

**RESPON IMUN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)
DALAM SISTEM BIOFLOK YANG DIKOMBINASI
DENGAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. D2.2 TERHADAP INFEKSI BAKTERI
*Vibrio harveyi***

(Skripsi)

Oleh

ENDAYANI



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

IMMUNE RESPONSE OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) IN A BIOFLOC SYSTEM COMBINED WITH PROBIOTICS *Bacillus* sp. D2.2 AGAINST BACTERIAL INFECTION *Vibrio harveyi*

By

Endayani

White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diseases can be caused by bacteria, viruses, or co-infection. One of the bacterial infectious diseases is Vibriosis caused by *Vibrio harveyi*. The disease has an impact on the decline in aquaculture production and high economic losses. The controlling efforts that can be taken are to improve the immune system in shrimp through the application of probiotics and biofloc systems. This research aimed to study the treatment effect and analyze the best treatment between probiotics, biofloc system, and a combination of both to improve the immune response of white shrimp to *V. harveyi* infection. Shrimp test used has an average weight of ± 12 g with a density of 10 fish/tank and there were five treatments namely control +, control -, probiotic feed, biofloc system, and a combination of feed probiotics and biofloc system. The parameters observed included Total Haemocyte Count (THC), phagocytocyte activity, phagocytic index, Differential Haemocyte Count (DHC), Total Vibrio Count (TVC) and total *Bacillus* sp. D2.2, clinical symptoms, survival rate, relative percent survival, and water quality. The results of research indicate probiotics *Bacillus* sp. D2.2 on feed and biofloc system affect the immune response of white shrimp, which can increase THC, AF, IF, Total *Bacillus* sp. D2.2, SR, RPS, and minimize clinical symptoms of *V. harveyi* infection with the highest increase in the combination treatment of feed probiotics and biofloc system.

Keywords: *Penaeid, Immunostimulant, THC, Biocontrol, Vibriosis.*

ABSTRAK

RESPON IMUN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) DALAM SISTEM BIOFLOK YANG DIKOMBINASI DENGAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. D2.2 TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio harveyi*

Oleh

Endayani

Penyakit pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dapat disebabkan oleh bakteri, virus, ataupun koinfeksi. Salah satu penyakit infeksi bakteri adalah Vibriosis yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi*. Penyakit tersebut telah berdampak terhadap penurunan produksi budidaya dan kerugian ekonomi yang cukup tinggi. Upaya pengendalian yang dilakukan adalah meningkatkan sistem imun pada udang melalui aplikasi probiotik dan penerapan sistem bioflok. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian perlakuan dan menganalisis perlakuan terbaik antara probiotik, bioflok, dan kombinasi keduanya untuk meningkatkan respon imun udang vaname terhadap infeksi *V. harveyi*. Udang uji yang digunakan mempunyai bobot rata-rata ± 12 g dengan kepadatan 10 ekor/bak dan terdapat lima perlakuan yaitu kontrol +, kontrol -, probiotik pakan, bioflok, dan kombinasi probiotik pakan dan bioflok. Parameter yang diamati meliputi *Total Haemocyte Count* (THC), aktivitas fagositosis, indeks fagositosis, *Differensial Haemocyte Count* (DHC), *Total Vibrio Count* (TVC) dan total *Bacillus* sp. D2.2, gejala klinis, *Survival Rate* (SR), *Relatif Percent Survival* (RPS), dan kualitas air. Hasil penelitian menunjukkan pemberian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan dan bioflok berpengaruh terhadap respon imun udang vaname yaitu dapat meningkatkan THC, AF, IF, Total *Bacillus* sp. D2.2, SR, RPS, dan memperkecil gejala klinis infeksi *V. harveyi* dengan peningkatan tertinggi pada perlakuan kombinasi probiotik pakan dan bioflok.

Kata kunci : *Penaeid, Imunostimulan, THC, Biokontrol, Vibriosis.*

**RESPON IMUN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)
DALAM SISTEM BIOFLOK YANG DIKOMBINASI
DENGAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. D2.2 TERHADAP INFEKSI BAKTERI
*Vibrio harveyi***

Oleh

Endayani

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Program Studi Budidaya Perairan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

Judul Skripsi : **RESPON IMUN UDANG VANAME**
Litopenaeus Vannamei (Boone, 1931)
DALAM SISTEM BIOFLOK YANG
DIKOMBINASI DENGAN PROBIOTIK
Bacillus Sp. D2.2 TERHADAP INFEKSI
BAKTERI Vibrio Harveyi

Nama Mahasiswa : **Endayani**

No. Pokok Mahasiswa : 1514111036

Program Studi : Budidaya Perairan

Jurusan : Perikanan dan Kelautan

Fakultas : Pertanian



1. Komisi Pembimbing

Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc.
NIP. 197911182002122001

Wardiyanto, S.Pi., M.P.
NIP. 196907052001121001

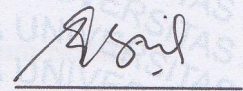
2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.
NIP. 196402151996032001

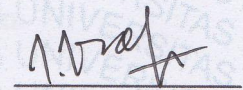
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Esti Harpeni S.T., M. App., Sc.



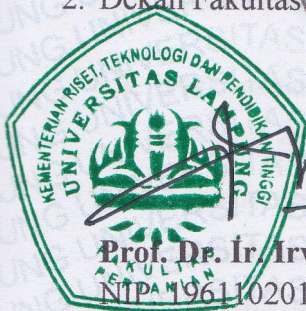
Sekretaris : Wardiyanto S.Pi., M.P.



Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Ir. Abdullah Aman Damai, M. Si.



2. Dekan Fakultas Pertanian



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

NIDPA 19611020198631002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 11 November 2019

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis, skripsi/laporan akhir ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana/Ahli Madya), baik di Universitas Lampung maupun di perguruan tinggi lain.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan dari Tim Pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini, tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan naskah yang disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila kemudian 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.

Bandar Lampung, 3 Desember 2019
Yang Membuat Pernyataan,



Endayani
Endayani
NPM. 1514111036

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di desa Bandar Kejadian, kecamatan Wonosobo, kabupaten Tanggamus, Lampung pada 26 Juli 1997 sebagai anak keempat dari lima bersaudara dari pasangan Bapak Azali dan Ibu Rohida. Penulis menempuh pendidikan formal dari Sekolah Dasar SD Negeri 1 Bandar Kejadian pada tahun

2003-2009, dilanjutkan ke Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Kotaagung pada tahun 2009-2012, dan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Kotaagung pada tahun 2012-2015. Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang Perguruan Tinggi di Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) dan memperoleh beasiswa Peningkatan Prestasi Akademik (PPA) pada tahun 2018.

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah Ikhtiologi, Avertebrata Akuatik, Penyakit Parasit Organisme Akuatik, dan Manajemen Kesehatan Ikan. Selain itu, penulis pernah aktif dalam organisasi kampus dan mengikuti berbagai kegiatan. Penulis mengemban amanah di UKMF FOSI Fakultas Pertanian periode 2017 dan menjadi pengurus Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (HIMAPIK) Unila Bidang Kerohanian pada tahun 2016-2017 dan 2017-2018.

Pada Januari-Maret 2018 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Air Bakoman, kecamatan Pulau Pangung, kabupaten Tanggamus selama 40 hari. Pada Juli-Agustus 2018, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro Dan Biomedika (Laptiab), Badan Pengkajian Dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong dengan judul “Pengamatan *Vas Deferens* Gonad Udang Galah *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) Siratu Jantan Melalui Metode Histologi” selama 40 hari. Pada tahun 2019 penulis menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Respon Imun Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) dalam Sistem Bioflok yang Dikombinasi dengan Probiotik *Bacillus* sp. D2.2 Terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi*”**”.

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas kelimpahan rahmat dan karuniaNya yang telah memberikan kesehatan, kekuatan dan kemudahan sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi yang berjudul “Respon Imun Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) dalam Sistem Bioflok yang Dikombinasi dengan Probiotik *Bacillus* sp. D2.2 Terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi*”, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung.

Selama proses penyelesaian skripsi, penulis telah memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak terutama kedua orang tua saya, Bapak Azali dan Ibu Rohida yang telah menjadi orangtua terhebat, terimakasih atas segala kasih sayang, do’a, dukungan, serta motivasi sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Maka dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ibu Ir. Siti Hudaidah, M.Sc selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung.
3. Ibu Esti Harpeni, S.T., M.App., Sc. selaku Pembimbing Utama yang telah membimbing, memberikan ilmu dan ide pemikiran, arahan, masukan serta waktunya untuk selalu membimbing penulis dalam menyelesaikan tugas akhir skripsi ini.
4. Bapak Wardiyanto, S.Pi., M.P. selaku Pembimbing Anggota atas kesediaan meluangkan waktu dan kesabarannya memberikan bimbingan, dukungan, masukan berupa kritik dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir skripsi ini.
5. Bapak Dr. Ir. Abdullah Aman Damai, M. Si. selaku Penguji yang telah

meluangkan waktu, memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun terhadap skripsi ini.

6. Bapak Deny Sapto Chondro Utomo, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan bimbingan mulai dari mahasiswa baru sampai bisa menempuh gelar sarjana.
7. Seluruh Dosen dan Staf Jurusan Perikanan dan Kelautan yang penuh dedikasi dalam memberikan ilmu yang bermanfaat serta segala bantuan selama penulis menyelesaikan studi.
8. Kakak-kakak tersayangku Rohila, Rasid, Arbaiyah, dan adikku Fajar Hidayat yang selalu memberikan semangat, dukungan, doa, dan motivasi selama ini.
9. Teman-teman terbaik, Novi, Yuke, Asep, Berry, Falqi, Nurlia, Agung H., Ignatius, Rafif, Riana, Triga, Romi, Ajeng, Puspa, Rara, Anggraini, Merlinda, Anggun, Santrika, Dwi, Nadila, dan Eka, serta teman teman seperjuangan angkatan 2015 atas bantuan, kebersamaan, canda tawa, dan pengalaman selama menempuh pendidikan ini, kiyay dan atu 2012, 2013, 2014, serta adik-adik.
10. *Team Microbiology Squad*, Ibu Oktora Susanti, S.Pi., M.Si. dan Yeni Elisdiana, S.Pi., M.Si., Mba Dian, Mba Arum, Andre, Panji, Michael, Nia, Alfitra, Mai, Tiwi, Rena, Suharyanto, Chelin, Winda, Rafif, Ellen, Novi, Yuke, dan Falqi untuk ilmu, pengalaman, dan kebersamaannya selama ini.
10. Keluarga FOSI FP 2017, terkhusus Eka, Rina, Sri, Utri, dan Neni untuk segala dukungan, do'a, kebersamaan, dan bantuan selama ini.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini. Terimakasih atas bantuan dan dukungannya.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak sekali kekurangan, akan tetapi penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan keilmuan kita.

