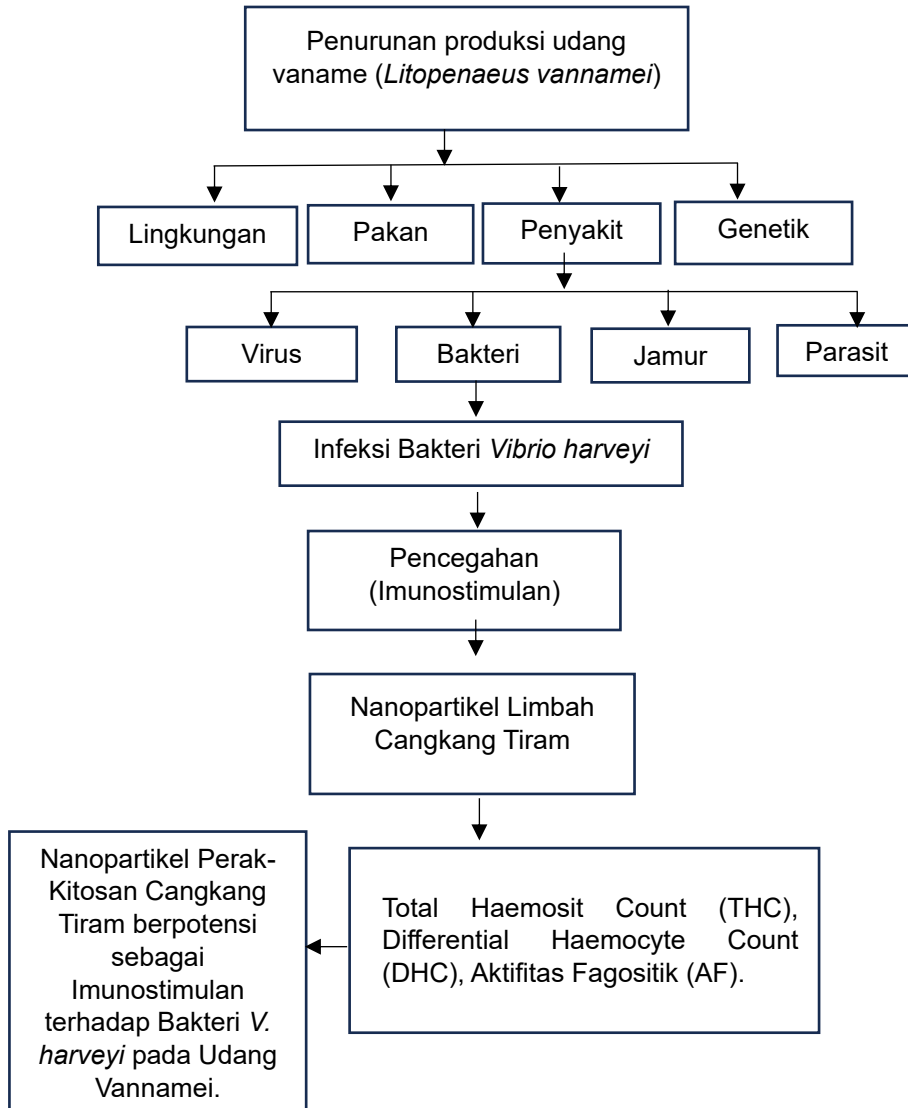
1.4 Hipotesis

Berdasarkan tujuan penelitian, maka hipotesis penelitian ini adalah:

1. Terdapat dosis yang tepat pada AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan terhadap respon imun udang vannamei yang di injeksi bakteri *V. harveyi*.
2. Ada pengaruh pemberian AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) yang diformulasikan dengan pakan buatan dalam meningkatkan respon imun udang vaname yang di injeksi bakteri *V. harveyi*.



