

**STUDI PERBANDINGAN EFEKTIVITAS PROBIOTIK KOMERSIL
Lactobacillus sp DAN ISOLAT *Bacillus subtilis* ATCC 6633 DALAM
MENCEGAH SERANGAN *Vibrio parahaemolyticus* PADA BUDIDAYA
UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

Oleh

ILHAM MIFTAHUL FIRDAUS

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar

SARJANA PERIKANAN

Pada

Jurusan Perikanan dan Kelautan

Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDARLAMPUNG
2025**

**STUDI PERBANDINGAN EFEKTIVITAS PROBIOTIK KOMERSIL
Lactobacillus sp. DAN ISOLAT *Bacillus subtilis* ATCC 6633 DALAM
MENCEGAH SERANGAN *Vibrio parahaemolyticus* PADA BUDIDAYA
UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

SKRIPSI

Oleh

**ILHAM MIFTAHUL FIRDAUS
NPM 2154111004**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRACT

A COMPARATIVE STUDY ON THE EFFECTIVENESS OF COMMERCIAL PROBIOTIC *Lactobacillus* sp. AND *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ISOLATE IN PREVENTING *Vibrio parahaemolyticus* INFECTION IN THE CULTURE OF PACIFIC WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

By

ILHAM MIFTAHUL FIRDAUS

Vibrio parahaemolyticus is one of the pathogenic bacteria of *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). One of the means to resolve the issue is through the supplementation of probiotics to enhance shrimp immunity and to inhibit the development of the pathogens. This study was undertaken to compare the performance between commercial grade *Lactobacillus* sp. probiotics and the isolate of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 to enhance the immune response as well as whiteleg shrimp resistance against infection by *V. parahaemolyticus*. Completely randomized design (CRD) was used with four treatments and three reps: positive control (feed and challenge test), negative control (feed with no challenge test), treatment A (feed + *Lactobacillus* sp. 10^6 CFU/kg feed + challenge test), and treatment B (feed + *B. subtilis* ATCC 6633 10^6 CFU/kg feed + challenge test). Total *Hemocyte Count* (THC), *Differential Hemocyte Count* (DHC), *Mean Time to Death* (MTD), *survival rate*, *Lipid droplet* accumulation, clinical symptoms, and quality of the water were data recorded. It was discovered that the supplementation with *B. subtilis* isolate provided significant effect ($P < 0.05$) on THC, the number of the hyaline cells on the test on DHC test, MTD test, survival rate, and lipid droplet level. *B. subtilis* ATCC 6633 at the level of 10^6 CFU/ml demonstrated more effectiveness when tested with the commercial grade *Lactobacillus* sp. probiotics to enhance theimm.

Keywords: Immune response, Probiotics, Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Vibrio* sp.

ABSTRAK

STUDI PERBANDINGAN EFEKTIVITAS PROBIOTIK KOMERSIL *Lactobacillus* sp. DAN ISOLAT *Bacillus subtilis* ATCC 6633 DALAM MENCEGAH SERANGAN *Vibrio parahaemolyticus* PADA BUDIDAYA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)

Oleh

ILHAM MIFTAHUL FIRDAUS

Vibrio parahaemolyticus merupakan salah satu bakteri patogen penyebab penyakit *Acute hepatopankreatic nekrosis disease* (AHPND) terhadap udang vaname. Salah satu upaya untuk mengatasi masalah ini adalah dengan menggunakan probiotik, yang dapat meningkatkan imunitas udang dan menekan pertumbuhan patogen. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk membandingkan efektivitas probiotik *Lactobacillus* sp. komersil dan isolat *B. subtilis* ATCC 6633 dalam respon imun dan ketahanan udang vaname terhadap *V. parahemolyticus*. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan 3 kali ulangan yaitu Kontrol + (pakan dan diujiantang), Kontrol – (pakan dan tidak diujiantang), perlakuan A (pakan+ *Lactobacillus* sp. 10^6 CFU/kg pakan dan diujiantang), perlakuan B (pakan+ isolat *B. subtilis* ATCC 6633 10^6 CFU/kg pakan dan diujiantang). Data yang dikumpulkan yaitu *Total hemosit count* (THC), *Differensial hemosit count* (DHC), *Mean time death* (MTD), Tingkat kelangsungan hidup, *Lipid Droplet*, Gejala klinis dan Kualitas air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian Isolat *B. subtilis* memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap THC, DHC sel hyalin, MTD, TKH, dan *Lipid droplet*. Pemberian isolat *B. subtilis* ATCC 6633 10^6 CFU/ml menunjukkan efektivitas yang lebih baik dibandingkan probiotik *Lactobacillus* sp. komersial dalam meningkatkan respon imun dan menekan tingkat kematian pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang terinfeksi *V. parahaemolyticus*.

Kata Kunci: Probiotik, respon imun, Udang vaname (*Litopenaeus vanamei*), *Vibrio* sp.

Judul skripsi

: Studi Perbandingan Efektivitas Probiotik

Komersial *Lactobacillus* sp. dan Isolat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dalam Mencegah Serangan *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Nama Mahasiswa

: Ilham Miftahul Firdaus

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2154111004

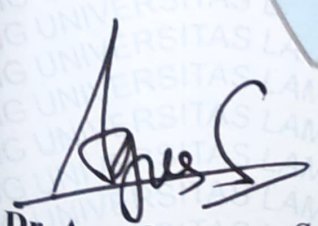
Program Studi

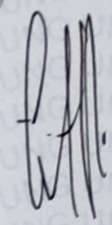
: Budidaya Perairan

Fakultas

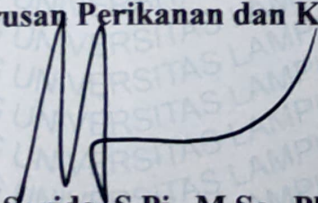
: Pertanian




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


Huriyatul Fitriyah Noor, S.Pi., M.P.
NIP. 199212122022032019

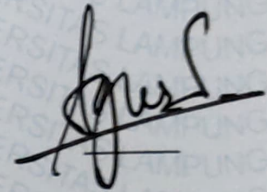
MENGETAHUI
Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan


Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 198309232006042001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

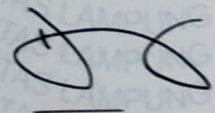


Sekretaris

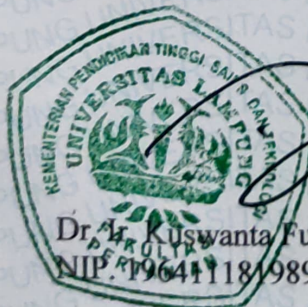
: Huriyatul Fitriyah Noor, S.Pi., M.P.



Penguji Bukan Pembimbing : Deny Sapto Chondro Utomo, S.Pi., M.Si.



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP. 196411181989021002

Tanggal lulus ujian skripsi: 19 Juni 2025



UNIVERSITAS LAMPUNG
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN

Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145 Telp (0721) 704946 Fax (0721) 770347

FORM BUKTI PENGECEKAN KESESUAIAN SKRIPSI

Menerangkan dengan sebenar-benarnya, bahwa mahasiswa Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian di bawah ini:

Nama : Ilham Miftahul Firdaus
NPM : 2154111004
Program Studi : Budidaya Perairan
Judul Skripsi : Studi Perbandingan Efektivitas Probiotik Komersial *Lactobacillus* sp. dan Isolat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dalam Mencegah Serangan *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Telah melengkapi skripsi sesuai dengan panduan sebagai berikut:

No	Komponen Kelengkapan Skripsi	Sesuai	Tidak Sesuai*
1.	Cover (luar, dalam)	✓	✗
2.	Abstract (maks. 250 kata)	✓	
3.	Abstrak (maks. 250 kata)	✓	
4.	Lembar Persetujuan	✓	
5.	Lembar Pengesahan	✓	
6.	Pernyataan Orisinalitas Karya Ilmiah	✓	
7.	Riwayat Hidup	✓	
8.	Halaman Persembahan (pilihan)	✓	
9.	Sanwacana	✓	
10.	Daftar Isi	✓	
11.	Daftar Gambar	✓	
12.	Daftar Tabel	✓	
13.	Daftar Lampiran	✓	
14.	Pendahuluan	✓	
15.	Tinjauan Pustaka	✓	
16.	Metode Penelitian	✓	
17.	Hasil dan Pembahasan	✓	
18.	Simpulan dan Saran	✓	
19.	Daftar Pustaka	✓	
20.	Lampiran	✓	

Bandar Lampung, 28 Juli 2025
Dosen Pembimbing II

Huriyatul Fitriyah Noor, S.Pi.,
M.P. NIP. 199212122022032019

Mayor Perikanan
Mohon ul. berdiskusi
kembali dgn dosen
pembimbing ul. penulisan
skripsi ini.
Draft ini masih jauh
dari standar layak
cetak. 14 ag 2025
ms
Ace Cita
08/2025
10 Mks



KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN

Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145 Telp (0721) 704946 Fax (0721) 770347

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi yang berjudul **“Studi Perbandingan Efektivitas Probiotik Komersial *Lactobacillus* sp. dan Isolat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dalam Mencegah Serangan *Vibrio parahaemolyticus* pada Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)”** tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh pihak lain untuk mendapatkan karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebut dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata dalam naskah skripsi ini ditemukan dan terbukti terdapat unsur-unsur fabrikasi, falsifikasi, plagiat dan konflik kepentingan saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (S1) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Bandar Lampung, 28 Juli 2025

Yang membuat pernyataan

Ilham Miftahul Firdaus
NPM. 2154111004

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kota Lampung, Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung, pada tanggal 17 September 2001 sebagai anak dari pasangan suami istri Bapak Marsudi dan Ibu Sulimah. Penulis menempuh pendidikan formal dari Taman kanak-kanak Darma Wanita Rawajitu Timur (2005- 2006), lalu melanjutkan pendidikan dasar di SD 01 Bumi Dipasena Mulya Rawajitu Timur pada tahun 2008 – 2014, dilanjutkan ke pendidikan menengah pertama di SMPN 01 Rawajitu Timur, Lampung pada tahun 2015 – 2017, dan pendidikan menengah atas di SMA IT Alluthfah Bekasi pada tahun 2017 – 2020.

Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang pendidikan tinggi di Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2021. Penulis pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah Manajemen Teknik Pembenihan Ikan pada tahun 2025. Penulis mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Agung Batin, Kecamatan Simpang Pematang, Kabupaten Mesuji, Provinsi Lampung selama 40 hari pada bulan Januari - Februari 2024. Penulis juga telah melaksanakan kegiatan Praktik Umum di Karang Suraga, Kecamatan Cinangka, Banten.