Bandar lampung, Desember 2019
Penulis,

Endayani

PERSEMBAHAN

Dengan segala rasa syukur kepada Allah S.W.T atas kenikmatan dan kemudahan yang selalu mengiringi langkah untuk semua hambanya.

Kupersembahkan karya ini kepada : Bapak dan Ibu tercinta, yang senantiasa memberikan kasih sayang, do'a dukungan, motivasi, pengorbanan dan selalu memberikan yang terbaik untuk anakmu. Bagiku, jasa dan pengorbanan kalian tidak akan mampu tergantikan dengan apapun. **Terimakasih**

Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a dan dukungan selama masa studi. Teman-teman 2015 yang telah memberikan kebersamaan dari awal hingga akhir masa studi.

&

Almamater tercinta "**UNIVERSITAS LAMPUNG**"

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi orang lain”

(HR. Ahmad, ath-Thabrani)

“Jika seseorang meninggal maka terputuslah amalnya kecuali tiga hal:
shadaqah jariyah, ilmu yang bermanfaat, dan anak shalih yang
mendo'akan orang tuanya”

(HR. Bukhari & Muslim)

“Sukses adalah sebuah perjalanan, bukan sebuah tujuan. Usaha sering lebih penting daripada hasilnya.” – Arthur Ashev

Jalani, nikmati, dan hargai setiap proses kehidupan,
ambil positifnya dan jadikan sebagai pembelajaran
untuk proses selanjutnya.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian	4
C. Manfaat Penelitian	4
D. Kerangka Pimikiran	4
E. Hipotesis	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Udang Vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	8
B. Respon Imun Udang	10
C. Bioflok	13
D. Probiotik.....	15
E. <i>Bacillus</i> sp. D2.2	17
F. <i>Vibrio harveyi</i>	19
III. METODE PENELITIAN	21
A. Waktu dan Tempat.....	21
B. Alat dan Bahan.....	21
C. Rancangan Penelitian.....	22
D. Prosedur Penelitian	22
1. Persiapan Wadah dan Hewan Uji.....	22
2. Kultur Bakteri Probiotik <i>Bacillus</i> sp. D2.2.....	23
3. Pencampuran Pakan dengan Probiotik.....	24
4. Pemeliharaan Udang Vaname	24
5. Penganasan Bakteri <i>V. harveyi</i>	25
6. Uji Tantang	25
E. Parameter Uji	26
1. Parameter Imun	26
1.1 <i>Total Haemocyte Count</i> (THC).....	26
1.2 Aktifitas Fagositosis dan Indeks Fagositosis (AF dan IF)	27

1.3 Diferensial Hemosit.....	28
2. <i>Survival Rate</i> (SR)	29
3. RPS (<i>Relative Percent Survival</i>)	29
4. Perhitungan Bakteri pada Usus	29
5. Gejala Klinis	30
6. Kualitas Air	30
F. Analisis Data.....	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
A. <i>Total Haemocyte Count</i> (THC).....	32
B. Aktivitas Fagositosis (AF).....	35
C. Indeks Fagositosis (IF).....	38
D. <i>Differential Haemocyte Count</i> (DHC).....	40
E. <i>Total Vibrio Count</i> (TVC) dan Bakteri <i>Bacillus</i> sp. D2.2	45
F. Gejala Klinis	49
G. <i>Survival Rate</i> (SR)	52
H. RPS (<i>Relative Percent Survival</i>).....	55
I. Kualitas Air	56
V. SIMPULAN DAN SARAN	58
A. Simpulan	58
B. Saran	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perlakuan Pada Penelitian	22
2. Perubahan Morfologi Udang Vaname Pasca Infeksi <i>Vibrio harveyi</i>	50
3. Kualitas Air Media Pemeliharaan Udang Vaname Selama Penelitian.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Pikir Penelitian	6
2. Sel Hemosit Udang	12
3. <i>Time Line</i> Penelitian	26
4. Kotak Pada <i>Haemocytometer</i>	27
5. <i>Total Hemocyte Count</i> (THC) Udang Vaname.....	33
6. Aktivitas Fagositosis (AF) Udang Vaname.....	36
7. Indeks Fagositosis (IF) Udang Vaname.....	39
8. Persentase Sel Hialin Udang Vaname.....	41
9. Persentase Sel Semi Granular Udang Vaname	41
10. Persentase Sel Granular Udang Vaname	42
11. Total <i>Vibrio</i> Count (TVC)	46
12. Total <i>Bacillus</i> sp. D2.2.....	48
13. Perubahan Morfologi Udang Vaname Pasca Infeksi <i>Vibrio harveyi</i>	50
14. <i>Survival Rate</i> (SR) Udang Vaname	53
15. RPS (<i>Relative Percent Survival</i>) Udang Vaname	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Glosarium.....	70
2. Perhitungan Pakan Perhari (P/H) dan Bioflok	75
3. Pembuatan Larutan Giemsa 10%	76
4. Pembuatan Larutan Safranin 10%	76
5. Pemberian Rifampisin.....	76
6. Proses Uji Tantang	77
7. Pengambilan Hemolim dan Pengamatan THC	78
8. Data Hasil Uji SPSS.....	79
9. Analisis Kandungan Karbon Molase	100

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan udang introduksi pada tahun 2000 yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Produksi udang nasional di tahun 2017 masih didominasi oleh udang vaname yaitu mencapai 70%, dimana dari 642.000 ton produksi udang nasional sebesar 488.019 ton merupakan udang vaname (KKP, 2018). Udang ini memiliki nilai ekonomis yang tinggi di pasar domestik maupun global dan permintaan pasar yang terus meningkat. Untuk memenuhi permintaan pasar, dilakukan budidaya secara intensif hingga super intensif. Namun, pengaplikasian budidaya secara tidak tepat dan bijaksana akan dapat menimbulkan dampak negatif seperti munculnya serangan penyakit. Penyakit pada udang akan muncul jika terjadi interaksi antara kondisi lingkungan yang buruk, keberadaan patogen, dan kondisi udang yang lemah (Anderson, 1974).

Penyakit pada udang vaname disebabkan oleh bakteri, virus, ataupun koinfeksi. Salah satu penyakit infeksi bakteri adalah Vibriosis yang disebabkan oleh *Vibrio* spp. Vibriosis telah berdampak terhadap penurunan hasil produksi budidaya perikanan, *Vibrio harveyi* menyebabkan mortalitas sebesar 86,7–100 %

pada larva udang windu (Feliatra & Yoswaty, 2012); pada larva udang vaname Vibriosis menyebabkan kematian hingga 89% dan infeksi *V. harveyi* menyebabkan kematian massal hingga 46% (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001). Akibat infeksi mikroorganisme patogen tersebut, banyak organisme perairan yang dibudidayakan mengalami kematian massal sehingga menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi. Upaya pengendalian umum yang telah dilakukan yaitu penggunaan antibiotik sintetis dan bahan kimia, namun pemberian antibiotik sintetis secara terus menerus dapat menyebabkan resistensi bakteri (Verschuere *et al.*, 2000) dan efek samping lain berupa residu yang dapat membahayakan manusia dan lingkungan (Ninawe & Selvin, 2009). Oleh karena itu, salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk menanggulangi penyakit pada udang adalah dengan meningkatkan sistem imun pada udang. Peningkatan sistem imun dapat dilakukan melalui aplikasi probiotik dan penerapan sistem bioflok.

Sistem bioflok yaitu memanfaatkan mikroorganisme heterotrof untuk mengubah senyawa organik dan anorganik yang mengandung senyawa karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N) dan sedikit fosfor (P) menjadi masa *sludge* berupa flok. Teknologi bioflok meminimalkan penggunaan air dalam sistem akuakultur dengan memperbaiki kualitas air serta menghasilkan *bioflocs* yang tinggi protein dapat berfungsi sebagai pakan untuk organisme air (Crab, 2010). Pembentukan bioflok oleh bakteri heterotrof secara umum bertujuan untuk meningkatkan pemanfaatan nutrisi, menghindari stress lingkungan dan predasi (De Schryver *et al.*, 2008). Penelitian oleh De Schryver & Verstraete (2009) menunjukkan bahwa bioflok mengandung *poly- γ -hydroxybutyrate* (PHB) berkisar antara 0,9-16 % yang cukup memadai untuk memenuhi kebutuhan ikan akan PHB yang tidak lebih

dari 1 %. *Poly- γ -hydroxybutyrate* (PHB) merupakan produk polimer intraselular yang diduga mempunyai efek pencegahan dan pengobatan terhadap infeksi *Vibrio* serta manfaat prebiotik dalam akuakultur (De Schryver *et al.*, 2008).

Probiotik merupakan mikroba hidup yang mampu memberikan keuntungan bagi inang dengan berasosiasi dengan inang yaitu memperbaiki nilai nutrisi dan pemanfaatan pakan, memperbaiki respon inang terhadap penyakit dan memperbaiki kualitas lingkungan budidaya (Verschuere *et al.*, 2000). Salah satu bakteri probiotik yaitu *Bacillus* sp. D2.2 yang termasuk dalam golongan bakteri gram positif dan berbentuk batang yang berasal dari tambak tradisional di Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung (Aji, 2014). Bakteri ini mampu menstimulasi sistem imunitas udang vaname dan memiliki kemampuan untuk menghambat *V. harveyi* (Harpeni *et al.*, 2017).

Pengaplikasian bioflok pada pemeliharaan dan probiotik pada pakan diharapkan mampu meningkatkan respon imun udang vaname lebih baik daripada penggunaan dengan salah satu sistem tersebut. Berdasarkan penelitian Azhar (2018), penggunaan probiotik dan bioflok sebagai pencegahan terhadap *V. parahaemolyticus* mampu meningkatkan performa sistem imun terbaik yaitu dengan THC sebesar $9,7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ dan SR sebesar 76,67%. Pengaplikasian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan sistem bioflok pada pemeliharaan udang vaname diharapkan mampu meningkatkan respon imun terhadap *V. harveyi*.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Mempelajari pengaruh pemberian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan pengaplikasian sistem bioflok terhadap respon imun udang vaname yang diinfeksi *V. harveyi*.
2. Menganalisis perlakuan yang terbaik antara probiotik, bioflok, dan kombinasi keduanya untuk meningkatkan respon imun udang vaname terhadap infeksi *V. harveyi*.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu untuk memberikan informasi ilmiah kepada mahasiswa dan pembudidaya udang, penggunaan bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 mampu meningkatkan respon imun udang vaname terhadap serangan penyakit bakteri patogen *V. harveyi*.