1.5 Kerangka Pikir



Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Agustus-November 2024, di Hatchery FIKP Unhas, pembuatan AgNPs-CT (nanopartikel perak limbah cangkang tiram) dan pengukuran kualitas air dilakukan di laboratorium kualitas air dan pengamatan darah dilakukan di laboratorium hama dan penyakit Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

2.2 Bahan dan Alat

2.2.1 Wadah dan Peralatan Penelitian

Wadah penelitian yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 16 kontainer berukuran 40 cm x 36 cm x 32 cm, masing-masing diisi dengan 20 L air laut 30 ppt dan dilengkapi dengan sistem aerasi. Peralatan penunjang yang digunakan dalam penelitian ini meliputi serokan udang, spoit, *slide glass*, *objek glass*, cawan petri, *tube*, tip putih dan biru, mikropipet, refraktometer, termometer, tisu, toples pakan, plastik sampel, *grinder*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, gelas kimia dan tabung reaksi.

2.2.2 Hewan Uji

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah udang vaname pada stadia PL 10-15 dengan kepadatan sebanyak 4 ekor per liter atau 80 ekor per wadah. Total udang yang akan digunakan berjumlah 1.280 ekor. Benur udang vaname diperoleh dari PT. Esaputlii Prakarsa Utama, Kecamatan Mallusetasi, Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan.

2.2.3 Cangkang Tiram

Cangkang tiram yang digunakan adalah cangkang tiram jenis *Crassostrea bilineata* yang diperoleh dari Rumah Makan Kerang Celebes, Kabupaten Takalar. Proses pengolahan cangkang tiram hingga menjadi nanopartikel mengikuti metode yang dijelaskan dalam penelitian Rusdi *et al.*, (2015).

2.2.4 Persiapan Bakteri

Isolat bakteri *Vibrio harveyi* yang digunakan berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Tawar, Sulawesi Selatan. Selanjutnya bakteri diremajakan pada media TSA. Inokulasi bakteri dilakukan menggunakan jarum ose, kemudian metode gores lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu penanaman media cair Triptycase Soy Broth (TSB) dengan cara mengambil isolat ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi TSB. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam waterbath shaker selama 24 jam.



Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri udang vaname dalam media TSA dengan menambahkan media TSA cair sebanyak 20 ml kedalam cawan petri hingga memadat. kemudian menambahkan 200 µl suspensi bakteri uji dengan kepadatan 10^7 CFU/ml secara aseptis ke permukaan media yang telah memadat dalam cawan petri menggunakan pipet. Lalu suspensi bakteri disebarakan menggunakan spreader secara merata hingga permukaan agar mengering. Selanjutnya, diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C .

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 1,28 g ditambahkan aquadest sebanyak 32 ml lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampe media membeku.

Selanjutnya dilakukan pengenceran bakteri yang diawali dengan mengisi 2 buah tabung reaksi dengan larutan fisiologis sebanyak 10 ml dan 9 ml, kemudian bakteri dari agar miring di ulas dan campurkan ke tabung reaksi berisi larutan fisiologis 10 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata, selanjutnya di encerkan dengan cara mengambil 1 ml dari tabung reaksi 10 ml menggunakan mikropipet dan di masukkan pada tabung reaksi 9 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata. Selanjutnya dituankan pada wadah dan bakteri siap untuk digunakan atau di injeksikan pada udang.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Persiapan Wadah