Untuk orang tua tercinta, Ibu Sulimah dan Bapak Marsudi
, yang tiada henti dalam mendukung dan memotivasi serta selalu mendoakan yang
terbaik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Tuhan yang Maha Esa, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul “*Studi Perbandingan Efektivitas Probiotik Komersial Lactobacillus sp. dan Isolat Bacillus subtilis ATCC 6633 dalam Mencegah Serangan Vibrio parahaemolyticus pada Budidaya Udang Vaname (Litopenaeus vannamei)*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan FP Unila;
2. Munti Sarida, S.Pi. M.Sc. Ph.D. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan;
3. Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama;
4. Huriyatul Fitriyah Noor, S.Pi., M.P selaku Dosen Pembimbing Pembantu/Sekretaris.
5. Deny Sapto Chondro Utomo, S.Pi.,M.Si. selaku Dosen Penguji Utama dan Pembimbing Akademik.
6. Kedua orang tua, ibu Sulimah dan bapak Marsudi

Bandar Lampung, Oktober 2025

Ilham Miftahul Firdaus

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat	3
1.4 Kerangka Pikir	4
1.5 Hipotesis	6
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Udang Vaname.....	8
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.1.2 Habitat Udang Vaname.....	9
2.1.3 Siklus Hidup.....	10
2.1.4 Kebiasaan Makan.....	11
2.2 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	11
2.2.2 Peranan	12
2.2.3 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	13
2.3 Bakteri <i>Lactobacillus</i> sp	14
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	14
2.3.2 Habitat	15
2.4 Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	15

2.4.2 Habitat.....	16
2.5 Probiotik.....	17
2.6 <i>Total Haemocyte Count</i> (THC).....	17
2.7 <i>Differential Haemocyte Count</i> (DHC)	18
2.8 <i>Lipid Droplet</i>	18
2.9 Kualitas Air	19
III. METODE PENELITIAN	20
3.1 Waktu dan Tempat.....	20
3.1.1 Waktu Penelitian.....	20
3.1.2 Tempat Penelitian	20
3.2 Bahan dan Alat.....	20
3.2.1 Bahan	20
3.2.2 Alat.....	22
3.3 Rancangan Penelitian.....	23
3.4 Prosedur Tahap Pelaksanaan.....	24
3.4.1 Pembuatan Media <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA).....	24
3.4.2 Pembuatan Media <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	24
3.4.3 Rekultur Bakteri <i>Bacillus Subtilis</i>	25
3.4.4 Kultur <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
3.5 Persiapan Penelitian	25
3.5.1 Persiapan Wadah.....	25
3.5.2 Persiapan Hewan Uji.....	26
3.5.3 Persiapan Pakan Uji	26
3.6 Tahap Pelaksanaan.....	27
3.6.1 Pemeliharaan.....	27
3.6.2 Uji LD ₅₀	27
3.6.4 Uji Tantang	27
3.7 Paramter Penelitian	28
3.7.1 Parameter Uji	28
3.7.2 <i>Total Hemosit Count</i> (THC).....	28
3.7.3 <i>Diferensial Hemosit Count</i> (DHC)	29
3.7.4 <i>Mean Time Death</i> (MTD).....	30
3.7.5 Tingkat Kelangsungan Hidup.....	30

3.7.6 <i>Lipid Droplet</i>	31
3.7.7 Gejala Klinis	31
3.7.8 Kualitas Air	31
3.8 Analisis Data.....	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 <i>Total Haemocyte Count (THC)</i>	33
4.2 <i>Differensial Hemosite Count (DHC)</i>	37
4.2.1 Sel hyalin	37
4.2.2 Sel granular	40
4.3 <i>Mean Time to Death (MTD)</i>	44
4.4 Tingkat Kelangsungan Hidup	46
4.5 <i>Lipid Droplet</i>	48
4.6 Gejala Klinis	52
4.7 Kualitas Air	54
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	56
5.1 Simpulan	56
5.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 Bentuk Pakan Udang Vaname	11
2 Bahan penelitian.....	21
3 Alat penelitian.	22
4 Hasil pengamatan lipid udang vaname secara mikroskopis.....	51
5 Gejala klinis udang vaname yang terinfeksi <i>V. parahaemolyticus</i>	53
6 Kisaran nilai kualitas air pada media pemeliharaan udang vaname pasca pemberian probiotik.	54
7 Kisaran nilai kualitas air pada media pemeliharaan udang vaname pasca uji tantang.	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pikir penelitian	5
2. Morfologi Udang Vaname	9
3. Siklus Hidup Udang Vaname	10
4. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	12
5. Tata letak akuarium pemeliharaan udang vaname	24
6. Kotak pada <i>Haemocytometer</i>	29
7. Nilai <i>Total Heamocyte Count</i> (THC) udang vaname	33
8. Persentase total hemosit udang vaname	34
9 .Bentuk sel hemosit udang vaname (pembesaran 40x).	35
10. Nilai sel hyalin udang vaname	37
11. Persentase sel hyalin udang vaname	38
12. Bentuk sel hyalin udang vaname pembesaran 40x	39
13. Nilai sel granular udang vaname	40
14. Persentase sel granular udang vaname	42
15. Bentuk sel granular.	42
16. <i>Mean Time to Death</i> (MTD)	44
17. Persentase tingkat kelangsungan hidup udang vaname	46
18. Persentase lipid droplet udang vaname	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Penelitian	73
2. Data Hasil Uji SPSS.....	74
3. Hasil uji SPSS Sel Hyalin	78
4. Hasil uji SPSS sel Granular.....	81
5. Hasil uji SPSS <i>Mean Time To Death</i> (MTD).....	83
6. Hasil uji SPSS Tingkat Kelangsungan Hidup	84
7. Hasil uji SPSS <i>Lipid Droplet</i>	84
8. Hasil uji LD50.....	87

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas utama dalam bidang budidaya perikanan karena metode produksinya tidak hanya efisien dari segi biaya, tetapi juga mendukung pengembangan budidaya secara intensif (Mangampa & Suwoyo, 2016). Menurut KKP (2021), pada tahun 2019 jumlah produksi udang vaname dari kegiatan budidaya sebanyak 861.261,21 ton dan jumlah ekspor sebesar 116.090,88 ton. Udang vaname telah berkembang secara pesat dan menjadi hasil budi daya perikanan untuk mendatangkan devisa negara (KKP, 2014). Udang vaname mempunyai beberapa kelebihan, seperti dapat dipelihara dengan padat tebar yang tinggi lebih dari 150 ekor/m², serta pemeliharaannya yang singkat yaitu 90-100 hari per siklus (Purnamasari dan Dewi, 2017). Akan tetapi saat ini budi daya udang vaname banyak sekali mengalami permasalahan, seperti terinfeksi oleh penyakit (Supono, 2021). Hal ini disebabkan dari lingkungan yang kurang baik, serta adanya patogen (Supono et al., 2019). Salah satu patogen yang sering menyerang udang vaname adalah *Vibrio parahaemolyticus* (Haditomo et al., 2018).

V. parahaemolyticus dapat mengakibatkan kematian udang hingga 100% dalam kurun waktu yang cukup singkat (Feliatra et al., 2012). Awal gejala klinis yang dialami udang pada saat terinfeksi *V. parahaemolyticus* yaitu tubuh berwarna hitam kemerahan terutama pada bagian insang serta seluruh anggota badan (Septiani et al., 2012). Infeksi *V. parahaemolyticus* pada udang vaname dimulai ketika bakteri masuk kedalam saluran pencernaan serta melepaskan dua toksin yaitu PiraA'vp dan PirB'v, kedua toksin ini dapat merusak sel-sel hepatopankreas, sebagaimana organ tersebut penting dalam metabolisme dan kekebalan tubuh pada udang vaname (Lai et al., 2015). Kerusakan ini memicu pengelupasan

epitel, nekrosis, dan akhirnya membuat hepatopankreas tampak kemerahan, warna tersebut menunjukkan tingkat keparahan akibat infeksi (Luangtrakul et al., 2021). Jenis strain ini dilaporkan sebagai salah satu jenis bakteri pembawa toksin dari agen yang menghasilkan *Acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) terhadap udang vaname (Tran et al., 2013). AHPND adalah penyakit yang merusak budi daya pada udang vaname, disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* yang memiliki plasmid virulen, sehingga dapat merusak hepatopankreas dan dapat menyebabkan kematian (Lightner et al., 2012; Soto-Rodríguez et al., 2015). Secara ekonomi, AHPND dapat menimbulkan kerugian yang besar. Di Thailand, kerugiannya mencapai US\$ 11,58 miliar akibat paparan penyakit dari AHPND (Nusantics., 2023), selanjutnya Vietnam mengalami kerugian sekitar US\$ 2,56 miliar sejak tahun 2011 (The Fish Site., 2022), dan secara global kerugian diperkirakan melebihi US\$43 miliar menurut (Aquaculture Magazine, 2022).

Salah satu upaya untuk mengatasi patogen, memperbaiki respon imun dan kondisi lingkungan budi daya adalah pengaplikasian probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bermanfaat bagi inangnya dengan cara mengubah komunitas mikroba, serta meningkatkan nilai nutrisi pakan, memperkuat respons tubuh terhadap penyakit, dan memperbaiki kualitas lingkungan (Verschuere et al., 2000). Probiotik berperan dalam menjaga keseimbangan mikroba di saluran pencernaan, menghambat pertumbuhan patogen, dan menghasilkan enzim yang membantu proses pencernaan, daya cerna yang meningkat mencerminkan optimalnya penyerapan nutrisi oleh tubuh (Jusadi et al., 2004). Pemberian probiotik atau zat tambahan ke dalam kolam diyakini mampu menjaga kualitas air dan menekan pertumbuhan patogen, sehingga menciptakan lingkungan budidaya yang sehat dan berkelanjutan (Khasani, 2007).

Pada penelitian ini menggunakan probiotik *Lactobacillus* sp. strain komersial dan strain isolat *B. subtilis* ATCC 6633. Probiotik *Lactobacillus* sp. secara komersial banyak digunakan dalam budidaya udang karena kemampuannya menjaga keseimbangan mikrobiota usus, menekan pertumbuhan patogen, dan meningkatkan sistem imun. Mekanisme kerjanya mencakup kompetisi dengan patogen sebagai nutrisi, serta produksi senyawa antimikroba seperti asam laktat dan bakteriosin (Balcázar et al., 2006; Vieira et al., 2010).

Selain itu, *Lactobacillus* juga merangsang gen imun non-spesifik seperti *prophenoloxidase* dan *lysozyme* yang meningkatkan pertahanan tubuh udang (Zhang et al., 2014; Supungul et al., 2004). Sementara itu, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 memiliki keunggulan berupa kemampuan membentuk spora yang tahan terhadap lingkungan ekstrem. Setelah masuk ke usus, spora akan aktif dan menghasilkan enzim serta metabolit bioaktif seperti surfaktan dan iturin yang bersifat antimikroba menurut (Cutting, 2011; Chen et al., 2019). Selain meningkatkan pencernaan, isolat ini juga memperkuat sistem imun udang dengan menaikkan aktivitas enzim pertahanan seperti fenoloksidase dan memperbaiki struktur jaringan hepatopankreas (Zokaeifar et al., 2012). Oleh karena itu, perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut terkait dengan penggunaan probiotik komersial dan isolat terhadap respon imun, ketahanan udang vaname yang terinfeksi oleh *V. parahaemolyticus* dan tingkat kelangsungan hidup udang vaname.

1.2 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu untuk membandingkan efektivitas probiotik *Lactobacillus* sp. strain komersial dan strain isolat *B. subtilis* ATCC 6633 dalam meningkatkan respon imun dan ketahanan udang vaname terhadap serangan *Vibrio parahaemolyticus*.

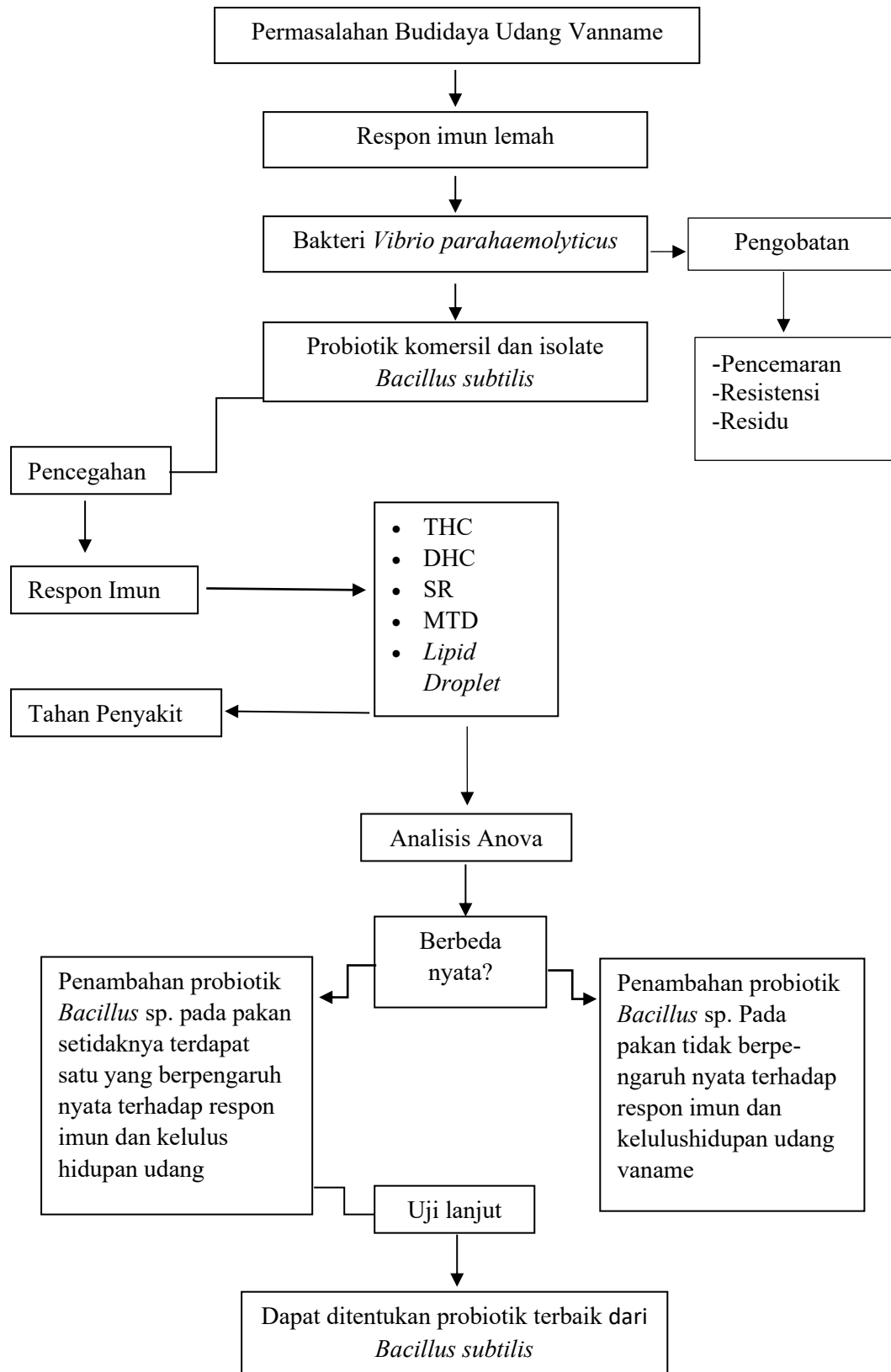
1.3 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pembudidaya mengenai penggunaan probiotik komersial *Lactobacillus* sp dan isolat *Bacillus subtilis*. sebagai salah satu upaya yang relevan dalam menekan dan mencegah pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada saat melakukan kegiatan budi daya udang vaname.