D. Kerangka Pemikiran

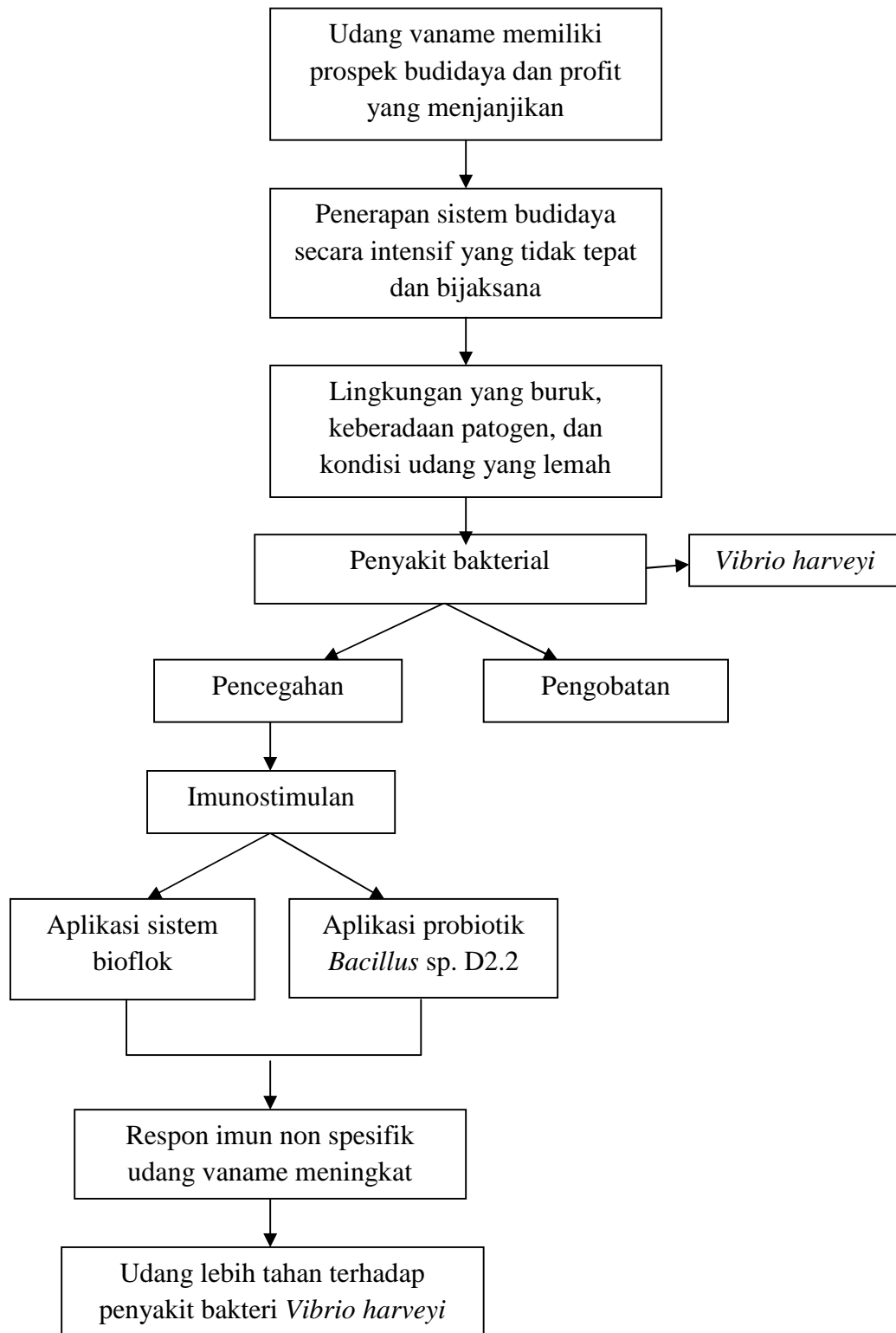
Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan komoditas perikanan yang memiliki prospek dan profit yang menjanjikan. Permintaan pasar akan komoditas ini yang terus meningkat dan harganya yang cukup tinggi menyebabkan udang ini banyak dibudidayakan di Indonesia. Untuk meningkatkan produksi dilakukan budidaya dengan padat tebar tinggi yaitu budidaya secara intensif. Budidaya udang secara intensif yang tidak dikelola dengan baik dan bijaksana menimbulkan permasalahan pada lingkungan budidaya. Permasalahan utama yang sering ditemukan adalah buruknya kualitas air selama masa pemeliharaan, adanya

bakteri patogen, dan kondisi imun udang yang melemah sehingga menyebabkan penyakit pada udang vaname. Padat tebar yang tinggi dan pemberian pakan yang banyak dapat menurunkan kondisi kualitas air. Hal ini diakibatkan adanya akumulasi bahan organik (Yuniasari, 2009), karena udang meretensi protein pakan sekitar 16.3-40.87 % dan sisanya dibuang dalam bentuk ekskresi, residu pakan, serta feses (Hari *et al.*, 2004). Akumulasi bahan organik menyebabkan udang stress dan rentan terhadap penyakit sehingga dapat menyebabkan kematian pada udang budidaya.

Penyakit pada udang disebabkan oleh bakteri patogen, salah satunya yaitu *Vibrio harveyi*. Bakteri ini telah menjadi patogen yang mematikan pada larva hingga pembesaran budidaya udang (Soto-Rodriguez *et al.*, 2010). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah dan menanggulangi penyakit pada udang yaitu dengan meningkatkan sistem imun dan memperbaiki kualitas air lingkungan budidaya. Peningkatan sistem imun dan perbaikan lingkungan budidaya dapat dilakukan melalui aplikasi probiotik dan penerapan sistem bioflok.

Penggunaan bioflok mampu memperbaiki kualitas air dan mencegah *Vibrio* sp. karena bioflok mengandung *poly- β -hydroxybutyrate* (PHB) (De Schryver *et al.*, 2008). Selain itu, probiotik juga mampu memperbaiki respon inang terhadap penyakit dan memperbaiki kualitas lingkungan budidaya (Verschuere *et al.* 2000). Probiotik yang digunakan yaitu *Bacillus* sp. D2.2 memiliki kemampuan untuk menghambat *V. harveyi* dan meningkatkan sistem imun udang vaname (Harpeni *et al.*, 2017). Penggunaan sistem bioflok yang dikombinasikan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan diharapkan mampu lebih baik dalam meningkatkan sistem imun

non spesifik pada udang vaname yang diinfeksi bakteri patogen *V. harveyi* (Gambar 1).



Gambar 1. Kerangka Pemikiran Penelitian

E. Hipotesis

Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

H₀ : Tidak ada pengaruh pengaplikasian bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 terhadap respon imun non spesifik udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*.

H₁ : Terdapat minimal satu pengaruh pengaplikasian bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 terhadap respon imun non spesifik udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Udang vaname termasuk golongan krustase dalam ordo dekapoda dimana di dalamnya juga termasuk udang, lobster dan kepiting. Klasifikasi udang vaname adalah sebagai berikut (Fast & Lester, 1992):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Anthropoda
Subfilum	: Krustase
Kelas	: Malacostraca
Subkelas	: Eumalacostraca
Orde	: Decapoda
Famili	: Penaeidae
Genus	: <i>Litopenaeus</i>
Spesies	: <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)

Morfologi tubuh udang terdiri dari 2 bagian utama yaitu kepala dada (*cephalathorax*) dan perut (*abdomen*). Pada *cephalathorax* terdapat bagian *antennula* (sungut kecil), *scophocerit* (sirip kepala), *antenna* (sungut besar), *mendibula* (rahang), 2 pasang *maxilla*, 3 pasang *maxilliped*, 3 pasang pareiopoda (kaki jalan), yang ujung-ujungnya bercapi disebut chela. *Cephalathorax* terdiri dari 13 ruas (kepala 5 ruas, dada 8 ruas) dan abdomen 6 ruas. Pada bagian kepala

tertutup oleh karapas yang pada ujungnya terdapat rostrum pada bagian atas (dorsal) 6-8 buah sedangkan bagian bawah (ventral) sebanyak 2-4 buah (Motoh, 1985).

Udang mempunyai standar kualitas air tertentu agar dapat hidup dengan baik untuk mendukung kelangsungan hidup yang tinggi dan pertumbuhan yang optimal. Suhu pada budidaya udang berkisar antara 26-33°C, sedangkan pH berkisar antara 7,5-8,5. Oksigen terlarut memiliki batas minimum pada kolam pemeliharaan udang yaitu > 4 mg/l. Udang vaname memiliki kisaran salinitas yang lebar yaitu antara 5-35 ppt. Beberapa variabel kualitas air yang bersifat toksik seperti nitrit dan H₂S memiliki batas maksimum yaitu <0,01 mg/l, sedangkan ammonia <1,0 mg/l (Supono, 2017).

Pertumbuhan adalah tujuan utama dari semua budidaya udang. Udang akan tumbuh setelah terlebih dahulu melakukan molting. Molting yaitu proses pelepasan eksoskeleton yang lama dan digantikan dengan eksoskeleton baru yang masih lunak. Eksoskeleton baru yang fleksibel akan dengan cepat mengeras dengan bantuan mineral dan protein. Proses molting ini menghasilkan peningkatan ukuran diskontinu. Pada setiap molting, diikuti oleh peningkatan ukuran vertikal. Selain itu, selama molting udang rentan terhadap serangan penyakit dan predator baik dari jenis lain maupun sesamanya (Fast & Lester, 1992). Kondisi yang mempengaruhi frekuensi molting yaitu lingkungan dan faktor nutrisi. Pada temperatur yang lebih tinggi, frekuensi molting meningkat.

Udang penaeid bersifat omnivor, karnivora dan pemakan detritus. Pada postlarva dan juvenil udang akan memakan mikroalga, agregat detritus, makrophyta,

nematoda, copepod, larva moluska. Ketika udang tumbuh, akan digantikan oleh invertebrata yang lebih besar seperti amphipoda, polichaeta, dan moluska, serta ikan. Udang dewasa juga akan memakan sejumlah besar agregat detritus (Fast & Lester, 1992).

B. Respon Imun Udang

Krustase tidak memiliki respon imun spesifik (*adaptive*) dan bergantung pada berbagai respon imun nonspesifik (*innate*). Meskipun dianggap tidak begitu memuaskan, respon imun nonspesifik mampu dengan cepat dan efisien mengenal dan menghancurkan material asing, termasuk patogen (Witteveldt *et al.*, 2004). Respon imun nonspesifik terdiri atas respon selular dan respon humoral. Sistem pertahanan seluler meliputi fagositosis sel-sel hemosit, nodulasi dan enkapsulasi. Sistem pertahanan humoral mencakup phenoloksidase (PO), prophenoloksidase (ProPO), lektin dan agglutinin (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Sistem pertahanan ini akan aktif ketika menerima rangsangan berupa protein dan karbohidrat seperti lipopolisakarida, peptidoglikan, dan α -glukan (Lin *et al.*, 2006).

