

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

PEMANFAATAN MADU UNTUK MENINGKATKAN RESPONS IMUN DAN RESISTANSI UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) TERHADAP INFEKSI *White Spot Syndrome Virus*

Widanarni^{*)#}, Muhamad Gustilatov^{*)}, Sukenda^{*)}, dan Diah Ayu Satyari Utami^{**)}

^{*)} Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

^{**)} Program Studi Budi Daya Ikan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Jembrana
Desa Pengambangan, Kecamatan Negara, Kabupaten Jembrana, Bali 82218

(Naskah diterima: 8 Mei 2019; Revisi final: 11 Juni 2019; Disetujui publikasi: 14 Juni 2019)

ABSTRAK

Wabah penyakit *white spot diseases* (WSD) akibat infeksi *white spot syndrome virus* (WSSV) menyebabkan penurunan produksi udang global. Alternatif pencegahan infeksi WSSV dapat dilakukan melalui peningkatan respons imun udang dengan aplikasi madu sebagai prebiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas pemberian madu dalam meningkatkan respons imun dan resistansi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap infeksi WSSV. Penelitian ini terdiri atas lima perlakuan dan tiga ulangan yang meliputi perlakuan kontrol positif (tanpa pemberian madu dan diuji tantang dengan WSSV), kontrol negatif (tanpa pemberian madu dan tanpa uji tantang dengan WSSV), pemberian madu pada dosis 0,2%; 0,4%; dan 0,6%; serta diuji tantang dengan WSSV. Udang vaname berukuran $0,4 \pm 0,11$ g diberi pakan komersial dengan penambahan madu selama 10 minggu sebelum diuji tantang dengan WSSV, kemudian udang diuji tantang dengan WSSV dan diamati sintasan, serta parameter respons imunnya selama tujuh hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa parameter respons imun udang yang diberi perlakuan madu meliputi *total haemocyte count* (THC), aktivitas fagositik (AF), *respiratory burst* (RB), dan *phenoloxidase* (PO), baik sebelum maupun setelah uji tantang dengan WSSV lebih baik ($P < 0,05$) dibanding kontrol. Pada akhir uji tantang, sintasan udang yang diberi perlakuan madu pada dosis 0,4% dan 0,6% masing-masing mencapai 66,67%; sedangkan pada perlakuan kontrol positif hanya mencapai 36,67%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian madu pada dosis 0,4% efektif meningkatkan respons imun dan resistansi udang vaname terhadap infeksi WSSV.

KATA KUNCI: aktivitas fagositik; *phenoloxidase*; prebiotik; *respiratory burst*; sintasan; *total haemocyte count*

ABSTRACT: *Utilization of honey to improve immune responses and resistance of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) against White Spot Syndrome Virus infection. By: Widanarni, Muhamad Gustilatov, Sukenda, and Diah Ayu Satyari Utami*

White spot disease (WSD) outbreaks due to white spot syndrome virus (WSSV) infection cause the decline of the global shrimp production. The alternative prevention method against WSSV infection can be done by the improvement of immune responses through the application of honey as a prebiotic. This study aimed to evaluate the effectiveness of the administration of honey in improving immune responses and resistance of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) against WSSV infection. This study consisted of five treatments and triplicates including positive control (without the administration of honey and challenged by WSSV); negative control (without the administration of honey and without the challenge test with WSSV); the administration of honey at doses of 0.2%, 0.4%, and 0.6% and challenged by WSSV. Pacific white shrimp sized 0.4 ± 0.11 g were fed commercial feed with the addition of honey for 10 weeks before challenged by WSSV, then the shrimp were challenged by WSSV and were observed their survival and immune responses parameters for seven days. The results of the study showed that immune responses parameters of the shrimp treated by honey treatments including total haemocyte count (THC), phagocytic activity (PA), respiratory burst (RB), and phenoloxidase (PO), both before and after the challenge test with WSSV were better ($P < 0.05$) compared to control. At

Korespondensi: Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia.
Tel. + 62 251 8622915
E-mail: widanarni@yahoo.com

the end of the challenge test, the survival of the shrimp treated with honey treatments at doses of 0.4% and 0.6% reached 66.67%, while that of positive control treatment only reached 36.67%. These results indicated that the administration of honey at a dose of 0.4% was effective to improve immune responses and resistance of Pacific white shrimp against WSSV infection.

KEYWORDS: phagocytic activity; phenoloxidase; probiotic; respiratory burst; survival; total haemocyte count

PENDAHULUAN

Produksi perikanan budidaya terus mengalami peningkatan, dengan nilai produksi pada tahun 2017 mencapai 17,2 juta ton dan berkontribusi sebanyak 74% dari produksi perikanan Indonesia (KKP, 2018). Salah satu komoditas perikanan budidaya Indonesia yang menjadi komoditas ekspor unggulan adalah udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Indonesia menempati urutan ketiga sebagai produsen terbesar udang vaname setelah Cina dan India, dengan total produksi mencapai 505.549 ton pada tahun 2015 (FAO, 2017).

Budidaya udang vaname masih menemui kendala berupa serangan berbagai penyakit mematikan. Virus dilaporkan menjadi patogen utama yang menyerang udang. Beberapa virus yang diketahui menyerang udang di Asia antara lain *white spot syndrome virus* (WSSV), *infectious myonecrosis virus* (IMNV), *yellow head virus* (YHV) tipe-1, dan *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis* (IHHNV) (Flegel, 2012). *White spot disease* (WSD) merupakan penyakit viral yang disebabkan oleh WSSV, yang berasal dari genus *Whispo virus* dan famili *Nimaviridae*. Penyakit ini bersifat letal bagi organisme budidaya dengan tingkat kematian yang tinggi dan berlangsung relatif cepat (Flegel, 2006). Kematian akibat WSD dapat mencapai 70%-90% dalam waktu 3-7 hari pascainfeksi (Mai & Wang, 2010).

