

**APLIKASI *Bacillus* sp. D2.2 DALAM SINBIOTIK TERHADAP RESPON
IMUN SELULER UDANG VANNAME (*Litopenaeus vannamei*)**

(Skripsi)

Oleh

DIAH PERMATASARI



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2017**

ABSTRACT

Application of *Bacillus* sp. D2.2 in Sinbiotics Against Cellular Immune Response White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

By

Diah Permatasari

Bacillus sp. D2.2 is a probiotic that can be used in an effort to improve the cellular immune system of vaname shrimp. *Bacillus* sp. D2.2 in sinbiotics added to commercial feed with FR 3% is an alternative combination of bacterial treatment in vaname shrimp. Application of the addition of *Bacillus* sp. D2.2 in sinbiotics on commercial feed is aimed to determine the effect of probiotics given to cellular immune response of vaname shrimp. Shrimp vaname used 12 gram size as much as 10 each tail tub. The test tubes used were 4 fruits for treatment A (0% probiotics), B (2% probiotics), C (4% probiotics), and D (6% probiotics) added 3% white sweet potato flour extract and binder Eggs 2%). The study was conducted for 12 days of maintenance period with total test parameters of hemocyte count, phagocytosis activity, phagocytosis index. *Bacillus* sp. D2.2 the applied has an effect on the increase in total hemocyte count and phagocytosis activity, as well as the phagocytosis index. The best percentage of probiotics in improving cellular immune response of vanilla shrimp is *Bacillus* sp. D2.2 treatment D with 6% concentration as evidenced by increasing THC value and phagocytic activity of vaname shrimp in observation, whereas phagocytosis index value owned by treatment D is stable index compared to other treatment.

Keywords: probiotics, *Bacillus* sp. D2.2, THC, phagocytosis activity, phagocytosis index

ABSTRAK

Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam Sinbiotik Terhadap Respon Imun Seluler Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Oleh

Diah Permatasari

Bacillus sp. D2.2 merupakan probiotik yang dapat digunakan dalam upaya peningkatan sistem imun seluler udang vaname. Isolat *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik yang ditambahkan pada pakan komersil dengan FR 3% merupakan perpaduan alternatif pengobatan bakterial pada udang vaname. Aplikasi penambahan *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik pada pakan komersil ditujukan untuk mengetahui pengaruh probiotik yang diberikan terhadap respon imun seluler udang vaname. Udang vaname yang digunakan berukuran 12 gram sebanyak 10 ekor tiap bak. Bak uji yang digunakan berjumlah 4 buah untuk perlakuan A (0% probiotik), B (2% probiotik), C (4% probiotik), dan D (6% probiotik) yang ditambahkan ekstrak tepung ubi jalar putih 3% dan binder (putih telur 2%). Penelitian dilakukan selama 12 hari masa pemeliharaan dengan parameter uji total *hemocyte count*, aktivitas fagositosis, indeks fagositosis. *Bacillus* sp. D2.2 yang diaplikasikan memiliki pengaruh terhadap peningkatan total *hemocyte count* dan aktivitas fagositosis, serta indeks fagositosis. Persentase probiotik terbaik dalam meningkatkan respon imun seluler udang vaname yakni *Bacillus* sp. D2.2 perlakuan D dengan konsentrasi 6% yang dibuktikan dengan meningkatnya nilai THC dan aktivitas fagositosis udang vaname dalam pengamatan, sedangkan nilai indeks fagositosis yang dimiliki oleh perlakuan D merupakan indeks yang stabil dibandingkan perlakuan lainnya.

Kata kunci : probiotik, *Bacillus* sp. D2.2, THC, aktivitas fagositosis, indeks fagositosis

**APLIKASI *Bacillus* sp. D2.2 DALAM SINBIOTIK TERHADAP RESPON
IMUN SELULER UDANG VANNAME (*Litopenaeus vannamei*)**

Oleh

DIAH PERMATASARI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERIKANAN**

Pada

**Jurusan Perikanan Dan Kelautan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2017**

Judul Skripsi : **APLIKASI *Bacillus* sp. D2.2 DALAM SINBIOTIK TERHADAP RESPON IMUN SELULER UDANG *(Litopenaeus Vannamei)***

Nama :

Diah Permatasari

No. Pokok Mahasiswa :

1314111018

Program Studi :

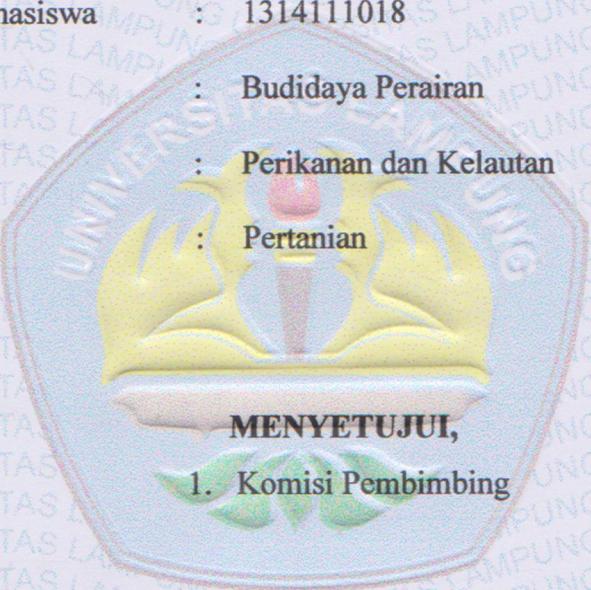
Budidaya Perairan

Jurusan :

Perikanan dan Kelautan

Fakultas :

Pertanian



MENYETUJUI,

1. Komisi Pembimbing

Limin Santoso, S.Pi., M.Si.

NIP 19770327 200501 1 001

Esti Harpeni, S.T., M.AppSc.

NIP 19791118 200212 2 001

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

Ir. Siti Hudaidah, M. Sc.

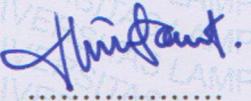
NIP 19640215 199603 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Pengudi

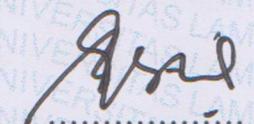
Ketua

: **Limin Santoso, S.Pi., M.Si.**



Sekretaris

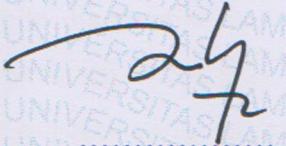
: **Esti Harpeni, S.T., MAppSc.**



Pengudi

Bukan Pembimbing

: **Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.

NIP 19611020 198603 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **18 Agustus 2017**

PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Karya tulis saya, Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana/Ahli Madya) baik di Universitas Lampung maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan oleh orang lain, kecuali secara tertulis dicatumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini, serta sanksi lainnya yang sesuai dengan norma yang berlaku di Perguruan Tinggi ini.

Bandar Lampung, 18 Agustus 2017

Yang membuat pernyataan



Diah Permatasari
NPM. 1314111018

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Purajaya 11 Agustus 1994 sebagai anak pertama dari lima bersaudara dari pasangan Ibu Fadma dan Bapak Amali Fatulloh.

Penulis memulai pendidikan formal di Sekolah Dasar Negeri (SDN) 1 Purajaya sampai dengan tahun 2003, kemudian melanjutkan di Sekolah Dasar Negeri (SDN) 5 Metro Utara diselesaikan pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 6 Metro diselesaikan pada tahun 2010, Sekolah Menengah Atas Muhammadiyah (SMAM) 1 Metro diselesaikan pada tahun 2013. Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang S1 di Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) pada tahun 2013.

