

Respon imun nonspesifik dan pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida dengan lama pemberian berbeda

(Nonspecific immune response and growth of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed nucleotide-supplemented diet at different feeding time)

Henky Manoppo

Staf pengajar pada Program Studi Budidaya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi

Abstract

This study evaluated the effects of feeding protocol of nucleotide-supplemented diet on total hemocytes, PO activity and growth of whiteleg shrimp. Shrimp juveniles were reared in five 120-l glass aquaria at the density of 25 juveniles each. Shrimp pellet was supplemented with nucleotides mixture at 400 mg.kg⁻¹ diet. Shrimps were fed three time a day at 3%/bw/d. Feeding protocol was 7 days nucleotides diet – 7 days basal diet alterably for 49 days. Total hemocyte count, PO activity, and growth were measured at the end of experiment. Research result showed that oral administration of nucleotides at seven days interval did not affect THC, PO activity, and growth of shrimp. But if the feed was administered successively for four weeks, supplementation of nucleotides would significantly enhance the nonspecific immune response and shrimp growth.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, nucleotides, PO activity, total hemocyte count

PENDAHULUAN

Produksi usaha budidaya udang secara langsung dipengaruhi oleh pertumbuhan dan resistensi udang yang dipelihara. Namun demikian, penyakit terutama yang disebabkan oleh virus telah menyebabkan banyak usaha yang mengalami kerugian ekonomi yang cukup besar. Oleh karena itu, kontrol penyakit perlu mendapat perhatian serius agar usaha dapat berkesinambungan.

Nukleotida merupakan imunostimulan yang potensial untuk diaplikasikan dalam mengontrol penyakit pada ikan dan udang. Beberapa penelitian pada ikan telah

membuktikan bahwa pemberian oral nukleotida dapat meningkatkan respon imun dan resistensi, toleransi terhadap stres serta pertumbuhan ikan (Li & Galtin 2006). Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya telah ditemukan bahwa suplementasi nukleotida dalam pakan dapat meningkatkan respon imun nonspesifik, resistensi dan pertumbuhan udang vaname.

Dua hal yang perlu dipertimbangkan dalam aplikasi imunostimulan dalam budidaya adalah dosis dan lama waktu pemberian. Pemberian nukleotida dalam jumlah yang tepat dapat meningkatkan imunitas dan pertumbuhan udang yang dipelihara,

sebaliknya dosis berlebihan akan menekan pertumbuhan dan bersifat immunosupresor bagi hewan yang dipelihara (Sakai 1999).

Lama waktu pemberian sangat penting untuk menghasilkan respon imunitas optimal sebab pemberian imunostimulan yang berkepanjangan dapat menekan resistensi ikan terhadap penyakit dan pertumbuhan (Li & Galtin 2006). Sebagai contoh, *rainbow trout* yang diberi peptidoglikan selama 56 hari tidak memperlihatkan proteksi terhadap *V. anguillarum*, tetapi ikan yang diberi 28 hari memperlihatkan peningkatan proteksi. Bagaimana pengaruh pemberian imunostimulan yang berkepanjangan terhadap penurunan respon imun atau pertumbuhan belum diketahui (Misra *et al.* 2006; Sakai 1999). Oleh karena itu, lama waktu pemberian yang efektif perlu diteliti untuk masing-masing imunostimulan.

Sampai saat ini, belum ada hasil penelitian yang menetapkan lama waktu atau protokol pemberian nukleotida pada udang maupun ikan. Beberapa penelitian pada ikan menggunakan lama waktu adminitrasi nukleotida yang berbeda-beda. Ramadhan *et al.* (1994) memberikan nukleotida komersil (ascogen) selama 120 hari pada hybrid tilapia, Burrel *et al.* (2001) memberikan nukleotida (optimun) selama 3 minggu pada *atlantik salmon*, Sakai *et al.* (2001) memberikan yeast RNA selama 3 hari pada *Cyprinus carpio*, Li *et al.* (2007) memberikan campuran nukleotida murni selama 5 minggu pada udang vaname, dan Leonardi *et al.* (2003) memberikan optimun selama 120 hari pada *rainbow trout*.