Berbagai upaya yang telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit tersebut antara lain dengan penggunaan antibiotik, vaksin, imunostimulan, dan probiotik. Pengendalian penyakit dengan menggunakan antibiotik telah dibatasi karena dapat menyebabkan resistansi patogen di perairan dan residu antibiotik dapat terakumulasi di dalam tubuh udang (Kathleen *et al.*, 2016). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah infeksi penyakit viral pada udang yakni dengan cara meningkatkan respons imun non-spesifik melalui pemberian probiotik.

Probiotik adalah bahan pangan yang tidak dapat dicerna inang, namun memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri tertentu di usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.*, 2011). Beberapa hasil

penelitian menunjukkan bahwa prebiotik seperti fruktooligosakarida (FOS), galaktoligosakarida (GOS), mananoligosakarida (MOS), dan inulin dapat meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, serta menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas udang (Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Aktas *et al.*, 2014). Pengaruh pemberian prebiotik terhadap peningkatan imunitas merupakan pengaruh tidak langsung dan berhubungan dengan perubahan komposisi mikrobiota usus yang memegang peran penting dalam peningkatan imunitas (Hoseinifar *et al.*, 2015). Pemberian prebiotik menyebabkan peningkatan jumlah bakteri menguntungkan dan menekan jumlah bakteri merugikan. Bakteri menguntungkan tersebut menekan jumlah bakteri patogen melalui kompetisi lokasi pelekatan, produksi asam organik, hidrogen peroksida, dan senyawa lainnya seperti senyawa antibiotik, bakteriosin, *siderophore*, lisozim, serta memodulasi respons imun (Nayak, 2010). Pemberian prebiotik juga menyebabkan tingginya produksi metabolit mikroba seperti propionat, butirrat atau *short-chain fatty acid* (SCFA) yang dapat menginduksi sel-sel imun yang terdapat pada *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) (Hoseinifar *et al.*, 2015).

Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai sumber prebiotik, serta memiliki kandungan oligosakarida seperti fruktooligosakarida (FOS), galaktoligosakarida (GOS), serta inulin adalah madu (Sanz *et al.*, 2005). Karimah *et al.* (2011) melaporkan bahwa isolat oligosakarida madu memenuhi kriteria sebagai prebiotik, karena resistan terhadap asam lambung dan enzim pencernaan, memiliki efek stimulasi pertumbuhan yang selektif, serta memengaruhi aktivitas fermentasi. Indonesia memiliki potensi tinggi untuk menghasilkan madu dengan total produksi mencapai 1.000-1.500 ton per tahun (Muslim, 2014). Sejauh ini penelitian mengenai aplikasi madu sebagai prebiotik banyak dilakukan pada manusia dan tikus (Sanz *et al.*, 2005; Rosendale *et al.*, 2016), sedangkan pada organisme akuatik masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas pemberian madu terhadap respons imun dan resistansi udang vaname yang diinfeksi WSSV.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Wadah dan Media Pemeliharaan

Wadah yang digunakan adalah akuarium kaca berukuran 60 cm x 30 cm x 30 cm sebanyak 15 unit. Sebelum digunakan, akuarium dicuci bersih dan didesinfeksi menggunakan klorin dengan dosis 30 µl/L selama 24 jam. Akuarium kemudian dibilas dengan air tawar dan dikeringkan. Selanjutnya bagian luar akuarium dilapisi plastik hitam lalu akuarium diisi air laut dengan ketinggian 20 cm, serta dipasang aerasi.

Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah udang vaname bersertifikat *specific pathogen free* (SPF) yang berasal dari hatchery PT Suri Tani Pemuka, Anyer, Banten. Udang pada stadia pascalarva 10 (PL-10) terlebih dahulu diaklimatisasi dan dipelihara selama tiga puluh hari hingga mencapai ukuran $0,4 \pm 0,11$ g. Selama proses adaptasi dan pemeliharaan, udang vaname diberi pakan nauplii *Artemia*, serta pakan komersial (Feng-li 0) dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak empat kali sehari secara *ad satiation*.

Persiapan Pakan Uji

Pakan yang digunakan adalah pakan komersial dengan kandungan protein 40%. Pakan uji dibuat dengan mencampurkan pakan komersial dengan prebiotik berupa madu sesuai dosis perlakuan dan pengencer berupa *phosphate buffered saline* (PBS) dengan perbandingan madu dan PBS yaitu 1:1, serta putih telur sebagai perekat (*binder*) dengan dosis 2% dengan metode *coating*. Madu yang digunakan yaitu madu yang berasal dari pembudidaya madu di Depok, Jawa barat.

Pemeliharaan Hewan Uji

Udang uji dipindahkan ke dalam 15 unit akuarium perlakuan dengan kepadatan awal 100 ekor per m³ (15 ekor per akuarium). Pakan diberikan sebanyak lima kali sehari (pukul 06.00, 10.00, 14.00, 18.00, dan 22.00 WIB) secara *ad satiation*. Pengelolaan kualitas air dilakukan dengan penyiponan setiap hari dan pergantian air. Udang diberi perlakuan selama 10 minggu dan diamati respons imunnya, kemudian diuji tantang menggunakan WSSV. Perlakuan pemberian madu pada udang uji selama 10 minggu bertujuan untuk mencapai ukuran udang uji yang layak diambil hemolimnya untuk sampel pengukuran parameter respons imun ($8,50 \pm 1,50$ g/ekor), sehingga udang uji tidak mengalami *stress* atau kematian akibat diambil hemolimnya yang dikhawatirkan akan memengaruhi validitas data parameter respons imun.