Selama menjadi mahasiswa penulis aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Budidaya Perairan UNILA (HIDRILA) sebagai Bendahara Umum periode 2015-2016. Penulis aktif dalam perlombaan yang diadakan pada tingkat universitas maupun nasional, penulis meraih juara 1 lomba MTQ tingkat Kecamatan pada tahun 2006, juara 3 dalam lomba melukis pada peringatan HUT RI tingkat Kecamatan tahun 2006, juara 1 lomba dengan tema “kuliah sambil berdagang” pada tahun 2013 yang diadakan oleh FOSI FP Universitas Lampung, Juara 1 Hand Drawing Poster Dakwah yang diadakan oleh 2014, pada tahun 2013 yang diadakan oleh FOSI FP Universitas Lampung. Penulis telah melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata di Desa Banjar Agung , Tanggamus pada bulan Januari-Maret 2016. Penulis mengikuti Praktik Umum di Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan Serang pada bulan Juli-Agustus 2016.

Penulis pernah menjadi Asisten Mata Kuliah Biologi Akuatik pada tahun ajaran 2014/2015, Ikhtiologi pada tahun ajaran 2014/2015, Plankton dan Tumbuhan Air

pada tahun ajaran 2015/2016, Mikrobiologi Akuatik pada tahun ajaran 2015/2016, Penyakit dan Parasit Organisme Akuatik pada tahun ajaran 2015/2016, serta Menajemen Kesehatan Ikan, Bioteknologi Akuakultur, dan Toksikologi Perairan dan Ekologi Perairan pada tahun ajaran 2016/2017. Penulis melakukan penelitian pada bulan September-November 2016 di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Pesawaran, Lampung dengan judul “**Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam Sinbiotik Terhadap Respon Imun Seluler Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*)**”.

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”
(QS. Al Mujadalah : 11)

“Belajarlah kalian ilmu untuk ketentraman dan ketenangan serta rendah hatilah pada orang yang kamu belajar darinya”
(HR. At Tabrani)

“Saling berjabat tanganlah kalian, niscaya akan hilang kedengkian. Saling memberi hadiah lah kalian, niscaya kalian saling mencintai dan hilang (dari kalian) kebencian”
(HR. Iman Malik)

“Ikatlah ilmu dengan menulisnya”
(Ali bin Abi Talib)

“Berhentilah membuat semuanya menjadi rumit”
(Confucius)

“Aku tidak suka belajar hal yang sama, aku lebih suka belajar yang lain, karena aku ya aku”
(Dyah Ps)

SANWACANA

Alhamdulilah berkat kehadirat Allah Adza wa Jalla atas limpahan rahmat dan hidayah-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam Sinbiotik Terhadap Respon Imun Seluler Udang Vanname (*Litopenaeus Vannamei*)” sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada nabiallah Muhammad saw, yang kita nantikan syafaatnya.

Penulis dalam menyelesaikan skripsi memperoleh bantuan dan dukungan dari beberapa pihak, sehingga dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Ibu ku Fadma, ayah ku Amali Fatullah, adik ku Dwi Bobby Saidulloh dan Adnan Nur Fadly atas dukungan moril maupun dana, kasih sayang, dan doa yang diberikan dengan keikhlasan selama hidup.
2. Bapak Limin Santoso, S.Pi., M.Si., Ibu Esti Harpeni, S.T., MAppSc., dan Ibu Ir. Siti Hudaidah, M.Sc., selaku bapak dan ibu dosen yang telah bersedia meluangkan waktu dalam membimbing dan mengarahkan dalam berjalannya penelitian dan penyusunan skripsi.
3. BDPI 13 selaku teman senasib sepenanggungan Ikem, laksmita, Ema, Binti, Indri, Nia, Idul, Wedeh, Acil, Neni, Masna, Rara rehe, Ratna, Ketum Kuro, Kuple, Anrifal, Ricky, Rifki, Wahyu, Rio, Kak Enggi, Arbi, Akbar, Bibin, Haris, Evan, Wulan, Gina, Ute, Shinta, Suarlin, Ayu Nope, Dewi, Gita, Winny, Mona, Decky, Adjie, Glenn, Vanny, Juli, Mira, Desti, Rizka, Tania, Arga, Atik, Eko, Ari.
4. Keluarga kecil ku Prizka, Momsky Ara, Papsky Johar, Babang Iqbal, adik Intan, Ghozie.
5. Para wanita hebat ku Tya, Rika, Intan, Saroh, Umi, Oktri, Afria.

Penulis juga menghaturkan terimakasih dan mohon maaf kepada Dosen-Dosen tercinta yang telah menyalurkan pegetahuannya selama berada di perkuliahan, dan teman-teman lainnya yang tentu saja luput dari penulisan. Penulis menyadari dalam penulisan dan penyusunan masih terdapat kekeliruan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan skripsi ini dapat disempurkan dikemudian hari oleh pembaca yang berkenan dan saya berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat selain kepada penulis tentu kepada pembaca juga.

Bandar Lampung, Agustus 2017
Penyusun

Diah Permatasari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Kerangka Pikir.....	3
1.5 Hipotesis.....	6
II. METODE PENELITIAN	7
2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	7
2.2 Alat dan Bahan Penelitian	7
2.3 Rancangan Penelitian	9
2.4 Prosedur Penelitian.....	10
2.4.1 Persiapan wadah.....	10
2.4.2 Persiapan Hewan Uji.....	11
2.4.3 Persiapan Probiotik	12
2.4.4 Persiapan Prebiotik.....	12
2.4.5 Persiapan Pakan Uji	13
2.4.6 Pemeliharaan Udang	14
2.4.7 Pengambilan <i>Hemolymph</i>	15
2.4.8 Parameter Uji	15
2.4.9 Analisis Data	18
III. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
3.1 Total <i>Hemocyte Count</i> (THC)	19
3.2 Aktivitas Fagositosis (AF).....	22
3.3 Indeks Fagositosis (IF)	24
3.4 Kualitas Air	26
IV. KESIMPULAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Alat-alat dalam penelitian	7
Tabel 2. Bahan-bahan dalam penelitian	9
Tabel 3. Komposisi probiotik dan prebiotik pada pakan	9
Tabel 4. <i>Total Haemocyte Count</i> (THC) udang vaname yang diaplikasikan pakan dengan kandungan probiotik	20
Tabel 5. Aktivitas fagositosis udang vaname.....	23
Tabel 6. Indeks fagositosis udang vaname.....	25
Tabel 7. Parameter kualitas air yang diamati diawal dan akhir perlakuan pemberian probiotik terhadap respon imun udang vaname (<i>Litopenaeus vaname</i>)	26

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Kerangka pikir penelitian	5
Gambar 2. Sterilisasi wadah.....	10
Gambar 3. Sterilisasi air.....	11
Gambar 4. Persiapan hewan uji.....	11
Gambar 5. Persiapan probiotik.....	12
Gambar 6. Persiapan prebiotik.....	13
Gambar 7. Persiapan pakan uji.....	14
Gambar 8. Prosedur Pemeliharaan udang	14
Gambar 9. Pengambilan <i>hemolymph</i>	15
Gambar 10. Parameter uji THC	16
Gambar 11. Parameter AF/IF	17
Gambar 12. Parameter kualitas air	17
Gambar 13. Pengaruh pemberian probiotik terhadap <i>Total Haemocyte Count</i> (THC) udang vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	20
Gambar 14. Aktivitas fagositosis hemosit udang vaname yang ditambahkan dengan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> inaktif	22
Gambar 15. Indeks fagositosis udang vaname yang dialami hemosit udang vaname setelah disuspensikan dengan bakteri inaktif <i>Staphylococcus aureus</i>	25

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Perhitungan Statistik Respon Imun Seluler Udang Vaname	31
Lampiran 2. Persiapan Alat dan Bahan Uji.....	48
Lampiran 3. Pembuatan Pakan uji	52
Lampiran 4. Pemeliharaan Hewan Uji	53
Lampiran 5. Pengambilan Sampel <i>haemolymph</i>	54
Lampiran 6. Parameter Uji.....	55
Lampiran 7. Formulasi Pakan Uji	57
Lampiran 8. Standar Deviasi Parameter Uji	58

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname merupakan komoditas ekspor unggulan dan memiliki produktifitas tinggi di Indonesia. Pada tahun 2015 produksi udang vaname di Indonesia mencapai 518.600 ton dan Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) menargetkan untuk tahun 2016 produksi udang vaname mencapai 600.000 ton (KKP, 2015). Berdasarkan data tersebut peluang untuk membudidayakan udang vaname potensial dalam memenuhi permintaan pasar.