1.4 Kerangka Pemikiran

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan komoditas unggulan dalam budidaya karena pertumbuhannya cepat dan toleran terhadap kondisi lingkungan. Namun, penyakit seperti AHPND akibat infeksi *Vibrio parahaemolyticus* masih menjadi tantangan serius. Penggunaan antibiotik untuk mengatasi masalah ini berisiko menyebabkan resistensi dan pencemaran lingkungan. Sebagai solusi ramah lingkungan, probiotik seperti *Lactobacillus* sp. dan *B. subtilis* digunakan sebagai imunostimulan alami. Probiotik ini meningkatkan daya tahan udang, menekan patogen, dan memperbaiki sistem pencernaan.

Permasalahan yang terjadi saat ini disebabkan oleh kurangnya pengetahuan tentang pencegahan penyakit pada udang vaname, khususnya mengenai infeksi *V. parahemolyticus* yang dapat berdampak buruk terhadap umur dan pertumbuhan udang yang dibudidayakan. Pemberian probiotik terbukti bermanfaat dalam pengobatan penyakit mikroba dengan menghilangkan bakteri dan patogen berbahaya. Oleh sebab itu, pemberian probiotik sangat penting untuk keberhasilan mengatasi masalah tersebut. Kerangka pemikiran dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pemikiran

1.5 Hipotesis penelitian

Hipotesis pada penelitian ini sebagai berikut:

1. *Total Hemosit Count* (THC)

$H_0 : \tau_i = 0$

Perlakuan pemberian probiotik dengan dicampurkan pada pakan tidak berbeda nyata terhadap total haemocyte count (THC) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

$H_1 : \tau_i \neq 0$

Minimal satu pengaplikasian probiotik yang berpengaruh nyata terhadap *Total Haemosit Count* (THC) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

2. *Diferensial Hemosit Count* (DHC)

$H_0 : \tau_i = 0$

Perlakuan pemberian probiotik dengan dicampurkan pada pakan tidak berbeda nyata terhadap peningkatan *Diferensial Hemosit Count* (DHC) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

$H_1 : \tau_i \neq 0$

Minimal ada satu pengaplikasian probiotik yang berpengaruh nyata terhadap peningkatan *Diferensial Hemosit Count* (DHC) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

3. Tingkat Kelangsungan Hidup (SR)

$H_0 : \tau_i = 0$

Perlakuan pemberian probiotik yang dicampurkan pada pakan terhadap kenaikan presentase Tingkat Kelangsungan Hidup (SR) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

$H_1 : \tau_i \neq 0$

Minimal ada satu pengaplikasian probiotik yang berpengaruh nyata terhadap pakan pada kenaikan presentase Tingkat Kelangsungan Hidup (SR) udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

4. *Mean Time To Death* (MTD)

$H_0 : \tau_i = 0$

Perlakuan pemberian probiotik yang dicampurkan pada pakan terhadap ketahanan dan respon imun udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

$H_1 : \tau_i \neq 0$

Minimal ada satu pengaplikasian probiotik yang berpengaruh nyata terhadap pemberian probiotik dalam pakan pada ketahanan dan respon imun udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

5. *Lipid Droplet*

$H_0 : \tau_i = 0$

Perlakuan pemberian probiotik yang dicampurkan terhadap pakan pada jumlah persentase lipid pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

$H_1 : \tau_i \neq 0$

Minimal ada satu pengaplikasian probiotik yang berpengaruh nyata terhadap pemberian probiotik dalam pakan terhadap jumlah persentase lipid pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Udang Vaname

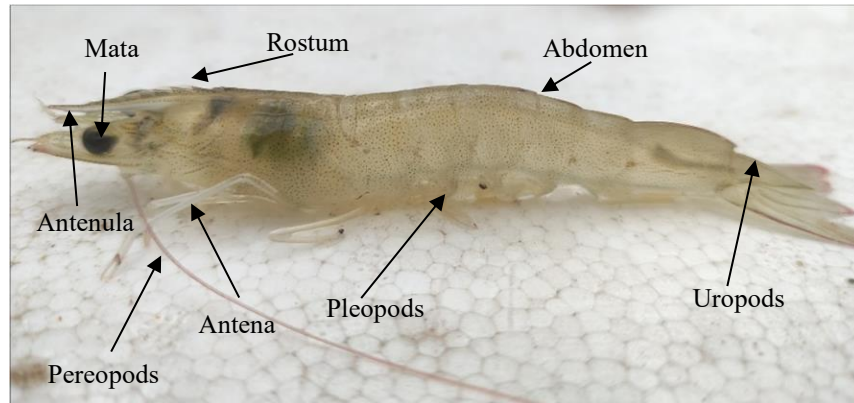
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi udang vaname menurut Wyban dan Sweeney (1991), sebagai berikut.

Kingdom : Animalia
Filum : Anthropoda
Subfilum : Crustase
Kelas : Malacostraca
Subkelas : Eumalacostraca
Ordo : Decapoda
Family : Penaeidae
Genus : *Penaeus*
Sub Genus : *Litopenaeus*
Spesies : *Litopenaeus vannamei*

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) mempunyai tubuh berbentuk silindris memanjang yang terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kepala, dada, dan abdomen. Tubuhnya dilindungi oleh eksoskeleton transparan berwarna putih keabu-abuan yang keras namun lentur. Bagian kepala dilengkapi dengan rostrum pendek yang bergerigi, sepasang mata majemuk, serta dua pasang antena panjang yang berfungsi sebagai alat peraba dan navigasi di dalam air. Udang ini memiliki lima pasang kaki jalan (*pereopoda*) dan lima pasang kaki renang (*pleopoda*) yang berperan dalam pergerakan serta membawa telur pada betina. Di bagian ekor terdapat uropoda dan telson yang membentuk kipas, membantu dalam berenang mundur dengan cepat. Ukuran tubuh dewasa dalam budidaya intensif berkisar

antara 10–12 cm panjangnya (Apriliani et al., 2016). Ciri-ciri morfologi ini menjadi dasar identifikasi spesies dan juga penting dalam pemantauan kesehatan selama proses budidaya. Berikut morfologi udang vaname dapat dilihat pada Gambar 2.



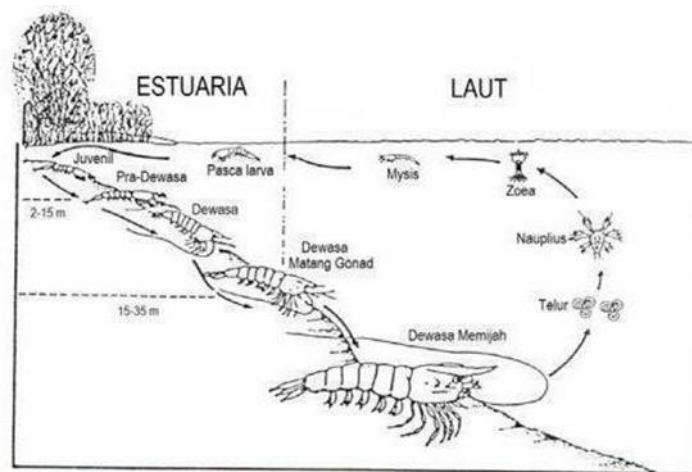
Gambar 2 Morfologi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

2.1.2 Habitat

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan spesies udang laut yang berasal dari perairan pesisir tropis dan subtropis di kawasan Samudra Pasifik bagian timur, mulai dari Meksiko hingga Peru (Martínez-Córdova et al., 2005). Udang ini biasanya ditemukan di perairan dangkal berlumpur, suhu optimum 26–30°C, dan salinitas antara 10–35 ppt (Erlangga et al., 2021). Spesies ini memiliki toleransi yang luas terhadap perubahan lingkungan, sehingga dapat dibudidayakan baik di perairan bersalinitas tinggi maupun rendah (Martínez-Córdova et al., 2005). Dalam budi daya intensif, habitat buatan seperti tambak dan kolam resirkulasi digunakan untuk menciptakan lingkungan yang optimal bagi pertumbuhan udang vaname (Supono et al., 2022).

2.1.3 Siklus Hidup

Udang vaname (*Litopenaeus vanamei*) dimulai dari telur yang menetas menjadi nauplius dengan waktu yang kurang dari 24 jam setelah pembuahan (Fauzi et al., 2022). Pada fase nauplius, larva belum mempunyai sistem pencernaan dan hidup dengan cadangan kuning telur. Larva berkembang menjadi zoea yang memiliki mulut dan mulai diberi pakan berupa fitoplankton seperti *Chaetoceros calcitrans* dan *Thalassiosira weissflogii*, yang terbukti meningkatkan pertumbuhan dan sintasan larva (Fahrur et al., 2019). Fase zoea selanjutnya berubah menjadi mysis, yang sudah mulai menyerupai udang kecil. Pada tahap post-larva, morfologi udang semakin lengkap dan mulai mampu mengonsumsi pakan buatan. Fase ini sangat krusial karena merupakan masa transisi sebelum dipindahkan ke kolam pembesaran (Erlangga et al., 2021). Setelah mencapai ukuran *juvenil*, udang akan mengalami fase pertumbuhan cepat hingga dewasa dan siap panen. Gambar 3. Menyajikan tahapan siklus hidup udang vaname mulai dari telur sampai menjadi udang dewasa.



Gambar 3. Siklus Hidup Udang Vaname

Sumber: FAO (2005)

2.1.4 Kebiasaan Makan

Sebagai hewan nokturnal, udang vaname lebih aktif mencari makan pada malam hari atau saat intensitas cahaya rendah, sementara pada siang hari mereka cenderung pasif dan berdiam di dasar tambak (Sanudin et al., 2015). Di habitat alaminya, udang bersifat omnivora, memakan berbagai bahan organik seperti plankton, alga, dan sisa-sisa organisme lain. Dalam sistem budidaya intensif, udang vaname dapat menyesuaikan diri dengan pakan buatan seperti pelet, asal-pakan pakan tersebut mudah untuk dicerna dan sesuai dengan kebutuhan nutrisinya (Ulumiah et al. 2020). Pada tabel 1 disajikan bentuk pakan udang vaname yang umum digunakan dalam kegiatan budi daya.