Uji Tantang

Preparasi filtrat WSSV dilakukan berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Ramos-Carreño *et al.* (2014). Organ udang vaname yang positif terinfeksi WSSV (insang dan daging) digerus dan dilarutkan dalam TN *buffer* (200 mM Tris-HCl; 400 mM NaCl; pH 7,4) (perbandingan antara sampel dan TN *buffer* yaitu 1:4). Sampel yang telah larut, disentrifugasi menggunakan sentrifus dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh disaring menggunakan *millipore* dengan diameter 0,45 µm. Filtrat virus yang dihasilkan dapat langsung digunakan atau disimpan pada *freezer* dengan suhu -80°C sebelum digunakan. Virus WSSV ditingkatkan virulensinya dengan teknik pasase pada udang sehat. Pasase dilakukan dengan menginjeksikan filtrat virus sebanyak 0,1 mL ke abdomen udang sehat dengan menggunakan *syringe* volume 1 mL. Selanjutnya udang yang dipasase, diamati gejala klinisnya dan dipelihara hingga mengalami kematian. Udang yang telah mengalami kematian karena WSSV hasil pasase selanjutnya dibuat filtrat virusnya untuk digunakan pada uji letal dosis 50% (LD₅₀). Pengujian LD₅₀ dilakukan pada pengenceran filtrat virus 10⁻² hingga 10⁻⁶. Dosis LD₅₀ yang diperoleh pada penelitian ini yaitu pengenceran 10⁻⁴ WSSV. Dosis tersebut kemudian digunakan sebagai dosis filtrat virus yang diinjeksikan pada udang sehat pada saat uji tantang. Uji tantang dilakukan dengan menginjeksikan filtrat virus pada pengenceran 10⁻⁴ WSSV pada abdomen udang sehat menggunakan *syringe* volume 1 mL sebanyak 0,1 mL larutan virus. Udang kontrol negatif diinjeksi dengan PBS. Setelah dilakukan uji tantang, pengamatan respons imun dan mortalitas udang dilakukan pada hari ketiga (UT3), kelima (UT5), serta ketujuh (UT7).

Pengukuran Parameter Kualitas Air

Pengukuran parameter kualitas air dilakukan pada awal dan akhir pemeliharaan udang vaname. Parameter kualitas air yang diukur yaitu *dissolved oxygen* (DO) menggunakan DO meter, suhu menggunakan termometer, pH menggunakan pH meter, salinitas menggunakan salinometer, serta *total ammonia nitrogen* (TAN), nitrit, dan nitrat menggunakan spektrofotometer. Nilai kualitas air pada semua perlakuan selama penelitian berkisar antara: DO 5,0-6,2 mg/L; suhu 27,9°C-29,3°C; pH 7,0-7,3; salinitas 26-33 g/L; TAN 0,0-0,1 mg/L; nitrit 0,0-0,3 mg/L; dan nitrat 0,24-1,04 mg/L.

Konfirmasi WSSV

Udang yang mengalami kematian setelah ujiantang dikonfirmasi menggunakan analisis *polymerase chain reaction* (PCR) setelah tujuh hari ujiantang. Konfirmasi WSSV mengacu pada metode Nunan & Lighthner (2011).

Rancangan Percobaan

Percobaan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas lima perlakuan dan tiga ulangan yang meliputi perlakuan kontrol positif (K+) (tanpa penambahan madu dan diujiantang WSSV), kontrol negatif (K-) (tanpa penambahan madu dan diinjeksi PBS), penambahan madu 0,2% (A); 0,4% (B); 0,6% (C); dan diujiantang WSSV. Data yang diperoleh ditabulasi menggunakan Microsoft Excel 2007 dan diuji lanjut menggunakan SPSS 20.0.

Parameter Uji

Parameter yang diamati setelah perlakuan pemberian madu dan pascaujiantang yaitu sintasan, serta respons imun yang meliputi *total haemocyte count* (THC), aktivitas fagositik (AF), *respiratory burst* (RB), dan aktivitas *phenoloxidase* (PO). Sintasan atau kelangsungan hidup yaitu perbandingan jumlah udang yang hidup pada akhir pemeliharaan dengan jumlah udang pada awal pemeliharaan yang dihitung berdasarkan acuan Effendie (1997). *Total haemocyte count* diuji untuk mengetahui jumlah hemosit pada udang berdasarkan metode Wang & Chen (2006). Parameter selanjutnya yaitu AF yang diukur berdasarkan Anderson & Siwicki (1995). *Respiratory burst* diuji berdasarkan reduksi *nitroblue tetrazolium* per 10 μ L hemolim, sesuai dengan metode Cheng *et al.* (2004). Parameter terakhir yaitu aktivitas *phenoloxidase* yang diuji berdasarkan formasi dopachrome dalam 50 μ L hemolim sesuai metode Liu & Chen (2004).

HASIL DAN BAHASAN

Sintasan

Setelah diujiantang, sintasan udang diamati selama tujuh hari dan tersaji pada Gambar 1. Nilai sintasan tertinggi diperoleh pada perlakuan B dan C dengan nilai masing-masing $66,67 \pm 11,54\%$ dan $66,67 \pm 5,774\%$, serta berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan K+ ($36,67 \pm 5,77\%$), sedangkan sintasan pada perlakuan A yaitu $50 \pm 10\%$.