Budidaya udang tidak lepas dari masalah penurunan produksi yang disebabkan oleh penyakit yang timbul akibat lemahnya imunitas udang. Sistem pertahanan pada udang masih sangat primitif dan tidak memiliki sel memori, tidak sama dengan hewan vertebrata lainnya yang sudah mempunyai antibodi spesifik dan komplemen. Sistem kekebalan tubuh pada udang tidak mempunyai immunoglobulin yang berperan dalam mekanisme kekebalan, udang hanya mempunyai sistem kekebalan alami. Udang mempunyai daya tahan alami yang bersifat non spesifik terhadap organisme patogen berupa pertahanan fisik (mekanik), kimia, seluler dan humorai. Daya tahan alami ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan, sehingga terdapat tingkatan yang berbeda-beda tergantung strain, lingkungan pemeliharaan, spesies maupun famili (Ridlo dan Pramesti, 2009).

Sistem imun udang tergantung pada proses pertahanan non spesifik sebagai pertahanan terhadap infeksi (Lee *et al.*, 2004). Pertahanan pertama terhadap penyakit pada udang dilakukan oleh hemosit melalui fagositosis, enkapsulasi dan *nodule formation* (Ridlo dan Pramesti, 2009). Hemosit merupakan faktor yang sangat penting dalam sistem pertahanan seluler yang bersifat non spesifik. Kemampuan hemosit dalam aktivitas fagositosis yang dapat meningkat pada kejadian infeksi, menunjukkan pertahanan tubuh yang bersifat seluler.

Meningkatnya ketahanan tubuh udang dapat diketahui dari meningkatnya aktivitas fagositosis sel-sel hemosit (Putri *et al.*, 2013).

Infeksi yang sering terjadi pada udang disebabkan oleh infeksi bakterial (Kharisma dan Abdul, 2012). Selama ini, penanggulangan penyakit infeksi bakteri pada udang masih banyak menitikberatkan kepada upaya pengobatan setelah infeksi menyerang. Upaya-upaya pencegahan yang cukup efektif untuk meningkatkan imunitas udang belum menjadi prioritas utama.

Sinbiotik merupakan gabungan antara prebiotik dan probiotik yang dapat digunakan sebagai salah satu alternatif dalam pengobatan penyakit, seperti yang disebabkan oleh infeksi bakterial pada udang. Probiotik merupakan mikroba yang memberikan pengaruh menguntungkan bagi kesehatan inang (Nayak, 2009). Sedangkan prebiotik sendiri merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh inang secara langsung, tetapi memberikan keuntungan atas kemampuan prebiotik dalam merangsang pertumbuhan mikroba dalam saluran pencernaan inang (Schrezenmeir dan Verse, 2001).

Bacillus sp. D2.2 adalah isolat bakteri yang diperoleh dari tambak tradisional Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur (Mariska, 2013) dan potensial digunakan sebagai probiotik. Isolat ini menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro* dan *in vivo* (Mariska, 2013; Hardiyani, 2014). Probiotik ini dapat dipadukan dengan prebiotik dari ekstrak tepung ubi jalar putih yang diketahui mengandung oligosakarida sehingga menjadi sinbiotik yang mendukung imunitas seluler udang vaname dan dapat diaplikasikan dalam pengobatan terhadap infeksi bakterial melalui parameter uji THC (*Total Hemocyte Count*) dan AF (Aktivitas Fagositosis)/IF (Indeks Fagositosis).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian mengenai pengaplikasian *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap respon imun seluler udang vaname yakni :

- a. menganalisis pengaruh aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap respon imun seluler udang melalui parameter THC, AF, dan IF.
- b. menganalisis pengaruh aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terbaik untuk udang vaname.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian sebagai upaya untuk mengetahui efektivitas *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap peningkatan sistem imun udang vaname, serta mengetahui pencampuran terbaik untuk pengaplikasian sinbiotik tersebut.

1.4 Kerangka Pikir

Udang vaname diketahui memiliki nilai ekonomis tinggi berdasarkan tingkat permintaan pasar luar negeri yang tinggi, selain itu udang vaname merupakan salah satu pangan ekspor yang dapat meningkatkan devisa negara (Agustatik, *et al.*, 2003), sehingga dibutuhkan budidaya intensif untuk mendukung permintaan pasar. Munculnya penyakit terutama penyakit bakterial merupakan faktor utama penyebab penurunan produktifitas udang vaname, umumnya disebabkan oleh penurunan kualitas air akibat sistem budidaya intensif ini (Kharisma dan Abdul, 2012).

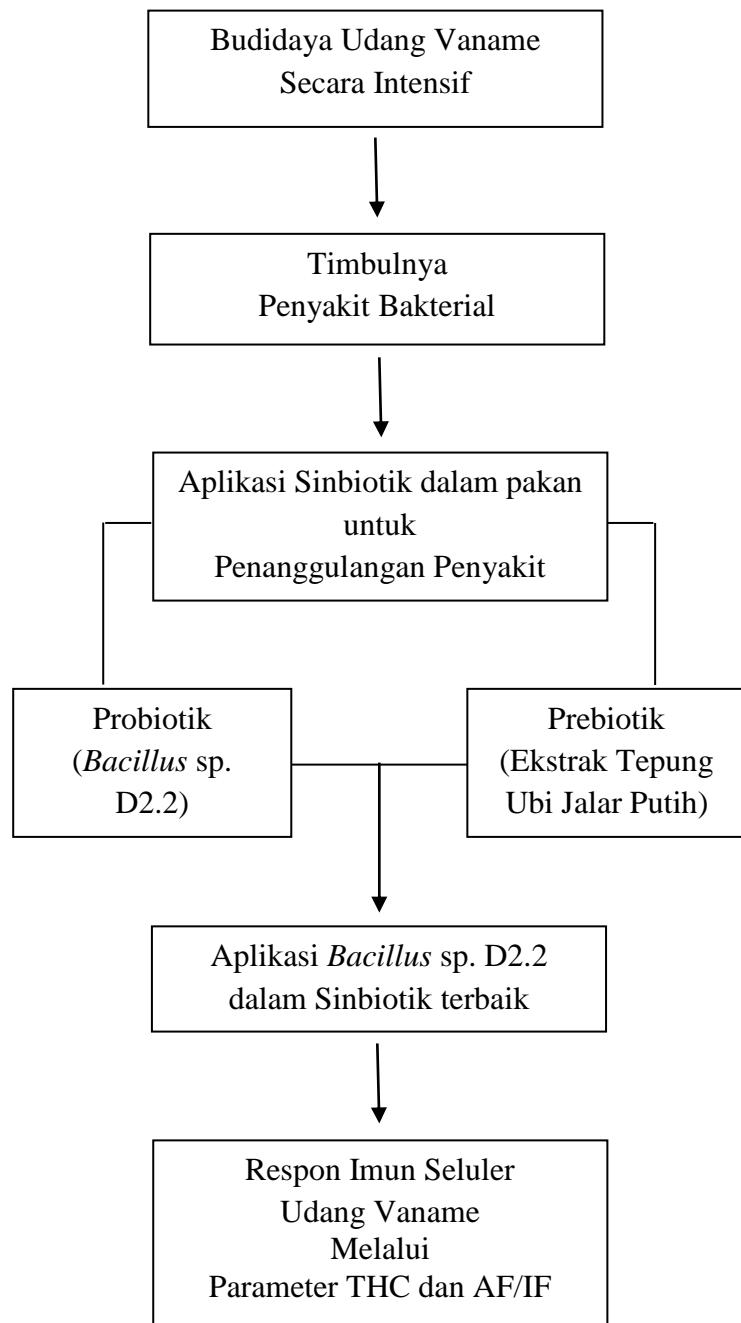
Infeksi penyakit bakterial diketahui menyerang sistem imun dari udang (Irianto, 2005). Pengendalian penyakit ini memerlukan bahan yang mampu meningkatkan sistem imun udang itu sendiri. Upaya peningkatan sistem imun udang dapat mengaplikasikan imunostimulan, vitamin C, hormon (Johny *et al.*, 2005) serta antibiotik dan probiotik (Taslihan *et al.*, 2004) akan tetapi belum signifikan.