Pada penelitian yang telah dikerjakan pada tahap sebelumnya, didapatkan bahwa aplikasi nukleotida pada level 400 mg.kg⁻¹

pakan mampu meningkatkan total hemosit, aktivitas PO, resistensi, dan pertumbuhan udang vaname. Berapa lama faktor-faktor ini dapat ditingkatkan oleh penambahan nukleotida tanpa menimbulkan resiko yang berbahaya pada udang seperti menekan respon imun dan pertumbuhan belum diketahui, atau bagaimana protokol pemberian yang efektif yang dapat mengoptimalkan respon imun nonspesifik, resistensi dan pertumbuhan belum diketahui. Dengan menggunakan dosis yang ditetapkan terbaik pada penelitian tahap sebelumnya, maka dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengevaluasi pengaruh protokol pemberian nukleotida terhadap jumlah hemosit, aktivitas PO dan pertumbuhan udang vaname.

METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan pada 23 April–2 Juli 2009.

Hewan uji

Hewan uji adalah juvenil udang vaname yang diambil dari fasilitas pembesaran udang vaname di areal pertambakan Bakauheni Lampung Selatan. Udang dimasukkan dalam kotak styrofoam yang dilengkapi aerator baterai kemudian diangkut ke laboratorium Kesehatan Ikan IPB menggunakan mobil.

Nukleotida

Nukleotida yang digunakan adalah nukleotida murni (Sigma-Aldrich) yang terdiri

atas adenosine monophosphate (AMP), guanosine monophosphate (GMP), cytidine monophosphate (CMP), uridine monophosphate (UMP), dan inosine monophosphate (IMP).

Rancangan percobaan

Eksperimen ini bersifat eksploratif guna mendapatkan protokol pemberian imunostimulan nukleotida yang tepat dalam mengoptimalkan respon imun nonspesifik dan

pertumbuhan udang vaname. Hewan uji dipelihara dalam 5 buah akuarium kaca yang masing-masing berukuran 60x50x40 cm dengan kapasitas 120 liter air. Udang dalam akuarium Aq1 diberi pakan standar sedangkan udang dalam akuarium Aq2, Aq3, Aq4, dan Aq5 masing-masing diberi pakan yang ditambahkan nukleotida 400 mg.kg^{-1} pakan namun jadwal waktu pemberian yang berbeda. Protokol pemberian nukleotida disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Protokol pemberian pakan dengan dan tanpa suplementasi nukleotida pada udang vaname

Wadah Percobaan	Waktu pemberian (minggu)						
	1	2	3	4	5	6	7
Aq1	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Aq.2	NT	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Aq.3	NT	PS	NT	PS	PS	PS	PS
Aq4	NT	PS	NT	PS	NT	PS	PS
Aq5	NT	PS	NT	PS	NT	PS	NT

Ket: NT: pakan dengan suplementasi nukleotida; PS: pakan standar

Prosedur penelitian dan pengambilan data

Sebanyak 125 ekor juvenil udang vaname dipelihara dalam bak fiberglas (kapasitas 1 ton) untuk proses penyesuaian kondisi lingkungan. Bak aklimatisasi ini dilengkapi dengan aerator serta menggunakan resirkulasi air. Selama periode aklimatisasi, udang diberi pakan standar sebanyak 3% bb/hari yang diberikan tiga kali sehari yakni pada pukul 09.00, 13.00, dan 17.00. Pada akhir periode aklimatisasi, udang (rata-rata $9.41 \pm 0.43 \text{ g}$) dipindahkan ke dalam akuarium Aq1, Aq2, Aq3, Aq4, dan Aq5, masing-masing sebanyak 25 ekor. Setiap akuarium berisi 100 l air dan dilengkapi dengan aerator

menggunakan *airlift system* serta menggunakan resirkulasi air.

Udang dalam akuarium Aq1 diberi pakan standar tanpa suplementasi nukleotida dari awal sampai akhir masa percobaan yaitu 49 hari. Udang dalam akuarium Aq2 diberi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 7 hari, kemudian pakan diganti dengan pakan standar sampai akhir masa percobaan. Pada akuarium Aq3, udang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 7 hari, kemudian diganti dengan pakan standar selama 7 hari berikutnya, dan diberi lagi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 7 hari (pakan bernukleotida 2×7 hari), setelah itu udang diberi pakan standar sampai akhir

periode percobaan. Pada akuarium Aq4, udang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 7 hari, kemudian 7 hari standar, 7 hari pakan nukleotida, 7 hari pakan standar, 7 hari berikutnya pakan nukleotida (pakan bernukleotida 3x7 hari) dan selanjutnya diberi pakan standar sampai akhir periode percobaan. Udang dalam akuarium Aq5 diberi pakan yang ditambahkan nukleotida sebanyak 4 x 7 hari dengan protokol pemberian yang sama seperti pada akuarium Aq3 dan Aq4. Tingkat pemberian pakan adalah 3%/bb/hari dengan frekuensi pemberian tiga kali per hari yakni pada pukul 09.00, 13.00, dan 17.00. Penggantian air dilakukan setiap 3-4 hari sekali tergantung pada kondisi air sedangkan sisa pakan atau kotoran udang yang terakumulasi dalam akuarium dikeluarkan setiap hari melalui penyiponan.

