

AKTIVASI SISTEM IMUN *Artemia* MELALUI SUPLEMENTASI β -GLUKAN

Romi Novriadi¹ dan Ibtisam²

¹ Balai Perikanan Budidaya Laut Batam, Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, Jl. Raya Bareleng, PO BOX 60 Sekupang, Batam –29422, Kepulauan Riau – Indonesia

² Mahasiswi Pasca Sarjana Program Human Nutrition, University of Ghent – Belgia
Corresponding : Romi_bbl@yahoo.co.id

ABSTRACT

Development of *Artemia* culture is needed to support larvae production sustainability for fisheries commodities such as fish and shrimps. One of concern facing *Artemia* production is newly infectious and non-infectious diseases that cause lowering quality of the *Artemia* growth and survival. Disease control on *Artemia* production was depend on the different sensitivity of the cyste uses and divers patogenity that potentially infect the *Artemia*. Amongst them, bacterium, called *Vibrio* spp is the most prominent infectious agents. As an invertebrate, *Artemia* has no equipped with an adaptive immune system, thus, they depends on the natural immune system without memory system. One of natural immune system owned by *Artemia* is activation of prophenoloxidase (proPO) and phenoloxidase (PO) enzymes that play key role on *melanization*, *cell-adhesion*, *degranulation* and *encapsulation* processes. This review article focus on the effectiveness of natural immune system activated by β -glukan and their immune responses of *Artemia* culture.

Keywords : immune system, β -glukan, *Artemia*, Prophenoloxidase, Phenoloxidase, *Vibrio* spp, Immunostimulan

PENDAHULUAN

Industrialisasi perikanan budidaya ikan dan udang merupakan sektor yang sangat diharapkan dapat berkontribusi dalam peningkatan ekonomi masyarakat di berbagai daerah di Indonesia. Salah satu kegiatan yang tidak terlepas dari program industrialisasi ini adalah ketersediaan benih ikan dan udang yang berkualitas yang bertujuan untuk menjamin keberlanjutan dan peningkatan produksi budidaya. Program penyediaan benih berkualitas ini tentunya sangat bergantung kepada penentuan strategi pemberian pakan yang tepat, khususnya selama masa transisi dari ketergantungan pada kuning telur hingga kepada konsumsi pakan dari lingkungan (Hjort, 1914).

Introduksi pakan alami yang sesuai akan sangat berpengaruh terhadap kelangsungan hidup larva. Kesalahan dalam pemberian pakan alami akan berdampak kepada: pertumbuhan yang lambat dan abnormal serta akan mengakibatkan kerusakan pada saluran pencernaan larva (Léger et al., 1987). Diantara pakan alami, seperti rotifer maupun daphnia, *Artemia* banyak digunakan di berbagai panti benih ikan dan udang dikarenakan kualitas nutrisi yang tinggi untuk mendukung

pertumbuhan larva dan sistem penyediaan yang mudah (Sorgeloos et al., 1986). Disamping itu, teknologi untuk pengembangan *Artemia* telah distandarisasi dan kista *Artemia* dapat digunakan untuk periode waktu yang lama selama mereka disimpan dalam keadaan kering. Kelayakan penggunaan *Artemia* sebagai pakan alami juga didukung oleh keberadaan asam lemak 20:5 (Ω -3) eicosapentaenoic acid atau EPA (Leger et al., 1986).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa degradasi kualitas pakan dan lingkungan telah menyebabkan tingkat kematian yang tinggi pada ikan budidaya dan memberikan kondisi ideal bagi perkembangan bakteri patogen. Kehadiran bakteri patogen ini juga menimbulkan kekhawatiran bahwa *Artemia* dapat menjadi vektor dalam perkembangan penyakit, khususnya penyakit yang disebabkan oleh kelompok bakteri dalam genus *Vibrio* spp (Gomezgil et al., 1994; Muroga et al., 1994; Verdonck et al., 1994). Pada budidaya *Artemia*, beberapa bakteri patogen yang termasuk kedalam genus *Vibrio* spp dilaporkan telah menjadi menjadi faktor penghambat dalam keberlanjutan produksi, diantaranya adalah: *Vibrio hispanicus* (Gomez-Gil, B et al., 2004); *Vibrio alginolyticus* (Gunther dan Catena., 1980;

Rico-Mora dan Voltolina., 1995); *Vibrio parahaemolyticus* (Gunther dan Catena., 1980; Puente et al., 1992; Rico-Mora dan Voltolina, 1995; Orozco-Medina et al., 2002). *Fusarium solani* (Criado-Fornelio et al., 1989); *Vibrio proteolyticus* (Verschuere et al., 1999, 2000b); *Vibrio harveyi* atau *Vibrio campbelli* (Roque and Gomez-Gill, 2003; Soto-Rodriguez et al., 2003a,b); dan *Vibrio vulnificus* (Soto-Rodriguez et al., 2003a). Disamping bakteri dari kelompok genus *Vibrio* spp, beberapa bakteri dari kelompok genus yang lain juga dilaporkan dapat menyebabkan penyakit pada *Artemia*, diantaranya adalah bakteri dari kelompok genus *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., and *Erwinia* sp (Austin dan Allen. 1982).

