

**PROFIL RESPON IMUN NONSPESIFIK LOBSTER AIR TAWAR
Cherax quadricarinatus (VON MARTENS, 1868) DENGAN PEMICU PAKAN
BERBASIS BUNGKIL INTI SAWIT FERMENTASI (BISF)**

(Skripsi)

**Oleh :
HILMA NAHWA FIRDAUSI
2014111007**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRACT

PROFILE OF NONSPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN REDCLAW CRAYFISH *Cherax quadricarinatus* (VON MARTENS, 1868) WITH FEED TRIGGER BASED ON FERMENTED PALM KERNEL MEAL (FPKM)

By

HILMA NAHWA FIRDAUSI

The enhancement of the immune system in crayfish during aquaculture activities has been extensively conducted to prevent the risk of disease attacks caused by pathogens. One of the efforts to increase immune response is through the application of prebiotics in feed. One source of prebiotics that can be applied is fermented palm kernel meal (FPKM). The aim of this study was to evaluate the profile of the nonspecific immune response of crayfish fed a feed formulated with FPKM. The study was conducted from September-November 2023 at the Fishculture Laboratory, University of Lampung. The method used in this research was a completely randomized design (CRD) consisting of 4 treatments with 3 replicates each. The test subjects were red-claw crayfish (*C. quadricarinatus*) with an average weight of $10,3 \pm 0,15$ g. The research was carried out by feeding the crayfish with an FPKM-based feed for 14 days. Hemolymph samples were taken on day 0 (before treatment), day 3, day 5, day 7, and day 14 post-treatment. The feeding of the FPKM-based feed showed an enhancement in the nonspecific immune response of the crayfish. This was evidenced by increases in parameters such as total haemocyte count (THC), phagocytic activity (PA), phagocytic index (PI), superoxide dismutase (SOD) activity, and phenoloxidase (PO) activity, with the best results observed in the treatment with 120 g/kg FPKM substitution in the feed. The up-regulation of immune-related genes, indicated by the increased expression of lectin and LGBP genes, showed the best results in the treatment with 40 g/kg FPKC substitution in the feed. The highest increase in immune response occurred on the 7th day post-treatment.

Keywords : nonspecific immune response, palm kernel cake, prebiotics, redclaw crayfish

ABSTRAK

PROFIL RESPON IMUN NONSPESIFIK LOBSTER AIR TAWAR *Cherax quadricarinatus* (VON MARTENS, 1868) DENGAN PEMICU PAKAN BERBASIS BUNGKIL INTI SAWIT FERMENTASI (BISF)

Oleh

HILMA NAHWA FIRDAUSI

Peningkatan imun lobster air tawar pada kegiatan budi daya telah banyak dilakukan guna mencegah resiko serangan penyakit akibat patogen, salah satu upaya peningkatan respon imun yang dapat dilakukan yaitu dengan aplikasi prebiotik melalui pakan. Salah satu sumber prebiotik yang dapat diaplikasikan salah satunya bersumber dari bungkil inti sawit fermentasi (BISF). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi profil respon imun nonspesifik lobster air tawar yang diberi pakan dengan formulasi berbasis BISF. Penelitian ini dilakukan pada bulan September-November 2023 di Laboratorium Budidaya Perikanan, Universitas Lampung. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dan terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 ulangan. Hewan uji yang digunakan adalah lobster air tawar (*C. quadricarinatus*) berukuran $10,3 \pm 0,15$ g. Penelitian ini dilakukan dengan mengaplikasikan pakan berbasis BISF selama 14 hari masa pemeliharaan. Pengambilan sampel hemolim dilakukan pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-3, hari ke-5, hari ke-7, dan hari ke-14 setelah perlakuan. Pemberian pakan berbasis BISF menunjukkan adanya peningkatan respon imun nonspesifik pada lobster air tawar. Hal tersebut dapat dilihat melalui peningkatan pada parameter *total haemocyte count* (THC), aktivitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), aktivitas *superoxide dismutase* (SOD), aktivitas *phenoloxide* (PO) dengan hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan dengan substitusi BISF sebanyak 120 g/kg pada pakan. Peningkatan gen-gen imun ditandai dengan *up*-regulasi ekspresi gen lektin dan LGBP dengan hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan dengan substitusi BISF sebanyak 40 g/kg pakan. Peningkatan respon imun tertinggi terjadi pada hari ke-7 setelah perlakuan.

Kata kunci : Bungkil inti sawit, lobster air tawar, prebiotik, respon imun nonspesifik

**PROFIL RESPON IMUN NONSPESIFIK LOBSTER AIR TAWAR *Cherax
quadricarinatus* (VON MARTENS, 1868) DENGAN PEMICU PAKAN
BERBASIS BUNGKIL INTI SAWIT FERMENTASI (BISF)**

Oleh

Hilma Nahwa Firdausi

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Skripsi : **PROFIL RESPON IMUN NONSPESIFIK LOB-
STER AIR TAWAR *Cherax quadricarinatus*
(VON MARTENS, 1868) DENGAN PEMICU
PAKAN BERBASIS BUNGKIL INTI SAWIT
FERMENTASI (BISF)**

Nama Mahasiswa : **Hilma Nahwa Firdausi**


Nomor Pokok Mahasiswa : 2014111007

Jurusan/Program Studi : Perikanan dan Kelautan

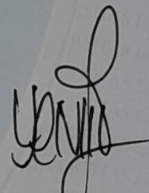
Fakultas : Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

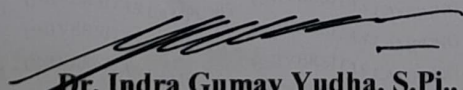


Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P
NIP. 198408052009121003



Yeni Elisdiana, S.Pi., M.Si.
NIP. 199003182019032026

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung

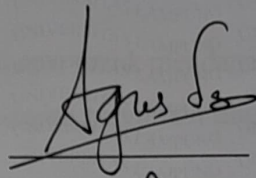


Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si
NIP. 197008151999031001

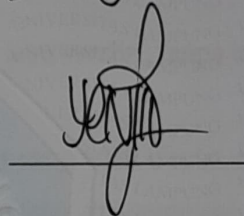
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

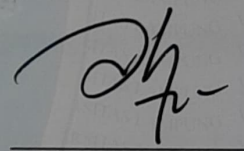
Ketua : Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P



Sekretaris : Yeni Elisdiana, S.Pi., M.Si.



Penguji
Bukan Pembimbing : Ir. Siti Hudaidah, M.Sc



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Ir. Kuswanto Futas Hidayat, M.P.

NIP. 196411181989021002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 2 Mei 2024

PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis/skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik sarjana baik di Universitas Lampung maupun 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 orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan naskah, dengan naskah disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di 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 sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandarlampung, Juli 2024

Yang membuat pernyataan,



Hilma Nahwa Firdausi

NPM. 2014111007

RIWAYAT HIDUP

Penulis memiliki nama lengkap Hilma Nahwa Firdausi. Lahir pada tanggal 5 Juli 2002 di Pekalongan, Lampung Timur. Penulis menempuh pendidikan formal di TK Aisyah Bustanul Atfal pada tahun 2006-2007, SD Negeri Ciparigi Bogor pada tahun 2008-2014, SMP Negeri 8 Bogor pada tahun 2014-2017, SMA Negeri 6 Bogor pada tahun 2017-2018, dan SMA Negeri 1 Kalirejo pada tahun 2018-2020. Penulis melanjutkan pendidikan strata-1 (S1) pada Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah Biologi Organisme Akuatik (2021), Fisiologi Ikan (2022), dan Fisiologi Pengenalan Larva Ikan (2022). Penulis melakukan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Januari-Februari 2023 di Dusun Karya Penggawa, Kecamatan Menyancang, Pesisir Barat. Penulis mengikuti kegiatan MBKM Pertukaran Pelajar pada tahun 2022 di Universitas Sriwijaya dan MBKM Riset di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Universitas Lampung pada tahun 2023. Penulis juga aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan dan pernah menjabat sebagai Bendahara Bidang Pengabdian Masyarakat periode 2023.

PERSEMBAHAN

Puji syukur hanya kepada Allah SWT Tuhan semesta alam yang telah melimpahkan rahmat, kekuatan, serta karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Dengan kerendahan hati, kupersembahkan skripsi ini sebagai tanda bukti dan kasih cintaku yang tulus dan mendalam kepada:

Kedua orang tua yang selalu memberikan doa, dukungan, nasihat, serta upaya demi tercapainya cita-citaku. Saya ucapkan terima kasih dan semoga Allah selalu melimpahkan kesehatan, keberkahan, dan rezeki dalam setiap langkah orang tua saya.

Kepada sahabat dan teman-teman yang senantiasa kebersamai selama ini.

&

Almamater tercinta,
Universitas Lampung.

MOTO

Dan Dia bersama kamu dimana saja kamu berada. Dan Allah Maha Melihat apa yang kamu kerjakan.

(Q.S. Al-Hadid: 4)

“Keep on going with your silly dream
Life is prettier than it may seem.”

(Laufey)

SANWACANA

Segala puji bagi Allah atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat pada waktunya dan tidak terkendala apapun. Sholawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladan yang senantiasa dinantikan syafaatnya kelak. Skripsi ini berjudul "Profil Respon Imun Nonspesifik Lobster Air Tawar *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) dengan Pemicu Pakan Berbasis Bungkil Inti Sawit Fermentasi (BISF)" sebagai salah satu persyaratan dan bentuk tanggung jawab penulis untuk meraih gelar Sarjana Perikanan (S.Pi). Penyusunan skripsi ini tak luput dari banyak sekali bantuan doa, bimbingan, serta pertolongan, baik materil maupun moril dari berbagai pihak selama pelaksanaan. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, yaitu:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
2. Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
3. Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P. selaku Pembimbing Utama yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
4. Yeni Elisdiana S.Pi., M.Pi. selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini

5. Ir. Siti Hudaidah, M.Sc. selaku Penguji Utama yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
6. Deny Sapto Chondro Utomo, S.Pi.,M.Si. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
7. Dosen-dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat dan pengalaman hidup kepada penulis selama penulis menjadi mahasiswa.
8. Kedua orang tua tercinta yang selalu memberikan doa, semangat, kasih sayang, dukungan serta motivasi yang luar biasa.
9. Sahabat terdekat saya (Astrid, Aqilah, Nia, Tata, Rindi, Rani, Shinta dan Yoseva) yang senantiasa menemani penulis belajar semasa kuliah.
10. Keluarga besar Perikanan dan Kelautan 2020 yang telah memberikan kenangan selama masa perkuliahan.
11. Semua pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah banyak membantu selama pembuatan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk semua pihak.