Sinbiotik sebagai alternatif diduga mampu meningkatkan sistem imun udang sehingga menghambat infeksi penyakit bakterial (Schrezenmeir dan Verse, 2001).

Sinbiotik merupakan perpaduan antara probiotik dan prebiotik yang dapat dijadikan alternatif pengobatan penyakit bakterial (Cerezuela *et al*, 2011). Probiotik merupakan mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan pada inang dengan cara memodifikasi komunitas mikroba, meningkatkan penggunaan pakan atau nilai nutrisi, meningkatkan ketahanan inang terhadap penyakit atau meningkatkan kualitas lingkungan (Verschuere *et al.*, 2000). Sedangkan prebiotik sendiri merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh inang secara langsung, tetapi memberikan keuntungan atas kemampuan prebiotik dalam merangsang pertumbuhan mikroba dalam saluran pencernaan inang (Schrezenmeir dan Verse, 2001).

Udang mempunyai daya tahan alami yang bersifat non spesifik terhadap organisme patogen berupa pertahanan fisik (mekanik), kimia, seluler dan humoral. Daya tahan alami ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan, sehingga terdapat tingkatan yang berbeda-beda tergantung strain, lingkungan pemeliharaan, spesies maupun famili (Bellanti, 1989). Sistem imun udang tergantung pada proses pertahanan non spesifik sebagai pertahanan terhadap infeksi (Lee *et al.*, 2004).

Oleh karenanya dilakukan pendekatan melalui pencampuran prebiotik dengan probiotik atau dikenal dengan sinbiotik dalam pakan komersil. Sinbiotik dengan komposisi yang seimbang dapat mendukung kelangsungan hidup dan pertumbuhan bakteri dalam saluran pencernaan makhluk hidup (Schrezenmeir dan Verse, 2001). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengaplikasian *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap peningkatan respon imun seluler udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diamati dengan parameter THC (*total haemocyte count*), AF (aktifitas fagositosis)/IF (indeks fagositosis).



Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian

1.5 Hipotesis

Uji ANOVA

- H_0 : Tidak ada pengaruh pengaplikasian *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap total *hemocyte count*, aktifitas fagositosis, dan indek fagositosis respon imun seluler udang vaname.
- H_1 : Terdapat pengaruh pengaplikasian *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap respon imun seluler udang vaname.

Uji Lanjut BNT

- H_0 : Tidak ada pengaruh pengaplikasian *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik terhadap total *hemocyte count*, aktifitas fagositosis, dan indek fagositosis respon imun seluler udang vaname.
- H_1 : Minimal ada satu perlakuan yang berpengaruh terhadap respon imun seluler udang vaname yang diberi *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 29 Agustus - 21 November 2016, di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian mengenai pemberian sinbiotik dengan komposisi berbeda terhadap respon imun seluler udang vaname dapat dilihat pada (Tabel 1).

Tabel 1. Alat-alat dalam penelitian

No.	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1.	Kontainer uji	CB 150 L, ukuran 74x52x40 cm.	Wadah pemeliharaan hewan uji.
2.	Pipa paralon	Ukuran 13-15 cm.	Shelter ketika moulting.
3.	Selang aerasi	Panjang 1-1,5m	Menyalurkan aerasi.
4.	Batu aerasi	Panjang 2 cm, diameter 1 cm, 4 buah/container	Mengoptimalkan oksigen pada kontainer.
5.	Spuit 1 cc	Spuit 1 cc, ukuran 26G	Pengambilan sampel hemolimph.
6.	Gelas ukur	Iwaki, Jepang, (vol.500ml, 100 ml)	Untuk menakar volume larutan yang akan digunakan.
7.	Cawan petri	Iwaki, Jepang	Kultur bakteri.
8.	<i>Ice box</i>	Terbuat dari fiber glas dapat menyimpan suhu dingin.	Menyimpan sampel hemolimph.
9.	<i>Cool ice</i>	Menjaga suhu ±12 jam bergantung suhu luar.	Mempertahankan suhu di dalam cool box.
10.	Serokan	Panjang tongkat 1 m	Sampling udang.
11.	Waring	Ukuran 6x0,5 m dan 2x6 m.	Menutup permukaan bak uji dan tandon.
12.	Mikropipet	Socorex, Swiss	Memindahkan larutan
13.	Timbangan	Kern ABJ, d=0,1 mg.	Untuk menakar bahan yang akan digunakan.
14.	Erlenmeyer	Iwaki pyrex, Jepanf.	Pencampuran larutan dan bahan.

15.	Plastik tahan panas	Ukuran 0,5 dan 1 kg.	Membungkus alat saat di autoklaf.
16.	<i>Sentifuge</i>	Hitachi RXII	Memisahkan partikel-partikel zat berdasarkan berat molekul.
17.	Inkubator	Memmert, Germany.	Menginkubasi mikroba pada suhu terkontrol.
18.	Autoklaf	Himaraya Hva 85.	Mensterilkan alat dan bahan uji.
19.	<i>Waterbath</i>	Suhu 0-110°C, dengan 6 lubang.	Mempertahankan suhu air dalam selang waktu yang ditentukan.
21.	Spatula	Logam dan semi plastik, bibir lonjong dengan panjang 155 mm.	Mengambil bahan saat proses menimbang.
22.	Kaca preparat	CAT.NO.7101, China.	Meletakkan objek yang akan diamati di bawah mikroskop.
23.	Cover glass	Ukuran 18x18 mm.	Menutup objek di kaca preparat.
24.	DO meter	Jenway.	Mengukur kadar oksigen terlarut dalam air.
25.	pH paper	Range pH 0-14, isi 100 strip/kotak.	Mengukur kadar keasaman.
26.	Refraktometer	Atago .	Mengukur salinitas media hidup hewan uji.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian terdapat pada (Tabel 2).

Tabel 2. Bahan-Bahan dalam Penelitian

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Udang vaname	Hewan uji dalam penelitian mengenai uji imunitas.
2.	Air laut steril	Pergantian air sebagai media hidup, dilakukan setiap hari dengan volume $\frac{1}{2}$ atau secukupnya.
3.	Na Sitrat 10%	Antikoagulan saat pengambilan sampelhemolimph
4.	Formalin	Untuk inaktifasi bakteri.
5.	<i>Bacillus</i> sp. D2.2	Probiotik yang ditambahkan ke dalam pakan.
6.	Ekstrak ubi jalar	Prebiotik media tumbuh probiotik.
7.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri patogen untuk uji AF/IF.
8.	Safranin 10%	Pewarnaan dalam preparasi uji AF/IF.
9.	NaCl fisiologis 0,85%	Larutan pembilas dalam preparasi uji AF/IF.
10.	Alkohol 70%	Disinfektan dan pembilas dalam preparasi uji AF/IF.
11.	Aquades	Pelarut dalam pembuatan media.
12.	PBS (<i>Phosfat Buffer Saline</i>)	Pengenceran.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang terdiri atas empat perlakuan dengan persentase probiotik dalam pakan sinbiotik berbeda dan tiga ulangan individu dalam populasi (Tabel 3).