Upaya mengatasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri umumnya masih bertumpu kepada penggunaan antibiotik. Namun penggunaan antibiotik secara berlebihan dalam industri akuakultur telah menyebabkan bakteri resisten terhadap beberapa antibiotik. Kajian dari Karunasagar et al. (1994) menyebutkan bahwa kematian massal udang windu (*Penaeus monodon*) disebabkan oleh bakteri *Vibrio* yang resisten terhadap *cotrimoxazole*, *chloramphenicol*, *erythromycin* dan *streptomycin*. Selain hal tersebut, penggunaan antibiotika juga menimbulkan ancaman terhadap kesehatan manusia berupa alergi dan keracunan melalui akumulasi antibiotik pada produk olahan ikan dan udang (Alderman dan Hastings, 1998; Cabello, 2006). Saat ini, upaya untuk melindungi organisme akuatik dari infeksi *Vibrio* tanpa penggunaan antibiotik sedang terus dikembangkan dan diujicoba. Sebuah pendekatan menyeluruh yang bersifat pencegahan terhadap timbulnya penyakit terus dilakukan. Dalam konteks *Artemia*, penguatan sistem imun alamiah melalui immunostimulan dapat menjadi salah satu upaya pengendalian penyakit yang cukup efektif.

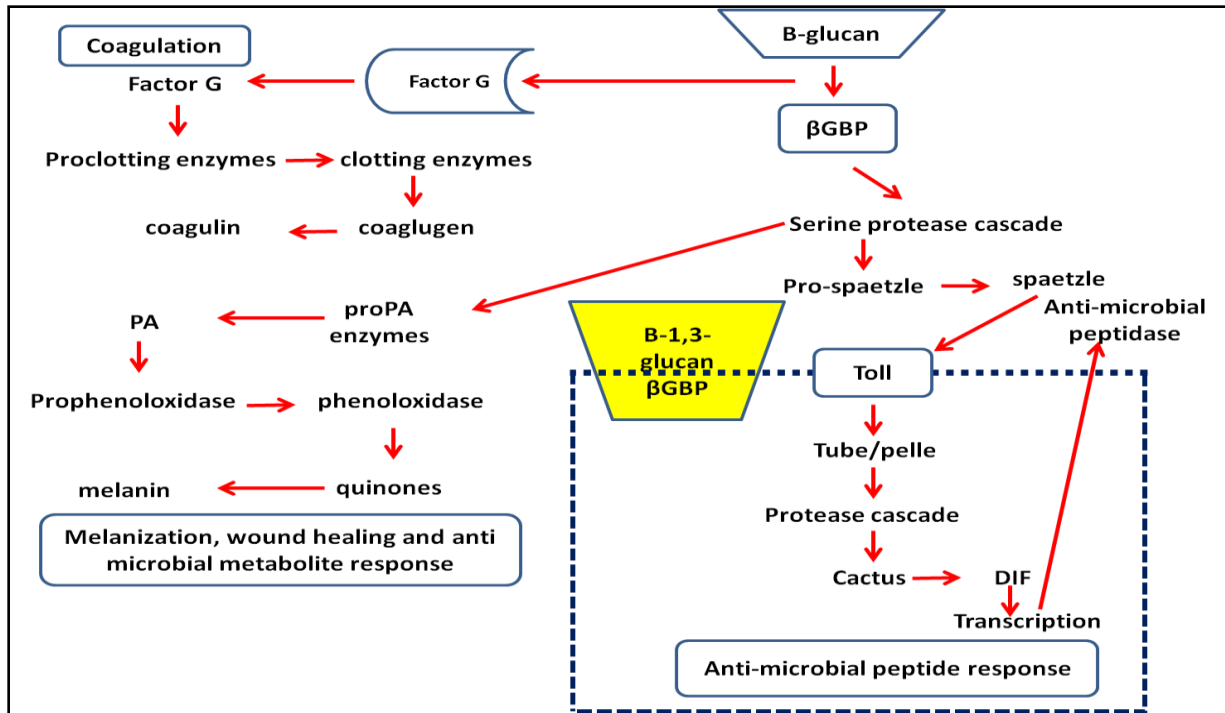
Sistem imunitas *Artemia* dan upaya pengendalian penyakit

Produksi udang dan ikan yang berkelanjutan sangat bergantung kepada ketersediaan benih yang berkualitas dan bebas penyakit. Untuk menghasilkan benih dengan status *Specific pathogen free* ini, upaya konvensional seperti: penerapan *Best management practices* (BMPs) dapat

dikombinasikan dengan kemajuan teknologi di bidang fisiologi, genetik, imunologi hingga skala molekuler. Kombinasi ini akan memberikan pemahaman yang lebih mendasar tentang bagaimana sistem pertahanan tubuh avertebrata (baca: *Artemia*) terhadap serangan penyakit dan kondisi stres selama masa pemeliharaan. Meskipun demikian, perlu digarisbawahi bahwa kesulitan mendasar dalam upaya pengendalian penyakit pada *Artemia* disebabkan oleh perbedaan kualitas kista yang digunakan dan keragaman patogen yang berpotensi untuk menginfeksi *Artemia*. Saat ini, masih sangat sedikit informasi yang berkaitan dengan ontogeni sistem imun pada *Artemia*.