Bandarlampung, Juli 2024

Hilma Nahwa Firdausi

DAFTAR ISI

	Halaman
SANWACANA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Kerangka Pikir Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Biologi Lobster Air Tawar	8
2.1.1 Klasifikasi Lobster Air Tawar.....	8
2.1.2 Morfologi Lobster Air Tawar.....	8
2.1.3 Siklus Hidup Lobster Air Tawar	10
2.1.4 Habitat Lobster Air Tawar	10
2.1.5 Penyakit Lobster Air Tawar	11
2.2 Sistem Imunitas Lobster Air Tawar	12

2.3 Ekspresi Gen Imun	13
2.4 Bungkil Inti Sawit Fermentasi (BISF).....	14
2.5 Mannan Oligosakarida (MOS)	15
III. METODOLOGI	17
3.1 Waktu dan Tempat	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.3 Rancangan Penelitian.....	19
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	19
3.4.1 Pembuatan BISF	19
3.4.2 Pembuatan Pakan	20
3.4.3 Analisis Proksimat	21
3.4.4 Persiapan Wadah Penelitian dan Lobster Uji.....	21
3.4.5 Pemeliharaan Lobster.....	22
3.4.6 Pengambilan Hemolim.....	22
3.5 Parameter yang Diamati.....	22
3.5.1 <i>Total Haemocyte Count</i> (THC).....	22
3.5.2 <i>Differential Haemocyte Count</i> (DHC).....	23
3.5.3 Aktivitas Fagositosis dan Indeks Fagositosis	23
3.5.4 Aktivitas PO (<i>Phenoloxidase</i>).....	23
3.5.5 Aktivitas SOD (<i>Superoxide Dismutase</i>)	23
3.5.6 Total Protein Plasma	24
3.5.7 Ekspresi Gen Imun.....	24
3.6 Analisis Data	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Hasil	28
4.1.1 <i>Total Haemocyte Count</i> (THC).....	28
4.1.2 Aktivitas Fagositosis.....	29
4.1.3 Indeks Fagositosis	30

4.1.4 <i>Differential Haemocyte Count (DHC)</i>	31
4.1.5 Aktivitas <i>Superoxide Dismutase (SOD)</i>	32
4.1.6 Aktivitas <i>Phenoloxide (PO)</i>	33
4.1.7 Total Protein Plasma	34
4.1.8 Ekspresi Gen Imun.....	35
4.2 Pembahasan.....	36
V. SIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Simpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Kerangka pikir	5
2.	Morfologi lobster air tawar (<i>C. quadricarinatus</i>)	10
3.	Siklus hidup lobster air tawar.....	11
4.	Sel-sel hyalin, semi granular, granular.....	14
5.	Tata letak wadah penelitian.....	20
6.	Rata-rata nilai THC pada lobster air tawar	28
7.	Rata-rata nilai AF pada lobster air tawar	29
8.	Rata-rata nilai IF pada lobster air tawar.....	30
9.	Rata-rata nilai sel hyalin pada lobster air tawar.....	31
10.	Rata-rata nilai sel granular pada lobster air tawar	32
11.	Rata-rata nilai SOD pada lobster air tawar.....	33
12.	Rata-rata nilai PO pada lobster air tawar.....	34
13.	Rata-rata nilai TPP pada lobster air tawar	35

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Alat-alat penelitian.....	17
2.	Bahan-bahan penelitian.....	18
3.	Formulasi bahan baku pakan uji	20
4.	Primer gen imun lobster air tawar.....	25
5.	Komposisi bahan sintesis cDNA	26
6.	Komposisi bahan qPCR	26
7.	Kondisi qPCR	27
8.	Nilai ekspresi gen (<i>fold change</i>) lobster air tawar	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Hasil uji proksimat pakan	54
2.	Gambar sel hemosit pada LAT	54
3.	Nilai CT ekspresi gen imun	54
4.	Uji statistik THC	55
5.	Uji statistik DHC.....	59
6.	Uji statistik AF	65
7.	Uji statistik IF	69
8.	Uji statistik aktivitas PO	73
9.	Uji statistik aktivitas SOD	76
10.	Uji statistik TPP.....	78

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lobster air tawar saat ini menjadi komoditas perikanan penting di Indonesia maupun global. Produksi lobster air tawar mengalami peningkatan dari 150.000 metrik ton/tahun menjadi lebih dari 850.000 metrik ton/tahun di seluruh dunia (Núñez-Amao *et al.*, 2018). Salah satu jenis lobster air tawar yang banyak dibudidayakan adalah *Cherax quadricarinatus* atau biasa dikenal dengan lobster air tawar capit merah. Lobster air tawar memiliki potensi yang besar untuk dibudidayakan karena digemari masyarakat. Permintaan terhadap lobster air tawar cukup tinggi baik pada pasar lokal maupun internasional. Hingga saat ini produksi lobster air tawar belum maksimal, karena beberapa kendala pada kegiatan budi daya. Salah satu kendala dalam kegiatan budi daya lobster air tawar adalah serangan penyakit.

Serangan penyakit terjadi karena pengaruh lingkungan budi daya, seperti padat tebar yang tinggi sehingga menyebabkan kualitas air yang tidak terjaga. Beberapa penyakit yang dilaporkan sering menyerang lobster air tawar antara lain adalah *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) (Hayakijkosol & Owens, 2012), *yellow head virus* (YHV) (Tirasophon *et al.*, 2005), *C. quadricarinatus parvo-like virus* (CqPV) (Bowater *et al.*, 2002), *white spot syndrome virus* (WSSV) (Neuhaus *et al.*, 2022), penyakit ekor melepuh yang disebabkan oleh *A. hydrophila* (Nurhayati, 2008; Haya-kijkosol *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021). Upaya pencegahan serangan penyakit

pada lobster air tawar adalah dengan peningkatan sistem imun. Peningkatan sistem imun dapat dilakukan salah satunya dengan pemberian prebiotik pada pakan.

Prebiotik secara umum diartikan sebagai suatu bahan makanan yang tidak dapat dicerna dan memberikan pengaruh menguntungkan bagi inang dengan cara bekerja sama dengan satu atau beberapa jenis mikroba menguntungkan (probiotik) dalam pencernaan (Masrukan, 2020). Prebiotik banyak digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan maupun sistem imun pada ikan. Prebiotik bersimbiosis dengan mikroflora di dalam usus sehingga mengakibatkan terusirnya bakteri patogen pada saluran pencernaan (Haryati, 2011). Jenis prebiotik yang telah banyak diaplikasikan yaitu frukto oligosakarida (FOS), mannan oligosakarida (MOS), inulin, dan β -glukan.

Salah satu sumber MOS yang dapat diaplikasikan pada lobster air tawar berasal dari bungkil inti sawit fermentasi (BISF). Fermentasi yang dilakukan pada bungkil inti sawit (BIS) dapat mendegradasi mannan dengan menghasilkan enzim pendegradasi mannan. Enzim pendegradasi mannan kemudian akan mengubah mannan menjadi mannan oligosakarida (MOS) (Singh *et al.*, 2018). Penelitian Sang *et al.* (2009) membuktikan efektivitas pemberian mannan oligosakarida (MOS) yang berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* meningkatkan status kesehatan, meningkatkan kemampuan melawan patogen dan kondisi stres pada lobster air tawar jenis *Cherax tenuimanus*.

Fermentasi BIS dengan bantuan kapang *Aspergillus niger* dilakukan untuk menurunkan kandungan serat kasar yang tinggi. Kandungan serat yang tinggi akan menyebabkan BIS sulit untuk dicerna karena keterbatasan enzim yang mampu menghidrolisis serat kasar dalam pencernaan ikan atau krustasea. Berdasarkan pada hasil uji pendahuluan, fermentasi menggunakan *Aspergillus niger* dapat mengurangi jumlah serat kasar sebesar 21% dan meningkatkan protein kasar sebesar 86%. Selain sebagai prebiotik pada pakan, BISF dapat dijadikan bahan baku alternatif pengganti tepung bungkil kedelai. Saat ini, kebutuhan terhadap tepung bungkil kedelai sebagai bahan baku pakan sangat tinggi. Menurut Kemendag (2022) Indonesia mengimpor tepung

bungkil kedelai sebesar 7,53 juta ton atau senilai USD 3 milyar pada tahun 2020, sehingga untuk mengurangi impor tersebut dibutuhkan bahan baku alternatif yang lebih terjangkau.

Berdasarkan latar belakang tersebut, MOS yang berasal dari BISF memiliki potensi yang besar untuk digunakan sebagai prebiotik pada pakan. Namun, hingga saat ini belum ada kajian penambahan MOS yang berasal dari bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada krustasea baik untuk performa pertumbuhan maupun ketahanan tubuh (respon imun). Penelitian ini diharapkan menjadi pionir dalam kajian substitusi BISF untuk respon imun lobster air tawar.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi profil respon imun nonspesifik lobster air tawar yang diberi pakan dengan formulasi berbasis BISF.

