

INTISARI

FUCOIDAN DARI ALGA COKELAT TROPIS SEBAGAI IMUNOSTIMULAN PADA UDANG VANAMEI (*Litopenaeus vannamei*): KAJIAN HEMATOLOGI, EKSPRESI GEN-GEN IMUN, RESISTENSI TERHADAP WSSV, DAN PERTUMBUHAN UDANG, SERTA IDENTIFIKASI ALGA TERPILIH

Agus Setyawan

Fucoidan telah dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai imunostimulan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian fucoidan dari alga cokelat tropis melalui pakan terhadap respon imun, ekspresi gen-gen imun, ketahanan terhadap WSSV pada udang vannamei, serta mengidentifikasi alga cokelat sumber fucoidan yang memiliki bioaktivitas terbaik. Fucoidan dari tiga alga cokelat, *Sargassum*, *Padina*, dan *Turbinaria* diekstraksi dengan metode asam. Konfirmasi ekstrak fucoidan dilakukan dengan uji FTIR spektroskopi yang dibandingkan dengan fucoidan standar. Masing-masing fucoidan dari tiga alga cokelat tersebut dicampur dengan pakan pada dosis 250 dan 500 mgkg⁻¹ serta pakan kontrol yang tidak mengandung fucoidan. Pakan diberikan kepada udang vannamei (± 18 g) sebanyak 3% dari berat biomassa perhari. Hematologi udang meliputi *total hemocyte count* (THC), aktifitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), aktivitas superoksida dismutase (SOD), aktivitas phenol oksidase (PO), dan total protein plasma (TPP) hemolim diamati dari pada hari ke-0, 4, 8, dan 12 setelah perlakuan. Perlakuan terbaik selanjutnya diuji ekspresi gen-gen imun dari hemolim meliputi *lipolisakarida-1,3- β glucan binding protein* (LGBP), Toll, lectin, dan proPO yang dibandingkan dengan kontrol internal β -actin diukur dengan menggunakan qPCR. Penelitian dilanjutkan dengan menguji fucoidan dari *Sargassum* sp. sebagai perlakuan terbaik dari tahap penelitian sebelumnya, dengan meningkatkan dosis 0, 500, 750, 1000, dan 1500 mgkg⁻¹ pada udang vannamei (± 17 g). Pemberian fucoidan dilakukan setiap hari dicampur dengan pakan (3% berat biomassa) selama 15 hari. Parameter hematologi seperti pada uji sebelumnya diamati pada hari ke-0, 2, 4, dan 6 setelah perlakuan. Pada hari ke-12, semua udang diinfeksi dengan *white spot syndrome virus* (WSSV). Uji ekspresi gen-gen imun seperti pada penelitian sebelumnya dilakukan pada hari ke-6, 12, dan 14 (setelah infeksi). Dalam penelitian terpisah, fucoidan dari *Sargassum* sp. dengan dosis yang sama diujikan kepada udang vannamei ($\pm 3,5$ g) selama 28 hari dan diamati laju pertumbuhan spesifik udang. Setelah perlakuan, semua udang diuji tantang dengan WSSV dan dihitung rerata laju sintasan (SR), rerata waktu kematian, dan jumlah kopi WSSV pada jaringan udang. Untuk menentukan spesies *Sargassum* sp., dilakukan identifikasi secara morfologi berdasarkan *Marine Plants* dan *AlgaeBase* (www.algaebase.org), serta secara molekuler dengan menggunakan penanda cytochrome oxidase sub unit I (COI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fucoidan dari ketiga alga cokelat berhasil diekstraksi dengan metode asam meskipun didapatkan rendemen yang berbeda-beda. Ketiga jenis fucoidan tersebut juga berhasil meningkatkan respon imun udang vannamei dari hasil peningkatan THC, aktivitas fagositosis, dan aktivitas SOD. Fucoidan dari *Sargassum* sp. menunjukkan bioaktivitas paling tinggi terhadap respon imun udang vannamei. Hasil tersebut didukung dengan up-regulasi gen-gen imun lectin, Toll, dan LGBP 2 – 20 kali lipat pada hemolim udang yang diberi fucoidan dari *Sargassum* sp. Peningkatan dosis fucoidan dari *Sargassum* sp. 500 - 1500 mg kg⁻¹ masih dapat memicu respon imun udang vannamei yang ditunjukkan dengan peningkatan secara signifikan semua parameter hematologi yang diujikan maupun ekspresi gen-gen imun yang diukur, meskipun didapatkan dosis paling optimal pada 750 mg kg⁻¹. Namun, dosis 1000 maupun 1500 mg kg⁻¹ lebih meningkatkan resistensi udang vannamei terhadap WSSV



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

**FUCOIDAN DARI ALGA COKELAT TROPIS SEBAGAI IMUNOSTIMULAN PADA UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*):
KAJIAN HEMATOLOGI, EKSPRESI GEN-GEN IMUN, RESISTENSI TERHADAP WSSV, DAN
PERTUMBUHAN**

AGUS SETYAWAN, Dr. Ir. Alim Isnansetyo, M.Sc.; Dr. Ir. Murwantoko; Dr. drh. Soedarmanto Indarjulianto
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

maupun pertumbuhan. Hasil uji identifikasi secara morfologi mengkonfirmasi bahwa *Sargassum* sp. yang digunakan adalah *Sargassum crassifolium*. Namun, hasil uji analisis barcode DNA dengan marker COI menunjukkan bahwa gen COI *Sargassum* sp. ada di luar *clade* spesies-spesies *Sargassum* yang tersedia di NCBI. Penelitian ini membuka peluang besar pemanfaatan *Sargassum* sebagai penghasil fucoidan untuk imunostimulan pada budidaya udang vannamei.