Sampel hemolim untuk pengukuran parameter imun diambil dari 2 ekor udang dari setiap unit percobaan dengan prosedur yang sama seperti pada eksperimen tahap pertama. Sekitar 0.1 ml hemolim diambil dari *ventral sinus* pada pangkal ruas tubuh pertama dengan menggunakan alat suntik 1-mL setelah sebelumnya dimasukkan 0.1 ml antikoagulan (30 mM trisodium citrate, 0.34 M sodium chloride, 10 mM EDTA, pH 7.5). Selanjutnya tambahkan antikoagulan sehingga perbandingan hemolim : antikoagulan menjadi 1 : 9. Pengukuran parameter imun dikerjakan pada akhir periode percobaan yakni hari ke 49. Sebelum udang dikorbankan terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat udang.

Parameter imun

Parameter yang diukur terdiri atas parameter imun (total hemocyte count dan aktivitas PO) serta pertumbuhan udang.

Prosedur pengukuran parameter imun adalah sama seperti yang dikerjakan pada penelitian tahap pertama sebagai berikut:

Penghitungan THC

Sebanyak 50 µl campuran hemolim-antikoagulan dimasukkan dalam neutral buffered formalin (10%) selama 30 menit. Selanjutnya, THC dihitung dengan menggunakan hemasitometer di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x.

Aktivitas phenoloxidase (PO)

Aktivitas PO hemosit diukur berdasarkan formasi dopachrome yang dihasilkan oleh L-DOPA. Pengukuran aktivitas PO dikerjakan berdasarkan prosedur yang dikemukakan oleh Liu & Chen (2004). Pertama-tama, 1 ml campuran hemolim-antikoagulan disentrifuse pada 700 g selama 20 menit pada 4°C. Supernatan dikeluarkan dan pelet disuspensikan kembali secara perlahan-lahan ke dalam 1 ml larutan cacodylate-citrate buffer (0.01 M sodium cacodylate, 0.45 M sodium chloride, 0.10 M trisodium citrate, pH 7) dan disentrifuse kembali. Pelet kemudian diambil dan disuspensikan dalam 200 µl cacodylate buffer (0.01 M sodium cacodylate, 0.45 M sodium chloride, 0.01 M calcium chloride, 0.26 M magnesium chloride, pH 7). Selanjutnya, aliquot sebanyak 100 µl diinkubasi dengan 50 µl tripsin (1 mg.ml⁻¹ cacodylate buffer) sebagai aktivator selama 10 menit pada temperatur 25°-26°C. Selanjutnya ditambahkan 50 µl L-DOPA (3 mg.ml⁻¹ cacodylate buffer), setelah 5 menit, ditambahkan 800 µl cacodylate buffer. Densitas optikal (OD) 490 nm diukur dengan menggunakan Spectrophotometer.

Larutan standar mengandung 100 μ l suspensi hemosit, 50 μ l cacodylate buffer (pengganti tripsin), dan 50 μ l L-DOPA digunakan untuk mengukur blanko aktivitas PO pada semua larutan uji. Densitas optikal (OD) dari aktivitas PO *pada* semua kondisi uji dinyatakan sebagai formasi dopachrome dalam 50 μ l hemolim.

Pertumbuhan

Pertumbuhan udang diukur pada akhir percobaan yaitu pada hari ke 49. Pertumbuhan dihitung dengan formula sebagai berikut:

$$G = W_t - W_o$$

dimana: G = pertumbuhan (g)
 W_t = berat udang pada waktu t (g);
 W_o = berat udang pada awal percobaan (g)

Analisis data

Data setiap parameter imun dan pertumbuhan udang dinyatakan dalam nilai rata-rata \pm Sdv. Evaluasi terhadap hubungan antara lama waktu pemberian pakan yang ditambahkan nukleotida dengan masing-masing parameter imun maupun pertumbuhan dilakukan secara deskriptif dengan menggunakan angka mutlak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Hemocyte Count

Total hemocyte count (THC) udang yang diukur pada akhir periode percobaan (hari ke 49) disajikan pada Tabel 2. Data hasil penelitian memperlihatkan bahwa sampai akhir periode percobaan, nukleotida (400

mg.kg⁻¹ pakan) yang ditambahkan dalam pakan yang diberikan dengan protokol 7 hari pakan bernukleotida dan 7 hari pakan standar secara bergantian selama 49 hari tidak memberikan pengaruh terhadap peningkatan THC.