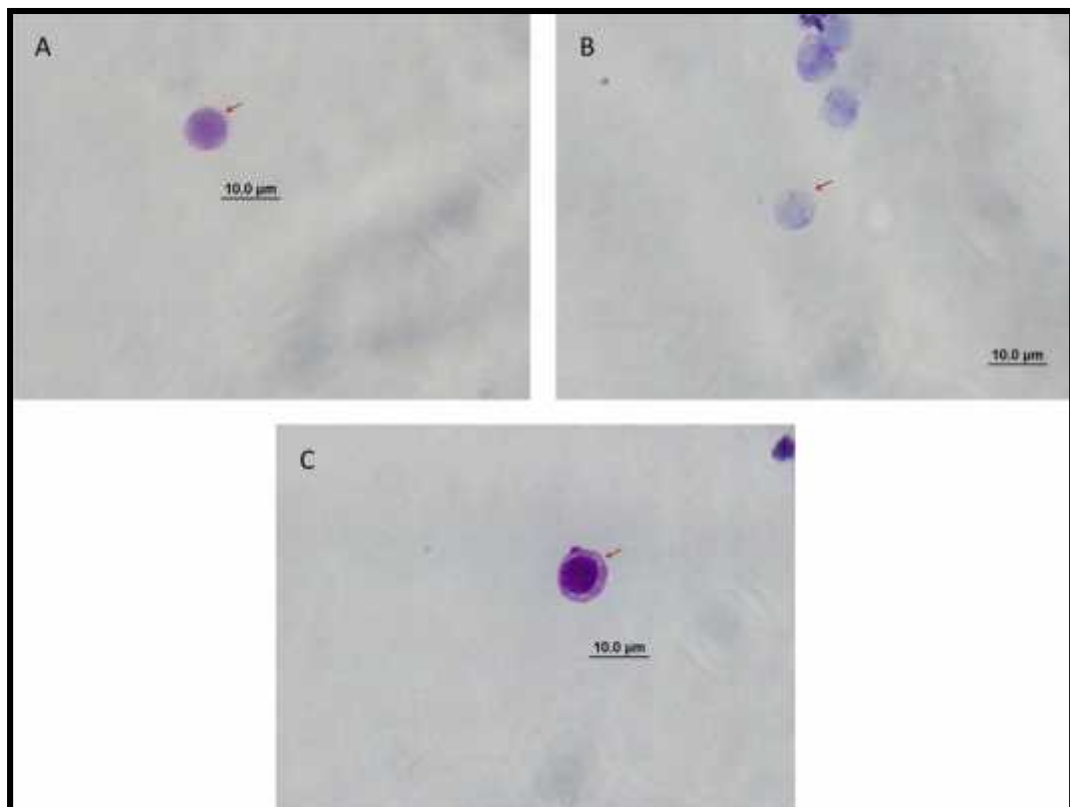
Melalui proses fagositosis hemosit mengeluarkan partikel asing dalam *hemocoel*, enkapsulasi dan agregasi nodular. Selain itu, hemosit berperan dalam penyembuhan luka melalui *cellular clumping* serta membawa dan melepaskan *prophenoloxidase system* (proPO) (Rodriquez & Le Moullac, 2000). Jumlah hemosit dapat sangat bervariasi berdasarkan spesies, respon terhadap infeksi, stres lingkungan, aktivitas endokrin selama siklus molting (Johansson *et al.*, 2000), seks, fase perkembangan, status reproduksi dan nutrisi (Song *et al.*, 2003). Hasil penelitian

Song *et al.* (2003) menunjukkan bahwa setelah 3-5 hari diinfeksi dengan *Taura Syndrome Virus* (TSV), THC *L. vannamei* berukuran 10-20 g mengalami penurunan sebesar 70% menjadi 0.345×10^7 sel/ml dibandingkan dengan kontrol 1.64×10^7 sel/ml, dengan mortalitas mencapai 80%.

Fagositosis merupakan reaksi yang paling umum dalam pertahanan seluler udang. Tahapan awal proses fagositosis yaitu dengan perlekatan (*attachment*) dan penelanan (*ingestion*) partikel mikroba ke dalam sel fagosit. Sel fagosit kemudian membentuk vacuola pencernaan (*digestive vacuola*) yang disebut fagosom (Rodriquez & Le Moullac, 2000). Lisosom (granula dalam sitoplasma fagosit) kemudian menyatu dengan fagosom membentuk fagolisosom. Melalui proses *egestion* mikroorganisme selanjutnya dihancurkan dan debris, mikroba dikeluarkan dari dalam sel. Pemusnahan partikel mikroba yang difagosit melibatkan pelepasan enzim ke dalam fagosom dan produksi ROI (*reactive oxygen intermediate*) yang kini disebut *respiratory burst* (Rodriquez & Le Moullac, 2000).

Pada krustasea dekapoda ada tiga tipe sirkulasi hemosit. Tipe ini didasarkan pada keberadaan sitoplasma granula yaitu hialin, semi granular dan sel granular yang masing-masing memiliki morfologi dan fisiologi tertentu (Johansson *et al.*, 2000). Hialin berukuran 6-13 μm merupakan sel dengan perbandingan inti lebih besar dari sitoplasma dan memiliki sedikit granul sub-mikron. Semi granular berukuran 10- 20 μm merupakan sel dengan perbandingan inti lebih sedikit dari sitoplasma dan memiliki granul sub mikron dan mikron serta adanya granul *refractile*. Semi granular memperlihatkan kapasitas mengenali dan merespons partikel unsur atau molekul asing atau dikenal sebagai sel aktif dalam enkapsulasi. Granul berukuran

12-25 μm merupakan sel dengan perbandingan inti lebih rendah dari sitoplasma berisi butiran halus dan bertanggung jawab mengaktifkan sistem prophenol-oksidadase (sistem proPO) (Ramu & Zakaria, 2000). Sel semi granular dan granular melakukan fungsi sistem proPO sedangkan sel hialin melakukan fagositosis dalam imunitas krustasea (Wang & Chen, 2006).



Gambar 2. Sel hemosit udang: Granular (a), Hialin (b), dan Semi granular (c)
Yang *et al.* (2015)

Diferensial hemosit merupakan indikator yang menunjukkan persentase dari masing-masing jenis sel hemosit pada udang. Persentase dari setiap sel hemosit pada udang vaname normal yaitu sel hialin 22-27%, semi granular 54-61%, dan sel granular 13-18% (Heng & Lei, 1998). Peningkatan persen jenis hemosit tertentu disebabkan oleh proliferasi seluler yang diinduksi, perekrutan sel dari

kompartemen hemolim yang tidak bersirkulasi, atau diferensiasi seluler yang cepat sebagai respon terhadap tantangan antigen (Nurhaeda, 2017).

Sel hialin merupakan sel fagosit yang akan bertindak terlebih dahulu saat terdapat invasi benda asing dalam tubuh, sedangkan semi granular atau granular merupakan pematangan sel hialin dan berperan dalam proses enkapsulasi.

Menurut Van Dee Braak *et al.* (2000) bahwa sel semi granular merupakan pematangan dari sel hialin yang ketika terjadi serangan patogen maka yang berperan pertama adalah sel hialin, sehingga sel ini tidak berkembang menjadi sel semi granular dan terlihat penurunan jumlah sel semi granular yang terdapat dalam hemosit. Sedangkan menurut Johanson *et al.* (2000) bahwa sel semi granular berperan utama dalam proses enkapsulasi dan sedikit dalam proses fagositosis. Sel ini mampu merespon polisakarida dari dinding sel bakteri atau β -glukan yang berasal dari jamur. Sel semi granular ini dapat melakukan proses enkapsulasi dan sedikit berperan dalam proses fagositosis.

C. Bioflok

Konsep dasar bioflok adalah mengubah senyawa organik dan anorganik yang mengandung senyawa karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N) dan sedikit fosfor (P) menjadi masa *sludge* berupa bioflok dengan menggunakan bakteri pembentuk floc (*floc forming bacteria*) yang mensintesis biopolymer sebagai ikatan bioflok (Supono, 2017). Cara ini menurunkan konsentrasi amonium lebih cepat daripada proses nitrifikasi karena nitrogen digunakan bakteri heterotrofik sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan (Hargreaves,

2006). Jika karbon dan nitrogen seimbang dalam suatu wadah pemeliharaan, amonium dan limbah nitrogen organik akan diubah menjadi biomassa bakteri (Schneider *et al.*, 2005). Perombakan amonium oleh bakteri heterotrofik terjadi lebih cepat daripada bakteri nitrifikasi (Hargreaves, 2006).

Teknologi bioflok meminimalkan penggunaan air dalam sistem akuakultur dengan memperbaiki kualitas air serta menghasilkan *bioflocs* yang tinggi protein dapat berfungsi sebagai pakan untuk organisme air (Crab, 2010). Dibandingkan teknologi pengolahan air konvensional yang digunakan dalam budidaya, teknologi bioflok memberikan alternatif yang lebih ekonomis dan mengurangi biaya pakan karena efisiensi pemanfaatan protein dua kali lebih tinggi dalam sistem teknologi bioflok bila dibandingkan dengan konvensional (Avnimelech, 2009). Meskipun *bioflocs* menunjukkan kandungan protein, lipid, karbohidrat dan abu yang cukup untuk digunakan sebagai pakan akuakultur (Crab *et al.*, 2010a), namun kandungan asam amino dan komposisi asam lemaknya masih belum diketahui. Konsentrasi vitamin C dalam *bioflocs* mulai dari 0 hingga 54 µg / g bahan kering (Crab, 2010), nilai-nilai tersebut masih di bawah konsentrasi yang diperlukan untuk udang. Selain vitamin C, vitamin lain seperti tiamin, riboflavin, piridoksin, asam pantotenat, asam nikotinat, biotin, asam folat, vitamin B12, inositol, kolin, vitamin A, vitamin D3, vitamin E dan vitamin K, biasanya tidak cukup disintesis oleh organisme sehingga perlu dipasok melalui pakan buatan atau komersil (Crab *et al.*, 2012).

Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa teknologi bioflok merupakan alternatif untuk melawan bakteri patogenik dalam budidaya (Crab *et al.*, 2010a).

