**PENGGUNAAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. D2.2 DAN SISTEM BIOFLOK UNTUK MENINGKATKAN IMUNITAS UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) YANG DIINFEKSI *Vibrio harveyi***

**The Use of Probiotic *Bacillus* sp. D2.2 and Biofloc System to Increase the Immunity of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Infected by *Vibrio harveyi***

Endayani1\*, Esti Harpeni2, dan Wardiyanto1

1Program Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Lampung.

2Program Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Lampung.

\*yanienda97@gmail.com

**Abstrak**

Udang vaname rentan terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, ataupun koinfeksi, salah satunya infeksi bakteri *Vibrio harveyi*.Infeksi tersebut telah berdampak terhadap tingginya tingkat kematian udang sehingga menurunkan produksi udang vaname. Penggunaan probiotik dan pengaplikasian sistem bioflok merupakan alternatif untuk mencegah infeksi bakteri dengan meningkatkan sistem imun pada udang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan yang terbaik antara probiotik, bioflok, dan kombinasi keduanya untuk meningkatkan respon imun udang vaname terhadap infeksi bakteri *V. harveyi*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan yaitu kontrol +, kontrol −, probiotik pakan, bioflok, dan kombinasi probiotik pakan dan bioflok. Udang uji yang digunakan mempunyai bobot rata-rata ±12 g dengan kepadatan 10 ekor/bak. Parameter yang diamati meliputi *total haemocyte count*, aktivitas fagositosit, indeks fagositosis, *differensial haemocyte count*, *total vibrio count*, *survival rate*, *relatif percent survival,* dan kualitas air. Pemberian perlakuan probiotik pada pakan, bioflok, dan kombinasi keduanya mampu meningkatkan sistem imun udang dan memperkecil infeksi *V. harveyi,* dengan hasil terbaik pada perlakuan kombinasi probiotik pada pakan dan bioflok yang dapat meningkatkan parameter respon imun non spesifik udang vaname lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain.

Kata kunci :Udang vaname,Imunitas, Bioflok, Probiotik, *Vibrio harveyi*.

**Abstract**

White shrimp are susceptible to diseases caused by bacteria, viruses, or co-infection, one of which is bacterial infection *Vibrio harveyi*. The infection has an impact on the high mortality rate of shrimp, until reducing white shrimp production. The use of probiotics and the application of the biofloc system are alternatives to prevent bacterial infections by increasing the immune system in shrimp. This study aims to determine the best treatment between probiotics, biofloc, and a combination of both to improve the immune response of white shrimp to bacterial infection *V. harveyi*. This study used a RAL with 5 treatments, namely: control +, control -, probiotic feed, biofloc, and a combination of feed probiotics and biofloc. Shrimp test used has an average weight of ± 12 g with a density of 10 fish / tub. The parameters observed included total haemocyte count, phagocytocyte activity, phagocytosis index, differential haemocyte count, total vibrio count,, survival rate, relative percent survival, and water quality. Provisionof probiotic treatment in feed, biofloc, and a combination of both can improve shrimp immune system and reduce *V. harveyi* infection, with the best results in the combination of probiotic treatment in feed and biofloc which can increase the non-specific parameters of white shrimp immune response compared to other treatments .

Keywords : White shrimp, Immunity, Biofloc, Probiotic, *Vibrio harveyi.*

**PENDAHULUAN**

Budidaya udang vaname terus mengalami peningkatan selama beberapa tahun terakhir. Produksi udang vaname pada tahun 2017 yaitu mencapai 70% dari produksi udang nasional yaitu sebesar 488.019 ton (KKP, 2018). Peningkatan pada budidaya udang sering terhambat oleh munculnya penyakit, seperti vibriosis yang telah berdampak pada budidaya di beberapa negara (Soto-Rodriguez *et al*., 2006). Strain Vibrio terbukti bersifat patogen untuk udang termasuk *Vibrio harveyi* (Austin & Zhang, 2006). *V. harveyi* adalah patogen serius pada invertebrata laut (Rico *et al*., 2008), yang paling sering berkontribusi pada kematian masal selama pembesaran udang dan pada stadia larva menyebabkan kematian hingga 100% (Alavandi *et al*., 2006).

Alternatif yang paling banyak digunakan pembudidaya untuk mencegah penyakit bakterial pada udang yaitu menggunakan antibiotik sintetik. Namun, penggunaan antibiotik yang berlebihan dapat menyebabkan munculnya resistensi bakteri (Verschuere *et al*., 2000). Selain itu, penggunaan antibiotik juga membahayakan kesehatan manusia karena potensi paparan residu antibiotik dalam tubuh jika mengkonsumsi hasil budidaya yang telah terpapar antibiotik. Oleh karena itu, diperlukan alternatif yang lebih ramah lingkungan untuk mencegah penyakit bakterial yaitu peningkatan imun atau daya tahan tubuh udang terhadap penyakit. Pada penelitian ini menggunakan probiotik dan pengaplikasian sistem bioflok.