Tabel 3. Komposisi Probiotik dan Prebiotik pada Pakan

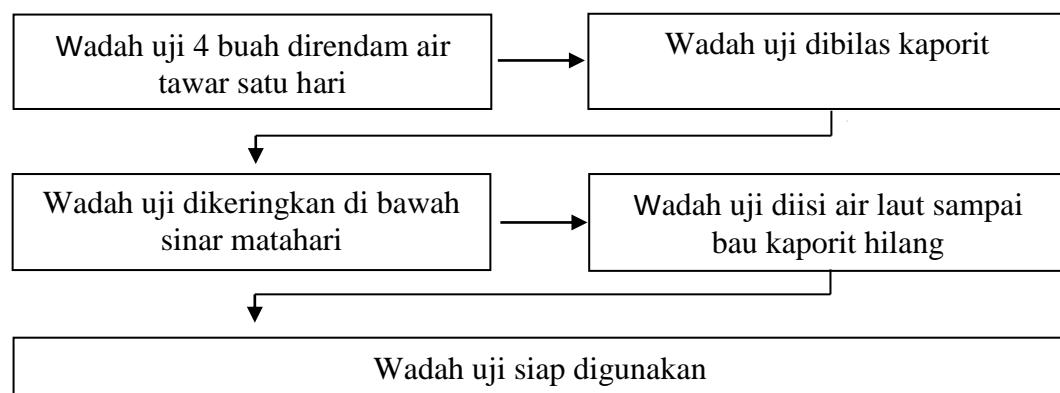
Perlakuan	Probiotik (%)	Prebiotik (%)	Binder (%)
A	0	3	2
B	2	3	2
C	4	3	2
D	6	3	2

2.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari persiapan wadah uji dan pemeliharaan udang, pencampuran formulasi pakan sinbiotik, pengambilan sampel *hemolymph*, pengamatan kualitas air, persiapan prebiotik, persiapan prebiotik, sterilisasi air, sterilisasi wadah, dan pengamatan sampel. Adapun proses tahapan tersebut, sebagai berikut :

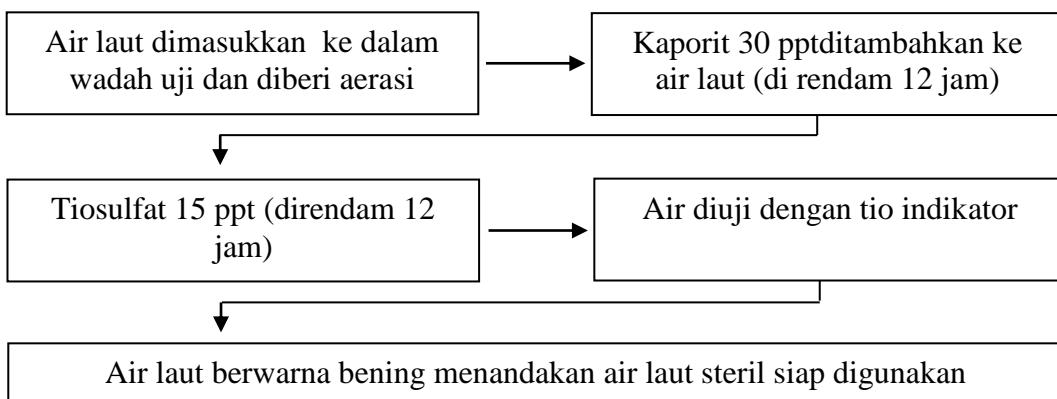
2.4.1 Persiapan wadah

Ukuran wadah uji yang digunakan yakni $74 \times 52 \times 40 \text{ cm}^3$ dengan volume air 150 L sejumlah 4 buah. Wadah tersebut disterilkan dengan direndam menggunakan air tawar selama satu hari, air tawar yang digunakan dipastikan menempati semua bagian wadah agar sterilisasi merata. Rendaman air tawar setelah satu hari dibuang, kemudian wadah dibilas dengan kaporit 30 ppm secara merata, dimana kaporit telah dicairkan terlebih dahulu menggunakan air secukupnya. Wadah uji yang telah dibilas dikeringkan di bawah sinar matahari. Wadah tersebut kemudian diisi air laut kembali, pengisian air laut ditujukan untuk penyelesaian sterilisasi wadah yang ditandai dengan tidak adanya bau kaporit pada wadah uji (Gambar 2).



Gambar 2. Sterilisasi wadah

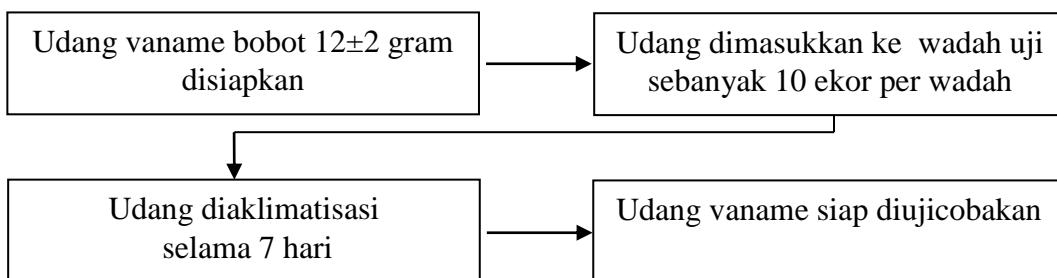
Sedangkan untuk sterilisasi air yaitu air laut dimasukkan ke dalam wadah tendon, kemudian dimasukkan kaporit 30 ppm direndam selama 12 jam, ditambahkan tiosulfat 15 ppm selama 12 jam, air laut steril diuji menggunakan indikator tio, jika warna tidak kuning (bening), air siap digunakan. Air laut steril tersebut didistribusikan ke setiap wadah uji setiap hari pada pergantian air setelah penyipahan. Air laut steril yang disediakan didukung dengan aerasi yang disiapkan pada wadah uji terdiri atas 4 titik untuk suplai oksigen (Gambar 3).



Gambar 3. Sterilisasi air

2.4.2 Persiapan Hewan Uji

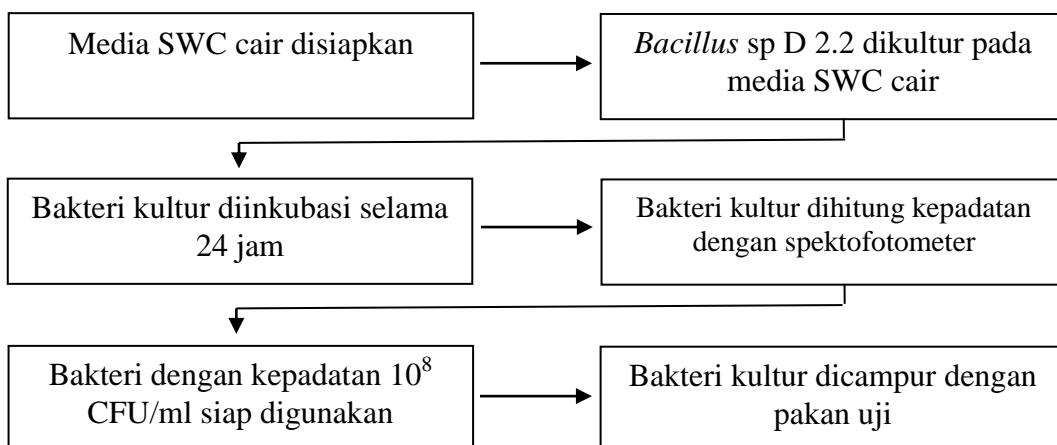
Udang vaname yang diuji diperoleh dari SIC (*Super Intensive Culture*) PT CPB Suak, Sidomulyo, Lampung Selatan. Udang vaname dalam stadium dewasa, dengan rata-rata bobot 12 ± 2 gram. Jumlah udang yang digunakan untuk setiap perlakuan yaitu 10 ekor. Udang diaklimatisasi sebelum perlakuan selama 7 hari sebelum perlakuan dilakukan untuk adaptasi dengan media hidup baru. Jika masa aklimatisasi telah selesai, udang dapat diberikan perlakuan (gambar 4).



Gambar 4. Persiapan hewan uji

2.4.3 Persiapan Probiotik

Bacillus sp. D2.2 dikultur pada media *Sea Water Complate* (SWC) agar miring (5 g *bactopeptone*, 1 g *yeast extract*, 3 ml gliserol, 15 g bacto agar, 750 ml air laut, dan 250 ml akuades) untuk rekultur. Sedangkan untuk prebiotik yang ditambahkan pada pakan berupa SWC cair dengan komposisi sama akan tetapi tanpa menggunakan bacto agar seperti pada SWC padat. Inkubasi bakteri kultur dilakukan selama 24 jam untuk mendapatkan kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml (Afiesh, 2012) yang akan dicampurkan pada pakan uji (Gambar 5).