Sistem imun *Artemia* dicirikan oleh tidak adanya sistem kompleks imun adaptif seperti halnya di vertebrata. Hal ini berarti bahwa seperti kebanyakan avertebrata, *Artemia* mengandalkan sistem imun alami sebagai mekanisme pertahanan utama yang terdiri atas respon selular dan respon humoral. Ketidakhadiran sistem imun adaptif pada *Artemia* juga menyebabkan tidak adanya *immunological memory* yang memungkinkan terbentuknya perlindungan seumur hidup terhadap infeksi patogen yang sama. Meskipun demikian, sistem imun di avertebrata mampu untuk mengenal dan menghancurkan invasi mikroorganisme patogen (Hauton & Smith, 2007). Kajian terbaru menyatakan bahwa pengalaman masa lalu terhadap patogen tertentu memungkinkan avertebrata untuk juga menyediakan sistem imun hingga generasi berikutnya. Walaupun masih dibutuhkan kajian lengkap, hal ini memberikan bukti baru bahwa *memory* mungkin ada di avertebrata (Kurtz, 2005).

Protein yang terlibat dalam proses pengenalan komponen dinding sel dari mikroorganisme, seperti *Lipopolysaccharide* (LPS) dan β -1,3-glukan (BG) telah ditemukan di avertebrata. Meskipun demikian, protein yang ada tidak mampu untuk menghancurkan zat asing tanpa kehadiran respon selular terutama sistem fagositosis. Sebagai konsekuensinya, faktor opsonin yang dapat merangsang aktivitas fagositosis sangat penting di *Artemia* khususnya dan avertebrata pada umumnya. Contoh faktor opsonin yang dapat memperkuat fagositosis diantaranya adalah sistem aktivasi prophenoloxidase (proPO) (Soderhall et al., 1994).



Gambar 1. Proses induksi respon selular dan humoral oleh β -glukan di avertebrata. (Diambil dari Soltanian et al., 2009, modifikasi dari Brown dan Gordon, 2005).

Proses imun pertama pada avertebrata adalah pengenalan mikroorganisme penyerang yang dimediasi oleh hemosit dan plasma protein (Bachere, 2003). Hemosit akan mengeluarkan partikel asing dalam *hemocoel* melalui fagositosis, enkapsulasi dan agregasi nodular. Kedua hemosit berperan dalam penyembuhan luka melalui *cellular clumping* serta membawa dan melepaskan *prophenoloxidase system* (proPO). Aktivasi proPO akan menginduksi proses oksidasi *tyrosine* untuk menghasilkan *quinone* dan proses reaksi lainnya yang berujung kepada pembentukan melanin. Telah diketahui bersama bahwa melanin akan berikatan dengan permukaan bakteri dan meningkatkan sistem adhesi dari hemosit ke bakteri yang mengarah kepada dikeluarkannya bakteri melalui aktivasi nodulasi (Cerenius et al., 2008; da Silva, 2002).

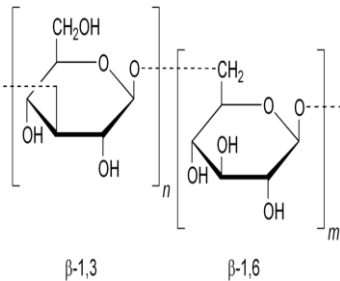
Kajian terbaru menyatakan bahwa koagulasi juga memiliki hubungan dengan aktivasi sistem proPO (Nagai dan Kawabata, 2000). Sejauh ini, informasi tentang peran PO (phenoloxidase) tersedia untuk arthropoda, terutama untuk serangga *Drosophila melanogaster* dan udang *Litopenaeus vannamei* (Cerenius dan Soderhall, 1995). Transformasi proPO menjadi PO melibatkan beberapa reaksi yang dikenal dengan *proPO activating system* (sistem aktivasi proPO). Sistem ini terutama

diaktifkan oleh β -glukan, dinding sel bakteri dan LPS. Tidak diragukan lagi, sistem proPO merupakan bagian terpenting dalam sistem pertahanan *Artemia* dan krustasea pada umumnya serta memberikan dampak kepada perilaku sel, aktivasi molekul penting, dan “netralisasi” molekul yang tidak efektif (Smith, V.J et al., 2003).

Sumber, struktur dan mekanisme kerja β -glukan

Berbagai kajian ilmiah pada ikan telah membuktikan bahwa β -glukan merupakan salah satu senyawa immunostimulan yang efektif dan memiliki potensi untuk meningkatkan status daya tahan tubuh dan mengendalikan penyakit dalam kegiatan budidaya (Robertsen et al., 1994; deBaulny et al., 1996; Anderson, 1997; Figueras et al., 1998; Kawakami et al., 1998; Robertsen, 1999, Meena et al., 2012). Potensi β -glukan juga terbukti efektif pada saat diaplikasikan di krustasea utamanya karena mampu merangsang aktivasi hemosit (Cheng et al., 2005). Segera setelah β -glukan terdeteksi, hemosit akan diaktivasi dan berupaya untuk menetralisasi atau mengeliminasi bakteri patogen melalui fagositosis dan enkapsulasi. Pendeteksian β -glukan juga dapat merangsang keluarnya

molekul bioaktif yang dapat membantu sistem kerja fagositosis, seperti protein mikroba (contohnya lektin), aglutinin, enzim hidrolisis, dan anti mikroba peptida yang tersimpan dalam sel tersebut (Smith dan Chisholm, 2001; Soderhall dan Cerenius, 1998).