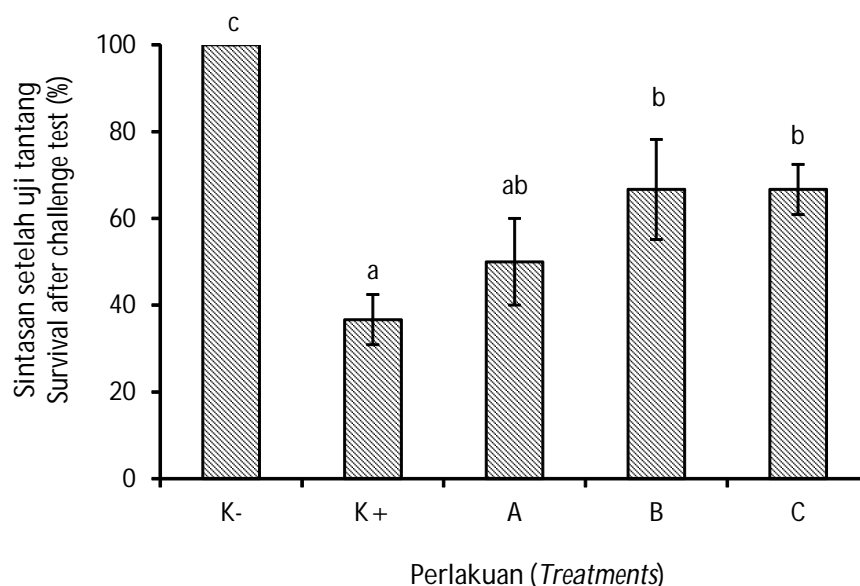
Dosis pemberian madu pada perlakuan B dan C mengindikasikan efek resistansi terbaik dalam melawan infeksi patogen. Sintasan yang berbeda nyata dengan perlakuan kontrol ($P < 0,05$), juga dilaporkan oleh Partida-Arangure *et al.* (2013), pada udang vaname

yang diberi 0,8% inulin dan diujiantang dengan WSSV. Febrianti *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa pemberian mikrokapsul sinbiotik (probiotik dan MOS) dapat meningkatkan sintasan udang vaname yang diinfeksi WSSV.

Total Haemocyte Count (THC)

Total haemocyte count (THC) diamati setelah perlakuan pemberian madu dan pada hari ketiga, kelima, serta ketujuh setelah ujiantang (Gambar 2). Setelah perlakuan prebiotik (madu), nilai THC tertinggi diperoleh pada perlakuan B ($10,16 \pm 0,55 \times 10^6$ sel/mL) dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan K+ dengan nilai THC yaitu $5,70 \pm 0,26 \times 10^6$ sel/mL. Pengamatan THC pada hari ketiga setelah ujiantang menunjukkan nilai THC tertinggi pada perlakuan C ($4,46 \pm 0,65 \times 10^6$ sel/mL). Nilai THC setelah hari kelima ujiantang menunjukkan hasil tertinggi pada perlakuan C dengan THC yaitu $3,93 \pm 0,15 \times 10^6$ sel/mL yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan A, tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap perlakuan K+ ($2,76 \pm 0,41 \times 10^6$ sel/mL) dan C. Hari ketujuh setelah ujiantang, K+ menunjukkan THC terendah yaitu $4,30 \pm 0,55 \times 10^6$ sel/mL yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan A, tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan B dan C yang masing-masing memiliki THC yaitu $7,10 \pm 0,45 \times 10^6$ sel/mL dan $6,4 \pm 0,34 \times 10^6$ sel/mL.

Sebagai organisme akuatik yang tidak memiliki respons imun spesifik, hemosit merupakan bagian penting dari sistem pertahanan udang melawan patogen. Menurut Sahoo *et al.* (2008), hemosit berfungsi dalam beberapa respons imun udang seperti aktivitas fagositik, enkapsulasi, agregasi nodula untuk partikel asing, serta menjalankan sistem proPO. Meningkatnya nilai hemosit berbanding lurus dengan meningkatnya ketahanan udang dalam melawan infeksi patogen. Setelah perlakuan pemberian madu sebanyak 0,2%; 0,4%; dan 0,6%; pemberian madu terbukti memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap total hemosit pada udang. Hal tersebut mengindikasikan bahwa pemberian madu mampu merangsang pembentukan hemosit udang vaname. Peningkatan nilai THC juga dilaporkan oleh Partida-Arangure *et al.* (2013) pada udang vaname yang diberi inulin. Selanjutnya hemosit mengalami penurunan pada hari ketiga dan kelima setelah diujiantang dengan WSSV, serta mengalami peningkatan kembali pada hari ketujuh setelah ujiantang dengan WSSV. Menurunnya total hemosit setelah ujiantang diduga karena hemosit bermigrasi dan terpusat pada jaringan yang terinfeksi oleh WSSV sehingga hemosit pada hemolim berkurang. Selain itu, sel hemosit juga rusak akibat invasi virus, serta terjadinya apoptosis pada

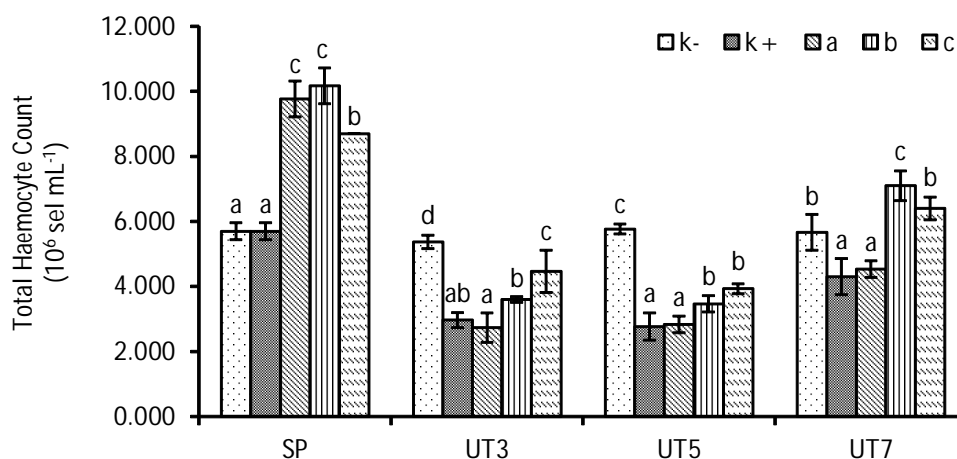


Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata (Duncan $P < 0,05$)

Note: Different letters on each bar indicate significantly different results (Duncan $P < 0.05$)

Gambar 1. Sintasan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi madu pada dosis berbeda pascauji tantang dengan white spot syndrome virus.