1.3 Manfaat Penelitian

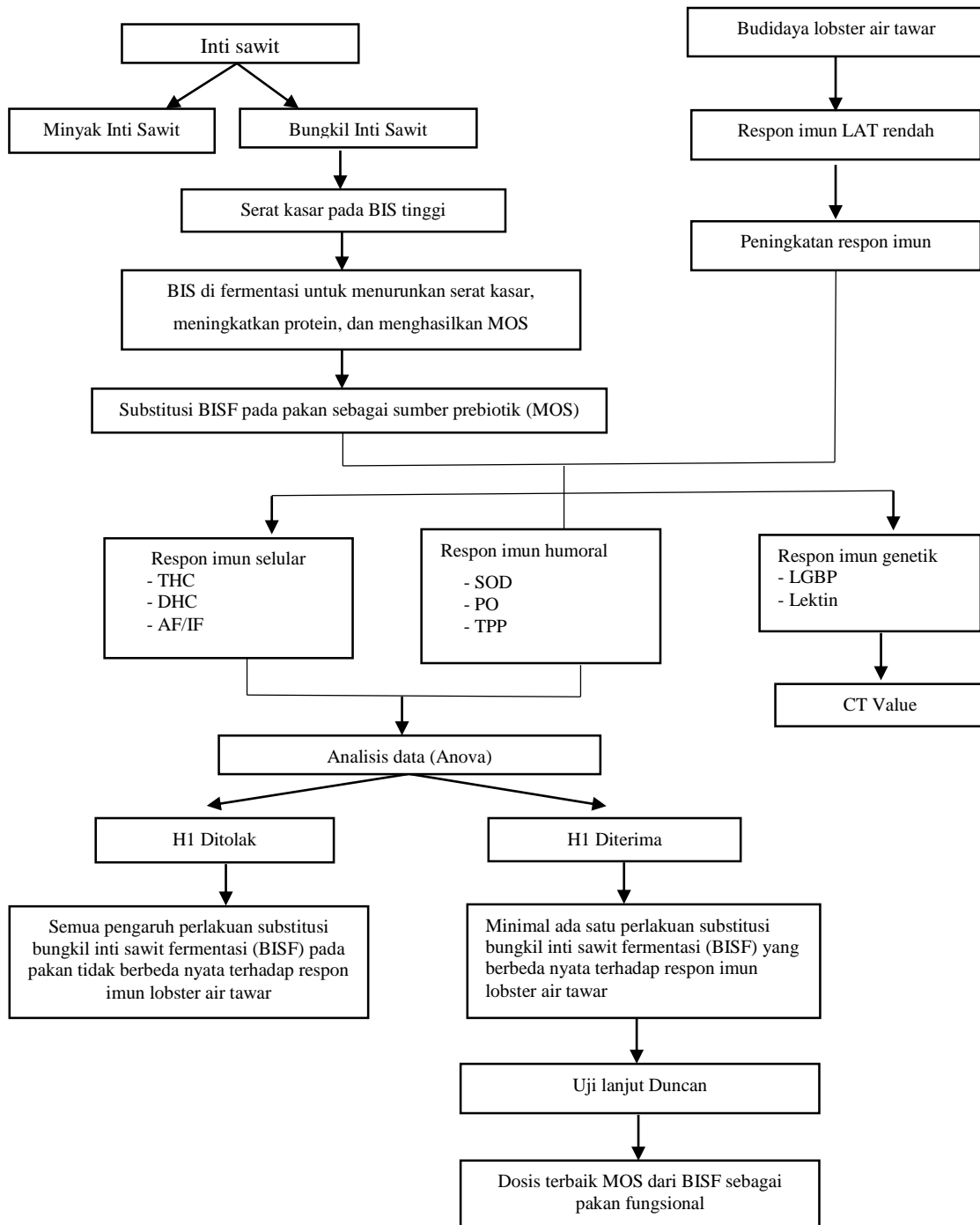
Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi bagi mahasiswa dan pembudidaya dalam melakukan upaya peningkatan respon imun terhadap lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*).

1.4 Kerangka Pikir Penelitian

Lobster air tawar menjadi komoditas unggulan karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Hal tersebut membuat permintaan lobster air tawar terus naik setiap tahunnya. Untuk memenuhi permintaan tersebut perlu dilakukan peningkatan produksi, namun dalam melakukan kegiatan budi daya seringkali mengalami hambatan yang dapat mengakibatkan kerugian. Salah satu penyebab terjadinya kerugian tersebut adalah karena terserang penyakit. Penyakit dapat menyerang lobster air tawar karena masuknya patogen kedalam tubuh lobster. Patogen tersebut dapat berasal dari lingkungan kegiatan budi daya yang buruk serta rendahnya sistem imun lobster air tawar yang menjadikan lobster mudah terserang penyakit.

Upaya untuk meningkatkan sistem imun lobster air tawar dapat dilakukan dengan pemberian prebiotik. Berbagai penelitian telah membuktikan aplikasi prebiotik dapat meningkatkan sistem imun secara signifikan. Penambahan prebiotik tersebut dapat meningkatkan jumlah bakteri baik pada pencernaan sehingga dapat meningkatkan sistem imun pada lobster. Prebiotik dapat dijadikan sebagai sumber energi bagi bakteri menguntungkan dalam usus sehingga terusirnya bakteri patogen. Prebiotik komersil yang telah banyak digunakan dalam akuakultur antara lain yaitu FOS, MOS dan β -inulin. Salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai prebiotik untuk meningkatkan imun lobster yaitu bungkil inti sawit yang difermentasi menggunakan *Aspergillus niger*.

Bungkil inti sawit fermentasi (BISF) memiliki kandungan mannan oligosakarida (MOS). MOS berperan sebagai prebiotik dan memperbaiki kondisi mikrobioflora pada usus, sehingga meningkatkan sistem imun dan mencegah terjadinya gangguan pada pencernaan. MOS yang terdapat dalam BISF berpotensi untuk dijadikan prebiotik alami pada pakan ikan atau krustasea. Namun, hingga saat ini belum ada kajian yang membahas penambahan MOS dari BISF pada pakan krustasea. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian lebih lanjut terkait pengaruh substitusi BISF pada pakan terhadap respon imun lobster air tawar. Secara umum kerangka pikir penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir

1.5 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. Hipotesis Parameter Respon Imun Selular

a. *Total Haemocyte Count* (THC)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap THC lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap THC lobster air tawar.

b. *Differential Haemocyte Count* (DHC)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap DHC lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap DHC lobster air tawar.

c. Aktifitas Fagositosis (AF)/Indeks Fagositosis (IF)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap AF/IF lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap AF/IF lobster air tawar.

2. Hipotesis Parameter Respon Imun Humoral

a. Aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas SOD lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas SOD lobster air tawar.

b. Aktivitas *Phenoloksidase* (PO)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas PO lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas PO lobster air tawar.

c. Total Protein Plasma (TPP)

H_0 : semua $\tau_i = 0$ = Semua pengaruh perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap TPP lobster air tawar.

H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$ = Minimal ada satu perlakuan substitusi bungkil inti sawit fermentasi (BISF) pada pakan yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap TPP lobster air tawar.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Lobster Air Tawar

2.1.1 Klasifikasi Lobster Air Tawar

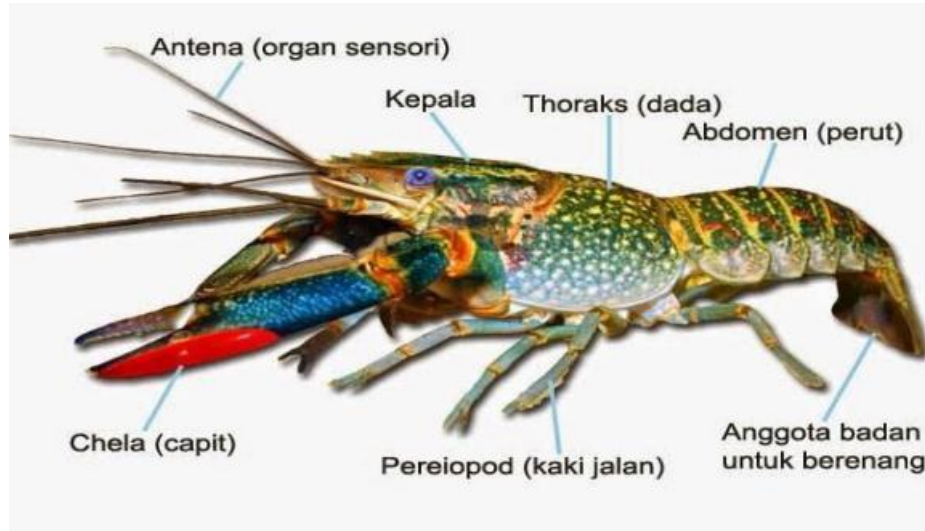
Lobster air tawar termasuk dalam subfilum Crustacea dengan ordo Decapoda. Umumnya lobster air tawar yang banyak dikenal dan dipelihara berasal dari tiga keluarga besar, yaitu Astacidae, Cambaridae, dan Parastacidae. Menurut Lukito & Prayugo (2007), klasifikasi salah satu jenis lobster air tawar dari genus *Cherax* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Arthropoda
Sub Filum : Crustaceaea
Kelas : Malacostraca
Ordo : Decapoda
Sub Ordo : Pleocymata
Famili : Parastacidae
Genus : *Cherax*
Species : *Cherax quadricarinatus*

2.1.2 Morfologi Lobster Air Tawar

Lobster air tawar memiliki tubuh yang terbagi menjadi dua bagian, yakni kepala (*cephalothorax*) dan badan (*abdomen*). Antara kepala bagian depan dan bagian belakang dikenal dengan nama *subcephalothorax*. Cangkang yang menutupi kepala disebut karapak (*carapace*) yang berperan dalam melindungi organ tubuh, seperti

otak, insang, hati, dan lambung. Morfologi lobster air tawar dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi lobster air tawar (*C. quadricarinatus*)