Gambar 2. Rumus molekul β -glukan

β -glukan merupakan polisakarida dengan gula sebagai struktur utama dan dihubungkan oleh ikatan β -glycosidic. Secara alami, β -glukan tersebar luas pada dinding berbagai tanaman, seperti gandum, barley dan rye (gandum hitam). Kita juga dapat menemukan β -glukan tersimpan dalam ragi roti dan khamir (dari genus *Saccharomyces*) dan didalam tanaman yang termasuk dalam golongan *Echinaceae* (Tokunaka et al., 2000). Sumber umum dari β -glukan diperoleh dari sel ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* dan kelompok paling penting pada β -glukan adalah β -1,3 glucan dan β -1,6 glucan. β -glukan sangat unik dan memiliki struktur kimia yang sangat beragam tergantung kepada sumber alamiahnya. Perbedaan struktur ini akan memicu perbedaan dalam sistem ekstraksi dan mengakibatkan variasi pada aktivitasnya. Berdasarkan struktur, β -glukan dapat dibagi menjadi tiga kelompok utama: cair, gel dan padat (partikel). Meskipun alasan yang dikemukakan tidak terlalu jelas, kelompok β -glukan yang bersifat cair memiliki daya *immunostimulator* yang lebih kuat dibandingkan kelompok gel dan padat (partikel) (Di Luzio et al., 1979; Di Luzio et al., 1980; Xiao et al., 2004, Ma et al., 2008).

β -glukan telah disepakati dapat mengaktifkan sedikitnya dua jenis respon humoral pada avertebrata, yakni: koagulasi dan produksi anti mikroba (Gambar 1). Mekanisme aktivasi ini utamanya dilakukan oleh *pattern recognition receptors* (PRRs), seperti faktor G, yang akan menginduksi serangkaian proses proteolisis yang pada akhirnya akan menghasilkan koagulasi protein, seperti koagulin.

Kajian lebih lanjut telah mengungkapkan bahwa, berbanding terbalik dengan vertebrata, sistem identifikasi molekul yang berasosiasi dengan patogen mikrobial pada avertebrata tidak dilakukan secara langsung namun lebih kepada bagian dari jalur sinyal yang menghasilkan transkripsi gen (Hoffman, 2003).

Molekul yang paling umum dikenal dapat berasosiasi dengan patogen mikrobial adalah lipopolisakarida, peptidoglikan, asam lipoteichoic, mannan, DNA bakteri, beta-glukan dari jamur dan sepasang pita RNA (Medzhitov dan Janeway, 2000). Proses identifikasi β -glukan di avertebrata utamanya terjadi di haemolymph melalui sejumlah protein yang tidak ada kaitannya sama sekali. Hal ini sangat bertolak belakang dengan apa yang terjadi di vertebrata, dimana proses identifikasi partikel β -glukan baik terlarut maupun tidak terlarut terjadi secara eksklusif melalui sejumlah reseptor permukaan sel (Soltanian et al., 2009).

Aplikasi β -glukan dalam kultur *Artemia*

Aplikasi β -glukan sebagai immunostimulan dalam kegiatan akuakultur telah dikaji secara luas dan lengkap. Bridle et al. (2005) mengatakan bahwa pemberian β -glukan kepada ikan salmon (*Salmon salar*) dapat menstimulasi peningkatan *respiratory burst activity* (RBA) pada macrophage secara *in vitro*. Uji tantangan yang dilakukan dengan menggunakan patogen (*in vivo*) justru menunjukkan hasil negatif terhadap peningkatan RBA, produksi lisozim dan ketahanan penyakit terhadap *amoebic gill disease* (AGD). Makrophage yang diisolasi dari bagian atas ginjal ikan *gilthead seabream* (*Sparus aurata*) menunjukkan adanya peningkatan *respiratory burst activity* (RBA) ketika diinkubasi dengan menggunakan β -glukan yang diperoleh dari sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* konsentrasi tinggi (Castro et al., 1999). Hasil ini dipertegas oleh kajian Spain-ortono et al. (2002) yang menyebutkan bahwa pemberian sel ragi (*S. cerevisiae*) yang mengandung β -glukan dapat meningkatkan beberapa parameter sistem imun alamiah pada ikan *gilthead seabream* (*Sparus aurata*).

Pada budidaya *Artemia*, kajian tentang efikasi dan efektifitas penggunaan β -glukan juga telah dilakukan. Beberapa laporan khususnya dari Marques et al. (2005) dan Soltanian (2007) mengkonfirmasi bahwa pemberian sejumlah kecil β -glukan secara rutin mampu memberikan perlindungan bagi *Artemia* melawan bakteri