Tabel 1. Bentuk pakan udang vaname

Umur Udang (hari)	Berat Udang(gr)	Bentuk Pakan	Nomor Pakan
1 – 15	0,1 – 1	<i>Fine Crumble</i>	0
16 – 30	1,1 – 2,5	<i>Crumble</i>	1 + 2
31 – 45	2,6 – 5	<i>Crumble</i>	2
46 – 60	5,1 – 8	Pellet	2 + 3
61 – 75	8,1 – 14	Pellet	3
76 – 90	14,1 – 18	Pellet	3 + 4
91 – 105	18,1 – 20	Pellet	4
106 – 120	20,1 – 22,5	Pellet	4

Sumber : SNI 7549:2009

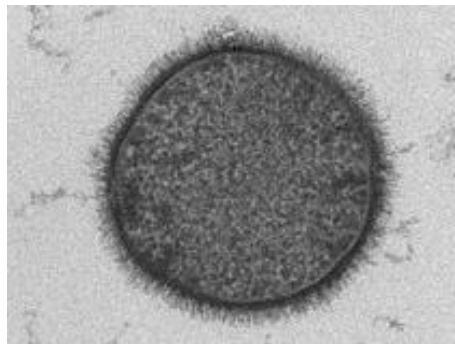
2.2 Bakteri *Bacillus subtilis*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Ehrenberg (1835), klasifikasi dari bakteri *Bacillus subtilis* yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>B. Subtilis</i>

Bakteri *Bacillus subtilis* tergolong sebagai salah satu bakteri gram positif yang mempunyai bentuk batang memanjang. Bakteri ini bersifat aerobik dikarenakan dalam proses metabolismenya membutuhkan oksigen untuk berkembang. *Bacillus subtilis* dapat membentuk endospora ketika dalam kondisi lingkungan yang kurang memungkinkan untuk bisa bertahan hidup. *Bacillus subtilis* dalam bentuk endospora dapat bertahan hingga 60 tahun lebih. Kondisi lingkungan yang ekstrim dan berkepanjangan akan mengakibatkan bakteri *Bacillus subtilis* mengalami fase tidur panjang. Secara umum bakteri ini dapat tumbuh pada tanah, air, dan tumbuhan yang telah terdekomposisi (Sholihati et al., 2015).



Gambar 4. Bakteri *Bacillus subtilis*

Sumber: Kosim & Putra (2010)

2.2.2 Peranan

Bacillus subtilis dapat dimanfaatkan sebagai produk bioteknologi secara oral untuk memperbaiki saluran pencernaan. Bakteri *B. subtilis* mempunyai sifat antagonistik pada bakteri gram negatif. Peranan ini dapat dimanfaatkan untuk mengendalikan bakteri gram negatif yang merugikan. Kandungan senyawa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *B. subtilis* menjadi antibiotik alami yang dihasilkan dari proses metabolisme (Budianto & Suprastyani, 2017). Bakteri yang mempunyai sifat antagonistik mampu sebagai pengendalian patogen, sehingga bersifat menguntungkan kemampuan untuk menghasilkan enzim *amilase*, *protease*, *pullulanase*, *chitinase*, *xylanase* dan *lipase* yang dapat digunakan sebagai

salah satu untuk mengoptimalkan proses pencernaan makanan baik manusia maupun hewan (Prihatiningsih et al., 2017).

2.2.3 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacillus subtilis ATCC 6633, dikenal juga sebagai strain E20, merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang yang berasal dari sumber fermentasi makanan seperti natto, serta dikoleksi secara resmi oleh *American Type Culture Collection*. Strain ini banyak digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur karena kemampuannya menghasilkan enzim protease, senyawa antimikroba, serta membentuk spora yang tahan terhadap kondisi lingkungan ekstrim. Dalam budidaya udang vaname, *B. subtilis* ATCC 6633 berperan dalam meningkatkan performa pertumbuhan, ketahanan terhadap stres, serta respons imun nonspesifik. Penelitian oleh Shen et al. (2010) membuktikan bahwa pemberian pakan mengandung *B. subtilis* 10^4 – 10^6 CFU/g selama 40 hari meningkatkan laju pertumbuhan, aktivitas fenoloksidase dan lisozim, serta enzim antioksidan seperti SOD dan GPx, dengan penurunan MDA sebagai penanda stres oksidatif. Liu et al. (2010) melaporkan bahwa aplikasi E20 melalui air pemeliharaan (10^9 CFU/L) pada fase larva meningkatkan kelangsungan hidup, toleransi terhadap salinitas dan nitrit, serta ekspresi gen profenoloksidase I/II dan lisozim.

Secara molekuler, Chien et al. (2020) mengungkap bahwa *B. subtilis* E20 mengaktifkan jalur metabolisme glutamin dan hexosamine biosynthetic pathway (HBP) di hepatopankreas udang, yang berkontribusi terhadap peningkatan senyawa imun seperti kreatinin dan protein O-glikosilasi, serta ekspresi gen antioksidan dan antimikroba. Selain itu, Tseng et al. (2009) menemukan bahwa probiotik ini meningkatkan aktivitas fagositosis dan ketahanan terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus* melalui peningkatan aktivitas enzim imun dan pertahanan seluler, sedangkan Liu et al. (2009) membuktikan bahwa E20 mampu memproduksi protease yang mendukung efisiensi pencernaan, konversi pakan, dan pertumbuhan udang secara signifikan. Dengan berbagai manfaat tersebut, *B. subtilis* ATCC 6633 menjadi salah satu kandidat probiotik unggulan yang potensial diterapkan secara berkelanjutan dalam sistem budidaya udang intensif.

2.3 Bakteri *Lactobacillus* sp.

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Beijerinck (1901), klasifikasi *Lactobacillus* sp. sebagai berikut:

Domain:	Bacteria
Filum:	Bacillota
Kelas:	Bacilli
Ordo:	Lactobacillales
Famili:	Lactobacillaceae
Genus:	<i>Lactobacillus</i>
Species	<i>Lactobacillus</i> sp.

Lactobacillus sp. merupakan bakteri Gram-positif berbentuk batang (rod-shaped), tidak membentuk spora, dan bersifat anaerob fakultatif hingga mikro-aerofilik. Sel bakteri ini umumnya memiliki ukuran berkisar antara 0,5–1,2 μm lebar dan 1–10 μm panjang, dan dapat ditemukan dalam bentuk tunggal, berpasangan, atau rantai pendek (Bhavini dan Sudeepa, 2020). Bakteri ini bersifat non-motil karena tidak memiliki flagel, serta tidak memproduksi enzim katalase (katalase-negatif). Koloni *Lactobacillus* pada media agar MRS biasanya tampak bulat, halus, sedikit menonjol, berwarna putih atau krem, dan tumbuh optimal pada suhu 30–45 C (Ludfiani et al., 2021). Dinding selnya tersusun atas lapisan pepti-doglikan yang tebal dan mengandung asam teikoat, khas bakteri Gram-positif (Firtel et al., 2004). Beberapa spesies seperti *L. acidophilus* memiliki struktur tambahan berupa S-layer protein pada permukaan sel, yang berfungsi dalam perlindungan dan adhesi pada permukaan inang. Morfologi khas ini mendukung peran *Lactobacillus* sebagai probiotik penting dalam pencernaan dan aplikasi industri pangan.

2.3.2 Habitat

Dalam lingkungan budidaya perairan, seperti tambak udang dan kolam ikan, *Lactobacillus* sp. dapat ditemukan di berbagai mikrohabitat, terutama di air budidaya, sedimen dasar tambak, dan saluran pencernaan organisme budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan berbagai jenis ikan. Bakteri ini dapat

diperkenalkan secara alami maupun melalui pemberian probiotik, baik dalam bentuk cair maupun campuran pakan (Hai & Fotedar 2009). Setelah diberikan, *Lactobacillus* sp. akan menetap di usus hewan budidaya dan membantu menyeimbangkan mikrobiota usus, meningkatkan sistem imun, dan menghambat pertumbuhan patogen seperti *Vibrio* spp. (Wang et al., 2008). Di luar tubuh inang, *Lactobacillus* juga dapat bertahan hidup di air kolam atau tambak dengan kandungan bahan organik yang cukup, terutama di zona dengan kandungan oksigen rendah dan pH netral hingga asam. Koloni *Lactobacillus* dapat berperan dalam menstabilkan kualitas air melalui produksi asam laktat dan kompetisi dengan mikroorganisme pembusuk, sehingga menciptakan lingkungan yang lebih sehat bagi organisme budidaya (Kesarcodi et al., 2008).

2.4 Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Pumipuntu dan Fujino et al., (1951) klasifikasi *V. parahaemolyticus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>V. parahaemolyticus</i>

Vibrio parahaemolyticus adalah bakteri Gram-negatif yang termasuk dalam filum Proteobacteria, kelas Gammaproteobacteria, ordo Vibrionales, dan famili Vibrionaceae. Spesies ini pertama kali diidentifikasi oleh Fujino et al., (1951) dan merupakan bagian dari genus *Vibrio* yang banyak ditemukan di lingkungan laut. Secara morfologi, bakteri ini berbentuk batang melengkung (*curved rods*) dan bersifat motil, dengan satu flagela polar yang memungkinkan pergerakan dalam lingkungan cair serta flagela lateral yang aktif dalam kondisi media kental atau saat membentuk biofilm (Kim & McCarter, 2000). *V. parahaemolyticus* tidak membentuk spora, tumbuh optimal pada suhu antara

20–30 °C, dan mampu bertahan di salinitas tinggi, menjadikannya bakteri halofilik (Letchumanan, 2014). Ciri khas fisiologis lain meliputi kemampuan positif terhadap uji oksidase dan katalase serta sifatnya yang fakultatif anaerob. Adaptasinya terhadap suhu laut dan lingkungan asin juga terkait dengan ekspresi gen yang mengatur adhesi dan pembentukan biofilm, yang menjadi faktor virulensinya (Rosa et al., 2017).

2.4.2 Habitat

Vibrio parahaemolyticus merupakan bakteri halofilik yang tersebar luas secara global di lingkungan laut, estuari, dan perairan pantai tropis maupun subtropis. Habitat alaminya mencakup air laut dengan salinitas sedang hingga tinggi serta organisme laut seperti kerang, udang, dan zooplankton (Martinez-Urtaza et al., 2005). Penelitian oleh Martinez-Urtaza dan kolega menemukan bahwa *V. parahaemolyticus* tidak hanya umum di muara sungai, tetapi juga terdeteksi secara konsisten di wilayah laut lepas, terutama yang terkait dengan zooplankton sebagai media transportasi dan reservoir ekologis (Martinez-Urtaza et al., 2012). Perubahan musim dan suhu air laut, seperti yang terjadi selama fenomena El Nino, telah dikaitkan dengan penyebaran global strain pandemi bakteri ini ke wilayah lintang yang lebih tinggi (Karunasagar & Raghunath, 2016). Selain itu, keberadaan bakteri ini juga ditemukan pada sampel kerang komersial, menunjukkan peran penting habitat laut sebagai jalur masuk ke rantai makanan manusia (Pereira et al., 2007).

2.5 Probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup, jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya, terutama dengan memperbaiki keseimbangan mikrobiota di saluran pencernaan. Probiotik umumnya terdiri dari bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, serta beberapa jenis ragi seperti *Saccharomyces*. Probiotik bekerja dengan meningkatkan fungsi pencernaan, meningkatkan sistem imun, dan melindungi tubuh dari infeksi patogen melalui mekanisme kompetisi dan modulasi mikrobiota usus.

Menurut (Sudaryono et al. 2014) menyebutkan bahwa probiotik seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, dan *Pseudomonas putida* mampu meningkatkan efisiensi pemanfaatan pakan, pertumbuhan, dan kelulushidupan ikan lele dumbo melalui perbaikan kualitas pencernaan dan perlindungan terhadap patogen (Sudaryono et al., 2014). Sementara itu, studi lain oleh (Li et al. 2022) juga menunjukkan bahwa *Bacillus cereus* dan *B. subtilis* mampu memperbaiki keseimbangan mikrobiota usus ikan maupun udang melalui peningkatan bakteri menguntungkan dan penurunan bakteri patogen seperti *Aeromonas*, dan *Vibrio* serta memperbaiki fungsi usus (Li et al., 2022).