Figure 1. Survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered with honey at different doses on post-challenge test period to white spot syndrome virus.



Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing batang dalam periode pengamatan yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan $P < 0,05$); SP: setelah perlakuan prebiotik; UT3: tiga hari setelah uji tantang; UT5: lima hari setelah uji tantang; UT7: tujuh hari setelah uji tantang dengan white spot syndrome virus

Note: Different letters on each bar in the same observation period indicate significantly different results (Duncan $P < 0.05$); SP: post-prebiotic treatment; UT3: three days after the challenge test; UT5: five days after the challenge test; UT7: seven days after the challenge test with white spot syndrome virus

Gambar 2. Total haemocyte count udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi madu pada dosis yang berbeda.

Figure 2. Total haemocyte count of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered with honey at different doses.

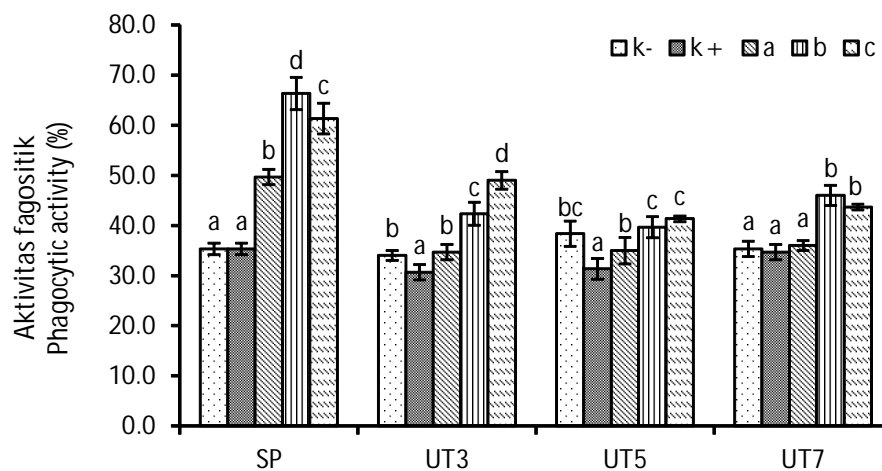
jaringan hematopoietik (Yeh *et al.*, 2009). Kembali meningkatnya jumlah hemosit pada hari ketujuh setelah ujiantang mengindikasikan udang telah mengalami *recovery* dan sistem imun berhasil meredakan serangan WSSV.

Aktivitas Fagositik

Aktivitas fagositik (AF) udang vaname selama penelitian disajikan pada Gambar 3. Aktivitas fagositik setelah perlakuan pemberian madu menunjukkan hasil tertinggi pada perlakuan B ($66,33 \pm 3,21\%$) dan berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap kontrol yang menunjukkan nilai AF terendah yaitu $35,3 \pm 1,15\%$. Nilai AF pada K+ pada hari ketiga setelah ujiantang yaitu $30,67 \pm 1,53\%$ dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan A, B, dan C dengan nilai AF berturut-turut yaitu $34,67 \pm 1,53\%$; $42,33 \pm 2,31\%$; dan $49,00 \pm 1,73\%$. Pada hari kelima setelah ujiantang, perlakuan C menunjukkan nilai AF tertinggi yaitu $41,33 \pm 0,58\%$ yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan B ($39,67 \pm 2,08\%$) dan AF terendah diperoleh pada perlakuan K+ ($31,33 \pm 2,08\%$). Nilai AF tertinggi pada hari ketujuh setelah ujiantang diperoleh pada perlakuan B yaitu $46,00 \pm 2,00\%$ yang tidak berbeda nyata dengan

perlakuan C ($43,67 \pm 0,58\%$), sedangkan AF terendah diperoleh pada perlakuan K+ yaitu $34,67 \pm 1,53\%$.

Aktivitas fagositik merupakan sistem pertahanan utama dalam melawan patogen yang masuk ke dalam tubuh udang. Kegiatan tersebut dilakukan oleh sel hialin dan sedikit peran dari sel semigranular (Johansson *et al.*, 2000). Setelah perlakuan pemberian madu, aktivitas fagositik tertinggi diperoleh pada perlakuan B. Pemberian madu diduga mampu meningkatkan jumlah produksi sel hialin dan meningkatkan aktivitas fagositik udang. Setelah ujiantang, nilai aktivitas fagositik lebih rendah dibanding setelah perlakuan pemberian madu. Hal tersebut berbanding lurus dengan menurunnya parameter total hemosit setelah ujiantang. Aktivitas fagosit yang menurun setelah ujiantang diakibatkan oleh banyaknya sel fagosit yang rusak dan lisis dalam melawan virus yang masuk. Nilai aktivitas fagositik yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Widanarni *et al.* (2016), aktivitas fagositik pada udang vaname yang diberi sinbiotik (probiotik dan prebiotik dari ekstrak ubi jalar) mengalami peningkatan setelah perlakuan dan terjadi penurunan aktivitas fagositik setelah ujiantang dengan IMNV.



Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing batang dalam periode pengamatan yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan $P < 0,05$): SP: setelah perlakuan prebiotik; UT3: tiga hari setelah ujiantang; UT5: lima hari setelah ujiantang; UT7: tujuh hari setelah ujiantang dengan *white spot syndrome virus*

Note: Different letters on each bar in the same observation period indicate significantly different results (Duncan $P < 0.05$); SP: post-prebiotic treatment; UT3: three days after the challenge test; UT5: five days after the challenge test; UT7: seven days after the challenge test with *white spot syndrome virus*

Gambar 3. Aktivitas fagositik udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi madu dengan dosis yang berbeda.