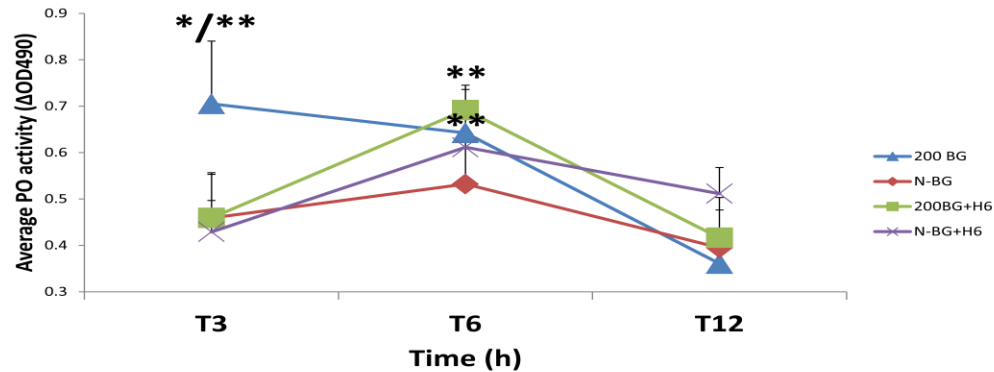
patogen *Vibrio campbellii* sementara untuk *Artemia* yang tidak mendapatkan suplementasi β -glukan tidak dapat bertahan terhadap infeksi patogen *V. campbellii*. Jenis ragi yang diberikan ke *Artemia* dapat memberikan pengaruh yang berbeda terhadap produksi biomass *Artemia*. Hal ini dibuktikan oleh Kajian yang dilakukan oleh Marques et al. (2004) dimana *Artemia* yang di berikan dua strain ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* yang berbeda, strain wild-type strain (WT) (BY4741; genotype Mat a his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0) dan strain mnn9 isogenic mutant (BY4741; genotype Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YPL050c::kanMX4) selama masa pemeliharaan memberikan hasil yang berbeda terhadap total biomass *Artemia* yang dihasilkan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa dibandingkan dengan strain wild-type (WT), *Artemia* yang diberi suplemen ragi strain mnn9 yang memiliki perpanjangan rantai mannose yang kurang sempurna untuk dinding luar terkait mannoprotein, memberikan produksi total biomass yang lebih baik ($P < 0.05$).

Perbedaan ini menunjukkan bahwa penurunan jumlah mannoprotein justru memberikan hasil pertumbuhan yang lebih baik pada *Artemia*. Hal ini sejalan dengan hipotesa Coutteau et al. (1990), yang menyatakan bahwa nilai gizi ragi roti tidak selalu konsisten dikarenakan adanya variasi di lapisan luar mannoprotein yang menjadi penyusun dinding sel ragi. Bila dikaitkan dengan hasil percobaan, jumlah mannoprotein yang rendah dikompensasikan oleh tingginya konsentrasi β -glukan dan kitin pada dinding sel, dimana kedua faktor ini pada akhirnya mampu meningkatkan produksi total produksi biomass di *Artemia*. Lebih lanjut, Kitin diketahui sangat berperan penting bagi seluruh krustasea, termasuk *Artemia*, karena merupakan bahan penyusun utama eksoskeleton di avertebrata (Horst, 1983).

Konsentrasi pemberian β -glukan pada kultur *Artemia* sangat berperan penting dalam menginduksi sistem perlindungan yang lebih baik, utamanya dari infeksi mikroorganisme patogen. Sebuah kajian yang dilakukan oleh Novriadi dan Kadari (2013b) menunjukkan bahwa pemberian 20 μg β -1,3 glukan/ml mampu memberikan tingkat kelulushidupan yang lebih baik jika dibandingkan dengan konsentrasi 10 μg β -1,3 glukan/ml ($P < 0.05$). Bahkan pada ujiantang yang dilakukan dengan menggunakan bakteri *Vibrio harveyi* strain BB120, menunjukkan bahwa konsentrasi 20 μg β -1,3 glukan/ml masih memberikan efek perlindungan yang lebih baik

jika dibandingkan dengan konsentrasi 10 μg β -1,3 glucans/ml. Namun, sangat penting untuk diingat bahwa dosis merupakan faktor kritis dari pemberian β -1,3/1,6 glucans. Percobaan sebelumnya yang dilakukan di udang putih india *F. Indicus* menunjukkan bahwa pemberian glukan dengan dosis tinggi justru menyebabkan penurunan sistem daya tahan tubuh dan degranulasi yang berlebihan sehingga menyebabkan kejenuhan pada sistem daya tahan tubuh (Sajeevan et al., 2009).

Peningkatan sistem imun pada *Artemia* dapat juga dilakukan dengan mekanisme “immune priming”, yaitu sebuah mekanisme untuk menyediakan ataupun membangkitkan respon imun setelah dipapar terlebih dahulu dengan senyawa pembangkit sistem imun seperti β -glukan atau senyawa pembangkit sistem imun lainnya. Aktifitas “immune priming” ini didasari oleh kondisi hewan avertebrata, khususnya *Artemia* yang tidak memiliki limfosit “sejati” dan antibody fungsional lainnya sehingga sangat bergantung kepada sistem imun alamiah sebagai mekanisme pertahanan utama. Namun, keberagaman dan kelimpahan avertebrata hingga kepada evolusi sistem imun berdampak kepada perkembangan sistem pertahanan yang lebih efisien dalam melawan berbagai infeksi patogen. Saat ini, beberapa ilmuwan telah menyatakan bahwa beberapa sistem imun (adaptif) mungkin ada di avertebrata (Kurtz dan Franz, 2003).