Sumber : Lukito & Prayugo, 2007

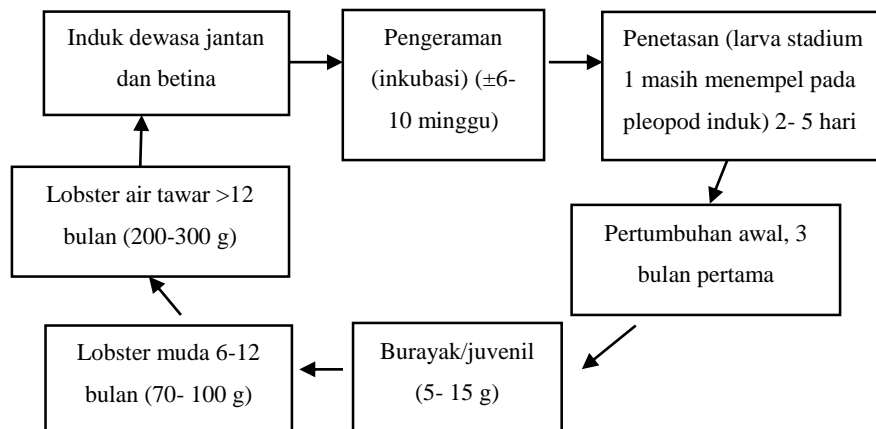
Ciri lain yang terdapat pada lobster air tawar adalah rostrumnya yang berbentuk hampir seperti segitiga memipih, lebar, dan terdapat duri di sekeliling rostrum tersebut. Menurut Iskandar (2003) dilihat dari organ tubuh luar, lobster air tawar memiliki beberapa alat pelengkap sebagai berikut :

- 1) Sepasang antena yang berfungsi sebagai indra perasa dan peraba terhadap pakan dan kondisi lingkungan.
- 2) Sepasang antenula yang berfungsi untuk mencium pakan, 1 mulut dan sepasang capit (*cheliped*) yang lebar dan berukuran lebih panjang dibandingkan dengan ruas dasar capitnya.
- 3) Ekor yang terdiri dari 1 ekor tengah (*telson*) berbentuk pipih, sedikit lebar dan memiliki duri-duri halus yang terletak disemua bagian tepi ekor, serta 2 pasang ekor samping (*uropod*) yang berbentuk pipih.

- 4) Lima ruas badan (*abdomen*) berbentuk agak pipih dan memiliki lebar rata-rata hampir sama dengan lebar kepala.
- 5) Empat pasang kaki renang (*pleopod*), yang berfungsi membantu dalam melakukan gerakan renang.
- 6) Empat pasang kaki jalan (*walking legs*).

2.1.3 Siklus Hidup Lobster Air Tawar

Lobster air tawar selama hidupnya mengalami beberapa tahapan, yaitu telur, calon anakan lobster, juvenil, dan lobster dewasa. Pada fase telur, telur lobster akan menempel pada kaki renang (*pleopod*) induk betina. Selama fase pengeraman warna telur berubah-ubah dimulai dari warna abu-abu, kuning, orange dengan bintik-bintik mata, kemudian menetas menjadi juvenile dan lepas dari induk. Menurut Wie (2006), proses perubahan ini berlangsung kurang lebih 35-45 hari. Setelah dipisahkan dari induk, juvenil akan melakukan molting berkali-kali hingga berusia 3 bulan, setelah itu frekuensi molting akan berkurang hingga dewasa secara bertahap. Siklus hidup lobster air tawar dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Siklus hidup lobster air tawar (*C. quadricarinatus*)

Sumber : Lukito & Prayugo (2007)

2.1.4 Habitat Lobster Air Tawar

Lobster air tawar adalah jenis hewan akuatik yang habitat alaminya adalah danau, sungai, rawa, dan saluran irigasi. Habitat alaminya membuat hewan ini bersifat endemik karena hanya ada satu spesies lobster air tawar yang hidup di habitat alaminya (Sukmajaya & Suharjo, 2003). Lobster air tawar dapat ditemukan di Australia, New Zealand, Papua, Amerika Serikat, Jepang, China, dan Eropa. Hewan-hewan ini termasuk hewan yang tahan terhadap cuaca buruk, misalnya pada musim kering mereka dapat hidup dalam tanah bahkan sampai kedalaman 5 cm, dan pada musim penghujan mereka keluar untuk mencari makan, memijah, dan bermigrasi (Iskandar, 2003).

Lobster air tawar merupakan spesies yang berasal dari daerah tropis yang banyak terdapat di Australia. Lobster air tawar tumbuh dengan baik pada suhu air 23-31°C, namun pertumbuhannya akan terganggu bila suhu air kurang dari 10°C atau lebih dari 36°C (Setiawan, 2010). Suhu air memiliki pengaruh yang besar untuk pertumbuhan lobster air tawar, bila suhu rendah pertumbuhan lobster akan semakin melambat. Selain itu suhu juga mempengaruhi lamanya waktu penetasan telur lobster air tawar. Bila suhu air normal telur akan menetas dalam waktu 5 minggu. Namun bila suhu air rendah, penetasan telur lobster membutuhkan waktu yang lebih lama antara 7–8 minggu (Setiawan, 2010).

2.1.5 Penyakit Pada Lobster Air Tawar

Menurut Edgerton (1999), *Cherax quadricarinatus* cukup rentan terhadap beberapa penyakit namun tidak sampai menyebabkan wabah yang luas. Beberapa penyakit yang dapat menyerang lobster air tawar antara lain berasal dari patogen seperti virus dan bakteri. Sejumlah virus termasuk *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) (Hayakijkosol & Owens, 2012), *yellow head virus* (YHV) (Tirasophon *et al.*, 2005), *C. quadricarinatus parvo-like virus* (CqPV) (Bowater *et al.*, 2002), *white spot syndrome virus* (WSSV) (Neuhaus *et al.*, 2022) telah dilaporkan menginfeksi *C. quadricarinatus*. Beberapa infeksi virus tak dikenal pada *C. quadricarinatus* juga telah dilaporkan namun dengan detail yang masih sedikit (Longshaw, 2011).

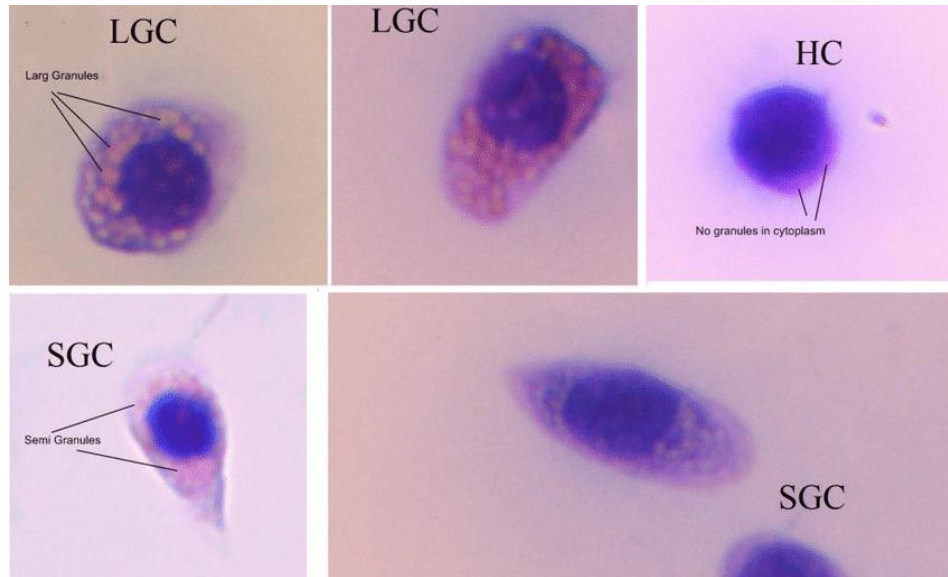
Penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan penyakit yang umum menyerang lobster air tawar. Bakteri yang diketahui cukup banyak menyerang lobster adalah *Vibrio mimicus* (Eaves & Ketterer, 1994), *A. hydrophila* (Nurhayati, 2008; Hayakijkosol *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021;), dan *C. cheraxi* (Romero & Jimenez, 2002). Bakteri *V. mimicus* merupakan patogen oportunistik yang dapat menyerang lobster air tawar melalui kondisi lingkungan yang buruk dan stres. *A. hydrophila* dapat menyebabkan penyakit ekor melepuh pada lobster air tawar sedangkan *C. cheraxi* merupakan bakteri mirip rickettsia yang diungkapkan pernah menyerang lobster air tawar di berbagai wilayah. Romero & Jimenez (2002) beranggapan bahwa penyakit yang disebabkan oleh *C. cheraxi* merupakan penyakit berbahaya yang telah banyak menyerang lobster air tawar di Ecuador.

2.2 Sistem Imunitas Lobster Air Tawar

Sistem kekebalan tubuh lobster air tawar sama dengan kekebalan tubuh hewan jenis krustasea. Sistem imun lobster air tawar bergantung pada sistem pertahanan nonspesifik sebagai pertahanan terhadap infeksi. Pada krustasea, kekebalan tubuh bawaan sangat penting mengingat krustasea tidak memiliki kekebalan adaptif. Meskipun hanya memiliki sistem imun nonspesifi, namun krustasea memiliki sistem imun yang cepat dan efektif dalam mengenali dan menghancurkan patogen. Pertahanan pertama terhadap penyakit pada udang dilakukan oleh hemosit melalui fagositosis, enkapsulasi, dan *nodule formation* (Ridlo & Pramesti, 2009). Dalam sistem kekebalan tubuh krustasea terdiri dari sistem fisika-kimia, humoral, dan selular.