Bioflok yang ditumbuhkan pada gliserol mampu melindungi *Artemia franciscana* terhadap patogen *Vibrio harveyi* (Crab *et al.*, 2010b). Pada bioflok terdapat akumulasi senyawa *poli- -hidroksibutirat* (PHB). Senyawa *poli- -hidroksibutirat* (PHB) mampu untuk melindungi hewan akuakultur dari infeksi bakteri (De Schryver *et al.*, 2010; Halet *et al.*, 2007). Penelitian oleh De Schryver dan Verstraete (2009) menunjukkan bahwa bioflok mengandung *poly- -hydroxybutyrate* (PHB) berkisar antara 0,9-16 %. Bioflok mengandung tingkat PHB yang cukup untuk melindungi udang dari infeksi oleh bakteri patogen (Halet *et al.*, 2007).

Udang yang dipelihara dengan teknologi bioflok yang menggunakan probiotik *Bacillus* memiliki kepadatan *Vibrio* 5 kali lebih rendah bila dibandingkan dengan udang yang diberi pakan buatan (Crab, 2010). Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan bakteri probiotik memiliki efek biokontrol terhadap *Vibrio* spp. Bioflok kemungkinan juga mengandung senyawa imunostimulan karena teknologi bioflok berurusan dengan bakteri dan produk-produk bakteri terutama bakteri probiotik. Beberapa jenis imunostimulan yaitu bakteri probiotik, karbohidrat kompleks, faktor nutrisi, ekstrak hewan, sitokin, lektin, ekstrak tumbuhan dan obat-obatan sintesis (Wang *et al.*, 2008). Peningkatan kekebalan bawaan organisme budidaya dapat memberikan resistansi terhadap infeksi.

D. Probiotik

Probiotik adalah sel mikroba yang memiliki berbagai efek menguntungkan bagi kesehatan inang yaitu dengan meningkatkan keseimbangan usus melalui

peningkatan nilai konversi pakan, penghambatan mikroorganisme patogen, aksi antimutagenik dan antikarsinogenik, faktor pemicu pertumbuhan, dan peningkatan kekebalan tubuh (Verschuere *et al.*, 2000). Beberapa keunggulan tersebut membuat probiotik kini banyak digunakan dalam kegiatan budidaya udang khususnya pada sistem budidaya intensif dibandingkan dengan penggunaan antibiotik sintetik yang menghasilkan residu bersifat merugikan.

Probiotik terutama dianggap sebagai agen kontrol penyakit dalam budidaya udang. Probiotik telah terbukti mampu secara langsung menghambat pertumbuhan dan proliferasi patogen serta merangsang dominasi mikrobiota menguntungkan pada inang dan lingkungan pemeliharannya (Lazado & Caipang, 2014). Penggunaan probiotik dapat dilakukan dengan secara langsung pada inang, tidak langsung pada tempat pemeliharaan, dan kombinasi keduanya. Penggunaan secara tidak langsung dapat meningkatkan kualitas air kondisi tambak budidaya terutama memodifikasi sifat fisika-kimia air dan tanah. Penggunaan secara langsung pada inang yaitu seperti penambahan pada pakan yang akan meningkatkan kekebalan terhadap serangan patogen dan meningkatkan penyerapan nutrisi dan memaksimalkan aktifitas enzim pencernaan (Lazado *et al.*, 2015).

Probiotik mampu menghambat langsung patogen melalui produksi metabolit antagonis (Lazado *et al.*, 2010). Karakteristik antagonisme ini biasanya digunakan sebagai tes utama dalam memilih dan mengidentifikasi kandidat probiotik.

Sebagian besar probiotik dalam udang dicirikan oleh kemampuan mereka untuk menghambat pertumbuhan berbagai patogen. Suatu isolat yang diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp. dari saluran pencernaan *Litopenaeus vannamei* yang

sehat menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* dan *V. cholera* (Far *et al.*, 2013). Beberapa kandidat probiotik *Bacillus* menunjukkan penghambatan pada pertumbuhan strain patogen *V. harveyi* yang diisolasi dari asal yang berbeda.

Probiotik menghasilkan asam organik dengan penurunan pH untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Ma *et al.*, 2009). *Bacillus licheniformis* dan *B. pumilus* menunjukkan aktivitas antibakteri, toleransi pH rendah dan konsentrasi tinggi (Ramesh *et al.*, 2015). *Lactobacillus* spp. menghasilkan berbagai senyawa yaitu organik asam, *diacetyl*, *hydro peroxide* dan protein *bacteriocidal* (Farzanfar, 2006). Senyawa ini mengaktifkan sistem kekebalan tubuh hewan, dan membuat mereka lebih tahan terhadap infeksi oleh virus, bakteri, jamur dan parasit, atau menghambat bakteri patogen dalam sistem akuakultur.

E. *Bacillus* sp. D2.2

Bacillus sp. D2.2 merupakan bakteri probiotik dengan kode D2.2 yang memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Bacillus* sp. melalui proses identifikasi metode analisis 16S rDNA menggunakan aplikasi *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), bakteri D2.2 diidentifikasi memiliki homologi paling tinggi yaitu dengan bakteri *Bacillus* sp., tingkat homologi mencapai 97% (Aji, 2014). Bakteri ini merupakan isolat lokal yang dapat menghambat *Vibrio harveyi* sebanyak 0,34% dari 293 isolat yang berasal dari tambak tradisional di Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung (Mariska, 2013). Bakteri *Bacillus* sp. D2.2 termasuk ke dalam bakteri Gram positif dan

berbentuk batang. Selain itu, bakteri ini bersifat aerob obligat atau fakultatif anaerob (bisa bertahan pada kondisi aerob dan anaerob), biasanya motil, bersifat katalase dan oksidase positif (Aji, 2014). Bakteri D2.2 ini tumbuh baik pada salinitas 20-30 ppt dan kisaran pH 6-8 (Septiani, 2016).

Sifat antagonisme bakteri *Bacillus* sp. D2.2 yaitu menghasilkan senyawa antibakteri berupa antibakteri polipeptida yaitu *bacitracin*, yang mampu menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel, merusak permeabilitas membran sel dan merubah sistem respirasi (Setyawan *et al.*, 2014). Isolat *Bacillus* sp. D2.2 secara *in vitro* mampu menekan pertumbuhan bakteri *V. alginoliticus*, *Stapylococcus aureus* dan *Aeromonas hydrophila* (Aji, 2014). Bakteri ini secara *in vivo* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginoliticus* pada udang vaname (Hardiyani *et al.*, 2016).

Pemberian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan prebiotik ekstrak tepung ubi jalar (sinbiotik) pada udang vaname terhadap performa pertumbuhan dan respon imun telah dilakukan. Probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dengan prebiotik dari ubi jalar dengan perlakuan 6 % probiotik dan 4% prebiotik dapat meningkatkan kinerja pertumbuhan secara signifikan dan dapat melindungi udang dari infeksi *V. harveyi* dengan meningkatkan kekebalan dan mikroflora di saluran pencernaan udang, melindungi udang dengan nilai RPS 53,48%, tingkat infeksi yang lebih rendah dan lebih sedikit kerusakan hepatopankreas (Harpeni *et al.*, 2017). Pemberian sinbiotik dengan perlakuan prebiotik 2% dan probiotik 6% mampu meningkatkan respon imun nonspesifik pada udang vaname dengan peningkatan nilai THC yang stabil, peningkatan tertinggi pada parameter AF mencapai 39% dibandingkan

kontrol, dengan nilai 61,3%, serta peningkatan aktivitas PO mencapai 4,2% dibandingkan kontrol (Ramadhani *et al.*, 2017). Respon imun humoral udang putih aktivitas *phenoloksidase* (PO), aktivitas *superoxidase dismutase* (SOD) dan Total Protein plasma (TPP). Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-0, hari ke-4, hari ke-8 dan hari ke-12. Bedakan penggunaan probiotik *Bacillus sp.* D2.2 memberikan pengaruh terhadap aktivitas PO dan SOD pada hari ke-8 (Amanah, 2017).

F. *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi merupakan bakteri patogen yang berpendar dan bersifat Gram negatif (Austin & Zhang, 2006). *V. harveyi* sebagai bakteri patogen utama pada udang yang menyebabkan mortalitas larva, pasca larva dan udang budidaya (Moriarty, 1999). Bakteri ini salah satu patogen yang menjadi penyebab penyakit Vibriosis pada udang vaname. Vibriosis telah banyak menyerang budidaya udang air payau dan menyebabkan kerugian yang tak sedikit. Karena *Vibrio* berpendar ini menimbulkan kematian yang serius dalam sistem pemeliharaan udang (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), penting dilakukan tindakan untuk mengontrol penyebaran bakteri ini.

Vibrio adalah Gram negatif, biasanya batang motil, mesofilik, kemoorganotropik, dan memiliki metabolisme fermentasi. Secara keseluruhan, memiliki lebar sel 1 μm dan panjang 2-3 μm dan bersifat motil (Thompson *et al.*, 2006). *Vibrio* memiliki variasi yang luas dalam morfologi koloni (bulat hingga tidak beraturan) dan warna (krem hingga merah). *Vibrio* pada umumnya mampu tumbuh pada

media agar laut dan pada medium selektif, misalnya TCBS (*Tiosulfat Citrat Bilesalts Sukrosa*) (Thompson *et al.*, 2006). Media agar TCBS bukan media diferensial dalam spesies *Vibrio* seperti *V. harveyi*, namun dapat dibedakan dari spesies yang mampu memanfaatkan sukrosa dan yang tidak mampu memanfaatkan sukrosa. Kebanyakan *Vibrio* tidak tumbuh pada suhu 4°C dan di media dengan 0 atau 12% (wt / vol) NaCl (Thompson *et al.*, 2006).

Bakteri *V. harveyi* menghasilkan lisin dekarboksilase, nitrat reduktase dan sitokrom oksidase serta enzim amilase, kitinase dan lipase. Protease, *phospholipase*, *haemolysin* atau eksotoksin merupakan faktor patogenitas penting *V. harveyi*. Kemampuan berpendar bakteri ini merupakan hasil aktivitas enzim luciferase yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi reduksi (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2019, berlokasi di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu bak kontainer, spuit 1 cc, selang aerasi, batu aerasi, pipa paralon, *scope net*, timbangan digital, DO meter, pH meter, refraktometer, termometer, mikropipet, inkubator, autoklaf, spektrofotometer, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, bunsen, erlenmeyer, gelas ukur, *shaker*, *cool ice*, *cool box*, kaca preparat, *cover glass*, *hemocytometer*, dan mikroskop.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu udang vaname, pakan komersil, bakteri *Bacillus* sp. D2.2, *Vibrio harveyi*, media SWC (*Sea Water Complete*) dengan komposisi yaitu 5 g *bacto peptone*, 1 g *yeast extract*, 3 ml gliserol, 15 g *bacto agar*, 750 ml air laut, dan 250 ml akuades, TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose Agar*), air laut, molase, alkohol 70%, Na sitrat 10%, akuades, klorin, PBS (*Phosfat Buffer Saline*), sodium tiosulfat, formalin 1%, NaCl 0,85%, safranin 10% (Lampiran 3), metanol, larutan giemsa

10% (Lampiran 2), dan rifampisin (Lampiran 4).