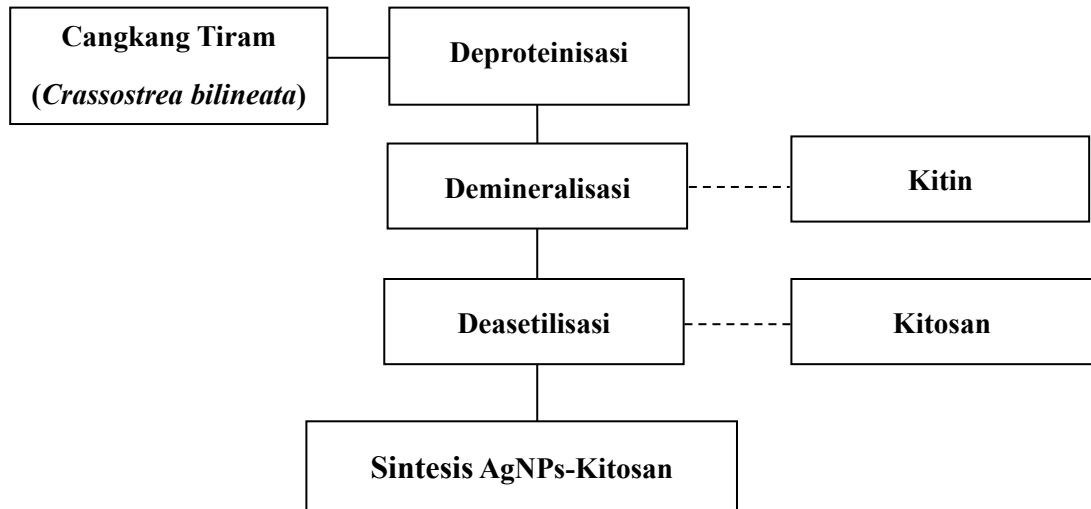
Wadah yang digunakan dalam penelitian ini dicuci bersih menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kontainer kering, diisi dengan 20 L air laut yang telah disterilisasi dan ditutup dengan plastik hitam di bagian luar untuk mencegah stres pada udang vaname. Bagian atas akuarium ditutup dengan waring untuk menghindari udang keluar dari wadah, serta dilengkapi dengan aerasi pada setiap wadah untuk menyuplai oksigen bagi udang vaname. Setiap wadah diberi label perlakuan dan ulangan untuk mempermudah pencatatan data. Selanjutnya, udang vaname dimasukkan ke dalam wadah setelah



sasi terlebih dahulu.

partikel Cangkang Tiram

ai dengan melakukan ekstrak kitin dari cangkang tiram. Adapun n ekstrak kitin dan kitosan cangkang tiram berdasarkan metode



Gambar 1. Proses pembuatan nanopartikel perak-kitosan

1) Deproteinisasi

Pada proses deproteinase dilakukan penambahan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan 6:1 pelarut dengan sampel kemudian dipanaskan kemudian dilakukan pengadukan dan di oven. Proses deproteinasi bertujuan untuk mengurangi kadar protein menggunakan larutan alkali encer dan pemanasan yang cukup. Protein harus hilang agar tidak mengganggu proses kimia berikutnya dan meningkatkan kemurnian kitosan serta kualitas kitosan (Luthfiyana et al., 2022).

2) Demineralisasi

Selanjutnya demineralisasi dengan penambahan HCl 1,5 N dengan perbandingan 10:1 sampel dan pelarut di campurkan. Proses demineralisasi juga harus dilakukan untuk menghilangkan kandungan mineral anorganik (CaCO₃) kalsium karbonat dari struktur keras cangkang tiram. Hal ini dilakukan agar kitosan tidak kasar, reaktif dan larut (Jayanudin et al., 2013)

3) Deasetilasi kitin menjadi kitosan

Setelah itu, Deasetilasi kitin menjadi kitosan menggunakan larutan NaOH 50% dengan perbandingan 10:1 (NaOH:Kitin) kemudian dilakukan pengadukan dan pemanasan selama 2 jam. Proses deasetilasi kitin ini bertujuan untuk asetil yang akan menyebabkan kitin tidak larut dalam air dan kurang (Aldila et al., 2021)



Sintesis Nanopartikel Cangkang Tiram

perak dilakukan dengan metode reduksi kimia. Proses dimulai dengan kitosan, lalu menembarkannya dengan asam asetat 1% dan mengaduknya selama 30 menit. Setelah itu, larutan kitosan disaring dan residunya

ditambah dengan 3 ml AgNO₃ 0,1 M dan 100 ml NaOH 1M. Campuran ini kemudian ditambahkan ke dalam larutan asam asetat 1% yang mengandung kitosan. Larutan diaduk selama 10 jam pada suhu 90 °C. Perubahan warna dari tidak berwarna menjadi kuning muda dan akhirnya coklat kekuningan menunjukkan pembentukan larutan AgNPs-CS (nanopartikel perak-kitosan cangkang tiram) (Kalaivani *et al.*, 2018).