Sistem imun pada krustasea sangat bergantung pada haemosit. Sel-sel haemosit pada krustasea dapat dibedakan menjadi sel hyalin (*HCS*), sel granular (*GCs*), dan sel semi granular (*SGCs*) yang memiliki karakteristik dan fungsi biologis yang berbeda-beda (Söderhäll & Cerenius, 1992). Hemosit memiliki peran dalam proses fagositosis, enkapsulasi, pembentukan nodul, dan sitotoksitas. Selain itu, haemosit juga melepaskan protein yang berfungsi untuk membunuh patogen berbahaya (Saputra, 2019). Menurut Rodriquez & Le Moullac (2000) hemosit juga berperan dalam penyembuhan

luka melalui *cellular clumping* serta membawa dan melepaskan *prophenoloxidase system* (*proPO*). Gambar hemosit pada udang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Sel-sel hyaline (HC), semi granulosit (SGC), granulosit (LGC).

Sumber : Kakoolaki *et al.* (2011)

Kim (2006) menggambarkan proses masuknya patogen ke dalam hemolim yang selanjutnya diikuti oleh reaksi pertahanan selular dan humoral. Molekul pengenalan dalam hemolim berperan dalam mengikat komponen dinding sel mikroba. Hal ini berkaitan dengan membran reseptor hemosit. Akibatnya hemosit mengalami degranulasi dan melepaskan molekul imun respon imun humoral seperti sistem *prophenoloxidase* (*proPO*), pembekuan hemosit, dan *antimicrobial peptides* (AMPs).

2.3 Ekspresi Gen Imun

Sistem imun pada udang terdiri dari respon imun seluler dan humoral yang disusun oleh beberapa molekul protein dan melibatkan banyak gen-gen yang terkait dengan sistem imun udang antara lain LGBP (*lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein*), TLR (*Toll-like reseptor*), lektin, *proPO*, dan sebagainya. Gen-gen imun lob-

ster seperti LGBP, TLR, proPO, dan lektin sangat penting untuk sistem kekebalan lobster. Gen-gen ini bekerja sama satu sama lain dalam berbagai proses, mulai dari pengenalan PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) pada patogen hingga penghancuran patogen dan pembentukan protein-protein antimikrobia (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Metode yang dapat dilakukan untuk mempresentasikan data *quantitative real-time PCR* adalah metode komparatif *Threshold cycle* (C_T) atau lebih dikenal dengan $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008). Prinsip metode komparatif C_T yaitu membandingkan nilai C_T dari sampel yang diminati dengan kontrol atau kalibrator. Jika efisiensi amplifikasi gen target dan gen referensi kira-kira sama, perhitungan $\Delta\Delta Ct$ valid. Keuntungan dari metode komparatif C_T adalah kemudahan dalam penggunaan dan penyajian data PCR yang disajikan dalam '*fold change*'.

2.4 Bungkil Inti Sawit Fermentasi (BISF)

Bungkil inti sawit (BIS) adalah limbah ikutan proses ekstraksi inti sawit. BIS berpotensi digunakan sebagai bahan pembuatan pakan sebagai sumber protein, vitamin dan mineral (Ketaren *et al.*, 1999). BIS memiliki kandungan zat-zat makanan yaitu protein kasar 15,40 %, lemak kasar 6,49 %, serat kasar 19,62 %, Ca 0,56 %, P 0,64 %, dengan energi metabolis 2446 kkal/kg (Noferdiman, 2011). Penggunaan BIS telah banyak diteliti, di antaranya sebagai pakan ikan mas (Amri, 2007), ikan lele (Nikhilani *et al.*, 2022) dan ransum boiler (Sukaryana *et al.*, 2011)

BIS berpotensi menjadi bahan pakan lokal untuk digunakan sebagai campuran bahan pakan ikan, hanya permasalahannya bahan tersebut mengandung serat kasar tinggi karena terdapat sebagian pecahan cangkang (kulit yang keras) (Ketaren *et al.*, 1999). Serat kasar yang tinggi tersebut mengakibatkan BIS sulit dicerna oleh ikan. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa bungkil inti sawit mengandung banyak nutrisi yang dapat dimanfaatkan tetapi karena keberadaa *non-starch polysaccharides* (NSP) seperti mannan dan xilan, dan zat anti nutrisi membuat pemanfaatan BIS menjadi rendah. Mannan menyusun 35% dinding sel BIS, namun mannan tersebut tidak bisa ter-

degradasi kecuali ditindaklanjuti oleh enzim β -mannanase, yang dapat mendegradasinya menjadi rantai yang lebih pendek sehingga mannan mudah dicerna (van Zyl *et al.*, 2010). Terdapat berbagai cara yang dapat dilakukan guna mendegradasi mannan yang terdapat pada BIS salah satunya adalah fermentasi.

Fermentasi dapat digunakan guna meningkatkan komposisi zat gizi atau nilai gizi pada produk sampingan agroindustri. Secara umum, biasanya hasil dari fermentasi mengandung senyawa yang lebih sederhana dan mudah dicerna daripada bahan asalnya (Laelasari & Purwadaria, 2004). Penggunaan teknologi fermentasi pada bungkil inti sawit telah banyak dilakukan, beberapa di antaranya menggunakan kapang seperti *Aspergillus niger*. Proses fermentasi pada BIS menggunakan *Aspergillus niger* telah terbukti dapat menurunkan serat kasar sebesar 15% dan meningkatkan protein kasar sebesar 81% (Puastuti *et al.*, 2014). Proses fermentasi pada bungkil inti sawit juga dapat menghasilkan produk yang lebih sederhana dari mannan, yaitu mannan oligosakarida (MOS) yang dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik pada pakan.

2.5 Mannan oligosakarida (MOS)

Mannan oligosakarida (MOS) merupakan jenis prebiotik yang telah banyak dipelajari dan dimanfaatkan untuk pakan ikan. MOS merupakan *non-digestible carbohydrates* yang dapat diperoleh dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*. Dinding sel tersebut terdiri dari hemiselulosa yang mengandung mannan (30%), glukukan (30%) dan protein (12,5%) (Nurhayati, 2018). MOS juga dapat ditemukan dalam BIS karena sebagian besar dinding sel BIS tersusun oleh mannan. MOS dijadikan sebagai prebiotik dalam usus untuk menunjukkan pengaruh seperti meningkatkan keseimbangan lapisan mukosa usus, meningkatkan imunitas, antimutagenik, dan pertahanan antioksidan.

Dalam akuakultur MOS telah banyak diteliti dapat meningkatkan sistem imun. MOS dapat digunakan sebagai antibakteri alternatif seperti pada penelitian Dimitroglou *et al.* (2010) dimana suplementasi MOS menunjukkan penurunan jumlah bakteri patogen pada saluran pencernaan *Sparus aurata*. MOS sebagai prebiotik mempunyai mekanis-

me yang berbeda dimana tidak ada terjadinya peningkatan populasi bakteri yang menguntungkan, tetapi melalui kemampuannya yang dapat melekat pada lektin spesifik manosa dari patogen Gram negatif tipe 1 fimbriae seperti *Salmonella* dan *E. coli* yang kemudian membuat patogen akan dikeluarkan dari saluran pencernaan (Baurhoo *et al.*, 2007). Hasil penelitian Sang *et al.* (2009) menunjukkan adanya peningkatan jumlah *total haemocyte count* (THC) pada lobster air tawar jenis *Cherax tenuimanus* setelah diberikan MOS.

III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan September-November 2023 bertempat di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2 berturut-turut.

Tabel 1. Alat-alat penelitian

No.	Nama Alat	Kegunaan
1.	Akuarium 60x40x40 cm ³	Wadah pemeliharaan lobster air tawar.
2.	Selang aerasi	Menyalurkan oksigen ke akuarium.
3.	Batu aerasi	Meningkatkan level optimal oksigen pada akuarium.
4.	<i>Syringe</i> 1 cc	Pengambilan sampel hemolim.
5.	Tabung eppendorf	Untuk meyimpan darah dan pengenceran.
6.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan yang dibutuhkan.
7.	Autoklaf	Mensterilkan alat dan bahan.
8.	Erlenmeyer	Pencampuran media.
9.	<i>Haemocytometer</i>	Mengamati darah untuk uji THC.

Tabel 1. Alat-alat penelitian (lanjutan)

No.	Nama Alat	Kegunaan
10.	Mikroskop	Pengamatan.
11.	Kaca preparat	Untuk membuat ulas darah.
12.	<i>Micropipet</i>	Memindahkan larutan.
13.	<i>ELISA Reader</i>	Untuk menganalisis uji SOD, PO dan TPP.
14.	Sentrifugasi	Untuk memisahkan pellet dan supernatan.
15.	<i>Microplate</i>	Tempat meletakkan sampel.
16.	<i>Vortex</i>	Untuk menghomogenkan sampel.
17.	DO meter	Mengukur kadar oksigen terlarut.