C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dengan 3 ulangan (Tabel 1).

Tabel 1. Perlakuan pada Penelitian

Perlakuan	Keterangan
K-	Tanpa pengaplikasian bioflok dan probiotik, udang tidak diinjeksi <i>Vibrio harveyi</i>
K+	Tanpa pengaplikasian bioflok dan probiotik, udang diinjeksi <i>Vibrio harveyi</i>
A	Pengaplikasian probiotik <i>Bacillus</i> sp. D2.2 pada pakan, udang diinjeksi <i>Vibrio harveyi</i>
B	Pengaplikasian sistem bioflok, udang diinjeksi <i>Vibrio harveyi</i>
C	Pengaplikasian sistem bioflok dan penambahan probiotik <i>Bacillus</i> sp. D2.2 pada pakan, udang diinjeksi <i>Vibrio harveyi</i>

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Wadah dan Hewan Uji

Wadah yang digunakan adalah bak kontainer ukuran 60 cm × 40 cm × 40 cm sebanyak 15 buah. Sebelum digunakan, bak dicuci terlebih dahulu menggunakan deterjen lalu dikeringkan. Setelah itu, diisi air laut sebanyak 50 L. Air laut didisinfeksi dengan larutan klorin 30 mg/L dan diaerasi kuat selama 24 jam. Kemudian ditambahkan sodium tiosulfat 15 mg/L untuk menetralkan kandungan klorin dan diaerasi kuat selama minimal 4 jam (Chayati, 2012).

Hewan uji yang digunakan yaitu udang vaname dengan bobot rata-rata ± 12 g. Jumlah udang yang digunakan untuk setiap perlakuan yaitu 10 ekor. Udang vaname pada ukuran 10-12 g padat tebar yang digunakan yaitu 50-80 ekor/m² (SNI 8037.1, 2014). Sebelum diberi perlakuan udang diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari.

2. Kultur Probiotik *Bacillus* sp. D2.2

Sebelum probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dikultur, bakteri dibuat resisten terhadap antibiotik rifampisin terlebih dahulu, untuk membedakan bakteri yang diinokulasikan dengan bakteri yang sudah ada pada media pemeliharaan maupun tubuh udang (Ayuzar, 2008). Rifampisin dicampurkan pada media SWC sebanyak 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lalu dikultur bakteri dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya bakteri yang telah resisten rifampisin dikultur pada media SWC agar miring lalu diinkubasi selama 24 jam. Kemudian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dikultur pada media SWC cair dan diletakkan pada *shaker* hingga kepadatan 10^8 CFU/ml (Novitasari *et al.*, 2017) pada suhu ruang. Komposisi pembuatan media SWC agar yaitu 5 g *bacto peptone*, 1 g *yeast extract*, 3 ml gliserol, 15 g *bacto agar*, 750 ml air laut, dan 250 ml akuades, sedangkan komposisi SWC cair sama seperti padat tapi tanpa menggunakan *bacto agar* pada proses pembuatan. Kultur cair tersebut akan digunakan untuk pembentukan bioflok di awal pemeliharaan untuk perlakuan sistem bioflok dan ditambahkan pada pakan untuk perlakuan penambahan probiotik pada pakan.

3. Pencampuran Pakan dengan Probiotik

Pakan yang digunakan adalah pakan komersial dengan kadar protein 30%. Proses persiapan pakan meliputi pencampuran probiotik *Bacillus* sp. D2.2, putih telur, dan pakan. Dosis probiotik yang digunakan sebanyak 6% (v/w) dari bobot pakan yang diberikan dan dosis putih telur yang digunakan sebanyak 2% (v/w) dari bobot pakan sebagai perekat (Permatasari, 2017). Pakan ditimbang sesuai biomassa udang dan FR (*Feeding Rate*) tiap akuarium. Suspensi bakteri tiap perlakuan dicampur dengan putih telur sebelum dicampur ke pakan. Setelah itu, campuran probiotik dan putih telur disemprotkan dan diaduk secara merata ke dalam pakan dengan menggunakan spayer kemudian dikering-anginkan sampai benar-benar kering, kemudian disimpan dan digunakan selama 6 hari.

4. Pemeliharaan Udang Vaname

Pemeliharaan udang vaname dilakukan dengan pemberian pakan komersil dan frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari (SNI 8037.1, 2014) yaitu pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB. Pemberian pakan pada udang sesuai dengan FR udang yaitu 3%. Pemberian molase dilakukan sekali sehari sebagai sumber karbon. Persentase kandungan karbon pada molase yaitu 22,75% dan penambahan molase pada media pemeliharaan sesuai dengan perhitungan yang dilakukan oleh Avnimelech (1999) dengan C/N rasio 1:20 sesuai dengan Pantjara *et al.* (2010) nilai ideal C:N rasio untuk bioflok 1:15 sampai 1:20 (Lampiran 1). Pemeliharaan udang uji dilakukan selama 15 hari (perlakuan) (Permatasari, 2017), selanjutnya diuji tantang dengan *V. harveyi* dan pengamatan selama 6 hari setelah uji tantang.

Pada perlakuan menggunakan bioflok dilakukan tanpa pergantian air, hanya penambahan air yang menguap. Pada perlakuan tanpa bioflok dilakukan penyiponan setiap hari dan penambahan air.

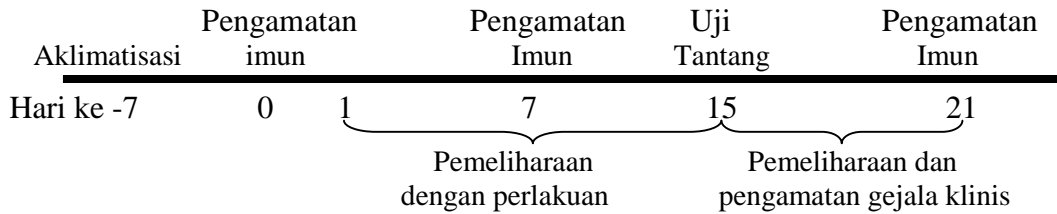
5. Penganasan Bakteri *Vibrio harveyi*

Penganasan bakteri digunakan untuk mendapatkan isolat murni bakteri patogen aktif yang selanjutnya digunakan untuk ujiantang. Pada penelitian ini bakteri patogen yang digunakan pada saat ujiantang yaitu *V. harveyi*. Tahapan uji kohabitasi yaitu isolat *V. harveyi* diinokulasi pada media TSB. Kemudian diinjeksi ke 3 ekor udang stok dengan dosis 0,1 ml/ekor, udang uji diamati hingga menunjukkan gejala infeksi dari bakteri tersebut. *V. harveyi* diambil dari udang sakit kemudian diisolasi pada media TCBSA, selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu, diinokulasi kembali pada media TSB dan diinkubasi selama 18-24 jam. Diukur kepadatan bakteri menggunakan spektrofotometer. Bakteri tersebut diinjeksikan pada udang baru, udang dipelihara hingga menunjukkan gejala infeksi. Bakteri diisolasi dari udang tersebut pada media TCBSA. Bakteri yang tumbuh pada media TCBSA tersebut akan digunakan untuk ujiantang (Wijayanti *et al.*, 2018).

6. Uji Tantang

Ujiantang dilakukan menggunakan bakteri patogen *V. harveyi* dengan dosis sesuai dengan uji patogenesis sebanyak 0,1 ml/ekor. Sebelum dilakukan ujiantang, *V. harveyi* dikultur terlebih dahulu pada media cair hingga kepadatan 10^8 CFU/ml. Ujiantang dilakukan dengan metode injeksi. Penyuntikan dilakukan

pada bagian pangkal kaki renang (pleopod) ke-3. Pengamatan dan pemeliharaan udang setelah injeksi dilakukan selama 6 hari. Pemeliharaan udang uji setelah injeksi tetap dengan perlakuan.



Gambar 3. *Time Line* Penelitian

E. Parameter Uji

1. Parameter Imun

Parameter imun udang yang diukur terdiri dari *total haemocyte count* (THC), aktifitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), dan diferensial hemosit.

Pengamatan dilakukan diawal pemberian perlakuan, sebelum uji tantang, dan sesudah uji tantang. Prosedur pengukuran parameter imun sebagai berikut:

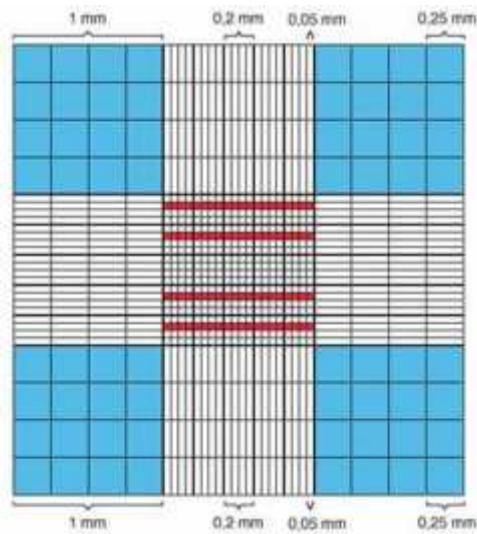
1.1 *Total Haemocyte Count* (THC)

Hemolim segar 10 μ L diencerkan dengan PBS 20 μ L, kemudian sampel yang telah diencerkan diletakkan diatas *hemocytometer*, lalu amati dibawah mikroskop pada bagian kotak biru (Gambar 4) (Permatasari, 2017). Jumlah hemosit yang tampak pada mikroskop kemudian dihitung. *Total Haemocyte Count* (THC) diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{THC (sel/ml)} = \text{Rata - rata sel} \times \frac{1}{\text{Volum kotak biru}} \times \text{FP}$$

Keterangan :

FP = Faktor Pengenceran



Gambar 4. Kotak pada *Haemocytometer*

1.2 Aktifitas Fagositosis dan Indeks Fagositosis (AF dan IF)

Hemolim segar 20 μL dimasukkan kedalam mikrotub dan ditambahkan 10 μL suspensi *Staphylococcus aureus* yang telah dilemahkan dengan formalin 1% selama 24 jam. Hasil campuran tersebut diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Selanjutnya diambil 5 μL untuk dibuat apusan di atas gelas preparat dengan meletakkan hemolim pada ujung kaca preparat, kemudian tekan dengan ujung *cover glass* dan didorong sampai 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 (Permatasari, 2017).