Figure 3. Phagocytic activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered with honey at different doses.

Respiratory Burst

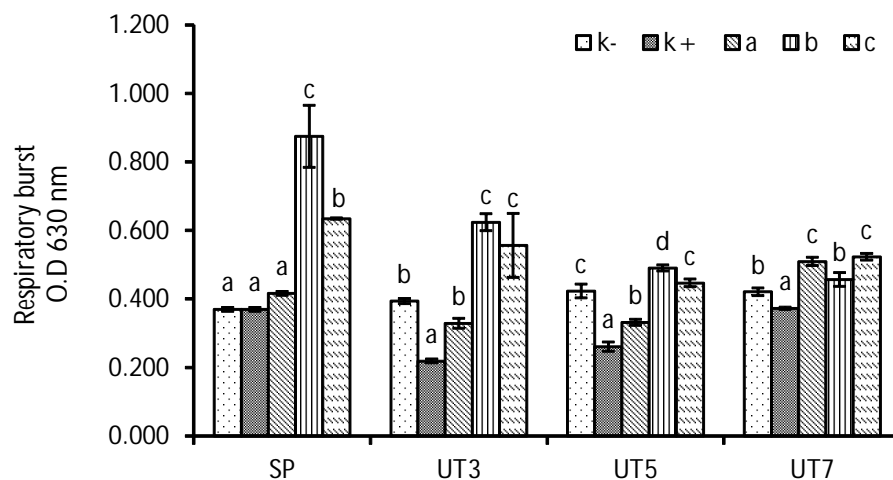
Respiratory burst (RB) udang vaname selama penelitian disajikan pada Gambar 4. Nilai RB tertinggi setelah perlakuan pemberian madu diperoleh pada perlakuan B yaitu $0,874 \pm 0,090$ dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan semua perlakuan lainnya. Pada hari ketiga setelah uji tantang, perlakuan B memiliki nilai RB tertinggi yaitu $0,624 \pm 0,024$ yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan C ($0,556 \pm 0,094$); tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan A dan K+. Nilai RB terendah pada hari kelima setelah uji tantang diperoleh pada perlakuan K+ yaitu $0,261 \pm 0,013$ dan tertinggi pada perlakuan B yaitu $0,490 \pm 0,009$. Pada hari ketujuh setelah uji tantang, perlakuan K+ menunjukkan nilai RB terendah yaitu $0,373 \pm 0,003$; sedangkan perlakuan C menunjukkan nilai RB tertinggi yaitu $0,523 \pm 0,009$ yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan A ($0,509 \pm 0,012$); namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan B ($0,457 \pm 0,010$).

Patogen yang masuk ke dalam tubuh udang akan difagositosis oleh sel-sel fagosit. Patogen yang menginfeksi akan dihancurkan dan partikelnya akan

dihilangkan oleh beberapa enzim degradatif ke dalam fagosom, serta menghasilkan *reactive oxygen intermediates* (ROI). Rangkaian proses penghapusan partikel dan pelepasan enzim tersebut dikenal dengan istilah *respiratory burst* (RB) (Rodriguez & Moullac, 2000). Setelah perlakuan pemberian madu, nilai RB tertinggi diperoleh pada perlakuan B. Hal tersebut menunjukkan adanya pengaruh pemberian madu terhadap aktivitas RB yang berbanding lurus dengan nilai THC. Setelah uji tantang, nilai RB menurun yang disebabkan oleh adanya *stress* biologis berupa infeksi patogen yang dapat menyebabkan penurunan nilai ROI, serta penurunan jumlah hemosit yang mengakibatkan adanya penurunan produk yang dihasilkan dari proses fagositosis (Febrianti *et al.*, 2016).

Aktivitas Phenoloxidase

Aktivitas *phenoloxidase* (PO) udang vaname selama penelitian disajikan pada Gambar 5. Setelah perlakuan pemberian madu, nilai PO K+ ($0,201 \pm 0,008$) berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan B ($0,343 \pm 0,061$) dan C ($0,290 \pm 0,006$). Pada hari ketiga setelah uji tantang, nilai PO tertinggi diperoleh pada perlakuan B

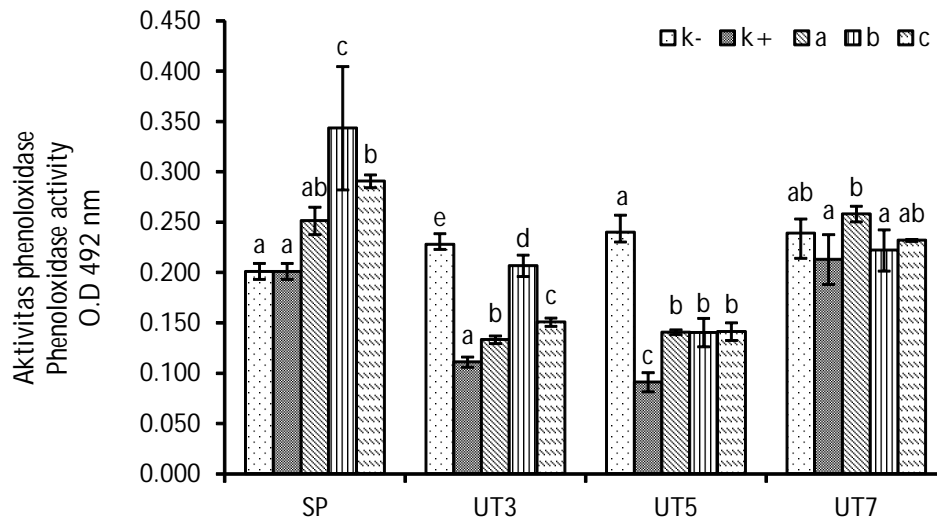


Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing batang dalam periode pengamatan yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan $P < 0,05$); SP: setelah perlakuan prebiotik; UT3: tiga hari setelah uji tantang; UT5: lima hari setelah uji tantang; UT7: tujuh hari setelah uji tantang dengan *white spot syndrome virus*

Note: Different letters on each bar in the same observation period indicate significantly different results Duncan ($P < 0,05$); SP: post-prebiotic treatment; UT3: three days after the challenge test; UT5: five days after the challenge test; UT7: seven days after the challenge test with *white spot syndrome virus*

Gambar 4. *Respiratory burst* udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi madu dengan dosis yang berbeda.