Tabel 2. Bahan-bahan penelitian

No.	Nama Alat	Kegunaan
1.	Lobster air tawar	Sebagai hewan uji.
2.	Alkohol 70%	Digunakan untuk sterilisasi.
3.	Probiotik komersil	Sebagai probiotik pada pakan.
4.	<i>Phospate buffer saline</i>	Sebagai bahan pengenceran.
5.	Na-sitrat 10%	Sebagai antikoagulan.
6.	AKuades	Sebagai pelarut media.
7.	Giemsa	Larutan pewarna sampel haemolim.
8.	Metanol	Sebagai bahan fiksasi preparat.
9.	<i>Bovine serum albumine</i>	Sebagai standar uji TPP.
10.	<i>Bradford reagen</i>	Digunakan untuk uji TPP.
11.	NBT	Digunakan untuk uji SOD.
12.	<i>Cacodylate citrate buffer</i>	Digunakan untuk uji PO.
13.	<i>Cacodylate buffer</i>	Digunakan untuk uji PO.
14.	L-DOPA	Digunakan untuk uji PO.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan sebagai berikut :

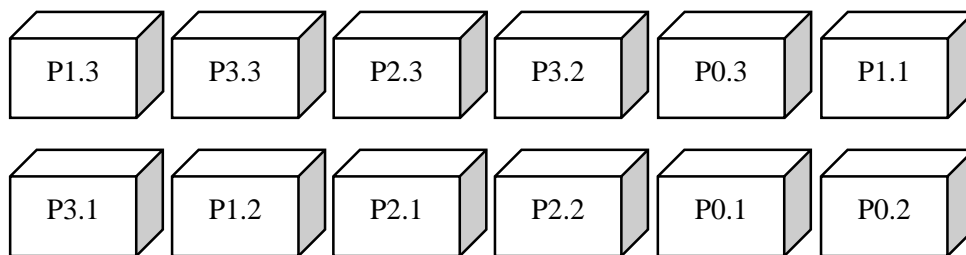
P0 : Pakan tanpa substitusi bungkil inti sawit fermentasi dan tanpa probiotik

P1 : Pakan dengan substitusi bungkil inti sawit fermentasi 40 g/kg pakan dan penambahan probiotik

P2 : Pakan dengan substitusi bungkil inti sawit fermentasi 80 g/kg pakan dan penambahan probiotik

P3 : Pakan dengan substitusi bungkil inti sawit fermentasi 120 g/kg pakan dan penambahan probiotik

Berikut susunan rancangan penelitian yang disajikan dalam gambar :



Gambar 5. Tata letak wadah penelitian

Keterangan :

P0.1, P0.2, dan P0.3 : Perlakuan P0 dan 1,2,3 merupakan ulangan.

P1.1, P1.2, dan P1.3 : Perlakuan P1 dan 1,2,3 merupakan ulangan.

P2.1, P2.2, dan P2.3 : Perlakuan P2 dan 1,2,3 merupakan ulangan.

P3.1, P3.2, dan P3.3 : Perlakuan P3 dan 1,2,3 merupakan ulangan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan BISF

Fermentasi bungkil inti sawit mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Puastuti *et al.* (2014) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1 kg BIS yang sudah halus ditambah air sebanyak 600 mL yang telah ditambahkan larutan mineral yang mengandung 1% ZA dan 0,5% urea (untuk memacu pertumbuhan mikroba) kemudian campuran tersebut

disterilisasi dengan cara diautoklaf selama 30 menit. Selanjutnya dibiarkan pada suhu ruang agar campuran BIS menjadi dingin. Setelah dingin BIS dicampurkan dengan starter kapang *Aspergillus niger* sebanyak 8 g/kg. Kemudian BIS yang sudah dicampur kapang ditempatkan dalam loyang plastik dan disimpan dalam suhu ruang (30 °C) secara aerob selama 3-5 hari. Kemudian campuran BIS dan kapang dikeringkan dalam oven selama 2 jam pada suhu 35-40 °C

3.4.2 Pembuatan Pakan

Pembuatan pakan dilakukan dengan mempersiapkan bahan yang akan digunakan seperti tepung ikan, tepung bungkil kedelai, tepung jagung, tepung pollard, tepung BISF, dan *premix*. Komposisi bahan pakan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Formulasi bahan baku pakan uji

Nama Bahan	Perlakuan			
	P0	P1	P2	P3
Tepung ikan	300	300	300	300
Tepung bungkil kedelai	350	310	270	230
BISF	0	40	80	120
Tepung jagung	100	100	100	100
Tepung pollard	180	180	180	180
<i>Binder</i>	20	20	20	20
Minyak cumi	20	20	20	20
Vitamin <i>premix</i>	5	5	50	50
Mineral <i>premix</i>	5	5	50	50
Alginat	20	20	20	20
Total (gram)	1.000	1.000	1.000	1.000

Semua bahan kemudian dicampur dan dicetak menggunakan mesin pencetak pelet. Setelah dicetak pelet dikeringkan menggunakan oven. Pelet yang sudah dicetak dan dioven harus diuji proksimat terlebih dahulu sebelum dapat diberikan kepada lobster uji. Sebelum pakan diberikan pada lobster pakan ditambahkan probiotik terlebih dahulu dengan metode *spray*.

3.4.3 Analisis Proksimat

Seluruh bahan pakan yang akan diformulasikan dianalisis proksimat. Analisis proksimat terdiri dari protein, kadar air, lemak kasar, dan serat kasar. Pada analisis kadar air menggunakan metode gravimetrik, kadar protein menggunakan metode kjedhal, uji lemak kasar menggunakan metode soxhlet, dan serat kasar menggunakan metode vansus.

3.4.4 Persiapan Wadah Penelitian dan Lobster Uji

Wadah uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 akuarium berukuran 60 x 40 x 40 cm³ dengan volume 50 L. Akuarium tersebut disterilkan dengan dicuci menggunakan sabun dan disinfektan, kemudian dibilas dan dikeringkan. Setelah kering, kontainer diletakkan pada rak penelitian dan diisi dengan air tawar sebanyak 20 L dan dilengkapi instalasi aerasi sebagai penyuplai oksigen.

Lobster air tawar yang digunakan memiliki rata-rata bobot $10,3 \pm 0,15$ g. Jumlah lobster air tawar yang digunakan sebanyak 1 ekor/5 L air. Lobster tersebut kemudian dipelihara selama 7 hari pada suhu ruang untuk proses penyesuaian dengan kondisi lingkungan atau aklimatisasi. Selama masa aklimatisasi lobster diberi pakan sebanyak dua kali sehari.

3.4.5 Pemeliharaan Lobster

Lobster diberi pakan dengan FR sebesar 3% (Trisnasari *et al.*, 2020). Pakan yang digunakan adalah pakan yang telah disubstitusi dengan bungkil inti sawit fermentasi dan ditambahkan probiotik. Lobster diberi pakan sesuai perlakuan (0, 40, 80, 120

g/kg pakan) sebanyak 2 kali sehari pada pukul 08.00 dan 17.00 WIB. Sisa pakan dan kotoran pada akuarium dibersihkan dengan metode sipon. Sipon dan pergantian air dilakukan setiap pagi untuk menghindari adanya penumpukan bahan organik pada akuarium yang dapat menyebabkan stres pada lobster. Pergantian air disesuaikan dengan volume air yang terbuang saat penyiponan.

3.4.6 Pengambilan Hemolim

3.5 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi *total haemocyte count* (THC), *differensial haemocyte count* (DHC), aktivitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), total protein plasma (TPP), aktivitas *superoxide dismutase*, aktivitas *phenol-oksidadase*, dan ekspresi gen (LGBP, lektin).

3.5.1 Total Haemocyte count (THC)

Hemolim segar (10 μ L) diencerkan dalam 20 μ L PBS (pengenceran 1:3) dan dihomogenisasi dengan *pipetting*. *Total hemocyte count* dihitung dengan *haemocytometer* (Neubauer, Jerman) dan diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 100x. Sel dihitung di kedua kotak, dan rata-rata digunakan sebagai jumlah hemosit (Sang *et al.*, 2009). Jumlah hemosit total dihitung sebagai berikut :

$$THC = \Sigma \text{ hemosit dalam 25 kotak kecil } \times \text{ pengenceran } \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

3.5.2 Differential Haemocyte Count (DHC)

Hemolim segar (20 μ L) diteteskan di atas kaca preparat dan diulas kemudian dikering udarakan. Kaca preparat kemudian difiksasi dengan memberikan methanol 70% selama 10 menit. Preparat ulasan kemudian diwarnai menggunakan Giemsa (Merck) masing-masing selama 10 menit. Kemudian di pasang *coverglass*.

$$DHC = \frac{\text{Jumlah sel haemocyte yang berbeda}}{\text{Total haemocyte yang dihitung}} \times 100\%$$

3.5.3 Aktivitas Fagositosis dan Indeks Fagositosis

Aktivitas fagositosis (AF) dan indeks fagositosis (IF) diuji berdasarkan pada penelitian Anderson (1992) yang dimodifikasi. Sampel hemolim segar (20 μ L) disuspensi dengan *Staphylococcus aureus* dan dibentuk dalam preparat ulas dan difiksatif menggunakan methanol. Preparat dicat menggunakan Giemsa 10% selama 20 menit. Persamaan aktivitas fagositosis mengacu pada Anderson (1992) yaitu $AF = (a/b) \times 100\%$, sedangkan indeks fagositosis $IF = c/a$, dengan keterangan a = jumlah sel fagosit, b = jumlah keseluruhan sel yang diamati, c = jumlah bakteri yang difagosit. Preparat ulas kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x.

3.5.4 Aktivitas PO (*phenoloxidase*)

Prosedur pengamatan PO mengacu pada penelitian Yudiati *et al.* (2016). Hemolim (100 μ L) diencerkan dengan PBS (100 μ L) (pengenceran 1:1) kemudian disentrifugasi pada 700 g, 4°C, selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambahkan 100 μ L cacodylate cytrate buffer (0,1M sodium cacodylate trihidrate; 0,45M NaCl, dan 0,01M sodium sitrat), disentrifugasi pada 700 g, pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambahkan 100 μ L buffer cacodylate (0,01M sodium cacodylate trihydrate; 0,45M NaCl; 0,01M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,26M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), dimasukkan dalam 96 well microplate. Kemudian masing-masing sumuran yang sudah berisi sampel ditambahkan dengan 100 μ L trypsin (Sigma Aldrich), diresuspensi dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 μ L L-DOPA dan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 490 nm. Aktivitas PO (*phenoloxidase*) didapatkan dari nilai absorbansi tersebut.