Aktifitas fagositosis (AF) dan Indeks Fagositosis (IF) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

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

Keterangan:

a = jumlah sel fagosit (sel/ml)

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

c = jumlah bakteri yang difagosit (sel/ml)

1.3 Diferensial Hemosit

Diferensial hemosit atau *Differential Haemocyte Count* (DHC) dihitung berdasarkan metode yang dilakukan Martin & Graves (1985). Gelas objek direndam dalam metanol selama 5-10 menit dan dikering udarakan. Hemolim ditetaskan pada gelas objek dan dibuat preparat ulas lalu dikering udarakan. Preparat difiksasi dengan metanol selama 5-10 menit lalu dikeringudarakan kembali. Preparat direndam dalam larutan giemsa 10% selama 15-20 menit, kemudian dicuci air mengalir selama 30 detik dan dibiarkan kering. Ulasan hemolim diamati dengan mikroskop pada pembesaran 400 kali dan diidentifikasi jenis selnya yaitu sel hialin, semi granular, dan granular. Jumlah hemosit dihitung hingga 100 sel dan ditentukan persentase tiap jenisnya. Diferensial hemosit dihitung dengan rumus:

$$\text{Sel Hialin} = \frac{\text{sel hialin}}{100} \times 100\%$$

$$\text{Sel Semi Granular} = \frac{\text{sel semi granular}}{100} \times 100\%$$

$$\text{Sel Granular} = \frac{\text{sel granular}}{100} \times 100\%$$

2. *Survival Rate (SR)*

Survival Rate (SR) atau tingkat kelangsungan hidup udang uji dapat diketahui dari jumlah udang pada akhir perlakuan dibagi dengan jumlah udang awal (Effendi, 2004), dirumuskan sebagai berikut :

$$SR = [N_t/N_o] \times 100 \%$$

Keterangan :

No = Jumlah udang pada awal perlakuan (ekor)

Nt = Jumlah udang pada akhir perlakuan (ekor)

3. *RPS (Relative Percent Survival)*

Perhitungan *RPS (Relative Percent Survival)* dilakukan selama ujiantang menggunakan rumus berdasarkan Amend (1981):

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ Mortalitas udang yang terinfeksi patogen}}{\% \text{ mortalitas udang kontrol (+)}} \times 100$$

4. **Perhitungan Bakteri Pada Usus**

Populasi bakteri yang dihitung yaitu bakteri probiotik dan *Vibrio* pada usus.

Perhitungan bakteri probiotik pada usus udang dilakukan pada akhir pemeliharaan (setelah ujiantang). Sampel udang uji diambil secara acak dari setiap perlakuan.

Udang dibedah lalu diambil usus kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube steril yang berisi air laut steril dan digerus. Dari hasil gerusan usus dalam air laut steril dilakukan pengenceran hingga kepadatan bakteri berkurang. Selanjutnya hasil pengenceran disebar pada media SWC agar yang telah diberi rifampisin 50 µg/mL di dalam media untuk bakteri probiotik dan pada media TCBSA untuk bakteri

Vibrio. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan. Perhitungan bakteri dilakukan menggunakan metode hitungan cawan.

$$\text{CFU}_{\text{ml}} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{pengenceran}} \times \frac{1}{\text{volume yang digunakan}}$$

5. Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan dengan melihat perubahan abnormalitas pada morfologi dan tingkah laku udang uji. Gejala klinis diamati selama 6 hari untuk melihat perubahan pada udang setelah diuji tantang dengan bakteri *V. harveyi*.

Pengamatan dilakukan dengan melihat nafsu makan, tingkah laku, nekrosis.

Berdasarkan penelitian Annisa & Prayitno (2015), pengamatan gejala klinis udang vaname yang diinfeksi bakteri *V. harveyi* ditandai dengan udang yang bergerak sangat pasif (lemas), berenang tidak beraturan serta nafsu makan berkurang.

Gejala klinis secara morfologi ditandai dengan munculnya warna kemerahan pada telson dan kaki renang (pleopod).

6. Kualitas Air

Kualitas air sebagai data pendukung selama proses pemeliharaan udang uji. Pengukuran kualitas air dilakukan diawal, ditengah, dan diakhir pemeliharaan yang meliputi pengukuran suhu, oksigen terlarut (DO), pH, salinitas, dan ammonia.

Pengukuran kualitas air menggunakan termometer, DO meter, pH meter, dan Refraktometer.

F. Analisis Data

Analisis data pada pengamatan THC, AF, IF, Diferensial hemosit adalah ANOVA (*analysis of variance*) dan *Repeated Measures* ANOVA, sedangkan perhitungan bakteri pada usus udang uji digunakan uji ANOVA dengan selang kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan nyata antara perlakuan maka dilanjutkan uji lanjut Duncan. Untuk data RPS dan *Survival Rate* (SR) dilakukan analisis nonparametrik Kruskal-Wallis. Sedangkan kualitas air dan gejala klinis dianalisis secara deskriptif.

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Simpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian perlakuan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan dan bioflok berpengaruh terhadap respon imun udang vaname yaitu mampu meningkatkan *Total Hemocyte Count* (THC), Aktifitas Fagositosis (AF), Indeks Fagositosis (IF), Total *Bacillus* sp. D2.2, *Survival Rate* (SR), *Relative Percent Survival* (RPS), dan memperkecil gejala klinis infeksi *Vibrio harveyi*.
2. Berdasarkan parameter tersebut perlakuan C memberikan respon imun tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

B. Saran

Disarankan melakukan penelitian mengenai durasi atau lama penggunaan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan untuk menjaga keseimbangan bakteri dan menghambat bakteri patogen pada usus udang vaname.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R., & Ascencio, F. 2001. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78(4): 215-219.
- Aji, M. B. 2014. Aktivitas Senyawa Antimikroba dari Bakteri Biokontrol D2.2 terhadap Bakteri pada Udang dan Ikan secara In Vitro. [Skripsi]. Universitas Lampung, Lampung.
- Alday-Sanz, V., Roque, A., & Turnbull, J. F. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 48 :91–99.
- Amanah, B. 2017. Respon Imun Humoral Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) Pada Pemberian Sinbiotik Dengan Kandungan Probiotik *Bacillus* sp. D2.2. [Skripsi]. Universitas Lampung, Lampung.
- Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization*. 49: 447-454.
- Anderson, D.P. 1974. Fish Immunology. Publications. Inc. Ltd. 218 hal.
- Andrade, A. J. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. *Doctoral dissertation, Tesis*. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University.
- Annisa, N., & Prayitno, S. B. 2015. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle*) Dengan Konsentrasi Yang Berbeda Terhadap Gejala Klinis, Kelulushidupan, Histologi Dan Pertumbuhan Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*) Yang Diinfeksi *Vibrio Harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 4(3): 54-60.
- Antony, P. S., & Philip, R. 2008. Probiotics in aquaculture. *World Aquaculture Magazine*. 39 : 59-63.
- Arisa, I. K. 2011. Pemberian prebiotik, probiotik, dan sinbiotik untuk meningkatkan respon imun udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap infeksi *Vibrio harveyi*. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Austin, B. & Zhang, X.H. 2006. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*. 43 (2): 119-124.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology—A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 182 pp.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176 (3-4): 227-235.
- Ayuzar, E. 2008. Mekanisme Penghambatan Bakteri Probiotik Terhadap Pertumbuhan *Vibrio harveyi* pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon*). [Disertasi]. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Azhar, F. 2018. Aplikasi Bioflok yang dikombinasikan dengan Probiotik untuk Pencegahan Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada Pemeliharaan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquaculture Science*. 3 (4): 128-137.
- Chang, C. C., Wu, Z. R., Kuo, C. M., & Cheng, W. 2007. Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*. 23(1): 24-33.
- Chayati, T. N. 2012. Kinerja Imunitas Udang Vaname *Litopenaeus Vannamei* Dalam Teknologi Bioflok dan Probiotik Terhadap Koinfeksi *Infectious Myonecrosis Virus* dan *Vibrio harveyi*. [Skripsi]. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B. F., & Hayball, J. D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*. 14(4): 333-345.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356-357: 351-356.
- Crab, R. 2010. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. [Thesis]. Ghent University.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., & Verstraete, W. 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for

- Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*. 41: 559–567.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*. 109 (5): 1643-1649.
- Das, B.K., & Sethi S.N. 2009. *Immune Functions in Crustaceans. Application of Molecular and Serological Tools in Fish Disease Diagnosis (CIFA)*. Orisaa, India.
- De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P. S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., De Boeck, G., & Bossier, P. 2010. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86 (5): 1535–1541.
- De Schryver, P., & Verstraete, W. 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 100 (3): 1162–1167.
- De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, & Verstraete W. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*. 277 (3-4): 125–137.
- Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, Boon N, Van de Wiele T, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W. 2007. The bacterial storage compound of poly- -hydrobutyrate protects *Artemia fransiseana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology*. 9 (2): 445-452.
- Effendi, I. 2004. *Pengantar Akuakultur*. Penerbit Swadaya, Jakarta. 140 pp.
- Far, H. Z., Saad, C. R. B., Daud, H. M., Kamarudin, M. S., & Ramezani-Fard, E. 2013. Isolation and identification of bacteria microflora of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with antagonistic properties against *Vibrio* species. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8 (2): 293-300.
- Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 48 (2): 149-158.
- Fast A.W. & Lester L.J. (Eds).1992. *Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries science, volume 23*. Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands. 855 pp.
- Feliatra, Z., & Yoswaty, D. 2012. Pathogenitas bakteri *Vibrio* sp. terhadap udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Sungkai*. 2(1): 23-36.

- Halet, D., Defoirdt, T., Van Damme, P., Vervaeren, H., Forrez, I., Van de Wiele, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Verstraete, W. 2007. Poly- -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiology Ecology*. 60 (3): 363–369.
- Hardiyani, S., Harpeni, E., Setyawan, A., dan Supono. 2016. Pathogenicity And In Vivo Study Of Local Isolate *Bacillus* sp. D2.2 At The Vannamei Culture (*Litopenaeus vannamei*). *Aquasains*. 5(1) : 421-425.
- Hari, B., Kurup, B. M., Varghese, J. T., Schrama, J. W., & Verdegem, M. C. J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*. 241 (1-4): 179-194.
- Hargreaves, J.A. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering*. 34 (3): 344–363.
- Harpeni, E., Santoso, L., Supono, Wardiyanto, Widodo, A., & Yolanda, L. 2017. Effects of Dietary Probiotic *Bacillus* sp. D2.2 and Prebiotik Sweet Potato Extract on Growth Performance and Resistance to *Vibrio harveyi* in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal Aquacultura Indonesiana*. 18: 55-61.
- Heng, L., & Lei, W. 1998. On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 16(4): 333-338.
- Huang, H., Pan, L., Pan, S., & Song, M. 2018. The feasibility of using primary shrimp hemocyte culture to screen herbal immunostimulants. *Aquaculture international*. 26 (3): 799-811.
- Istiqomah, I., Isnansetyo, A., Triyanto, T., Nitimulyo, K. H., & Murdjani, M. 2006. Patogenisitas *Vibrio fluvialis* 24SK terhadap Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*. 8 (1): 17-24.
- Jiravanichpaisal, P., Luel, L. B., & Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonisation. *Immunobiology*. 211: 213–236.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Soderhall, K. 2000. Crustacean hemocytes and haemotopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.
- Johansson, E., Mejlhede, N., Neuhard, J., & Larsen, S. 2002. Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*. 41(8): 2563-2570.

- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture : The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274 (1): 1-14.
- Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. 2000. Polyphenoloxidase. Di dalam: Haard NF, Simpson BK, editor. *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. New York: Marcel Dekker, Inc. hlm 271-316.
- KKP. 2018. KKP Targetkan Produksi Udang Budidaya Sebanyak 700000 ton Tahun ini. <https://industri.kontan.co.id/news/kkp-targetkan-produksi-udang-budidaya-sebanyak-700000-ton-tahun-ini>, 15 Agustus 2018.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R., & Leobert, D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*. 91(1-2): 1-13.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish & shellfish immunology*. 45(1): 2-12.
- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. 2014. Probiotics–pathogen interactions elicit differential regulation of cutaneous immune responses in epidermal cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Fish & shellfish immunology*. 36 (1): 113-119.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Rajan, B., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. 2010. Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2 (2): 126-134.
- Lin, C. Y., Hu, K. Y., Ho, S. H., & Song, Y. L. 2006. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. *Dev Comp Immunol*. 30: 1132-1144.
- Ma, C. W., Cho, Y. S., & Oh, K. H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*. 287(3-4): 266-270.
- Mansour, A. T., & Esteban, M. Á. 2017. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology*, 64, 202-209.
- Mariska, D. C. 2013. Penapisan Kandidat Bakteri Biokontrol dari Perairan Tambak Udang Tradisional terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. [Skripsi]. Universitas Lampung, Lampung.

- Martin, G. G., & Graves, B. L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of morphology*. 185 (3): 339-348.
- Martin, G. G., Rubin, N., & Swanson, E. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Diseases of aquatic organisms*. 60 (1): 21-29.
- Moriarty, D. J. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In *Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology*. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. pp. 237-243.
- Motoh, H. 1985. *Biology and ecology of Penaeus monodon*. In Taki, Y., Primavera, J.H., and Llobrera J. A. (Eds.). *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimp*. 4-7 December 1984, Iloilo City, Philippines (pp. 27-36). Iloilo City, Philippines. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Ninawe, A. S., & Selvin, J. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Critical reviews in microbiology*. 35(1): 43-66.
- Nasi, L., Prayitno, S. B., & Sarjito. 2012. *Kajian Bakteri Penyebab Vibriosis pada Udang secara Biomolekuler. [Disertasi]*. Magister Manajemen Sumberdaya Pantai, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Novitasari, A., Iskandar, R.N., Elvazia, H.A., Harpeni, E., Tarsim, & Wardiyanto. 2017. Efektivitas Pemberian *Bacillus* sp. D2.2 pada Media Teknis Molase terhadap Kualitas Air dan Performa Pertumbuhan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Biospecies*. 10(2) : 50-59.
- Nurhaeda. 2017. *Penggunaan RNA Untai Ganda (dsRNA) Protein Permukaan 19 (VP19) White Spot Syndrome Virus (WSSV) Untuk Pengendalian Infeksi Virus WSSV Pada Udang Vaname Penaeus Vannamei. [Tesis]*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Pantjara, B., Nawang, A., Usman, & Rachmansyah. 2010. Budidaya Udang Vaname Sistem Bioflok. *Media Akuakultur*. 5(2) : 93-97.
- Parentrengi, A., Tenriulo, A., & Tampangallo, B. R. 2013. Uji tantang udang windu, *Penaeus monodon* transgenik menggunakan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. *Konferensi Akuakultur Indonesia*. 226-233.
- Parlina, I., Nasirin, N., Ihsan, I. M., Suharyadi, S., Syaputra, A., Budiani, S., & Hanif, M. 2018. Perbandingan Pengelolaan Lingkungan pada Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Aplikasi Anorganik Chelated dengan Probiotik. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 19(1), 33-40.

- Permatasari, D. 2017. Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 Dalam Sinbiotik Terhadap Respon Imun Seluler Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*). [Skripsi]. Universitas Lampung, Lampung.
- Putri, F. M. 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.
- Ramadhani, I.S., Harpeni, E., Tarsim, & Santoso, L. 2017. Potensi Sinbiotik Lokal Terhadap Respon Imun Non Spesifik Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Depik*. 6(3) : 221-227.
- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., & Vignesh, V. S. 2015. Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*. 45 (2): 268-276.
- Ramu, K., & Zakaria, S. 2000. Defence mechanism in crustacean. *Infofish International*. 5 : 30 –32.
- Rodriguez, L., & Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191 (1-3): 109-119.
- Romano, N., Koh, C., & Ng, W. K. 2015. Dietary Microencapsulated Organic Acids Blend Enhances Growth, Phosphorus Utilization, Immune Response, Hepatopancreatic Integrity and Resistance Against *Vibrio harveyi* in White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 435 : 228–236.
- Ruwandeeepika, H.A.D., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban, Bhowmick P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture*. 4(2): 59–74.
- Sari, R.R.B., Sarjito, A.H.C., & Haditomo. 2015. Pengaruh Penambahan Serbuk Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*) dalam Pakan terhadap Kelulushidupan dan Histopatologi Hepatopankreas Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*) yang Diinfeksi Bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 4(1) : 26-32.
- Sarjito, N., Radjasa, O. K., & Prayitno, S. B. 2012. Application of repetitive sequence-based PCR on the richness of vibrio on the tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). *J. of Coastal Development*. 15(3): 303-309.

- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., & Verreth, J.A.J. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquaculture Engineering*. 32 (3-4): 379–401.
- Septiani, D.R. 2016. Uji Kinetika Dan Aktivitas Antibakteri Dari Bakteri Biokontrol D2.2 Pada Salinitas dan pH yang Berbeda. [*Skripsi*]. Universitas Lampung, Lampung.
- Setyawan, A., Harpeni, E., Ali, M., Mariska, D. C., & Aji, M. B. 2014. Potensi Agen Bakteri Biokontrol Indigenous Tambak Tradisional Udang Windu (*Penaeus monodon*) di Lampung Timur Strain D2.2, Terhadap Bakteri Patogen Pada Udang dan Ikan. *Prosiding Pertemuan Ahli Kesehatan Ikan 2014*, Serang 11-13 Februari 2014.
- Sneha, K.G., Anas, A., Jayalakshmy, K.V., Jasmin, C., Vipin Das, P.V., Pai, S.S., Pappu, S., Nair, M., Muraleedharan, K.R., Sudheesh, K., & Nair, S. 2016. Distribution of multiple antibiotic resistant *Vibrio* spp across Palk Bay. *Regional Studies in Marine Science*. 3 : 242-250.
- SNI 8037.1. 2014. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*), Bagian 1: Produksi induk model *indoor*. Jakarta, Badan Standardisasi Nasional.
- Soderhall, K. & Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 3-23.
- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C., & Lin, M.N. 2003. Hemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura Syndrome Virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 14 (4): 317-331.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., & Lozano, R. 2010. ‘Bright-red’ syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*. 92 (1): 11-19.
- Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*. 191 (1-3): 53-69.
- Supono. 2017. *Teknologi Produksi Udang*. Plantaxia, Yogyakarta. 163 hal.
- Sugumaran, M., & Nellaiappan, K. 2000. Characterization of a new phenoloxidase inhibitor from the cuticle of *Manduca sexta*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 268 (2): 379–383.
- Syahailatua, D.Y. 2009. Seleksi Bakteri Probiotik sebagai Stimulator Sistem Imun pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). [*Thesis*]. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Thompson, F. L., Austin, B., & Swings, J. 2006. *The biology of vibrios*. ASM press. 455 pp.
- Utami, W. 2016. Pengaruh Salinitas Terhadap Efek Infeksi *Vibrio Harveyi* Pada Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 5(1): 82-90.
- Van de Braak, C.B., Taveme, N., Botterblom, M.H.A., Van der Knaap, W.P.W., & Rombout, J.H.W.M. 2000. Characterisation of Different Morphological Features of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Haemocytes Using Monoclonal Antibodies. *Fish shellfish immunology*. 10 (6): 515-530.
- Van de Braak, C. B. T., Botterblom, M. H. A., Liu, W., Taverne, N., Van der Knaap, W. P. W., & Rombout, J. H. W. M. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & shellfish immunology*. 12 (3): 253-272.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., & Zenteno, E. 2009. Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity*. 15(3): 179-188.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64 (4): 655-671.
- Wang, F.I., & Chen, J.C. 2006. The immune respons of Tiger shrimp *Penaeus monodon* and susceptibility to *Photobacterium damsela* subs. *Damselae*. *Fish and Shellfish Immunology*. 20 (5): 671-681.
- Wang, J.C., Chang, P.S., & Chen, H.Y. 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3 glucan. *Fish & Shellfish Immunology*. 24 (1): 113-121.
- Wang, X. W., Zhao, X. F., & Wang, J. X. 2014. C-type lectin binds to α -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *Journal of Biological Chemistry*. 289 (4): 2405-2414.
- Widanarni, W., Sukenda, S., & Setiawati, M. 2008. Bakteri Probiotik Dalam Budidaya Udang: Seleksi, Mekanisme Aksi, Karakterisasi, dan Aplikasinya Sebagai Agen Biokontrol. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 13 (2): 80-89.
- Wijayanti, A., Dwinitasari, N., Febriyani, U., Harpeni, E., & Wardiyanto. 2018. Analisis Uji Tantang Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang

Diberi Bakteri Probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan Ekstrak Ubi Jalar sebagai Sinbiotik. *Biospecies*. 11(2) : 63-71.

- Witteveldt, J., Vlak, J. M., & van Hulst, M. C. W. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Journal of Virology*. 78 (4): 2057-2061.
- Xu, W. J., & Pan, L. Q. 2014. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 426: 181-188.
- Yang, C. C., Lu, C. L., Chen, S., Liao, W. L., & Chen, S. N. 2015. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*. 44(1): 265-271.
- Yuniasari D. 2009. Pengaruh pemberian bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi serta molase dengan C/N rasio berbeda terhadap profil kualitas air, kelangsungan hidup, dan pertumbuhan udang vaname *Litopenaeus vannamei*. [Skripsi]. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.