2.6 *Total Haemocyte Count (THC)*

Total Haemocyte Count (THC) adalah indikator penting dalam menilai status imun non-spesifik udang vaname. THC mencerminkan respons imun terhadap stres lingkungan, infeksi, maupun perlakuan imunostimulan. Penelitian menunjukkan bahwa THC udang vaname menurun signifikan saat mengalami stres suhu dingin (*cold shock*), yang dipicu oleh peningkatan hormon norepinefrin dan aktivasi apoptosis sel darah (Chang et al., 2009). Penurunan THC juga ditemukan saat udang dipapar stres salinitas rendah atau nitrit, yang memperlemah sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan risiko infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (Li et al., 2010, Tseng & Chen, 2004). Sebaliknya, pemberian imunostimulan seperti betaglukan jamur, ekstrak *Gracilaria tenuistipitata*, maupun spirulina terbukti meningkatkan THC secara signifikan, memperkuat sistem imun dan ketahanan terhadap infeksi bakteri (Yang et al., 2014; Chen, 2019).

2.7 *Differential Haemocyte Count (DHC)*

Differential Haemocyte Count (DHC) merupakan indikator penting sistem imun non-spesifik udang vaname (*Litopenaeus vannamei*), yang mencerminkan proporsi tiga jenis sel darah (hialin, semi-granular, dan granular) dengan fungsi imun yang berbeda. Komposisi DHC dapat berubah akibat stres lingkungan seperti hipoksia dan fluktuasi salinitas atau suhu, yang cenderung menurunkan proporsi sel granular dan aktivitas imun udang

(Pan et al., 2008; Pazir et al., 2020; An et al., 2012). Selain itu, imunostimulan seperti β -glukan jamur, probiotik, dan ekstrak tanaman dapat meningkatkan DHC dan memperkuat respon imun udang terhadap infeksi patogen (Yang et al., 2014; Chiu et al., 2007; Endayani, 2019). Oleh karena itu, DHC berperan sebagai parameter diagnostik penting dalam memantau kesehatan dan efektivitas perlakuan imun pada budidaya udang.

2.8 *Lipid Droplet*

Pada udang vannamei, *lipid droplet* (LD) merupakan organel penyimpan lipid netral seperti trigliserida dan ester kolesterol, yang dilapisi oleh monolayer fosfolipid dan protein spesifik, termasuk LvPerilipin. Penelitian oleh Li et al. (2022) menunjukkan bahwa *Vibrio parahaemolyticus*, penyebab infeksi HPV, meningkatkan ekspresi LvPerilipin dan akumulasi LD. Ekspresi LvPerilipin yang berlebihan menurunkan regulasi LD, meningkatkan kadar ROS, dan memengaruhi viabilitas udang. Sementara itu, Jannatul et al. (2022) melaporkan bahwa trigliserida (~0,71% dari total lipid), fosfolipid, dan kolesterol dalam hepatopankreas pada salinitas optimal berperan penting dalam metabolisme energi dan pembentukan membran. Dengan demikian, LD pada udang vannamei tidak hanya berfungsi sebagai cadangan energi, tetapi juga berperan dalam adaptasi terhadap stres lingkungan dan pertahanan imun.

2.9 *Kualitas Air*

Menjaga kualitas air merupakan hal yang sangat krusial dalam budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Beberapa parameter utama seperti suhu (26–30 °C), salinitas (30–33 ppt), pH (7,5–8,5), kadar oksigen terlarut minimal 4 ppm, serta tingkat amonia dan nitrit yang rendah harus selalu dipantau agar udang bisa tumbuh optimal dan bertahan hidup. Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan sistem biofloc dan biofilter mampu menjaga stabilitas parameter tersebut, terutama dengan menekan kadar amonia dan nitrit setelah fase awal pertumbuhan mikroorganisme (Chen et al., 2021). Kondisi air yang stabil terbukti dapat meningkatkan laju pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup udang

hingga 80 % Subedi & Shrestha. (2020). Selain itu, kandungan bahan organik, pH, dan keberadaan plankton juga menjadi indikator penting dalam menilai kesehatan air tambak (Han et al., 2024). Pedoman budidaya menyarankan agar pH tetap berada di kisaran 7,5–8,5, amonia bebas di bawah 0,01 ppm, dan tingkat alkalinitas minimal 80 ppm guna mencegah stres dan gangguan metabolisme pada udang (Xu et al., 2021). Oleh karena itu, pengelolaan kualitas air yang konsisten sangat berpengaruh terhadap keberhasilan budidaya udang vaname.

II. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

3.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan November 2024 sampai dengan Februari 2025.

3.1.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan yang digunakan pada penelitian

No.	Nama Bahan	Merek	Spesifikasi	Kegunaan
1	Udang Vaname	CP. Prima Akuakultur	DOC 30 hari	Hewan uji.
2	Alkohol 70%	Onemed	1 liter	Sterilisasi.
3	(TSB)	Inlabtek	500 mL	Pengenceran.
4.	Na-citrate 10%	Indo reagen	100 mL	Antikoagulan.
5.	Akuades	Pure water	5 L	Sebagai pengencer.
6.	Giemsa	Indo Reagen	100 mL	Pewarnaan sampel.
7.	Metanol	Cliger Shop	1 liter	Pelarut.
8.	Air Laut	Laut Lampung Selatan	5000 liter	Media Pemeliharaan.
9.	Media TSA	Himedia	100 g	Media Kultur Bakteri.
10.	Probiotik Kome- rsil <i>Lactoba- cillus</i> sp.	CV. Pradipta Paramita	1 L	Meningkatkan Kesehatan dan imun udang.
	Probiotik Isolate <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	Agavilab	10 mL	Meningkatkan Kesehatan dan imun udang.
12.	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Indilab Scientific	10 mL	Sebagai bakteri uji.
13.	Pakan Pelet	Fengli	2A	Pakan Hewan Uji.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada tabel 3.

Tabel 3. Alat yang digunakan pada penelitian.

No.	Alat	Konsentrasi	Merek	Kegunaan/Manfaat
1.	Kontainer	Kapasitas 20 L	Shinpo	Tempat Pemeliharaan Hewan Uji.
2.	Selang Aerasi	2 m	Puso	Untuk Menyalurkan oksigen.
3.	Batu Aerasi	2 cm	HappyAkvarium	Pemecah Gelembung udara.
4.	Blower	1800 LPM	Resun	Pompa udara.
5.	<i>Syringe</i>	1 cc	Onehealth	Mengambil darah.
6.	Tabung Corning	15 mL	Onemed	Menyimpan Media.
7.	Timbangan Digital	200 g	MTE	Menimbang bahan.
8.	Autoklaf	18 L	GEA YX	Sterilisasi.
9.	Erlenmeyer	250 mL	Onelab	Wadah bahan media.
10.	Botol Spray	100 mL	Yoneto	Pengaplikasian Probiotik.
11.	<i>Haemocytometer</i>	0,100 mm 0,0025 mm ²	Assistant	Bilik Hitung.
12.	Mikroskop	WF 10x/18mm	Optika B-159	Mengamati Objek.
13.	Kaca Preparat	1x3 inch	Italy Yazumi	Meletakkan objek.
14.	Mikrotube	1,5 mL	Onelab	Menyimpan darah udang.
15.	<i>Vortex</i>	500-3500 Rpm	Uchen	Menghomogenkan sampel.
16.	pH Meter	EZ9908	Marumura	Mengukur tingkat keasaman.
17.	DO Meter	DO-5510	Lutron	Mengukur kadar oksigen terlarut.
18.	Refraktometer	0-100%	ATC	Mengukur tingkat salinitas.
19.	Termometer	10-110 C°	Termtermometer	Mengukur suhu air.
20.	Bunsen	150 mL	Bunsen spirtus	Sterilisasi alat.
21.	Hotplate	SH-2	Magnetic stirer	Pengaduk dan pemanas.
22.	Plastik Tahan Panas	20x20	Sparta	Membungkus bahan media.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan perlakuan berbeda, dengan pemberian perlakuan probiotik selama 45 hari. Adapun rancangan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 3 ulangan.

Model rancangan acak lengkap RAL yang digunakan adalah :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + ij$$

Keterangan :

Y_{ij} : data pengamatan pengaruh dosis probiotik ke-i, ulangan ke-j

μ : nilai tengah umum

τ : pengaruh dosis probiotik ke-i

ij : galat percobaan pada pengaruh dosis probiotik pada pakan ke-i

dan ulangan ke-j

i : perlakuan dosis probiotik ke-i

j : ulangan ke-j

Berikut adalah perlakuan yang diberikan pada penelitian ini sebagai berikut :

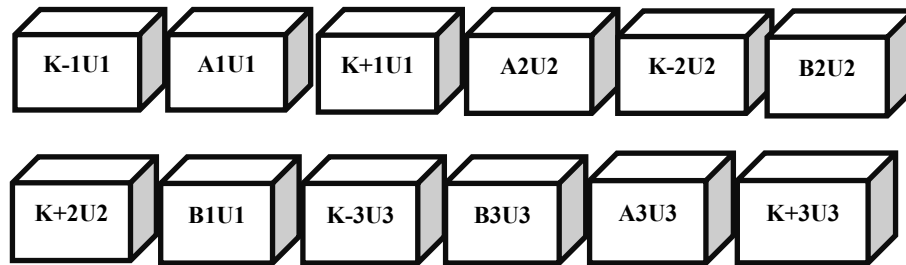
K(+) : Tanpa pengaplikasian probiotik komersil *Lactobacillus* sp. atau isolat *Bacillus* ATCC 6633 0 mL/kg pakan dan diuji tantang dengan *Vibrio parahaemolyticus*

K(-) : Tanpa pengaplikasian probiotik komersil *Lactobacillus* sp. atau isolat *Bacillus* ATCC 6633 0 mL/kg pakan dan tidak diuji tantang dengan *Vibrio parahaemolyticus*

A : Pengaplikasian probiotik komersial *Lactobacillus* sp. 10^6 CFU/pakan dengan dosis 60 mL/kg pakan dan di uji tantang dengan *Vibrio parahaemolyticus*.

B : Pengaplikasian isolat *B. subtilis* ATCC 6633 10^6 CFU/pakan dengan dosis 60 mL/kg pakan di uji tantang dengan *Vibrio parahaemolyticus*.

Berikut susunan rancangan penelitian yang disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5 Tata letak akuarium pemeliharaan udang vaname

3.4 Prosedur Tahap Pelaksanaan

Prosedur penelitian meliputi persiapan media, persiapan bakteri uji, persiapan wadah, persiapan hewan uji, persiapan pakan uji, pemeliharaan hewan uji, persiapan uji LD50, pelaksanaan ujiantang dan perhitungan parameter penelitian.

3.4.1 Pembuatan Media *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Media TSA ditimbang sebanyak 4 g, dimasukkan bubuk media yang sudah ditimbang ke dalam masing-masing erlenmeyer 500 ml. Kemudian ditambahkan akuades 100 mL ke dalam erlenmeyer. Dimasukkan *magnetic stirrer* ke dalam erlenmeyer, ditutup bagian ujung erlenmeyer menggunakan aluminium foil. Media diaduk dengan hotplate dengan suhu 80°C selama 15 menit. Setelah itu media yang sudah homogen dimasukkan kedalam plastik tahan panas, kemudian media diautoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C. Tahap terakhir yaitu media dituang ke dalam cawan sebanyak 15-20 mL/cawan.

3.4.2 Pembuatan Media *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Media TSB ditimbang sebanyak 3 g, bubuk media yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Kemudian tambahkan akuades 100 mL. Dimasukkan *magnetic stirrer* ke dalam erlenmeyer, lalu tutup bagian ujung erlenmeyer menggunakan aluminium foil. Media dihotplate selama 15 menit dengan suhu 80°C. Tuang media TSB ke dalam tabung corning sebanyak 9 mL/tabung.

Tahap terakhir media dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, dan diautoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C.

3.4.3 Rekultur Bakteri *Bacillus Subtilis*

Masukkan media TSA ke dalam *laminary flow* yang sudah mengeras pada cawan petri. Kemudian ambil bakteri *Bacillus subtilis* sebanyak 100 µl menggunakan jarum ose yang berada di media TSA miring, setelah itu bakteri di goreskan pada permukaan media pada cawan secara merata. Kemudian media di masukkan kedalam inkubator selama 8 jam dengan suhu 36°C. Bakteri yang telah tumbuh lalu di ambil menggunakan jarum ose dan di goreskan pada media TSA tabung dan diinokulasikan, setelah itu dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu 4°C.