Gambar 1. Evolusi aktivitas phenoloxidase pada *Artemia* setelah dipriming dengan β -glukan. **200 BG:** *Artemia* yang mendapatkan *immune priming* dengan β -glukan selama 6 jam; **N-BG:** *Artemia* tanpa perlakuan *immune priming*; **200BG+H6:** *Artemia* dengan perlakuan *immune priming* dan diuji tantang dengan *Vibrio* strain H6 dan **N-BG+H6:** *Artemia* tanpa *immune priming* dan diuji tantang dengan *Vibrio* strain H6 (Sumber: Novriadi, 2013).

Untuk membuktikan efektifitas "immune priming" dalam membangkitkan sistem imun adaptif pada *Artemia*, beberapa kajian telah dilakukan diantaranya oleh Novriadi (2013a) dimana *Artemia* dipapar terlebih dahulu selama 6 jam dengan menggunakan produk β -glukan komersial (MacroGard) sebelum diuji tantang dengan menggunakan *Vibrio* strain H6 (Van Maele et al., 2012). Kajian lainnya juga telah dilakukan oleh Baruah et al., (2011) dimana *Artemia* dipapar selama 6 jam dengan menggunakan heat shock protein sebelum dilakukan uji tantang dengan menggunakan bakteri *Vibrio campbellii* strain LMG 21363.

Hasil kajian menunjukkan bahwa *Artemia* yang mendapatkan perlakuan *immune priming* memiliki aktivitas phenoloxidase yang secara nyata lebih tinggi pada 3 jam dan 6 jam setelah mendapatkan perlakuan *immune priming*. Begitu juga dengan grafik yang ditunjukkan oleh *Artemia* dengan perlakuan *Immune priming* dan diuji tantang dengan bakteri strain H6. Namun secara keseluruhan, efek perlindungan yang dibangkitkan oleh aktivitas phenoloxidase dalam tubuh *Artemia* berlangsung sangat singkat, karna 12 jam setelah perlakuan *Immune priming*, aktivitas phenoloxidase kembali menurun dan hampir sama dengan aktivitas phenoloxidase pada *Artemia* tanpa adanya perlakuan *Immune priming*. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun perlakuan *immune priming* mampu membangkitkan aktivitas phenoloxidase

dan memperkuat sistem pertahanan tubuh *Artemia* terhadap serangan mikroorganisme patogen, efek yang ditimbulkan hanya berlangsung dalam periode yang cukup singkat. Kondisi ini juga diperkuat oleh hasil analisa yang dilakukan oleh Baruah et al. (2011) dimana perlakuan *Immune priming* pada *Artemia* dengan menggunakan *Heat Shock Protein 70 s*, walaupun mampu memberikan efek perlindungan bagi *Artemia* dari serangan infeksi bakteri *Vibrio campbellii*, namun efek perlindungan yang diberikan juga menurun setelah 12 jam.

Sangatlah jelas bahwa *Phenoloxidase* (PO) memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan selular. Melalui aktivasi dengan menggunakan β -glukan diketahui bahwa aktivitas PO secara nyata semakin meningkat bila dibandingkan dengan kelompok avertebrata tanpa perlakuan β -glukan (Chang et al., 2003). Stimulasi pembentukan phenoloxidase (PO) dari sistem non aktif proPhenoloxidase (proPO) melibatkan proses katalisasi hidrolisis senyawa fenol dan oksidasi o-fenol menjadi quinonens yang pada akhirnya mengarah kepada pembentukan melanin (Söderhäll, 1992; Ashida dan Yamazaki, 1990). Konversi bentuk non aktif proPO menjadi bentuk aktif PO dimediasi oleh serine protease yang disebut enzim pengaktivasi proPO (Sugumaran, 2002) yang diinduksi oleh berbagai jenis zat asing dan mengeluarkan peroxinectin (Lu et al., 2006). Walaupun begitu, aktivitas mereka harus dikendalikan secara ketat untuk menghindari pembentukan melanin di lokasi selain dari lokasi terjadinya infeksi (Holmblad dan Söderhäll, 1999). Terkait dengan kajian yang dilakukan oleh Novriadi (2013) dan ditampilkan pada **Gambar 1**, level tertinggi dari proPO pada udang galah *M. Rosenbergii* terjadi pada 1 jam setelah injeksi dengan menggunakan 5 mg CpG oligodeoxynucleotide. Sementara peningkatan aktivitas PO terjadi setelah 6 jam

proses injeksi dilakukan (Lu et al., 2006). Keseluruhan hasil ini diperkuat oleh hasil penelitian yang dilakukan Cerenius et al. (2003) yang menyatakan bahwa peningkatan aktivitas enzim atau transkrip mRNA dari proPO setelah diberi perlakuan Immunostimulan hanya terjadi pada 3 dan 12 jam setelah perlakuan.

KESIMPULAN DAN TREND PENGGUNAAN β -GLUKAN DI MASA DEPAN

Kajian tentang penggunaan β -glukan pada avertebrata umumnya dan *Artemia* khususnya menjadi sangat menarik karena adanya perkembangan pengetahuan tentang sistem pertahanan tubuh avertebrata dari serangan mikroorganisme patogen. Beberapa kajian bahkan menyebutkan bahwa sistem imun avertebrata yang sangat bergantung kepada sistem imun alamiah dapat dibangkitkan oleh sebuah mekanisme yang disebut dengan "Immune priming". Beberapa aplikasi Immune priming dengan menggunakan senyawa pembangkit sistem imun, seperti β -glukan mampu meningkatkan aktivitas sistem imun avertebrata baik komponen selular maupun humoral. Meskipun telah terbukti mampu membangkitkan sistem pertahanan tubuh dan melindungi *Artemia* dari infeksi mikroorganisme patogen, aktivasi komponen Prophenoloxidase (proPO) dan Phenoloxidase (PO) sebagai salah satu sistem pertahanan tubuh yang sangat penting pada *Artemia* dan avertebrata pada umumnya hanya dapat terjadi dalam waktu yang cukup singkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada De Vlaamse Interuniversitaire Raad (VLIR) dan Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan yang telah memberikan beasiswa masing-masing untuk program Master bidang Akuakultur dan Gizi Manusia di University of Ghent – Belgia.