Penggunaan probiotik telah banyak digunakan untuk mencegah penyakit bakterial pada udang. Udang yang diinfeksi *Vibrio harveyi* setelah diberi probiotik *Bacillus* S11 pada pakan, kelangsungan hidup udang meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kontrol (Meunpol *et al*., 2003). Efek antagonis *Bacillus* terhadap patogen *Vibrio* merupakan alternatif pengobatan yang lebih ramah lingkungan dalam budidaya udang (Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Pada penelitian ini menggunakan probiotik *Bacillus* sp. D2.2, yang mampu menstimulasi sistem imunitas udang vaname dan memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri *V. harveyi* (Harpeni *et al.,* 2017).

Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa teknologi bioflok merupakan alternatif untuk melawan bakteri patogenik dalam budidaya. Bioflok mampu melindungi *Artemia franciscana* terhadap patogen *Vibrio harveyi* (Crab *et al*., 2010).Penelitian oleh De Schryver & Verstraete (2009) menunjukkan bahwa bioflok mengandung *poly-β-hydroxybutyrate* (PHB) yang diduga mempunyai efek pencegahan dan pengobatan terhadap infeksi *Vibrio* serta manfaat prebiotik dalam akuakultur (De Schryver *et al.,* 2008). Bioflok kemungkinan juga mengandung senyawa imunostimulan karena teknologi bioflok berurusan dengan bakteri dan produk-produk bakteri terutama bakteri probiotik (Xu & Pan, 2013.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan terbaik antara probiotik, bioflok, dan kombinasi keduanya untuk meningkatkan respon imun udang vaname terhadap infeksi bakteri *V. harveyi.*

**METODOLOGI**

**Waktu dan Tempat**

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

**Materi Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu bak kontainer berukuran 60×40×40 cm, aerator, selang aerasi, *scope net*, spuit 1 cc, *cool box*, kaca preparat, *cover glass,* *hemocytometer*, mikroskop, inkubator, autoklaf, spektrofotometer, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, bunsen, erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, *shaker*, timbangan digital, DO meter, pH meter, refraktometer, dan termometer.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu udang vaname ±12 g, pakan komersil, *Bacillus* sp. D2.2, *Vibrio harveyi*, media SWC (*Sea Water Complete*), TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose Agar*), air laut, molase, alkohol 70%, Na sitrat 10%, akuades, klorin, PBS (*Phosfat Buffer Saline*), sodium tiosulfat, formalin 1%, NaCl 0,85%, safranin 10% (Lampiran 3), metanol, larutan giemsa 10%.

**Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan tiga kali ulangan. Rancangan percobaan yang digunakan yaitu:

K (−) : Tanpa probiotik dan bioflok, udang tidak diuji tantang

K (+) : Tanpa probiotik dan bioflok, udang diuji tantang

A : Pengaplikasian probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan, udang diuji tantang

B : Pengaplikasian sistem bioflok, udang diuji tantang

C : Pengaplikasian sistem bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan, udang diuji tantang

**Prosedur Kerja**

**Persiapan Penelitian**

Wadah yang digunakan adalah bak kontainer sebanyak 15 buah yang dicuci hingga bersih. Setelah itu, diisi air laut sebanyak 50 L dan didisinfeksi menggunakan metode Chayati (2012). Hewan uji yang digunakan yaitu udang vaname dengan bobot rata-rata ±12 g dengan 10 ekor setiap wadah. Sebelum diberi perlakuan udang diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari.

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

Bakteri dikultur pada media SWC cair dan di*shaker* hingga kepadatan bakteri 108 CFU/ml. Kultur bakteri tersebut akan digunakan untuk pembentukan bioflok diawal pemeliharaan dan ditambahkan pada pakan untuk perlakuan penambahan probiotik pada pakan.

**Pencampuran Probiotik pada Pakan**

Dosis probiotik yang digunakan sebanyak 6% (v/w) dan putih telur yang sebanyak 2% (v/w) dari bobot pakan yang diberikan (Permatasari, 2017). Suspensi bakteri dicampur dengan putih telur sebelum dicampur ke pakan. Setelah itu, disemprotkan secara merata ke dalam pakan kemudian dikering-anginkan hingga benar-benar kering.

**Pemeliharaan Udang Vaname**

Pemeliharaan udang vaname yaitu pemberian pakan komersil dan frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari yaitu pukul 07.00, 11.00, 15.00, dan 19.00 WIB. Pemberian pakan dengan FR udang yaitu 3% dan pemberian molase dilakukan sekali sehari dengan C/N rasio 1:20 sesuai dengan perhitungan yang dilakukan oleh Avnimelech (1999). Pemeliharaan udang uji dilakukan selama 15 hari (perlakuan).

**Uji Tantang**

Uji tantang dilakukan menggunakan bakteri patogen *V. harveyi* yang telah diganaskan terlebih dahulu, dengan dosis 108 CFU/ml sebanyak 0,1 ml/ekor. Uji tantang dilakukan dengan metode injeksi. Penyuntikan dilakukan pada pangkal bagian kaki renang (*pleopod*) ke-3. Pengamatan dan pemeliharaan udang setelah injeksi dilakukan selama 6 hari.