3.4.4 Kultur *Vibrio parahaemolyticus*

Metode kultur *Vibrio parahaemolyticus* dilakukan dengan menggoreskan isolat dari media TSA (*Tryptic Soy Agar*) miring ke permukaan media TSA dalam cawan petri secara aseptik, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Setelah pertumbuhan koloni diperoleh, satu ose koloni diambil dan diinokulasikan ke dalam 10 mL media TSB (*Tryptic Soy Broth*), lalu diinkubasi kembali pada suhu yang sama selama 18–24 jam untuk memperoleh kultur cair. Kultur tersebut selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan media TSB hingga mencapai konsentrasi akhir 10⁶ CFU/mL, dengan cara mengambil 1 ml kultur dan dimasukkan ke dalam 9 mL TSB (10⁸), lalu dilanjutkan hingga pengenceran 10⁶. Kultur hasil pengenceran ini siap digunakan untuk keperluan pengujian lebih lanjut.

3.5 Persiapan Penelitian

3.5.1 Persiapan Wadah

Wadah pemeliharaan berupa kontainer berukuran 48 x 31 x 27 cm sebanyak 12 kontainer dan volume air 20 L. Wadah dicuci menggunakan detergen, lalu dibilas sampai bersih terlebih dahulu, lalu dikeringkan. Setelah itu dilakukan sterilisasi media (air) menggunakan larutan kaporit dengan dosis 2 ppm. Selanjut-

nya dilakukan pemberian *thiosulfat* dengan dosis 2 ppm untuk menghilangkan kadar kaporit dalam air dan diendapkan selama 2 jam, sebelum air baru dimasukkan kembali. Kontainer dilengkapi dengan aerator, masing-masing kontainer diisi dengan air laut steril salinitas 30 ppt.

3.5.2 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah udang vaname berukuran 5 g yang telah diaklimatisasi selama 2 hari untuk penyesuaian terhadap lingkungan. Udang ini diperoleh dari CPP Kalianda, Lampung Selatan. Udang dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan dengan kepadatan 10 ekor/kontainer. Perhitungan kelangsungan hidup dilakukan pada akhir akhir ujiantang, dengan menghitung jumlah udang yang masih hidup.

3.5.3 Persiapan Pakan Uji

Pakan uji disusun menggunakan pakan komersil dengan kandungan protein 40% sebanyak 3 kg yang digunakan selama 75 hari pemeliharaan pada 12 kontainer, masing-masing berisi 10 ekor udang vaname dengan bobot awal 5 g dan bobot akhir sekitar 18 g per ekor. Probiotik cair ditambahkan sebanyak 6% dari total pakan (180 mL), serta putih telur sebanyak 2% (60 mL) sebagai perekat agar probiotik dapat menempel secara merata pada permukaan pakan. Pencampuran probiotik dilakukan dua kali dalam seminggu, sehingga selama penelitian terdapat 22 kali aplikasi probiotik, dengan volume probiotik per aplikasi sekitar 8,2 mL. Pakan diberikan sebanyak empat kali sehari, dengan total pemberian harian sebesar 39,47 g atau sekitar 3,29 g per akuarium per hari. Berdasarkan biomassa rata-rata selama pemeliharaan (1.380 g), *Feeding rate* (FR) rata-rata selama 75 hari adalah sekitar 2,86%, yang sesuai dengan kisaran kebutuhan pakan untuk udang vaname pada fase pertumbuhan tersebut.

3.6 Tahap Pelaksanaan

3.6.1 Pemeliharaan

Udang vaname sebanyak 120 ekor dipelihara selama 64 hari lalu dilanjutkan dengan 11 hari pemeliharaan untuk ujiantang. Udang vaname diberi pakan dengan campuran probiotik pada dosis sesuai dengan perlakuan (K+ (0mL), K- (0mL), A (60mL *Lactobacillus* sp. 10^6 CFU/kg pakan), dan B (60mL isolat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 10^6 CFU/kg pakan). Frekuensi pemberian pakan 4 kali dalam sehari dengan FR 3%, yaitu pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB. Sisa pakan dan kotoran pada akuarium akan dibersihkan dengan metode sipon. Sipon dan pergantian air dilakukan setiap pagi untuk menghindari adanya penumpukan bahan organik pada akuarium yang dapat menyebabkan stres pada udang. Pergantian air disesuaikan dengan volume air yang terbuang saat penyiponan.

3.6.2 Uji LD₅₀

Uji LD₅₀ bertujuan untuk menentukan dosis bakteri yang dapat mematikan setengah dari populasi udang. Dalam penelitian yang dilakukan, metode kohabitasi diterapkan pada udang vaname untuk mengetahui dosis bakteri yang dapat menyebabkan kematian hingga 50% populasi udang. Uji LD₅₀ dilakukan dengan menyiapkan 5 akuarium, pada masing-masing akuarium berisi 20 L air laut. Setiap akuarium diisi 10 ekor udang vaname. Dosis bakteri yang digunakan yaitu 1 mL suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan masing-masing kepadatan 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 CFU/mL. Pengamatan dilakukan selama 7 hari untuk mengetahui dosis yang tepat dalam menyebabkan kematian 50% pada populasi udang vaname.

3.6.3 Uji Tantang

Ujiantang dilakukan setelah 64 hari pemeliharaan, selanjutnya dilakukan ujiantang selama 11 hari. Ujiantang dilakukan dengan cara menginfeksi udang menggunakan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* (kepadatan 10^6 CFU/mL) secara kohabitasi (perendaman) dengan dosis 1 mL. Selama ujiantang berlangsung,

pengamatan gejala klinis dan perubahan tingkah laku terhadap udang. Pada hari ke-75 yaitu 11 hari pasca ujiantang, dilakukan pengambilan sampel darah untuk mengetahui *Total haemocyte count* (THC), *Differential haemocyte count* (DHC). Selain itu, ditulis jumlah udang yang mati hingga ujiantang berakhir.

3.7 Paramter Penelitian

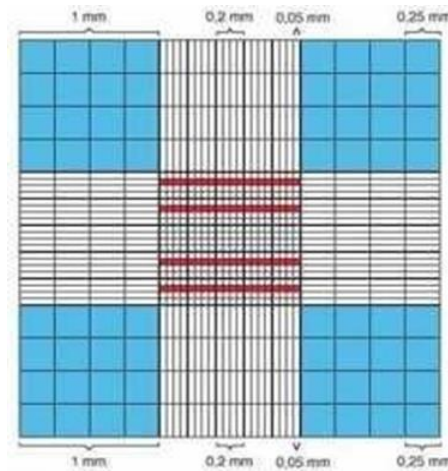
3.7.1 Parameter Uji

Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu: *Total haemocyte count* (THC), *Differential haemocyte count* (DHC), MTD, gejala klinis, tingkat kelangsungan hidup, *lipid droplet*, dan kualitas air. Pengamatan dilakukan sebanyak 4 kali selama pemeliharaan yaitu pada hari ke-0, hari ke-25 dan hari ke-45, kemudian dilanjutkan dengan ujiantang menggunakan *Vibrio parahaemolyticus* selama 11 hari dengan pengamatan pada hari ke-75 pemeliharaan.

3.7.2 Total Hemosit Count (THC)

Selama penelitian, perhitungan hemosit udang dilakukan 4 kali, pada hari ke 0, hari ke-25, hari ke 45 dan hari ke 75 akhir penelitian. Perhitungan total hemosit mengacu berdasarkan metode Brock & Madigan (1991). Hemolim segar yang diperoleh diencerkan menggunakan *Phosphate buffer saline* (PBS), lalu sampel yang telah diencerkan diambil menggunakan mikropipet dan diletakkan di atas permukaan hemocytometer pada bilik tengah dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x yang terdapat pada Gambar 6. Perhitungan jumlah total hemosit menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Total\ hemosit = \frac{\sum_{tiap\ sel}}{\sum_{total}} \times jenis\ sel \times 10^4$$



Gambar 6. Kotak pada haemocytometer

3.7.3 *Diferensial Hemosit Count (DHC)*

Untuk mengukur jumlah differensial hemosit berdasarkan metode Martin dan Graves (1985), hemolymph ditetaskan pada kaca preparat dan dibuat ulasan, dikeringkan dan difiksasi dengan etanol 95% selama 5 menit dan dikeringkan. Pewarnaan preparat direndam dalam larutan giemsa 10%. Setelah itu, dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan kering selama 15-20 menit. Untuk memeriksa hemolymph, digunakan mikroskop pembesaran 100 x untuk melihat jenis selnya: sel granular, dan hialin. Jumlah hemosit dihitung hingga 100 sel dan ditetapkan persentase serta tiap jenisnya. Diferensial hemosit dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

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

3.7.4 Mean Time Death (MTD)

Pengamatan dilaksanakan setelah udang vaname diinjeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* lalu di analisa setiap 5 jam sekali dan dicatat berapa jumlah kematian tiap perlakuan. Kegiatan ini dilakukan hingga hari ke-75 setelah udang vaname diinfeksi. Rata-rata waktu kematian dapat dihitung menggunakan rumus Istiqomah et al. (2006), sebagai berikut :

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n aibi}{\sum_{i=1}^n bi}$$

Keterangan

a_i : Waktu kematian pada jam ke i (jam)

b_i : Jumlah udang yang mati pada jam ke i (ekor)

3.7.5 Tingkat Kelangsungan Hidup

Perhitungan tingkat kelulushidupan dilaksanakan pada akhir penelitian. Uji ini dilaksanakan dengan cara memberikan infeksi *V. parahaemolyticus* dengan kepadatan yang dipakai 10^6 CFU/mL untuk semua hewan uji lalu dilakukan pemeliharaan selama 15 hari. Setelahnya udang vaname yang mati dihitung tiap perlakuan. Perhitungan tingkat kelulushidupan pada udang vaname ini menggunakan rumus persamaan berasal dari Muchlisin et al. (2016), sebagai berikut:

$$SR = \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

SR : tingkat kelangsungan hidup (%)

N_t : Jumlah udang vaname pada akhir penelitian (ekor)

N_0 : Jumlah udang vaname pada awal penelitian (ekor)

3.7.6 *Lipid Droplet*

lipid droplet digunakan sebagai indikator ditemukannya cadangan makanan dalam hepatopankreas udang vaname sebagai sumber energi. Udang vaname yang baik mengandung $> 30\%$ *lipid droplet*. Identifikasi *lipid droplet* sesuai dengan pernyataan Grobest, (2019) sampel udang yang diambil hepatopankreasnya dengan cara dibedah pada bagian kepala hingga dua ruas perut udang. Terdapat bagian kecil dari sisi bawah sebelah dalam hepatopankreas (dekat pangkal usus) lalu diambil menggunakan pinset. Sampel hepatopankreas diletakkan di atas kaca preparat dan ditutup dengan kaca slide. Pengamatan dan pembacaan *lipid droplet* dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 - 100x.

3.7.7 Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis pada udang vaname dilakukan setelah uji tantang dengan bakteri *V. parahaemolyticus*. Gejala klinis diamati selama 15 hari dilihat dari perubahan perilaku (seperti penurunan aktivitas berenang dan nafsu makan), perubahan morfologi tubuh (seperti kerapuhan cangkang, perubahan warna hepatopankreas, dan adanya lesi atau bercak pada permukaan tubuh). Serta nafsu makan yang menurun.

3.7.8 Kualitas Air

Air merupakan hal yang paling utama dalam budidaya di bidang akuakultur, terutama budidaya udang vaname. Karena sebab itu, sangat penting dilakukan pengukuran serta pengamatan kualitas air yang digunakan untuk budidaya yaitu suhu, pH, DO, dan salinitas. Pengamatan kualitas air dilakukan pada saat penelitian berjalan mulai dari awal sampai akhir penelitian.