Data di atas memperlihatkan bahwa udang yang diberi pakan standar (Aq1) dan udang yang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 1x7 hari (Aq2) memiliki hemosit yang hampir sama jumlahnya. Data di atas juga memperlihatkan bahwa udang yang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida dengan lama waktu pemberian 2x7 hari (Aq3), 3x7 hari (Aq4) dan 4x7 hari (Aq5) yang diberikan secara bergantian dengan pakan standar dengan interval 7 hari memiliki jumlah hemosit yang hampir sama. Dibandingkan dengan udang yang diberi pakan standar (Aq1), THC udang pada Aq3, Aq4 dan Aq5 hanya sedikit meningkat yakni sekitar 6-14.8%. Kondisi ini mengindikasikan bahwa pakan yang ditambahkan nukleotida apabila diberikan secara bergantian dengan pakan standar dengan interval 7 hari tidak dapat menunjang peningkatan jumlah hemosit udang vaname.

Aktivitas PO

Aktivitas PO hemolim udang juga tidak dipengaruhi oleh lama waktu pemberian nukleotida berdasarkan protokol yang diujicobakan. Nilai aktivitas PO udang yang diukur pada akhir periode percobaan (hari ke 49) dapat dilihat pada Tabel 6 (Lampiran 17). Sebagaimana dengan THC, aktivitas PO udang pada Aq1 dan Aq2 memiliki nilai hampir sama. Nilai aktivitas PO udang pada Aq3, Aq4, dan Aq5 juga hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian pakan

dengan protokol 7 hari pakan yang ditambahkan nukleotida – 7 hari pakan standar secara bergantian sampai 49 hari tidak efektif meningkatkan aktivitas PO udang.

Tabel 2. THC, aktivitas PO dan perolehan berat udang vaname setelah diberi pakan yang ditambahkan nukleotida dengan lama pemberian berbeda

Wadah Percobaan	Lama Pemberian Nukleotida	Parameter		
		THC ($\times 10^7$ sel/mL)	PO	WG (g)
Aq1	-	1.798 \pm 0.047	0.308 \pm 0.075	6.26 \pm 1.14
Aq2	1x7 hari	1.782 \pm 0.047	0.318 \pm 0.162	6.23 \pm 1.01
Aq3	2x7 hari	1.990 \pm 0.224	0.423 \pm 0.037	7.24 \pm 0.57
Aq4	3x7 hari	1.906 \pm 0.082	0.379 \pm 0.009	8.01 \pm 1.07
Aq5	4x7 hari	2.065 \pm 0.117	0.433 \pm 0.021	7.51 \pm 0.39

Pertumbuhan

Pemberian pakan dengan protokol pemberian 7 hari pakan yang ditambahkan nukleotida dan 7 hari pakan standar secara bergantian tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan udang vaname. Tabel 6 memperlihatkan bahwa udang pada Aq1 dan Aq2 memiliki perolehan berat yang sama (Lampiran 17). Udang pada Aq3 (suplementasi nukleotida 2x7 hari), Aq4 (suplementasi nukleotida 3x7 hari) dan Aq5 (suplementasi nukleotida 4x7 hari) juga memiliki perolehan berat yang tidak jauh berbeda yaitu masing-masing 7.24 g, 8.01 g, dan 7.51 g. Perolehan berat ini hanya mencapai 15-27% lebih berat dari perolehan berat udang yang tidak diberi suplementasi nukleotida (Aq1).

Belum ada laporan penelitian tentang protokol pemberian yang ditambahkan nukleotida pada udang maupun ikan. Beberapa penelitian pada ikan menggunakan waktu pemberian yang bervariasi mulai dari 3 hari sampai 120 hari dan diberikan setiap hari

secara berturut-turut. Sebagai contoh, Li *et al.* (2004a) melaporkan bahwa hybrid striped bass yang diberi pakan dengan penambahan nukleotida (ascogen) selama 8 minggu mengalami peningkatan respon imun nonspesifik namun jika diberi selama 16 minggu tidak terjadi peningkatan. Misra *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa pemberian imunostimulan (glukan) selama 42 hari dapat meningkatkan imun respon, pertumbuhan dan resistensi juvenil *Labeo rohita*, dan sesudahnya mulai terjadi penurunan.