Kata kunci: DNA barcode, ekspresi gen, fucoidan, *Litopenaeus vannamei*, respon imun, *Sargassum* sp., White spot syndrome virus

ABSTRACT

FUCOIDAN FROM TROPICAL BROWN ALGAE AS IMMUNOSTIMULANT IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*): STUDY OF HEMATOLOGY, IMMUNE GENE EXPRESSION, RESISANCE AGAINST WSSV, AND GROWTH PERFORMANCE IN SHRIMP, AND ALGAL IDENTIFICATION

Agus Setyawan

Fucoidan is known as immunostimulant activity. This study aimed to investigate the effect of dietary fucoidan from tropical brown algae toward immune response, immune-related genes expression, resistance against WSSV in *Litopenaeus vannamei*, and to identify the choosen alga producing the best bioactivity of fucoidan. Fucoidans from three brown algae, *Sargassum*, *Padina*, and *Turbinaria*, respectively were extracted by the acid method. Fucoidans were confirmed by FTIR spectroscopy which was compared with standard fucoidan (Sigma). The three types of fucoidan mixed with feed at doses of 250 mg kg⁻¹ and 500 mg kg⁻¹ and control feed that did not contain fucoidan, were tested on Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (\pm 18 g). Shrimp was fed three times as much as 3% of the weight of biomass per day. Shrimp hematology analysis included total hemocyte count (THC), pahogcytic activity and index (PA and PI), superoxide dismutase (SOD) activity, phenol oxidase (PO) activity, and total plasma protein (TPP) observed from hemolymph on days 0, 4, 8, and 12 treatments. The best treatment was then tested for the expression of immune genes from hemolim including LGBP, Toll, lectin, and proPO which were compared with β -actin internal control measured using qPCR. The study was continued by testing the fucoidan from *Sargassum* sp. as the best treatment from the previous research stage, by increasing the dosages of 0, 500, 750, 1000, and 1500 mg kg⁻¹ in Pacific white shrimp (\pm 17 g). The administration of fucoidan was carried out every day with feed (3% by weight of biomass) for 15 days. Hematologic parameters as in the previous test of shrimp were observed on days 0, 2, 4, and 6 treatments. On day 12, all shrimp were infected with WSSV. Expression test of immune genes as in previous studies was carried out on days 6, 12, and 14 (after infection). In a separate study, fucoidan from *Sargassum* sp. with the same dose tested for Pacific white shrimp (\pm 3.5 g) for 28 days and observed the specific growth rate of shrimp. After treatment, all shrimp were challenged with WSSV and calculated the average of survival rate (SR), mean time of death (MTD), and copy number of WSSV in shrimp tissue. As a complement to the study, *Sargassum* sp. was identified morphologically by comparing it with libraries and AlgaBase, as well as molecularly using cytochrome oxidase sub unit I (COI) markers. The results showed that the fucoidan from the three brown algae was successfully extracted by the acid method even though the yields were different. The three types of fucoidan also succeeded in increasing the immune response of Pacific white shrimp proved by increase in THC, phagocytic activity, and SOD activity. Fucoidan from *Sargassum* sp. showed the highest bioactivity to Pacific white shrimp immune response. These results were supported by up-regulation of 2 - 20-fold up-regulation of lectin, Toll and LGBP immune genes in shrimp hemolymph given fucodan from *Sargassum* sp. Increase in fucoidan dose from *Sargassum* sp. 500 – 1,500 mg kg⁻¹ still enhanced the immune response of Pacific white shrimp which was shown by a significant increase in all hematological parameters tested and the expression of immune genes measured, although the optimal dose was obtained at 750 mg kg⁻¹. However, doses of 1,000 and 1500 mg kg⁻¹ further increased the resistance of Pacific white shrimp to WSSV and its growth performance. Morphological identification test results confirmed that *Sargassum* sp. that used was *Sargassum crassifolium*. However, the test results of DNA barcode analysis with COI



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

**FUCOIDAN DARI ALGA COKELAT TROPIS SEBAGAI IMUNOSTIMULAN PADA UDANG VANNAMEI
(*Litopenaeus vannamei*):
KAJIAN HEMATOLOGI, EKSPRESI GEN-GEN IMUN, RESISTENSI TERHADAP WSSV, DAN
PERTUMBUHAN**

AGUS SETYAWAN, Dr. Ir. Alim Isnansetyo, M.Sc.; Dr. Ir. Murwantoko; Dr. drh. Soedarmanto Indarjulianto
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

markers still have a considerable distance with the same marker of *S. crassifolium* species available at NCBI. This study opens a great opportunity for the use of *Sargassum* as a fucoidan producer for immunostimulants in Pacific white shrimp cultivation.

Keywords: barcode DNA, fucoidan, gene expression, immune response, *Litopenaeus vannamei*, *Sargassum* sp., White spot virus syndrome