3.8 Analisis Data

Adapun data yang diperoleh dari hasil penelitian ditabulasi dengan menggunakan program Excel dan di analisis dengan program SPSS versi 26. Data para-

meter THC, Diferensial hemosit, MTD, SR dan *lipid droplet* yang digunakan pada penelitian ini adalah ANOVA (*analysis of variance*) dan apabila berbeda nyata akan diuji dengan uji lanjut Duncan dengan selang kepercayaan 95%. Sedangkan data gejala klinis dan kualitas air di analisis secara deskriptif.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *B. subtilis* ATCC 6633 lebih efektif dibandingkan probiotik komersial *Lactobacillus* sp. dalam meningkatkan respon imun dan ketahanan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap infeksi *V. parahaemolyticus*. Pemberian *B. subtilis* ATCC 6633 menghasilkan peningkatan jumlah hemosit, komposisi sel imun yang lebih baik, cadangan energi pada lipid droplet yang lebih stabil, serta tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi setelah ujiantang. Dengan demikian, *B. subtilis* ATCC 6633 dapat dinyatakan sebagai probiotik yang lebih unggul dan potensial diterapkan untuk mencegah penyakit *Vibrio* pada budi daya udang vaname.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disarankan agar dilakukan uji lanjutan dalam skala intensif untuk menguji konsistensi efektivitas isolat *B. subtilis* ATCC 6633 dalam kondisi lingkungan budidaya yang lebih kompleks dan dinamis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambas, I., Fotedar, R., & Buller, N. (2017). Health status of marron, *Cherax cainii*, fed customized probiotic *Bacillus mycoides*. *Journal Aquaculture Marine Biology*, 6(4), 339–344. <https://doi: 10.15406/jamb.2017.06.00165>
- An, L., Wang, A., Chen, J., & Yang, H. (2012). Impact of environmental stressors on haemocyte subpopulations in whiteleg shrimp. *Journal of Crustacean Immunology*, 6(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.-124759>
- Anas A, Sukumaran V, Nampullipurackal, D. D., Maniyath, S., Chekidhenkuzhiyil, J., Mary, A., Parakkaparambil, K, S. Tharakan, B. (2021). Probiotics inspired from natural ecosystem to inhibit the growth of *Vibrio* spp. causing white gut syndrome in *Litopenaeus vannamei*. *Biotech*, 11(2), 66. <https://doi: 10.1007/s13205-020-02618-2>.
- Apriliani, M., Sarjito, & Haditomo, A. H. C. (2016). Keanekaragaman agensia penyebab vibriosis pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan sensitivitasnya terhadap antibiotik. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 5(2), 98–107. <https://ejournal.s1.undip.ac.id/index.-php/jamt>
- Badan Standar Nasional. (2009). *Pakan buatan untuk udang vaname (Litopenaeus vannamei)*. Jakarta: SNI. 12 hlm.
- Balcázar, J. L., Blas, I., Ruiz Z, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.-2006.01.009>
- Beijerinck, M.W. (1901) Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles* (Section 2), 6, 212-243. <https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-delbrueckii>
- Bhavini K., & Sudeepa E. S. (2020). Review on *Lactobacillus fermentum*. International. *Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education*, 6(3), 719-726. www.ijariie.com

- Blaxhall P, Daisley K. (1973). Some blood parameters of the rainbow trout i the kamloops variety. *Journal Fish Biology*, 5:1-8. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>
- Budianto, B., & Suprastyani, H. (2017). Aktivitas antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Veteriner*, 18, 409-415. <https://dx.doi.org/10.19087/jveteriner.2017-18.3.409>
- Chang, C. C., Lee, Y. C., & Cheng, W. (2009). Cold shock induced changes in the immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(5), 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.011>
- Chang, C.-C., Lee, P. P., & Cheng, W. (2009). Cold shock-induced norepinephrine triggers apoptosis of haemocytes via caspase-3 in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(5), 760–766. <https://doi: 10.1016/j.fsi.2009.07.014>
- Chen, Z., Chang, Z., Zhang, L., Jiang, Y., Ge, H., Zhao, F., & Li, J. (2019). Effects of water recirculation rate on the microbial community and water quality in relation to the growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). 0(3). *BMC Microbiology*, 19, 192. <https://doi.org/10.1186/s-12866-019-1564-x>
- Chen, X., Xu, Z., Liu, Y., Ye, Z., Liu, J., & Liang, X. (2021). Water quality, microbial community and shrimp growth performance of *Litopenaeus vannamei* culture systems based on biofloc or biofilters. *Aquaculture Research*, 52(10), 5000–5013. <https://doi.org/10.1111/are.-15535>
- Chiu, S. T., Guo, S. Y., & Wang, S. Y. (2007). Effects of dietary administration of a herbal immunostimulant mixture on the immune response and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2), 364–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunology*, 23(2), 364-77. <https://doi: 10.1016/j.fsi.2006.11.010>.
- Chien, C. C., Lin, T. Y., Chi, C. C., & Liu, C. H. (2020). Probiotic, *Bacillus subtilis* E20 alters the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via glutamine metabolism and hexosamine biosynthetic pathway. *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01-014>
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>

- Dewi, I. C., Subariyanto, S., & Ernawati, E. (2023). Pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. dan *Bacillus* sp. dengan dosis yang berbeda pada media pemeliharaan terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan*, 3(1), 37–50. <https://doi.org/10.47767/-nektion.v3i1.444>
- Du, Y., Xu, W., Wu, T., Li, H., Hu, X., & Chen, J. (2022). Enhancement of growth, survival, immunity and disease resistance in *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Lactobacillus plantarum* Ep-M17. *Fish and Shellfish Immunology*, 129, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.-2022.08.066>
- Ehrenberg, C. G. (1835). *Die Infusionsthierchen als vollkommene organismen: Ein Blick in Das Tiefere Organische Leben Der Natur*. 548 hlm. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.58475>
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Endayani, R. P. (2019). Probiotik dan β -glukan dalam meningkatkan haemocyte counts udang putih. *Jurnal Ilmu Perikanan*, 11(3), 55–62. <https://repository.lppm.unila.ac.id>
- Erlangga, Y. M., Prakoso, V. A., & Andika, S. (2021). Pengaruh sistem bioflok terhadap kualitas air dan pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Akuakultur Tropis*, 7(1), 1–8.
- FAO. 2005. Cultured aquatic species information programme *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). <https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/-/Penaeus.monodon/en>. [diakses tanggal 20 Oktober 2024].
- Fahrur, M., Rusdi, I., & Sari, E. N. (2019). Pengaruh jenis pakan alami (*Chlorella* sp. dan *Tetraselmis* sp.) terhadap sintasan dan pertumbuhan larva udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 9(1), 47–54. <https://doi.org/10.33512/jpk.v9i1.6786>
- Feliatra, Zainuri, & Yoswaty, D. (2012). Pathogenitas bakteri *Vibrio* sp. terhadap udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Sungkai*, 2(1), 23–36. <https://ejournal.upp.ac.id/index.php/sungkai/article/view/466>
- Firtel, M., Henderson, G., & Sokolov, I. (2004). Nanosurgery observation of peptidoglycan strands in (*Lactobacillus helveticus*) cell walls. *Ultramicroscopy*. 101(2-4). <https://doi.org/10.48550/arXiv.q-bio/0407009>

- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., & Ueho, T. (1951). On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, 4(2), 299–304. <https://doi.org/10.5555/19542702324>
- Fyzul, N, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>
- Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation on growth and health of live bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*. 14(4), 289–299. <https://doi.org/10.1111/j.13652095.2007.00529.x>
- Grobest. (2019). *Prosedur monitoring kesehatan udang*. Tangerang. 14 hlm. www.grobest.com
- Haditomo, A. H. C., Djunaedi, A., dan Prayitno, S. B. (2018). The diversity of vibrios associated with vibriosis in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from extensive shrimp pond in Kendal District, Indonesia: *Earth dan Environmental Science*, 116(1), 1-7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012011>
- Hai, N. V. & Fotedar, R. (2009). Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos and β -1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture*, 289, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.001>
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 447, 1–6. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Han, T., Zhang, M., Feng, W., Li, T., Liu, X., & Wang, J. (2024). Effects of aeration intensity on water quality, nutrient cycling, and microbial community structure in the biofloc system of pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* culture. *Water*. 17(1), 41. <https://doi.org/10.3390/w17010041>
- Hauton, C. (2012). The scope of the crustacean immune system for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.005>

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Interaminense, J. A., Vogeley, J. L., Gouveia, C. K., Portela, R. S., Oliveira, J. P., Silva, S. M. B. C., Coimbra, M. R. M., Peixoto, S. M., Soares, R. B., Buarque, D. S., & Bezerra, R. S. (2019). Effects of dietary *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* in expression profile of immune related genes from hemolymph of (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.051>
- Interaminense, J. A., Vogeley, J. L., Albuquerque Costa, M. M., Mouriño, J. L. P., Martins, M. L., & Henrique, J. L. (2019). Effects of dietary *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* on the performance, immune response, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Research*, 50(5), 1378–1389. <https://doi.org/10.1111/are.14018>
- Istiqomah, I., Isnansetyo, A., Triyanto., Nitimulyo, K. H., & Murdjani, M. (2006). Patogenesitas *Vibrio fluvialis* 24SK terhadap kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan*, 8(1): 17–24. <https://doi.org/-10.22146/jfs.159>
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., & Muralidhar, M. (2022) Lipid class and fatty acid composition of whiteleg shrimp. *Aquaculture Research*, 53(16):5667–5677. <https://doi.org/10.1111/are.16049>
- Jusadi, D., Gandara, E., & Mokoginta, I. (2004). Pengaruh penambahan probiotik *Bacillus* sp.pada pakan komersil terhadap konversi pakan dan pertumbuhan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*). 3(1), 15–18. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 3(1). [https://jurnal.ipb.ac.id/index.php/jai/article-view/-3885?utm_source=chatgpt.com](https://jurnal.ipb.ac.id/index.php/jai/article/view/-3885?utm_source=chatgpt.com)
- Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Raghunath, P. (2016). *Ecology, virulence, and detection of pathogenic and pandemic Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00156>
- Kementrian Kelautan Perikanan. (2014). *Indonesia kuasai teknologi tambak udang. Akuakultur KKP*. Diakses dari <https://www.neraca.co.id/article/4-2910/akuakultur-kkp-indonesia-kuasai-teknologi-tambak-udang>

- Kementrian Kelautan Perikanan. (2021). *Laporan kinerja 2020* (p. 46). Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan. <https://kkp.go.id/publikasi/-akuntabilitas-kinerja/pelaporan-kinerja/detail/laporan-kinerja-kkp-20216655327b40b53.html>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- Kim, Y.K., & Mccarter, L.L.(2000) Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal Bacteriol*, 182(13), 3693–704. <https://doi:10.1128-/JB.182.13.3693-3704.2000>.
- Khasani, I. (2007). Aplikasi probiotik menuju sistem budi daya perikanan berkelanjutan. 2(2), 86-90. *Media Akuakultur*. https://scispace.com/pdf/-aplikasi-probiotik-menusu-sistem-budi-daya-perikanan-2t24hq9gz.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.13652095.2004.00327.x>
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Letchumanan, Vengadesh; Chan, Kok Gan; Lee, Learn Han. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*. 5, Article 705. <https://doi: 10.3389/fmicb.2014.00705>
- Li, X., Zhang, Y., Wang, Q., Chen, J., & Liu, Z. (2022). Effects of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* on gut microbiota balance and intestinal function in fish and shrimp. *Aquaculture Microbiome*, 7, 15. <https://doi: 10.1186/s42523-022-00123-4>
- Li, C.bC., Yeh, S. T., & Chen, J. C. (2010). Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low salinity stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(1), 121–127. <https://doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.003>

- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). *Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate*, 15(1), 40. <https://www.globalseafood.org/advocate/early-mortality-syndrome-affects-shrimp-in-asia/>
- Liu, K. F., Chiu, C. S., Shiu, Y. L., Cheng, W., & Liu, C. H. (2010). Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* e20 on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5–6), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.012>
- Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L., & Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1031–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>
- Luangtrakul, W., Boonchuen, P., Jaree, P., Kumar, R., Wang, H. C., & Somboonwiwat, K. (2021). Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. *PLoS Pathogens*, 17(3), e1009463. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009463>
- Ludfiani, D., Dini, Asmara., Widya, Wahyuni., Hastuti, A.E.T., Astuti, & Pudji (2021). *Identification of Lactobacillus spp. on basis morphological, physiological, and biochemical characteristic from jawa super chicken excreta. Web of Conferences*, 33, 06012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213306012>
- Luo, K., Liu, Y., Qin, G., Wang, S., Wei, C., Pan, M., Guo, Z., Liu, Q., & Tian, X. (2023). A comparative study on effects of dietary three strains of lactic acid bacteria on the growth performance, immune responses, disease resistance and intestinal microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 136, 108707. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108707>
- Magazine, A. (2022). *Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture*. <https://aquaculturemag.com/2022/05/16/-acute-hepatopancreatic-necrosis-disease-ahpnd-virulence-pathogenesis-and-mitigation-strategies-in-shrimp-aquaculture>
- Mangampa, M. & Suwoyo, H.S., (2016). Budidaya udang vaname (*litopenaeus vannamei*) teknologi intensif menggunakan benih tokolan. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(3), 351-361. <https://dx.doi.org/10.15578/-jra.5.3.2010-351-361>

- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., & Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1319–1320. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050322>
- Martinez-Urtaza, J., Blanco-Abad, V., Rodriguez-Castro, A., Ansede-Bermejo, J., Miranda, A., & Rodriguez-Alvarez, M. X. (2012). Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *The ISME Journal*, 6(5), 994–1006. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.156>
- Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 63(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>.
- Martin, G. G., & Graves, B. L. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology*, 185 (3), 339–348. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051850306>
- Martínez-Córdova, L. R., & Peña-Messina, E. (2005). Biotic communities and feeding habits of (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and (*Litopenaeus stylirostris* Stimpson, 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. *Aquaculture Research*, 36(11), 1075–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01323.x>
- Masriqah, N., & Munasik, M. (2022). The effectiveness of lactic acid bacteria on immune system of vannamei shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Advanced Zoology*, 44(2), 173–179. <https://doi.org/10.17762/jaz.v44i2.209>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Børgwald, J., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Muchlisin, Z. A., Arisa, A. A., Muhammadar, A. A., Fadli, N., Arisa, I. I., & Siti, A. M. N. (2016). Growth performance and feed utilization of keureling (*Tor tambra*) fingerlings fed a formulated diet with different doses of vitamin E (*alpha tocopherol*). *Journal Archives of Polish Fisheries*, 23, 47–52. <https://dx.doi.org/10.1515/aopf-2016-0005>
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics & immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>

- Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2014). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases* 38(11): 937-955. <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus probiotics* enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3–4), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>
- Nusantics. (2023). Kenali AHPND, musuh bebuyutan para petambak udang. <https://nusantics.com/en/blog/kenali-ahpnd-musuh-bebuyutan-para-petambak-udang>
- Ostovan, R., Pourmontaseri, M., Hosseinzadeh, S., & Shekarforoush, S. S. (2021). Interaction between the probiotic *Bacillus subtilis* (PY79 and ATCC 6633) and their metabolites on *Salmonella typhimurium* in Caco-2 cell culture. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(1), 91–97. <https://doi:10.18502/-ijm.v13i1.-5497>
- Pan, L. Q., Zhou, H. L., Wang, J. X., & Song, L. S. (2008). The effect of hypoxia and temperature stress on haemocyte parameters in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(2), 160–166. <https://doi.org.10.1016/j.fsi.2008.-04.006>
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., and Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 969-77. <https://doi:10.1007/s10695-009-9375-x>.
- Pazir, M. K., Ahmadi, A., & Hossein, Khezri, P. (2020). Effects of gradually declining salinity on haemolymph parameters of adult *L. vannamei*. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 2(4), 45–53. https://ijaah-ir/article-1-209-fa.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Pereira, C. S., Possas, C. A., Viana, C. M., & Rodrigues, D. P. (2007). Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), 64–67. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100011>
- Poormontaseri, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Kalantari, T. (2017). The effects of probiotic *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and its metabolite on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type A in Caco-2 cell culture. *BMC Microbiology*, 17(1), 150. <https://doi:10.1186/s12866-017-1051-1>

- Prihatiningsih, N., Djatmiko, H. A., & Lestari, P. (2017). Aktivitas siderofor *Bacillus subtilis* sebagai pemacu pertumbuhan dan pengendali patogen tanaman terung. *Jurnal Hama dan penyakit Tumbuhan Tropika*, 17(2), 170-178. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.217170-178>
- Purnamasari, I., & Dewi, P. (2017). Pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di tambak intensif. *Jurnal Enggano*, 2(1), 58–67. <https://doi.org/10.31186/jenggano.2.1.58-67>
- Putri, R. A., Safitri, E., & Murniati. (2019). Pengaruh salinitas terhadap pertumbuhan dan kelulushidupan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Akuakultur Tropika*, 3(2), 112–119. <https://ejournal.unib.ac.id/index.php/-jatropika/article/view/10500>
- 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 and Shellfish Immunology*, 45(2): 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.018>
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture*, 191(4), 271–288. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00440-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00440-3)
- Ringø E, Hoseinifar SH., Ghosh K., Doan HV., & Beck BR. (2018). Song sk. lactic acid bacteria in finfish an update. *Front Microbiology*. 10(9), 1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>.
- Rosa, J. V. da, Kæfer, K., Conceição, N. V. da, Conceição, R. C. S. da, and Timm, C. D. (2017). Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(4), 379–384. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000400007>
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS ONE*. 9(3), e91853. <https://doi.org/10.1371/-apx journal.pone.0091853>
- Sanudin, N., Tuzan, A. D., Kawamura, G., & Yong, A. S. K. (2015). Effect of different lighting conditions on feeding activity and eye adaptation of post larvae *Penaeus vannamei*. *Jurnal Teknologi*. 77(33), 1–6. <https://doi.org/10.11113/jt.v77.6993>

- Septiani, G., Priyatno, S., & Anggoro, S. (2012). Antibacterial activity of jeruju (*Acanthus ilicifolius*) extracts on the in vitro growth of the *Vibrio harveyi*. *Jurnal Veteriner*, 13(3), 257-262. <https://dx.doi.org/10.21157/j.ked.hewan.-v7i1.558>
- Shen, W. Y., Fu, L. L., Li, W. F., & Zhu, Y. R. (2010). Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 41(11), 1691–1698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x>
- Sholihati, A. M., Baharuddin, M., & Santi, S. (2015). Produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis*. *Al-Kimia*, 3(2), 78-90. <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v3i2.1672>
- Sudaryono, A. S., Suminto., & Herawati, V. E. (2014). Pengaruh bakteri kandidat probiotik (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*) pada pakan buatan terhadap efisiensi pemanfaatan pakan, pertumbuhan, dan kelulushidupan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(4), hlm. 1–10. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jamt>
- Subedi, B., & Shrestha, A. (2020). A review: Application of probiotics in aquaculture. *International Journal of Forest, Animal and Fisheries Research (IJFAF)*, 4(5), 52–60. <https://doi.org/10.22161/ijfaf.4.5.1>
- Soto, R, S. A., Gomez, G, B., Lozano, R., del Carpio, M. P., & Morales, L. A. (2015). Field & Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute hepatopancreatic necrosis disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico, 81(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Supono, S., Cania, M., Kurnia, W. Z., Setyawan, A., & Sapto, C. U. D. (2022). Performance of vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured on green water and brown water biofloc systems. *Barakuda 45: Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 4(2), 132–140. <https://doi.org/10.47685/-barakuda45.v4i2.260>
- Supono. (2021). Current status of technical and economic analysis of inland shrimp culture in Lampung Province, Indonesia. *AACL Bioflux*, 14(1): 218-216. <https://www.bioflux.com.ro/aac1>
- Supono., Wardiyanto., Harpeni, E., Khotimah, A. K., dan Ningtyas, A., (2019). Identification of *Vibrio* sp. as a cause of white feces diseases in white shrimp (*Litopenaus vannamei*) and handling with herbal ingredients in East Lampung Regency, Indonesia. *AACL Bioflux*. 12(2): 417-425. <https://www.bioflux.com.ro/aac1>

- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis Aquatic Organisms*. 61(1-2), 123-35. <https://doi.org/10.3354/dao061123>
- Sritunyalucksana, K., Gangnonngiw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D., Flegel, T.W. (2005). Clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Dis Aquatic Organisms*. 63(1), 89-94. <https://doi: 10.3354/dao063089>
- The Fish Site. (2022). Yang perlu Anda ketahui tentang EMS/AHPND dalam budidaya udang. <https://thefishsite.com/articles/yang-perlu-anda-ketahui-tentang-ems-ahpnd-dalam-budidaya-udang>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of *Acute hepatopancreatic necrosis* syndrome affecting (*Penaeid shrimp*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Tseng, D.Y, Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Liu, C. H., (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunology*, 26(2):339-44. <https://doi: 10.1016/Bacterial/j.fsi.2008-.12.-003>.
- Ulumiah, M., Lamid, M., Soepranianondo, K., & Al-arif, M. (2020) Manajemen pakan dan analisis usaha budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) pada lokasi yang berbeda di Kabupaten Bangkalan dan Kabupaten Sidoarjo. *journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(2). <https://doi:10.-20473/-jafh.v9i2.15783>
- Urtaza, M, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Alvarez, R, C., & Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1319–1320. <https://doi.org/10.3201/-eid1108.050322>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/-MMBR.64.4.655-671.2000>

- Vieira, F. N., Neto, B. C. C., Mourino, J. L. P., Ferreira, G. S., Seiffert, W. Q., & Martins, M. L. (2010). Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(3), 631–638. <https://doi.org/10.1590/S010209352010-000300034>
- Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>
- Wardika, A. S., Suminto, & Sudaryono, A. (2014). Pengaruh bakteri probiotik pada pakan dengan dosis berbeda terhadap fisiensi pemanfaatan pakan, pertumbuhan dan kelulushidupan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(4), 9-17. <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jamt/article/view/6635>
- Weerathunga, V., Huang, W.J., Dupont, S., Hsieh, H.H., Piyawardhana, N., Yuan, F.L., Liao, J.S., Lai, C.Y., Chen, W.M., & Hung, C.C. (2021). Impacts of pH on the fitness and immune system of pacific white shrimp. *Frontiers in Marine Science*, 8, 748837. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.748837>
- Whitaker, W. B., Parent, M. A., Naughton, L. M., Richards, G. P., Blumberman, S. L., & Boyd, E. F. (2010). Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4721–4730. <https://doi.org/10.1128/AEM.00474->
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W. J., Lee, S., & Bai, S. C. (2020). Evaluation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Microorganisms*, 8(2), 281. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020281>
- Wyban, J., & Sweeney, J.N. (1991). *Intensive shrimp production technology: the oceanic institute shrimp manual*. Oceanic Institute Honolulu. 165 hal. https://books.google.com.mx/books/about/Intensive_shrimp_production_technology.html?id=fVAYAQAIAAJ&redir_esc=y
- Xu, W. J., Xu, Y., Su, H., Hu, X., Xu, Y., Li, Z., (2020). Production performance, inorganic nitrogen control and bacterial community characteristics in a controlled bioflocbased system for indoor and outdoor superintensive culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 531(735749), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735749>

- Yang, C. L., Chen, H. Y., and Wang, A. L. (2014). Effects of dietary β -glucan on immunity and resistance of shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), 289–295.
- Yu, H., Nazir, S., Ijaz, F., Zahid, M. U., Mushtaq, M., Khan, M.; Rahman, A., Rahman, M. A. U. (2025). Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* as probiotic influenced the growth performance, hematological parameters, immune function, antioxidant status, and digestive enzyme activity of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 15(9), 1256. <https://doi.org/10.3390/ani15091256>
- Zhao C., Zhu J., Hu J., Dong X., Sun L., Zhang X., Miao S. (2019). Effects of dietary *Bacillus pumilus* on growth performance, innate immunity and digestive enzyme of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 712–720. <https://doi.org/10.1111/anu.12894>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, L., Guo, X., Zhang, Y., Xu, W., & Mai, K. (2014). Dietary administration of probiotics modulates immune-related gene expression in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.032>
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>
- Zhao C., Zhu J., Hu J., Dong X., Sun L., Zhang X., Miao S. (2019). Effects of dietary *Bacillus pumilus* on growth performance, innate immunity and digestive enzyme of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 712–720. <https://doi.org/10.1111/anu.12894>
- Zhou, X., Wang, Y., & Li, W. (2009). Effects of probiotic on larvae shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 287(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.046>
- Zhou, X., Wang, Y., & Li, W. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287(3–4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.046>
- Zokaiefar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Arshad, A. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* in the rearing water enhances water quality, growth, immune response and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.007>

- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Arshad, A. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>