Dalam penelitian ini jelas terlihat bahwa penambahan nukleotida pada dosis 400 mg.kg⁻¹ pakan dengan protokol pemberian 7 hari pakan yang ditambahkan nukleotida dan 7 hari pakan standar secara bergantian selama 49 hari tidak berpengaruh positif terhadap peningkatan respon imun nonspesifik dan pertumbuhan udang vaname. Hal ini mungkin terjadi karena pertama, lama waktu pemberian nukleotida dalam penelitian ini masih kurang sehingga nukleotida yang ditambahkan dalam pakan belum mampu memperlihatkan respon terhadap imunitas dan pertumbuhan udang.

Sebagai contoh, Itami *et al.* (1998) melaporkan bahwa pemberian oral peptidoglikan dengan interval pemberian 7 hari pakan yang ditambahkan peptidoglikan dan 7 hari pakan standar selama 95 hari dapat meningkatkan respon imun, resistensi dan pertumbuhan udang (*Penaeus japonicus*). Kedua, udang vaname mungkin membutuhkan suplai nukleotida secara kontinyu untuk dapat mempertahankan dan meningkatkan respon imun dan

pertumbuhannya. Dengan kata lain, suplementasi nukleotida dalam pakan harus diberikan secara berlanjut untuk jangka waktu tertentu agar dapat meningkatkan respon imun dan pertumbuhan udang.

Pada penelitian yang telah dikerjakan pada tahap sebelumnya, penambahan nukleotida 400 mg.kg⁻¹ pakan dipemberikan secara oral selama 4x7 hari (28 hari) secara berturut-turut. Hasil penelitian yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. THC, aktivitas PO dan perolehan berat udang vaname setelah diberi pakan yang ditambahkan nukleotida selama 4x7 hari berturut-turut

Perlakuan	Parameter		
	THC (x 10 ⁷ sel/mL)	PO	WG (g)
Pakan Standar	1.216±0.158	0.236±0.008	3.35±0.37
Nukleotida	2.109±0.553	0.364±0.086	5.05±0.40

KESIMPULAN

Hasil penelitian di atas memperlihatkan bahwa setelah 4 minggu (4x7 hari) pemberian pakan yang ditambahkan nukleotida, THC udang meningkat sebesar 73% lebih tinggi dari udang yang hanya diberi pakan standar. Aktivitas PO udang yang diberi pakan dengan penambahan nukleotida juga meningkat. Perolehan berat udang yang diberi pakan yang ditambahkan nukleotida meningkat sebesar 50.7% lebih berat dari udang yang hanya diberi pakan standar tanpa suplementasi nukleotida. Ini berarti bahwa udang vaname mungkin membutuhkan ketersediaan eksogenous nukleotida secara kontinyu untuk mempertahankan dan meningkatkan respon imun nonspesifik dan pertumbuhan.

Untuk dapat meningkatkan jumlah total hemosit, aktivitas phenoloxidase dan pertumbuhan udang vaname maka penambahan nukleotida dalam pakan dengan dosis 400 mg.kg⁻¹ pakan perlu diberikan selama 4 minggu secara terus menerus.

DAFTAR PUSTAKA

- Burrells C, Williams PD, Fomo PF. 2001. Dietary nucleotide: a novel upplement in fish feeds. 1 Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquac* 199: 159-169
- Itami T, Asano M, Tokushige K, Kubono K, Nakagawa A, Takeno N, Nishimura H, Maeda M, Kondo M, Takahashi Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from

- Bifidobacterium thermophilum*. Aquac 164: 277-288
- Leonardi M, Sadino AM, Klempau A. 2003. Effect of a nucleotide enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathol. 23:52-59
- Li P, Galtin III DM. 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future application. Aquac 251: 141-152
- Li P, Lawrence AI, Castille FL, Galtin III DM. 2007. Preliminary evaluation of a purified nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac Res 38: 887-890
- Li P, Lewis DH, Galtin III DM. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish Shellfish Immunol. 16:561-569
- Liu CH, Chen JC. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol 16: 321-334
- Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. 2006. Effect of long-term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and resistance of *Labeo rohita* fingerlings. Aquac 255: 82-92
- Ramadan A, Afifi NA, Mustafa M, Samy AM. 1994. The effects of ascogen on the immune response of tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Fish Shellfish Immunol. 5: 159-165
- Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquac 172: 63-92
- Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, Ogawa H, Tabata M. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. J Fish Dis 24: 433-438