Figure 4. *Respiratory burst* of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered with honey at different doses.



Keterangan: Huruf yang berbeda pada masing-masing batang dalam periode pengamatan yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata (Duncan $P < 0,05$); SP: setelah perlakuan prebiotik; UT3: tiga hari setelah uji tantang; UT5: lima hari setelah uji tantang; UT7: tujuh hari setelah uji tantang dengan *white spot syndrome virus*

Note: Different letters on each bar in the same observation period indicate significantly different results (Duncan $P < 0,05$); SP: post-prebiotic treatment; UT3: three days after the challenge test; UT5: five days after the challenge test; UT7: seven days after the challenge test with *white spot syndrome virus*

Gambar 5. Aktivitas *phenoloxidase* udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi prebiotik madu dengan dosis yang berbeda.

Figure 5. *Phenoloxidase* activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered with honey at different doses.

yaitu $0,206 \pm 0,010$. Pada pengamatan hari kelima setelah uji tantang, nilai PO pada perlakuan pemberian madu berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan K+ ($0,091 \pm 0,009$). Pada hari ketujuh setelah uji tantang, nilai PO tertinggi diperoleh pada perlakuan A yaitu $0,258 \pm 0,008$ yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan C ($0,232 \pm 0,001$).

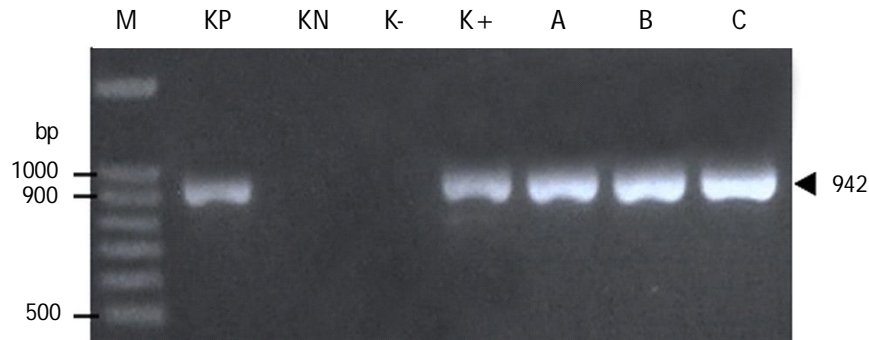
Salah satu respons imun humoral pada udang adalah dengan dibentuknya *phenoloxidase* (PO). *Phenoloxidase* (PO) dalam hemolim terdapat dalam bentuk inaktif yang disebut dengan *prophenoloxidase* (proPO). *Phenoloxidase* (PO) memiliki tugas untuk mengenali zat asing yang masuk ke dalam tubuh udang, serta melawan patogen yang masuk. Setelah perlakuan pemberian madu, nilai PO tertinggi diperoleh pada perlakuan B. Menurut Febrianti *et al.* (2016), nilai PO dan RB berhubungan dan berbanding lurus dengan nilai THC. Nilai PO setelah perlakuan pemberian madu yang lebih tinggi pada perlakuan B dan C dibanding perlakuan lainnya menunjukkan bahwa pemberian madu pada dosis 0,4% dan 0,6% dapat secara signifikan meningkatkan respons imun humoral udang. Nilai PO pada hari ketiga dan kelima setelah uji tantang mengalami penurunan

seiring menurunnya jumlah hemosit. Hal tersebut sejalan dengan nilai hemosit yang kembali meningkat di hari ketujuh setelah uji tantang, sehingga nilai PO pun mengalami kenaikan pada hari ketujuh setelah uji tantang yang mengindikasikan adanya proses *recovery* udang setelah diinfeksi patogen.

Konfirmasi *White Spot Syndrome Virus*

Udang yang mengalami kematian setelah uji tantang dengan WSSV kemudian dikonfirmasi melalui analisis PCR untuk membuktikan penyebab kematian udang. Analisis PCR menunjukkan bahwa perlakuan K+, A, B, dan C positif terinfeksi WSSV dengan terbentuknya pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang teramplifikasi pada panjang 942 bp, sedangkan pada perlakuan K- tidak menunjukkan pita DNA, sehingga K- terinfeksi WSSV (Gambar 6).

Udang vaname yang diinfeksi WSSV menunjukkan gejala klinis yaitu menurunnya nafsu makan, saluran pencernaan kosong, udang mengalami *lethargic* dan tidak responsif, perubahan warna hepatopankreas menjadi pucat, serta terdapat bintik-bintik putih pada udang terutama di bagian karapas. Menurut Lightner



Keterangan: KP: kontrol positif *white spot syndrome virus*; KN: kontrol negatif *white spot syndrome virus*; K-: perlakuan kontrol negatif; K+: perlakuan kontrol positif; A: perlakuan A; B: perlakuan B; C: perlakuan C

Note: KP: positive control of *white spot syndrome virus*; KN: negative control of *white spot syndrome virus*; K-: negative control treatment; K+: positive control treatment; A: treatment A; B: treatment B; C: treatment C

Gambar 6. Hasil konfirmasi *white spot syndrome virus* melalui analisis *polymerase chain reaction*.