DAFTAR PUSTAKA

Aldeman, D.J., Hastings, T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Technology 33, 139-155.

Anderson, D.P. 1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine

potency in fish. Dev Biol Stand 90, 257-265.

- Ashida, M., Yamazaki, H. 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: Ohnishi, E., Ishizaki, H. Eds., Molting and Metamorphosis. Springer, Berlin, 239–265 pp.
- Austin, B., Allen, D. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). Aquaculture 26, 369-383.
- Bachère, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. Aquaculture 227, 427–438.
- Baruah, K., Ranjan, J., Sorgeloos, P., MacRae, T.H and Bossier, P. 2011. Priming the prophenoloxidase system of *Artemia franciscana* by heat shock proteins protect against *Vibrio campbelli* challenge. Fish and Shellfish Immunology 31, 134-141.
- Bridle, A.R., Carter, C.G., Morrison, R.N., Nowak, B.F. 2005. The effect of beta glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, challenged with amoebic gill disease-evidence of inherent resistance. Journal of Fish Disease 28, 347-356.
- Brown, G.D., Gordon, S. 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. Cellular Microbiology 7, 471–479.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiology 8, 1137-1144.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J. 1999. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. Fish and Shellfish Immunology 9, 529-541.
- Cerenius, L., Söderhäll, K. 1995. Crustacean immunity and complement-A premature comparison. American zoologist 35, 60-67.
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K. 2003. Host prophenoloxidase expression in

- freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. Cell Microbiology 5, 353-357.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Soderhall, K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology 29, 263-71.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Liao, I.C. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology 15, 297-310.
- Cheng, E., Liu, C., Tsai, C. dan Chen, J. 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharides and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 18, 297-310.
- Criado-Fornelio, A., E. Mialhe., E. Constantin. and H. Grizel. 1989. Experimental infection of *Artemia* sp. By *Fusarium solani*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathology 9, 35-37.
- Da Silva, C.C.A. 2002. Activation of phenoloxidase and removal of *Bacillus subtilis* from the hemolymph of *Acheta domesticus* L. Orthoptera: Gryllidae. Neotropical Entomology 31, 487-491.
- deBaulny, MO., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., LeGouvello, R. 1996. Effect of long term oral administration of beta glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Disease Aquatic Organisms 26, 139-147.
- Di Luzio, N.R., Williams, D.L., McNamee, R.B., Malshet, V.G. 1980. Comparative evaluation of the tumour-inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan. Recent Results in cancer Research 75, 165-172.
- Di Luzio, N.R., Williams, D.L., McNamee, R.B., Edwards, B.F., Kitahama, A. 1979. Comparative tumour-inhibitory and antibacterial activity of soluble and particulate glucan. International J Cancer 24, 773-779.
- Figueras A, Santarém MM, Nov B. 1998. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Vet Immunol Immunopathology 64, 59-68.
- Gomez-Gil, B., F.A.A. Grobois, J.R. Jarero and M.D.H. Vega. 1994. Chemical disinfection of *Artemia nauplii*. J. World Aquaculture Society 25, 574-583.
- Gomez-Gil, B., Thompson, FL., Thompson, CC., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Swings, J. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. Int J Syst Evol Microbiology 54, 261-265.
- Gunther, D., Catena, A. 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In : G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.). The brine shrimp *Artemia*- Ecology, culturing and use in aquaculture. Vol. 1, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Hauton C., Smith V.J. 2007. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. BioEssays 29, 1138-1146
- Hjort. J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe. Rapp Pv Reun Cons int Explor Mer 20, 1-22.
- Hoffmann, J.A. 2003. The immune response of *Drosophila*. Nature 426, 33-38
- Holmblad, T and Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzyme in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture 172, 111-123.
- Hose, J. E., Martin, G. G., Nguyen, V. A., Lucus, J., and Rosenstein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. The Biological Bulletin 173, 178-187.
- Hose JE, Martin GG. 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. J Invert Pathology 53, 335-346.
- Hose, J. E., Martin, G. G. and Gerard, A. S., 1990a. A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. The Biological Bulletin 178, 33-45.

- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 203-209.
- Kawakami H, Shinohara N, Sakai M .1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathology* 33, 287-292.
- Kurtz, J., Franz, K. 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425, 37–38.
- Kurtz J. 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunology* 26, 186-192.
- Léger, P.H., D.A. Bengtson., K.L. Simpson. and P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521-623.
- Léger, P.H., Bengston, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L., Beeck, D.A. 1987b. The nutritional value of *Artemia* : a review. In P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Declair, E. Jaspers (Eds.), *Artemia Research and its Applications*, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, Universa Press, Wetteren, Belgium. 357–372 pp.
- Lu, K.Y., Huang, Y.T., Lee, H.H., Sung, H.H. 2006. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 274-284.
- Ma, Z., Wang, J., Zhang, I. 2008. Structure and chain conformation of beta-glucan isolated from *Auricularia auricular-judae*. *Biopolymers* 89, 614-622.
- Marques, A. 2005. A gnotobiotic *Artemia* test system to study host microbial interactions. pHd thesis, Ghent University, Belgium.
- Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P. & Bossier, P. 2004b. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically-grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312, 115-136.
- Marques, A., Francois, J., Dhont, J., Bossier, P. & Sorgeloos, P. 2004a. Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically-grown *Artemia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 247-264.
- Medzhitov, R. & Janeway Jr, C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173, 89–97.
- Muroga, K., K. Suzuki, K. Ishimaru. and K. Nogami. 1994. *Vibriosis* of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J. World Aquaculture Society* 25, 50-54.
- Novriadi, R. 2013. A Toolbox of immune system for *Artemia*. Master thesis, Ghent University, Belgium. 89 pp.
- Novriadi, R., Kadari, M. 2013. Perlakuan gnotobiotik kultur *Artemia* dengan β -glukan: Kajian potensi β -glukan untuk memperkuat resistensi terhadap vibriosis. *Journal of Aquacultura Indonesiana* 14, 25 – 32.
- Puente, M.E., Vega-Villasante, F., Holguin, G. and Bashan, Y. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea water. *J. Appl. Bacteriology* 73, 465-471.
- Orozco-Medina, C., A. Maeda-Martinez. and A. Lopez-Cortes. 2002. Effect of aerobic Gram positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of it's larvae. *Aquaculture* 213, 15-29.
- Rico-Mora, R., Voltolina D. 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 203-204.
- Robertsen, B., Engstad, RE., Jorgensen. JB. 1994. Beta glucans as immunostimulants. In : Stolen J, Fletcher TC (eds) *Modulators of fish immune response*. SOS Publication, fair Haven. 83 – 99 pp.
- Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally

- conserved microbial polymers. Fish Shellfish Immunol 9, 269-290.
- Roque, A., Gomez-Gill, B. 2003. Therapeutic effects of enrofloxacin in an experimental infection with a luminescent *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* Kellog 1906. Aquaculture 220, 37-42.
- Sajeevan, T.P., Philip, R., Singh, B.I.S. 2009. Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 287, 248-252.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. Fish shellfish immunol. 15, 71-90.
- Smith, V.J., Chisholm, J.R. 2001. Antimicrobial proteins in crustaceans. Advances in Experimental Medicine and Biology 484, 95-112.
- Söderhäll, K., 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. Boll. Zoology 59, 141-151.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. Ann. N. Y. Acad. Sci. 712, 155-161.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunology 10, 23-28.
- Soltanian, S. 2007. Protection of gnotobiotik *Artemia* against *Vibrio campbelli* using baker's yeast strains and extracts. PhD thesis. Ghent University. Belgium.
- Soltanian, S., Stuyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Critical Reviews in Microbiology 35, 109-138.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W. and Versichele, D. 1986. Manual for the culture and use of Brine shrimp *Artemia* in aquaculture. FAO, Ghent, Belgium.
- Soto-Rodriguez, S.A., Simoes, N., Jones, D.A., Roque, A. and Gomez-Gil, B. 2003b. Assessment of fluorescent-labeled bacteria for evaluation of *in vivo* uptake of bacteria (*Vibrio* spp.) by crustacean larvae. J Microbil Methods 52, 101-114.
- Soto-Rodriguez, S.A., Roque, A., Lizarraga-Partida, M.L., Guerra-Flores, A.L. and Gomez-Gil, B. 2003a. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. Dis Aquat Org 53, 231-240.
- Spain-Ortuno, J., Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Vet. Immunol. Immunop. 85, 41-50.
- Sugumaran, M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. Pigment Cell Res 15, 2-9.
- Tokunaka, K., Ohno, N., Adachi, Y., Tanaka, S., Tamura, H., Yadomae, T. 2000. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water soluble (1→3)-β-glucan, CSBG from *Candida* spp. Int J Immunopharmacol 22, 383-394.
- Vanmaele, S. Defoirdt, T., Bossier, P. 2012. Immunostimulation through the eyes of gnotobiotic *Artemia franciscana*. World Aquaculture Society 2012- Meeting Abstract no : 330.
- Verdonck, L., J. Swings, K. Kersters, M. Dehasque, P. Sorgeloos and P. Leger. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. J. World Aquaculture Society 25, 55-59.
- Verschuere, L., H. Heang., G. Criel., P. Sorgeloos. and W. Verstraete. 2000b. Selected bacterial strains protect *Artemia* sp. From pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. Appl. Environ. Microbiology 66, 1139-1146.
- Verschuere, L., G. Rombaut., G. Huys., J. Dhont., P. Sorgeloos. and W. Verstraete. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. Appl. Environ. Microbiology 65, 655-671.

Xiao, Z., Trincado, C.A., Murtaugh, M.P. 2004. Beta-glucan enhancement of T-cell INF-gamma response in swine. *Vet Immunol Immunopathology* 102, 315-320.