2.3.4 Persiapan Pakan Uji

Pakan yang digunakan pada penelitian ini yaitu pakan yang berbentuk pellet kemudian diformulasi sesuai kebutuhan nutrisi udang vaname. Perlakuan yang diberikan melibatkan nanopartikel perak-kitosan dari cangkang tiram pada dosis yang dicampurkan ke dalam pakan buatan yang telah dimodifikasi dari penelitian Quiñonez *et al.*, (2022). Adapun formulasi pakan buatan (pellet) adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Formulasi pakan buatan dengan penambahan larutan AgNPs-CS

Bahan Baku Pakan	AgNPs-CT (ml/2kg)			
	Kontrol	75ml	150ml	225ml
Tepung ikan	780	780	780	780
Tepung kepala udang	200	200	200	200
Tepung kedelai	540	515	490	465
Tepung jagung	120	95	70	45
Tepung terigu	100	75	50	25
CMC	40	40	40	40
Minyak ikan	160	160	160	160
Vitamin Mix	40	40	40	40
Mineral	20	20	20	20
AgNPs-CS	0	75	150	225
Total	2000	2000	2000	2000
Kandungan kimia (%)*				
Protein Kasar	32,23	32,97	34,73	34,54
Lemak Kasar	8,65	8,92	8,80	9,15
Serat Kasar	4,55	4,30	4,21	3,93
Kadar Abu	25,11	25,17	25,75	26,26
BETN	28,47	28,65	26,51	26,12
Energi (Kkal/kg pakan)	3969	4033	4030	4024

Keterangan: Analisis proksimat dilakukan di Laboratorium Nutrisi Pakan, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. BETN = Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen.



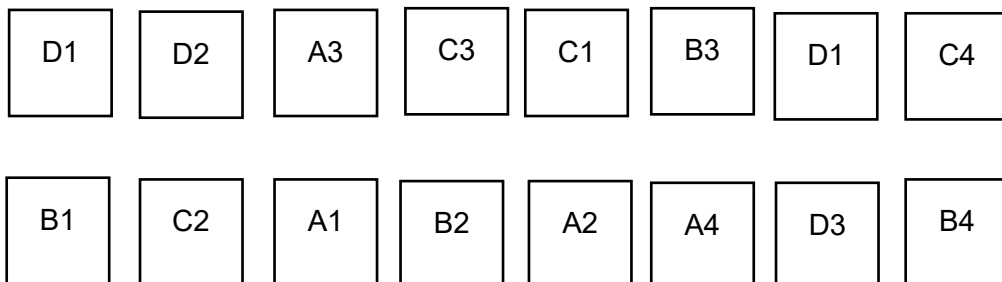
Udang Vaname

...tasisaasi, kemudian diberi makan empat kali sehari. Pakan yang ... dari berat tubuh udang setiap hari. Pemeliharaan ini berlangsung ... ap minggu, sampel diambil secara acak. Selama pemeliharaan, ... at udang ditimbang, sisa pakan diambil dan dilakukan penyiponan. ... dari empat perlakuan dihitung, ditimbang dan diuji respon imunnya terhadap *V. harveyi*. Uji ini dilakukan dengan menyuntikkan setiap udang dalam kelompok

eksperimen dengan 0,1 ml bakteri *V. harveyi* yang memiliki kepadatan 10^7 CFU/ml pada udang vaname (Natasya et al. 2022). Injeksi bakteri dilakukan pada segmen ketiga perut udang. Pengujian berlangsung selama 5 hari yakni pada 0, 24, 72 dan 120 jam dengan mengamati pola kematian udang. Prosedur pengambilan haemolim mengikuti metode dari Wei et al. (2012). Haemolim diambil dengan *syringe* 1 ml yang sebelumnya sudah diisi antikoagulan (NA-sitrat 10%). Antikoagulan ini adalah campuran 0,44 g trisodium sitrat, 0,99 g sodium klorida, 0,19 g EDTA dan 50 ml akuades dan dihomogenkan selama 5 menit (Jannah et al. 2018). Haemolim diambil dari segmen pertama perut udang, lalu darah dimasukkan ke mikrotube dan disimpan dalam *coolbox* agar sampel darah tidak rusak (Zahra et al., 2019).

2.3.6 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan empat ulangan, sehingga total terdapat 16 satuan percobaan. Perlakuan yang diberikan adalah AgNPs-CT dengan dosis yang berbeda ke dalam pakan buatan, dengan rincian pada Tabel 1.