Figure 6. The result of the confirmation of *white spot syndrome virus* through *polymerase chain reaction* analysis.

(2011), WSSV menginfeksi sel-sel pada jaringan mesodermal, serta eksodermal seperti jaringan epitel subkutikula, limfoid, dan hematopoeietik. Bintik-bintik putih pada udang disebabkan oleh abnormalitas deposit garam kalsium pada epitel kutikular. Pada beberapa kasus infeksi WSSV, terjadi *discolourization* yang disebabkan oleh rusaknya jaringan kutikular kromatofora.

KESIMPULAN

Pemberian prebiotik berupa madu melalui pakan dapat meningkatkan respons imun dan resistansi udang vaname terhadap infeksi WSSV dengan tingkat respons imun dan resistansi terbaik diperoleh pada pemberian madu sebanyak 0,4%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Direktorat Riset dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2018.

DAFTAR ACUAN

Aktas, M., Ciger, O., Genc, E., Genc, M.A., & Çavdar, N. (2014). Effects of mannan oligosaccharide and

serotonin on molting, growth, body composition and hepatopancreas histology of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 205-211.

Anderson, D.P. & Siwicki, A.K. (1995). Basic haematology and serology for fish health programs. In *Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and The Environment"* (p. 17). Phuket, Thailand.

Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M.A. (2011). Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture Research & Development*, S1, 008.

Cheng, W., Liu, C.H., Yeh, S.T., & Chen, J.C. (2004). The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(1), 41-51.

Effendie, M.I. (1997). *Biologi Perikanan*. Yogyakarta: Yayasan Pustaka Nusatama, hlm. 128-132.

FAO. (2017). Moderate and positive production trends for farmed shrimp. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1042377/>. [akses 01 Desember 2017].

Febrianti, D., Yuhana, M., & Widanarni. (2016). Dietary synbiotic microcapsule influence the immune responses, growth performance and microbial

- populations to white spot syndrome virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 11(1), 28-42.
- Flegel, T.W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258(1), 1-33.
- Flegel, T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173.
- Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., & Sun, Y.Z. (2015). Prebiotics and fish immune response: A review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(4), 315-328.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1), 45-52.
- Karimah, U., Anggowo, Y.N., Falah, S., & Suryani. (2011). Isolasi oligosakarida madu lokal dan analisis aktivitas prebiotiknya. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 6(3), 217-224.
- Kathleen, M.M., Samuel, L., Felecia, C., Reagen, E.L., Kasing, A., Lealey, M., & Toh, S.C. (2016). Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *International Journal of Microbiology*, Article ID 2164761.
- KKP. (2018). Produktivitas perikanan Indonesia. <https://kkp.go.id/wp-content/uploads/2018/01/KKP-Dirjen-PDSPKP-FMB-Kominfo-19-Januari-2018.pdf>. [akses 02 Juli 2018].
- Li, J., Tan, B., & Mai, K. (2009). Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to *white spot syndrome virus* in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1), 35-40.
- Lightner, D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 110-130.
- Liu, C.H. & Chen, J.C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(3), 321-334.
- Mai, W.J. & Wang, W.N. (2010). Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the *white spot syndrome virus* (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4), 727-733.
- Muslim, T. (2014). Potensi madu hutan sebagai obat dan pengelolannya di Indonesia. Dalam *Seminar Balai Penelitian Teknologi Konservasi Sumber Daya Alam "Tumbuhan Obat dari Hutan: Konservasi, Budidaya dan Pemanfaatan"* (hlm. 67-82). Balikpapan, Indonesia: Balai Penelitian Teknologi Konservasi Sumber Daya Alam.
- Nayak, S.K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1), 2-14.
- Nunan, L.M. & Lightner, D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of *white spot syndrome virus* (WSSV). *Journal of Virological Methods*, 171(1), 318-321.
- Partida-Arangure, B.O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J.A., Flores-Miranda, M.C., & González-Ocampo, H.A. (2013). Effect of inulin and probiotic bacteria on growth survival, immune response, and prevalence of *white spot syndrome virus* (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3366-3375.
- Ramos-Carreño, S., Valencia-Yáñez, R., Correa-Sandoval, F., Ruíz-García, N., Díaz-Herrera, F., & Giffard-Mena, I. (2014). *White spot syndrome virus* (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. *Archives of Virology*, 159(9), 2213-2222.
- Rodriguez, J. & Moullac, G.L. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191(1-3), 109-119.
- Rosendale, D., Butts, C.A., de Guzman, C.E., Maddox, I.S., Martell, S., McIntyre, L., Skinner, M.A., Dinnan, H., & Ansell, J. (2016). Consumption of antimicrobial manuka honey does not significantly perturb the microbiota in the hind gut of mice. *PeerJ*, 4, e2787.
- Sahoo, P.K., Das, A., Mohanty, S., Mohanty, B.R., Pillai, B.R., & Mohanty, J. (2008). Dietary α -1,3-glucan improves the immunity and disease resistance of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 39(14), 1574-1578.
- Sanz, M.L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G.R., & Rastall, R.A. (2005). In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2914-2921.
- Wang, F.I. & Chen, J.C. (2006). Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(5), 671-681.
- Widanarni, Sukenda, & Septiani, G.R. (2016). Aplikasi sinbiotik untuk pencegahan infeksi *infectious myonecrosis virus* pada udang vaname (*Litopenaeus*

- vannamei*). *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10(2), 121-127.
- Yeh, S.P., Chen, Y.N., Hsieh, S.L., Cheng, W., & Liu, C.H. (2009). Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with *white spot syndrome virus* and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4), 582-588.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 1027-1032.