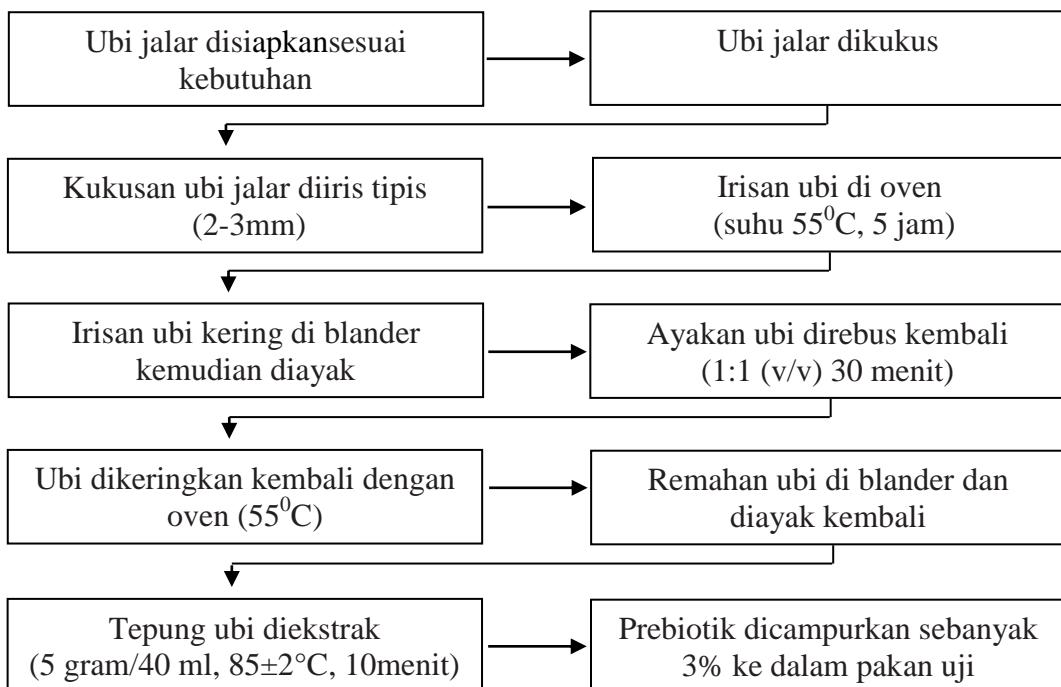


Gambar 5. Persiapan probiotik

2.4.4 Persiapan Prebiotik

Ubi jalar dicuci dan dikupas kulitnya, lalu dikukus, kemudian diiris-iris dengan menggunakan pisau dengan ketebalan sekitar 2-3 mm. Irisan ubi jalar dikeringkan dalam oven pengering pada suhu 55 °C selama 5 jam hingga irisan-irisan tersebut bisa dipatahkan. Irisan ubi yang sudah kering tersebut digiling menggunakan *blender* dan diayak dengan ukuran ayakan 60 *mesh size*. Setelah digiling selanjutnya tepung ubi tersebut dikukus terlebih dahulu dengan perbandingan air (1:1) selama 30 menit kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 55°C sampai tepung kembali kering. Pengekstraksian oligosakarida di dalam tepung ubi jalar dilakukan dengan mengacu pada metode Sukenda (2015). Pertama-tama 5 g tepung ubi jalar dicampur dengan 40 ml air mendidih sambil diaduk. Ekstrak dipertahankan pada suhu 85±2 °C dengan pengadukan terus-menerus selama sepuluh menit. Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disaring

menggunakan kertas saring. Penyaringan ditujukan agar diperoleh ekstrak tepung tanpa serat kasar dari ubi jalar. Ekstrak hasil saringan diambil sebanyak 3% untuk setiap perlakuan (Gambar, 6).

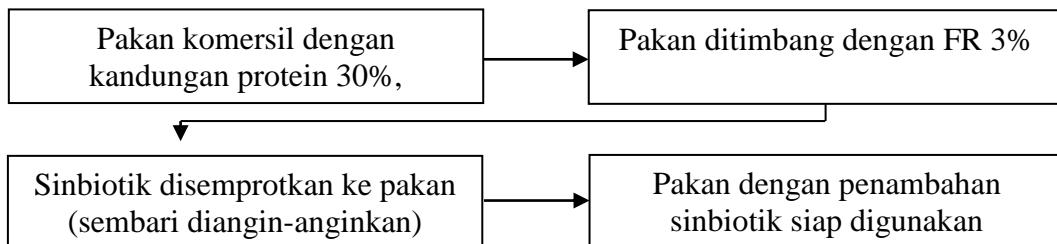


Gambar 6. Persiapan prebiotik

2.4.5 Persiapan Pakan Uji

Pakan komersial yang digunakan sebagai pakan uji memiliki kandungan protein 30%, dengan FR 3% (Praditia, 2009). Pakan uji dibuat dengan dicampurnya probiotik, prebiotik dan binder (putih telur), yang dimasukkan ke dalam botol *sprayer*. Pakan komersil tersebut terlebih dahulu ditimbang sesuai dengan ABW hewan uji, kemudian disemprotkan sinbiotik yang ada secara bertahap sambil diangin-anginkan agar formulasi meresap ke dalam pakan. Penjemuran pakan tidak dilakukan di bawah sinar matahari secara langsung, karena suhu tinggi dikhawatirkan dapat merusak komponen sinbiotik yang dicampurkan ke dalam pakan tersebut. Pakan sinbiotik sebelum diberikan ditimbang terlebih dahulu sesuai frekuensi pemberian pakan kemudian dimasukkan ke dalam plastik zip. Agar pakan tidak berjamur maka pembuatannya dilakukan untuk 3-4 hari, selain itu untuk tindakan mencegah dapat dilakukan dengan memasukkan pakan ke

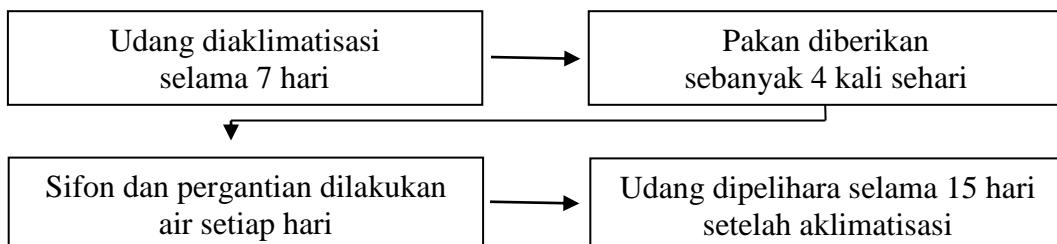
dalam plastik zip sejumlah frekuensi pemberian pakan perhari. Sisa pakan sinbiotik lainnya dibiarkan dalam nampan dan diangin-anginkan, dengan demikian pakan sinbiotik tahan lama (Gambar 7).