Gambar 2. Desain Penelitian

2.3.7 Parameter yang Diamati

2.3.8 Total Haemosit Count (THC)

Pengamatan terhadap Total Hemosit Count dilakukan pada akhir penelitian dan setelah uji tantang dengan *V. harveyi*. Penghitungan THC mengacu pada metode Maftuch et al. (2013). Hemolim diambil sebanyak 0,1 ml dari pangkal kaki renang pertama menggunakan



0,5 ml antikoagulan (Na-sitrat). Campuran tersebut dihomogenkan dengan tangan membentuk angka delapan. Selanjutnya, hemolim dimasukkan ke dalam hemositometer dan ditutup dengan *coverglass*. Sel hemosit kemudian diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Jumlah sel dihitung menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Sampa-Cardova et al., (2002) sebagai berikut:

$$\text{THC (sel/mL)} = \text{Rataan sel} \times \text{jumlah kotak} \times 10^6$$

2.3.9 Differential Hemosit Count (DHC)

Pengamatan diferensial hemosit (DHC) dilaksanakan pada akhir penelitian dengan merujuk pada metode Martin & Graves (1985). Hemolim ditetaskan pada objek gelas dan dibuat ulasan, kemudian dikering anginkan. Setelah kering, preparat ulasan hemolim difiksasi menggunakan methanol absolut selama 5-10 menit, kemudian kembali di keringkan anginkan. Preparat ini kemudian direndam dalam larutan pewarna giemsa selama 15-20 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan *aquadest* dan dibiarkan kering. Ulasan hemolim diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali dan diidentifikasi jenis selnya. Jumlah hemosit dihitung hingga mencapai 100 sel, dan persentase tiap jenisnya ditentukan. Tipe sel hemosit yang dihitung berjumlah 100 sel, kemudian persentase tiap jenis sel dihitung dengan rumus menurut (Cheng *et al.*, 2004):

$$\text{DHC (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel hemosit tertentu}}{\text{total sel hemosit}} \times 100$$

2.3.10 Aktivitas Fagositosis

Pengamatan aktivitas fagositosis dilakukan pada akhir pemeliharaan dan pasca injeksi *V. harveyi*. Hemolim udang diambil sebanyak 0,1 ml menggunakan spoit 1 ml yang berisi antikoagulan 0,1 ml lalu, 50 µl darah dimasukkan ke dalam *microtube*. Campuran ini diaduk dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sebanyak 5 µl ditetaskan pada objek glass, kemudian dibuat preparat ulas dan dikeringkan di udara. Preparat tersebut difiksasi dengan methanol selama 5-10 menit dan dikeringkan. Selanjutnya, direndam dalam pewarna giemsa selama 15-20 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tisu. Jumlah sel yang menunjukkan proses fagositosis dihitung dari 100 sel fagosit yang teramati. Indeks fagositik dihitung dengan rumus menurut (Cheng *et al.*, 2004):

$$\text{AF (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit yang aktif}}{\text{jumlah makrofag yang aktif}} \times 100$$

2.3.11 Kelangsungan Hidup

Perhitungan kelangsungan hidup/sintasan (SR) ditentukan pada akhir penelitian. Menurut



rumus kelangsungan hidup udang sebagai berikut:

$$\text{SR (\%)} = \text{Nt} / \text{No} \times 100$$

Optimized using
trial version
www.balesio.com

ngsungan hidup udang uji.

du udang uji pada akhir penelitian.

No: Jumlah individu udang uji pada awal penelitian.

2.3.12 Kualitas Air

Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran parameter kualitas air sebagai data penunjang penelitian antara lain suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut dan amoniak.

2.4 Analisis Data

Data kualitas air yang diperoleh selama penelitian dianalisis secara deskriptif. Kemudian data respon imun dan data kelangsungan hidup dianalisis menggunakan *Oneway ANOVA*. Jika data berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey. Sebagai alat bantu untuk melaksanakan uji statistik menggunakan *software* SPSS.



Optimized using
trial version
www.balesio.com