3.5.5 Aktivitas SOD (*superoxide dismutase*)

Prosedur pengamatan aktivitas SOD mengacu pada Yudiati *et al.* (2016). Sebanyak 50 μ L hemolim dimasukkan dalam microtube dan diencerkan dengan 150 μ L PBS (pengenceran 1:4), divortex kemudian disentrifugasi pada 700 g. Selanjutnya supernatan diambil dan dipanaskan dalam waterbath pada suhu 65°C selama 5 menit

sehingga didapatkan ekstrak kasar SOD. Ekstrak kasar SOD bisa disimpan dulu dalam suhu -20°C hingga digunakan untuk uji SOD. Pengujian SOD dilakukan dengan mengambil 100 μL ekstrak kasar SOD dicampur dengan 50 μL reagen *nitroblue tetrazolium*, NBT (NBT 0,1%), kemudian diinkubasi di suhu kamar selama 2 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Aktivitas SOD didapatkan dari nilai absorbansi tersebut.

3.5.6 Total Protein Plasma

Sebanyak 15 μL hemolim disentrifugasi pada 700 g selama 10 menit. Kemudian 5 μL supernatan diambil dan dipindahkan ke 96-well microplate (Iwaki, Japan), ditambahkan 250 μL reagen Bradford (Bio-Rad), dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya setiap sampel diukur absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* (R-Biopharm Well Reader, Germany) pada panjang gelombang 630 nm. Kurva standar kadar protein sebelumnya disiapkan dengan menggunakan *bovine serum albumine* (BSA) (Merck, Germany) pada konsentrasi yang berbeda (0; 50; 100; 150; dan 200 mg mL^{-1}).

3.5.7 Ekspresi Gen Imun

Dalam penelitian ini terdapat dua gen imun yang diamati yaitu LGBP (*lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein*) dan lectin. Masing-masing gen diamati dan dibandingkan dengan *housekeeping gene* sebagai kontrol internal. Primer masing-masing gen terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Primer gen imun lobster air tawar

Gen	Primer	Sekuen (5'-3')	Accession	Referensi
LGBP	CqLGBP-qPCR-F	CAGCGGTGAGATTGACATT	KP100470	Hou <i>et al.</i> (2015)
	CqLGBP-qPCR-R	TGGAAACTGTTAGCGAAGG		

Tabel 4. Primer gen imun lobster air tawar (lanjutan)

Gen	Primer	Sekuen (5'-3')	Accession	Referensi
Lectin	CqCTL-	ATGGTGAAGGCATGTGTGACG	MN944107	Wang <i>et al.</i> (2020)
	qRT-F			
β -actin (<i>Internal control</i>)	CqCTL-	GCAGACCAAGGTCTCTTGCTCA		Hou <i>et al.</i> (2015)
	qRT-R			
	β -actin-F	ATCACTGCTCTGGCTCCTGCTACC		
	β -actin-R	CGGACTCGTCGTA CTCTCCTTGG		

a. Isolasi RNA Hemolim

Metode isolasi RNA dilakukan sesuai dengan Schmittgen & Livak (2008). 50 μ L hemolim ditambahkan 500 μ L larutan Trizol. Hemolim dan Trizol dihomogenkan dengan menggunakan *pipetting*, sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sebanyak 100 μ L kloroform ditambahkan dan dicampur dengan kuat selama 5 detik, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g selama 15 menit. Supernatan dipindahkan pada 1,5 mL *microtube*. Tambahkan 250 μ L isopropanol kemudian diinkubasi selama 15 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Supernatant dipindahkan pada 1,5 mL *microtube*, kemudian tambahkan 1.000 μ L etanol 75%. Lalu sampel disentrifugasi pada 7.500 g selama 5 menit. Etanol yang terdapat pada tube dibuang menggunakan *micropipette*. *Pellet* diarutkan dengan *nuclease free water* sebanyak 50-100 μ L dan disimpan pada suhu -20°C

b. Sintesis cDNA (*Reverse transcrption*)

Master mix (Tabel 5) disiapkan dan ditambahkan 2 μ L RNA dengan konsentrasi 100 ng/ μ L kemudian campuran dihomogenkan menggunakan *vortex*. Setelah campuran homogen, kemudian campuran direaksikan pada suhu 42°C selama 30 menit. Selanjutnya enzim *reverse transcriptase* diinaktivasi pada suhu 94°C selama 5 menit. Komposisi bahan untuk sintesis cDNA dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Komposisi bahan sintesis cDNA

Bahan	Volume (μL)
<i>Buffer AMV</i>	2,5
Enzim AMV <i>transcriptase</i>	0,125
<i>Mix reverse primer</i>	2
<i>nuclease free water</i>	5,875
Total	10,5

c. *Real Time Quantitative PCR (qPCR)*

Eksresi gen imun di analisis menggunakan qPCR mengikuti standar protocol qPCR. Bahan dan kondisi qPCR terdapat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Komposisi bahan qPCR

Bahan	Volume (μL)
KAPA SYBR FAST qPCR <i>kit master mix</i>	6,25
<i>Primer forward</i> (10 μM)	0,25
<i>Primer reverse</i> (10 μM)	0,25
ROX <i>low reference dye</i>	0,25
dH ₂ O	10,5
Total	17,5

Tabel 7. Kondisi qPCR

Program	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94	5'	1
Denaturasi	94	6"	
<i>Annealing</i>	55-60	18"	45
<i>Extention</i>	68	30"	
<i>Final extention</i>	68	7'	1
<i>Melting curve</i>	95	30'	

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ditabulasi menggunakan program Excel dan dianalisis menggunakan program SPSS 26.0. Analisis data pada parameter *total haemocyte count* (THC), *differensial haemocyte count* (DHC), aktivitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), total protein plasma (TPP), aktivitas *superoxide dismutase* dan aktivitas *phenoloksidase* menggunakan uji Anova dan diuji lanjut dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 95%.

Data tingkat ekspresi gen dihitung menggunakan metode Schmittgen & Livak (2008). Kemudian *fold change* dihitung dengan menggunakan persamaan $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Fold change* digunakan untuk mengetahui perubahan relatif gen-gen imun LAT.

Fold change: $2^{-\Delta\Delta CT}$

$\Delta\Delta CT = [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sampel A} - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sampel B}]$

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Peningkatan pada parameter *total haemocyte count* (THC), aktivitas fagositosis (AF), indeks fagositosis (IF), aktivitas *superoxide dismutase* (SOD), aktivitas *phenoloxide* (PO) dan *up*-regulasi ekspresi gen, menunjukkan bahwa pakan berbasis BISF memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap peningkatan respon imun nonspesifik lobster air tawar (*C. quadricarinatus*) secara signifikan, serta aman digunakan dan tidak bersifat toksik.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Aplikasi substitusi BISF pada pakan sebanyak 120 g/kg pakan baik digunakan dalam kegiatan budi daya lobster air tawar, hal ini didukung oleh peningkatan parameter respon imun pada penelitian ini.
2. Disarankan untuk melakukan ujiantang menggunakan bakteri patogen dan selanjutnya dilakukan uji lapang sehingga mampu memberikan hasil yang lebih komprehensif dalam meningkatkan respon imun lobster air tawar menggunakan pakan berbasis BISF.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Amri, M. 2007. Pengaruh bungkil inti sawit fermentasi dalam pakan terhadap pertumbuhan ikan mas (*Cyprinus carpio L.*). *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*, 9(1): 71–76.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 281–307.
- Arcos, F.G., Ibarra, M.A., VazquezBoucard, C., Palacios, E., & Rocotta, S.I., 2003. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 34(1): 749-755.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191(1-3): 3-11.
- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., & Ruiz-feria, C.A. 2007. Cecal population of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science*, . 86(12): 2509–516.
- Bowater, R., Wingfield, M., Fisk, A., Condon, K., Reid, A., Prior, H., & Kulpa, E. 2002. A parvo-like virus in cultured redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* from Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(2): 79-86.
- Buckup, L., Dutra, K.B., & Ribarcki, P.F. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of crayfish *Parastacus defossus* (crustacea, decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 149(1): 59-67.
- Dasilva-Castiglioni, D., Dutra, K.B., Oliveria, T.G & Buckup, B.G. 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (crustacea,

- decapoda, parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148(1): 204-213
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, . & Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300(1-4): 188-192.
- Dodd R.B., & Drickamer K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11(5): 71-79.
- Dong, C., & Wang, J. 2013. Immunostimulatory effects of dietary fructooligosaccharides on red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Aquaculture Research*, 44(9): 1416-1424.
- Eaves, L.E. & Ketterer, P.J. 1994. Mortalities in red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* associated with systemic *Vibrio mimicus* infection. *Diseases of Aquatic Organism*, 19: 233-237.
- Edgerton, B.F., Webb, R., Anderson, I., & Kulpa, E. 1999. Description of a presumptive hepatopancreatic reovirus, and a putative gill parvovirus, in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41(2): 83-90.
- Fotedar, R. 2004. Effect of dietary protein and lipid source on the growth, survival, condition indices and body composition of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). *Aquaculture*, 230(1-4): 439-455.
- González A-Luna, J.C., Almaraz-Salas, J.A., Fierro-Coronado, M.C., Flores-Miranda, H.A., González-Ocampo, V., & Peraza-Gómez. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 362-363: 28-32.
- Haryati, T. 2011. Probiotik dan prebiotik sebagai pakan imbuhan nonruminansia. *Wartazoa*, 21(3): 125-132
- Hayakijkosol, O., & Owens, L. 2012. B2 or not B2: RNA interference reduces *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus replication in redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*, 326-329: 40-45.
- Hayakijkosol, O., Owens, L., & Picard, J. 2017. Case report of bacterial infections in a redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) hatchery. *Aquaculture*, 475: 1-7.