Gambar 7. Persiapan pakan uji

2.4.6 Pemeliharaan Udang

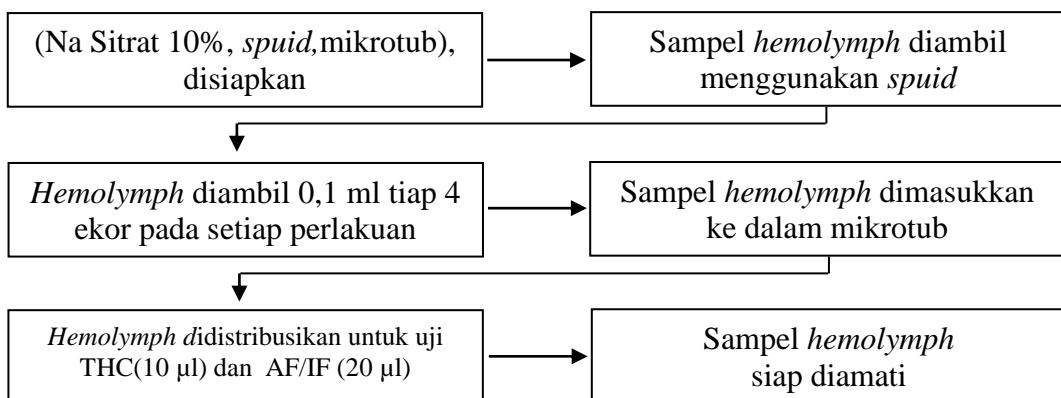
Aklimatisasi sebelum aplikasi perlakuan dilakukan selama 7 hari. Pemeliharaan hewan uji selama 15 hari. Pemberian pakan diberikan dengan frekuensi 4 kali dalam satu hari pada pukul 7:00; 12:00; 17:00; dan 22:00 WIB. Sisa pakan dan feses pada wadah uji akan dibersihkan dengan metode siphon. Siphon dan pergantian air dilakukan setiap pagi sebelum pemberian pakan ditujukan agar tidak terjadi akumulasi feses dan pakan yang menumpuk sehingga meningkatkan amoniak di dalam media uji. Pergantian air disesuaikan dengan volume air yang terbuang bersamaan dengan proses penyipiran (Gambar 8).



Gambar 8. Prosedur pemeliharaan udang

2.4.7 Pengambilan *Hemolymph*

Pengambilan sampel *hemolymph* dilakukan sebanyak 4 kali, pada hari ke-0, 4, 8, dan 12 sebanyak 0,1 ml tiap ekor. Pengambilan sampel dilakukan dibagian bawah karapas udang. Sampel *hemolymph* tiap perlakuan diambil dari 4 ekor udang secara acak. Sampel diambil menggunakan spuid 1 cc 26 G. *Hemolymph* yang diperoleh akan didistribusikan untuk uji THC sebanyak 10 μ l dan AF/IF sebanyak 20 μ l (Gambar 9).



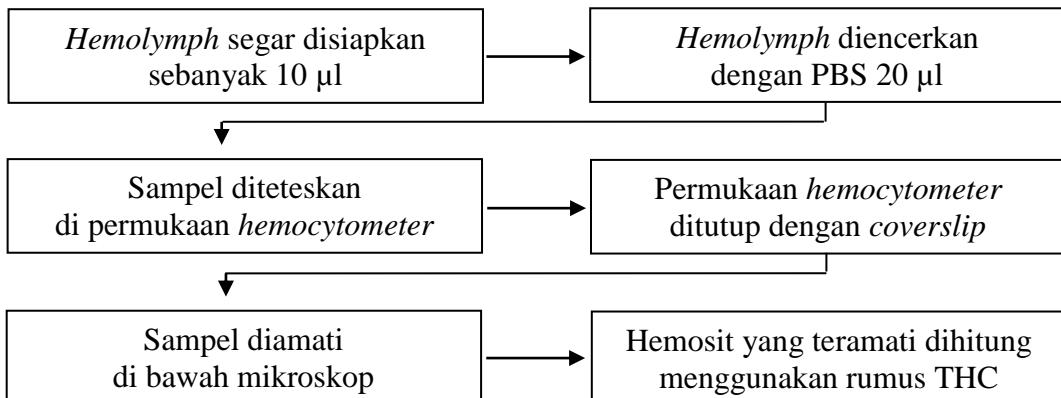
Gambar 9. Pengambilan *hemolymph*

2.4.8 Parameter Uji

2.4.8.1 Total Hemocyte Count (THC)

Hemolymph segar (10 μ l) diencerkan dengan PBS (20 μ l), kemudian ambil sampel yang telah diencerkan menggunakan mikropipet diletakkan di atas permukaan *hemocytometer*, kemudian diamati dibawah mikroskop. Hitung hemosit yang tampak pada mikroskop kemudian hitung total *hemocyte count* (THC) (Gambar 10):

$$\text{THC (sel/mL)} = \text{jumlah sel terhitung} \times \text{pengenceran} \times 10^4$$



Gambar 10. Parameter uji THC

2.4.8.2 Aktivitas Fagositosit/Indeks Fagositosit (AF/IF)

Haemolymph segar (20 µl) dimasukkan ke dalam mikrotub dan ditambahkan dengan 10 µl suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dilemahkan dengan 1% formalin selama 24 jam. Campuran *hemolymph* dan suspensi bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya diambil 5 µl untuk dibuat apusan di atas gelas preparat dengan meletakkan *hemolymph* pada ujung kaca preparat, kemudian tekan dengan ujung cover glass dan didorong sampan ujung kaca preparat secara merata. Preparat yang sudah kering selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama 20 menit dan dibilas dengan NaCl 0,85% kemudian dikeringkan kembali. Selanjutnya preparat dicat dengan safranin 10% selama 20 menit dan dikeringkan. Preparat selanjutnya diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Gambar 11).

Aktifitas fagositosis (AF) dan indeks fagositosis (IF) dihitung dengan:

$$AF = (a/b) \times 100\%$$

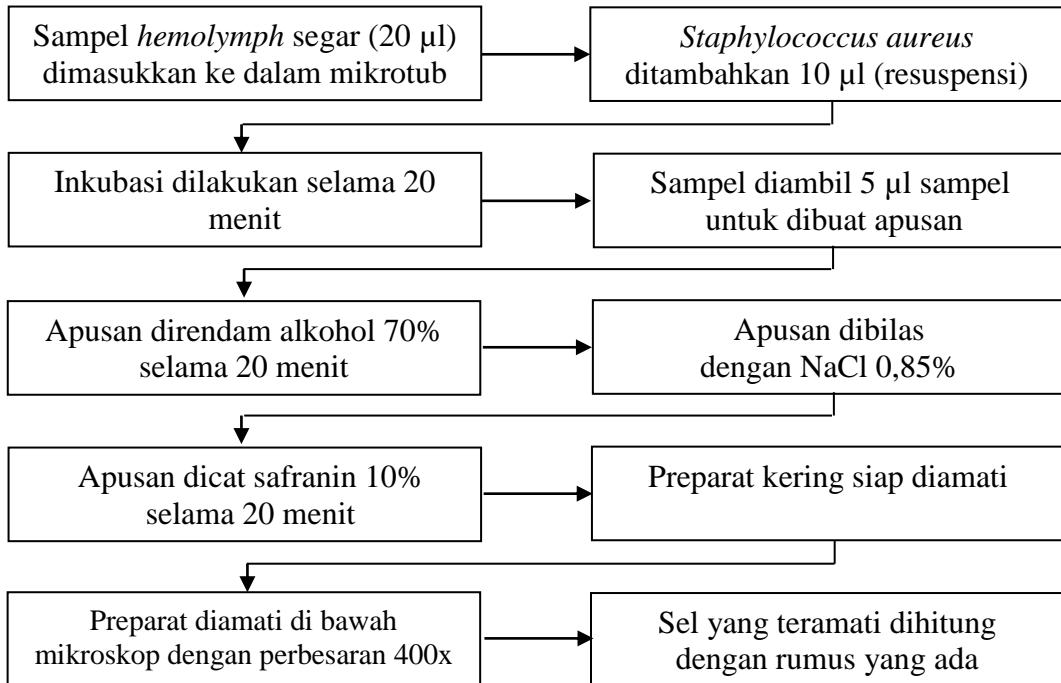
$$IF = c/a \text{ (dalam 100 sel)}$$

Keterangan:

a = jumlah sel fagosit (sel/ml)

b = jumlah keseluruhan sel yang diamati (sel/ml)