- Hou, L., Liu, X., Jing, Y., Zhang, J., Ding, Z., Huang, Y., Gu, W., Meng, Q., & Wang, W. 2015. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein from red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 441: 1–7.
- Iskandar. 2003. *Budidaya Lobster Air Tawar*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 76 hlm.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3), 45–52.
- Jussila, J., Jago, J., Tsvetnenko, E., Dunstan, B., & Evans, L. H. 1997. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus*) under post-harvest stress. *Marine and Freshwater Research*, 48(8): 863-868.
- Kakoolaki, S., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Sharifpour, I., Mirzargar, S., Afsgarnasab, M., & Motalebi, A.A. 2011. In whole treatments PCR and histopathological finding tramuscularly injected to the shrimp exposed to white spot virus and a new defferential hemocyte, experimentally changes of SPF imported. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3): 447–460.
- Kementrian Perdagangan Republik Indonesia. 2022. Neraca Perdagangan Indonesia. <https://bkperdag.kemendag.go.id>. Diakses pada 10 Mei 2024.
- Ketaren, P.P., Kompiang, I.P., Purwadaria, T., Zainuddin, D., & Sinurat, A. P. 1999. Bungkil inti sawit dan produk fermentasinya sebagai pakan ayam pedaging. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 4: 107–112.
- Kim, Y.A. 2006. *Hematopoiesis, Kazal Inhibitors and Crustins in Crustaceans*. (Disertasi). Acta Universitatis Upsaliensis. Swedia. 215 hlm.
- Kurniawan, M.H., Berta, P. & Elisdiana, Y. 2018. Efektivitas pemberian bakteri *Bacillus polymyxa* melalui pakan terhadap imunitas non spesifik udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 7(1): 739-750.
- Laela Sari, & Purdawaria, T. 2004. Pengkajian nilai gizi hasil fermentasi mutan *Aspergillus niger* pada substrat bungkil kelapa dan bungkil inti sawit. *Biodiversitas*, 5(2): 48-51.
- Li, F., & Xiang, J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental Comparative Immunology*, 39(1-2), 11–26.
- Li, K., & Underhill, D.M. (2020). C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 429:1-18

- Li, Y., Yuan, W., Zhang, Y., Liu, H., & Dai, X. 2021. Single or combined effects of dietary arabinoxylanoligosaccharide and inulin on growth performance, gut microbiota, and immune response in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(2): 741-754.
- Liu, Y., & Huang, G. 2018. The derivatization and antioxidant activities of yeast mannan. *International Jurnal Biological Macromolecules*, 107(Part A): 755-61.
- Longshaw, M. 2011. Diseases of crayfish: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1): 54-70.
- Lukito, A., & Prayugo, S. 2007. *Panduan Lengkap Lobster Air Tawar*. Penebar Swadaya. Jakarta. 290 hlm.
- Lu, Z., Feng, L., Jiang, W., Wu, P., Liu, Y., Kuang, S., Tang, L., Li, S., Zhong, C., Zhou, X. 2023. Mannan oligosaccharides alleviate oxidative injury in the head kidney and spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) via the Nrf2 signaling pathway after *Aeromonas hydrophila* infection. *Jurnal of Animal Science and Biotechnol*, 14(58): 1-15.
- Manoppo, H., & Kolopita, M.E.F. 2014. Respon Imun Krustase. *Budidaya Perairan*, 2(2): 22-26.
- Masrukan. 2020. Potensi modifikasi pati dengan esterifikasi sebagai prebiotik. *AGROTECH*, 1(1): 1-14.
- Nababan, Y.I., Nasrullah, H., Widanarni, Yuhana, M., & Alimuddin. 2021. Suplementasi prebiotik fruktooligosakarida (FOS) meningkatkan ekspresi gen terkait metabolisme serta pertumbuhan udang vaname, *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 16(4): 203-210.
- Neuhaus, H., Pund, R., Runge, M., Kleingeld, D.W., Nardy, E., & Fischer, U. 2022. First report of white spot syndrome virus (WSSV) DNA in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in Germany. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 41(6): 244-254.
- Nikhlani A., Pagoray, H. & Sulistyawati. 2022. Bungkil kelapa sawit sebagai bahan baku alternatif pakan buatan untuk pertumbuhan ikan lele sangkuriang (*Clarias gariepinus*). *Journal of Fisheries and Marine Research*, 6(2): 26-33.
- Noferdiman. 2011. Penggunaan bungkil inti sawit fermentasi oleh jamur *Pleurotus ostreatus* dalam ransum terhadap performans ayam broiler. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 14(1):35-43.

- Núñez-Amao, L., Naranjo-Páramo, J., Hernández-Llamas, A., Vargas-Mendieta, M., & Villarreal, H. 2018. Estimating production costs of preadult redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared in a commercial nursery system: A stochastic bioeconomic approach. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(1): 172-185.
- Nurhayati, N. 2008. *Identifikasi dan Uji Invitro Bakteri Penyebab Ekor Melepuh pada Lobster Air Tawar (Cherax quadricarinatus) Menggunakan Gentamicin*. (Tesis). Universitas Brawijaya. Malang. 55 hlm.
- Nurhayati. 2018. *Ekstraksi Mannan Oligosakarida (MOS) Hasil Fermentasi Campuran Bungkil Inti Sawit dan Onggok sebagai Prebiotik dalam Pakan terhadap Penampilan Produksi Ayam Pedaging*. (Disertasi). Universitas Brawijaya. Malang. 203 hlm.
- Puastuti, W., Yulistiani, D., & Susana I.W.R. 2014. Evaluasi nilai nutrisi bungkil inti sawit yang difermentasi dengan kapang sebagai sumber protein ruminansia. *JITV*, 19(2): 143-151.
- Ridlo, A., & Pramesti, R. 2009. Aplikasi ekstrak rumput laut sebagai agen imunostimulan sistem pertahanan non spesifik pada udang vannamei (*Litopennaeus vannamei*). *Ilmu Kelautan*, 14(3): 133-137.
- Rodríguez, J., & Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of Penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191(1-3): 109-119.
- Romero, X., & Jimenez, R. 2002. Histopathological survey of diseases and pathogens present in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens), cultured in Ecuador. *Journal of Fish Diseases*, 25(11): 653-667.
- Sang, H.M., Ky, L.T., & Fotedar, R. 2009. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of Marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2): 341-348.
- Saputra, I., 2019. Review sistem kekebalan tubuh pada lobster air tawar (*C. cainii*) dan metode pengujiannya. *Quarantamina*, 1(2): 29-43.
- Schmittgen, T.D., & Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101-1108.
- Setiawan, C. 2010. *Jurus Sukses Budi Daya Lobster Air Tawar*. Agromedia Pustaka, Jakarta. 106 hlm.

- Setyawan, A. 2019. *Fucoidan dari Alga Cokelat Tropis Sebagai Imunostimulan pada Udang Vannamei (Litopenaeus vannamei): Kajian Hematologi, Ekspresi Gen-Gen Imun, Resistensi terhadap WSSV, dan Pertumbuhan*. (Disertasi). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 117 hlm.
- Shafir, S., Tom, M., Ovadia, M., & Lubzens, E. 1992. Protein, vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biological Bulletin*. 183(3): 394-400.
- Singh, S., Singh, G., & Arya, S. K. 2018. Mannans: An overview of properties and application in food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119: 79-95.
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 3-23.
- Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68: 1-10.
- Sukaryana, Y., Atmomarsono, U., Yuniyanto, V.D., & Supriyatna, E. 2011. Peningkatan nilai pencernaan protein kasar dan lemak kasar produk fermentasi campuran bungkil inti sawit dan dedak padi pada broiler. *JITP*, 1(3): 167-172.
- Sukmajaya, I.Y., & Suharjo, I. 2003. *Lobster Air Tawar Komoditas Perikanan Prospektif*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 56 hlm.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4): 954-967.
- Tayibu, H. 2012. *Respon Fisiologi Juvenil Udang Windu, Penaeus Monodon Fabricius pada Bobot dan Densitas Pemeliharaan yang Berbeda dalam Wadah Terkontrol*. (Disertasi). Universitas Hasanuddin. Makasar. 179 hlm.
- Tirasophon, W., Roshorm, Y., & Panyim, S. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(1): 102-107.
- Trisnasari, V., Subandiyono., & Hastuti, S. 2020. Pengaruh triptofan dalam pakan buatan terhadap tingkat kanibalisme dan pertumbuhan lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*). *Jurnal Sains Akuakultur Tropis*, 4(1): 19-30.
- Van de Braak, C.B.T. 2002. *Haemocytic Defence in Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon)*. (Disertasi). Wageningen University, The Netherlands. 158 hlm.

- van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., & Görgens, J. F. 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45(8): 1203-1213.
- Wang, Y., Wang, B.J., Liu, M., Jiang, K.Y., Wang, M.Q., & Wang, L. 2020. The first identification of a C-type lectin gene (CqCTL) in *Cherax quadricarinatus*: sequence features and expression profiles. *Invertebrate Survival Journal*, 17(1): 108-116.
- Widayati, E. 2012. Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Majalah Ilmiah Sultan Agung*, 50(128): 26-32.
- Wie, K.L.C. 2006. *Pembenihan Lobster Air Tawar: Meraup Untung Dari Lahan Sempit*. PT. Agromedia Pustaka. Jakarta. 100 hlm.
- Yeh, S.T., Lee, C.S., & Chen, J.C. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(3), 332-345.
- Yu, X.Q., & Kanost, M.R. 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol*, 28(9): 891-900.
- Yudiati, E., Isnansetyo, A., Murwantoko, Ayuningtyas, Triyanto, & Handayani, C.R. 2016. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54: 46-53.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4):1027-1032.
- Zhang, Q., Lin, Y., Zhang, T., Wu, Y., Fang, P., Wang, S., Wu, Z., Hao, J., & Li, A. 2021. Etiological characteristics of “tail blister disease” of australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 184: 1-10.
- Zhang, S., Li, J., Wu, X., Zhong, W., Xian, J., Liao, S., Miao, Y., & Wang, A. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunology*, 34: 1131-8