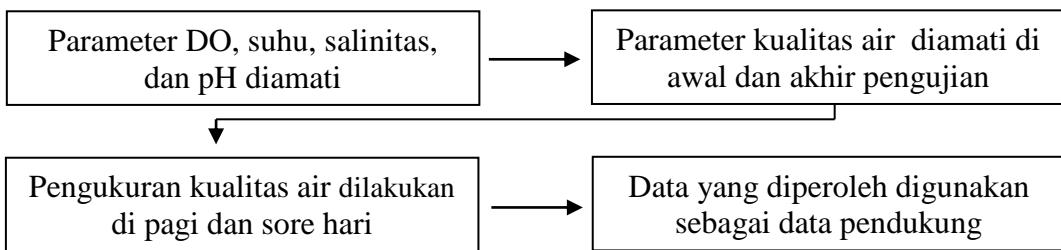
c = jumlah bakteri yang difagosit (sel/ml)



Gambar 11. Parameter AF/IF

2.4.8.3 Kualitas Air

Kualitas air sebagai data pendukung dalam pemeliharaan hewan uji, parameter yang akan diukur adalah parameter DO, salinitas, suhu, dan pH. Uji kualitas air akan dilakukan pada awal pemeliharaan dan akhir pemeliharaan hewan uji, dimana pengambilan data dilakukan pada pagi dan sore hari. Alat yang digunakan dalam pengukuran kualitas air untuk DO dan suhu menggunakan DO meter, salinitas menggunakan refraktrometer, dan pH menggunakan indikator kertas pH (Gambar 12).



Gambar 12. Parameter kualitas air

2.4.9 Analisis Data

Data parameter imunologi udang vaname dianalisis statistik dengan uji ANOVA dan uji lanjut BNT, menggunakan software SPSS 17.0. Parameter kualitas air diamati secara deskriptif.

IV. KESIMPULAN

1. Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik berpengaruh terhadap peningkatan total *hemocyte count* dan aktivitas fagositosis, dan indek fagositosis sebagai respon imun seluler udang vaname.
2. Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 dalam sinbiotik dengan persentase probiotik 6% memberikan hasil terbaik selama pemeliharaan udang vaname.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfi dan Hermawati W. S. (2013). Profil Hemosit dan Aktifitas Fagositosis Kepiting Bakau (*Scylla Sp.*) yang Terserang Ektoparasit di Ekosistem Mangrove Kuta Selatan, Bali. *Journal of Marine and Aquatic Science*, 2 (1) : 34-39.
- Afiesh. (2012). *Produk Probiotik Ikan dan Udang*. <http://afiesh.blogspot.co.id/2012/12/produk-probiotik-ikan-dan-udang.html>, 29 Desember 2016.
- Austin B dan Zhang X., H. (2006). Vibrio harveyi : a Significant Pathogen of Marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 119-124.
- Bellanti, J. A. 1989. *Immunology III*, Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bunga R., dan Tampangallo C. S. (2013). Sintasan Benih Udang Windu yang Dipelihara Dengan Beberapa Jenis Probiotik RICA dan Resistensinya Terhadap Bakteri Patogen V. harveyi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, 863-874.
- Cerezuela R., Mesegeur J., Esteban M., A. (2011). Current Knowladge in Sinbiotic use for Fish Aquaculture: A Review. *Journal of Aquaculture Reseach Development*, 1 : 1-8.
- Damayanti. (2011). *Pemberian Sinbiotik dengan Dosis Berbeda Pada Pakan Udang Vaname Untuk Pencegahan Infeksi IMNV (Infectious Myonecrosis Virus)* (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Famelia M., P. (2013). Pengaruh Penambahan Spirulina sp. dalam Pakan Buatan Terhadap JUmlah Total Hemosit dan Aktivitas Fagositosis Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, II (2) : 102-112.
- Hardiyani, S. (2014). *Uji Patogenisitas dan Studi In Vivo Bakteri Biokontrol *Bacillus* sp. D.2.2 terhadap *Vibrio alginolyticus* pada Pemeliharaan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)*. Bandar Lampung : Universitas Lampung.

- Irianto, A. (2005). *Patologi Ikan Teleostei*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Isnansetyo, Alim. (2005). Bakteri Antagonis sebagai Probiotik untuk Pengendalian Hayati pada Aquakultur. *Jurnal Perikanan*, VII (1) : 1-10.
- Johny E., Roza D., K., Mahardika, Zafran, dan Priyono. (2005). Penggunaan Imunostimulan untuk Meningkatkan Kekebalan Nonspesifik Benih Ikan Kerapu Lumpur, Epinephehelus cooides terhadap Infeksi imunostimulan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 11 (5) : 75-78.
- Jose L., B. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114 : 173-186.
- Kharisma, A dan Abdul, M. (2012). Kelimpahan Bakteri *Vibrio* sp. Pada Air Pembesaran Udang Vanamei (*Litopenaeus vannamei*) sebagai Deteksi Dini Serangan Vibriosis. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, IV (2) : 129-134.
- KKP. (2015). *KKP Genjot Peningkatan Udang Vaname*. <http://news.kkp.go.id/index.php/kkp-genjot-peningkatan-udang-vaname/>, 1 Desember 2016.
- Lee, M. H. dan Shiau, S., Y. (2004). Vitamin E Requirements of Juvenile Grass Shrimp, *P. monodon* and Effects on Nonspecific Immune Responses. *Fish & Shellfish Immunology*. 16 : 475 – 485.
- Lesmanawati, W. (2013). *Aplikasi Sinbiotik Pada Udang Vaname Litopenaeus vannamei : Resistensi Terhadap Infectious Myonecrosis Virus dan Performa Pertumbuhan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mariska D., C. (2013). *Penapisan Kandidat Bakteri Biokontrol dari Perairan Tambak Udang Tradisional Terhadap bakteri Vibriyo Harveyi* (Skripsi). Bandar Lampung : Universitas Lampung.
- Myrna Budi Resmawati, W. H. (2013). Pemberian Ekstrak Air Pana Spirullina platensis melalui Perendaman Terhadap Total Leukosit, Indeks Fagositosis dan Konsentrasi TNF-a Osphronemus gouramy. *Jurnal Biosains Pascasarjana*.
- Nayak, S., K. (2009). Probiotics and Immunity : a Fish Prospective. Review. *Fish and Shellfish Immunology*, 29 : 2-14.

- Praditia F.P. (2009). *Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik Melalui Pakan Terhadap Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Udang Windu (Penaeus monodon)* (Skripsi). Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Putri F.M., Sarjito dan Suminto. (2013). Pengaruh Penambahan *Spirulina* sp. dalam Pakan Buatan Terhadap Jumlah Total Hemosit dan Aktivitas Fagositosis Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2 (1) : 102-112.
- Resmawati, M., B., Satyantini, W., H., Suprapto, H. (2016). Pemberian Ekstrak Air Pana Spirullina platensis melalui Perendaman Terhadap Total Leukosit, Indeks Fagositosis dan Konsentrasi TNF-a Osphronemus gouramy. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 18 (3) : 1-8.
- Ridlo, A., dan Pramesti R. (2009). Aplikasi Ekstrak Rumput Laut Sebagai Agen Imunostimulan Sistem Pertahanan Non Spesifik Pada Udang (*Litopenaeus vannamei*). *Ilmu Kelautan*, 14 (3): 133-137.
- Taslihan, A., M., Murdjani, C., Pubomartono, dan Kusnendar, E. (2000). Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Mulut Merah Pada Ikan Kerapu Tikus. *Jurnal Perikanan*, II (2) : 57-62.
- Sukenda, R., P., dan Widanarni. (2015). Efektivitas sinbiotik dengan dosis berbeda pada pemeliharaan udang vaname di tambak. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 14 (1) : 1-8.
- Sukenda. (2007). Penggunaan Kitosan untuk Pengendalian Infeksi *Vibrio harvey* Pada Udang Putih *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6 (2), 205-209.
- Verschueren L., Pombaut G., Sorgeloos P., dan Verstraete W. (2000). Probiotic Bacteria Vs Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiological and Molecular Biology*, 64 : 655-671.
- Widanarni, Sukenda. Ghita,R., S. (2016). Aplikasi Sinbiotik Untuk Pencegahan Infeksi Infectious Myonecrosis Virus pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Kedokteran Hewan*, 108 : 121-128.