**Parameter Pengamatan**

Parameter pengamatan pada penelitian ini yaitu *Total Haemocyte Count* (THC) (Permatasari, 2017), aktifitas dan indeks fagositosis (Anderson & Swicki, 1995), *Differensial Haemocyte Count* (DHC) (Martin & Graves (1995), *Survival Rate* (SR), *Relatif Percent Survival* (Amend, 1981), *Total Vibrio Count* (TVC), dan kualitas air.

**Analisis Data**

Analisis data pada pengamatan THC, aktifitas dan indeks fagositosis, dan DHC, dan TVC adalah ANOVA *(analysis of variance)* dengan selang kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan maka dilanjutkan uji lanjut Duncan. Data RPS dan SR dilakukan analisis nonparametrik Kruskal-Wallis, sedangkan kualitas air dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

***Total Hemocyte Count* (THC)**

Total hemosit setelah pemberian perlakuan dan setelah uji tantang mengalami peningkatan (Gambar 1). Sebelum pemberian perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (p=0,348) antar perlakuan. Setelah pemberian perlakuan nilai THC tertinggi pada perlakuan C yaitu 2,055×106 sel/ml dan berbeda nyata dengan kontrol (p=0,000). Setelah uji tantang nilai tertinggi juga pada perlakuan C yaitu 6,58×106 sel/ml dan berbeda nyata terhadap semua perlakuan (p=0,000). Penghitungan total hemosit digunakan untuk mengukur tingkat respon imun seluler yang baik sebagai indikator kesehatan pada udang (Sritunyalucksana *et al*., 2005). Hemosit udang berperan dalam proses pertahanan seperti fagositosis, enkapsulasi, melanisasi dan koagulasi (Johansson *et al*., 2000).

Gambar 1. THC (x106 sel/ml) Udang Vaname

THC mengalami peningkatan setelah pemberian perlakuan dan setelah uji tantang. Peningkatan total hemosit diduga karena perlakuan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan bioflok mengandung komponen-komponen yang mampu menstimulasi meningkatnya jumlah hemosit pada udang. Pada dinding sel *Bacillus* sp. D2.2 terdapat peptidoglikan yang menstimulasi THC (Ramadhani, 2017). Bioflok mengandung berbagai mikroorganisme, komponen sel, dan metabolit dapat bertindak sebagai imunostimulan (Ekasari *et al*., 2014). Pada penelitian ini pembentukan bioflok menggunakan bakteri probiotik *Bacillus* sp. D2.2. Udang yang dipelihara pada sistem bioflok akan memanfaatkan mikroorganisme, nutrisi dan komponen lainnya dalam bioflok sebagai pakan alaminya. Dinding sel mikroorganisme seperti bakteri terdiri dari lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan (PG) dan β-1,3-glukan (BG), yang mampu mengaktifkan kekebalan tubuh pada udang (Soderhall & Cerenius, 1998) dan meningkatkan resistensi terhadap infeksi bakteri *V. harveyi* (Vieira *et al*., 2010). Penelitian Xu & Pan (2013) menunjukkan bahwa jumlah total hemosit udang yang dipelihara pada sistem bioflok lebih tinggi dari pada udang tanpa bioflok.

**Aktifitas dan Indeks Fagositosit**

Persentase aktifitas fagositosit mengalami peningkatan setelah pemberian perlakuan probiotik pada pakan dan bioflok, dan mengalami penurunan setelah infeksi bakteri *V. harveyi* (Gambar 2). Nilai AF sebelum pemberian perlakuan tidak menunjukkan perbedaan nyata (p=0,741) antar perlakuan yaitu berkisar antara 41,3-45,5%. Setelah pemberian perlakuan mengalami peningkatan aktifitas fagositosit dengan persentase tertinggi pada perlakuan C yaitu 71,2% dan berbeda nyata (p=0,000) dengan kontrol. Setelah uji tantang atau pasca infeksi mengalami penurunan dengan nilai AF tertinggi juga pada perlakuan C yaitu 65% yang berbeda nyata (p=0,002) dengan perlakuan udang kontrol yang sakit atau diinfeksi (K+), namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan udang sehat (K-).

Gambar 2. Aktivitas Fagositosis (%) Udang Vaname

Fagositosis adalah respons utama hemosit terhadap partikel asing seperti bakteri (Jiravanichpaisal *et al*., 2006). Pada penelitian ini, nilai aktivitas fagositosit meningkat pada perlakuan sistem bioflok dan *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan dibandingkan dengan udang kontrol. Hasil penelitian Xu & Pan (2013) menunjukkan bahwa bioflok dapat merangsang respon fagositosis udang yang dibuktikan dengan meningkatnya aktifitas fagositosit udang yang dipelihara pada bioflok dibandingkan dengan tanpa bioflok. Penggunaan *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan mampu mengaktifkan sel-sel fagosit yang ditunjukkan dengan meningkatnya aktifitas fagositosit udang (Ramadhani, 2017). Aplikasi probiotik *B. subtilis* secara efektif meningkatkan persen aktifitas fagositosit yang lebih tinggi dari kontrol terhadap infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* pada *L. vannamei* (Kewcharoen & Srisapoome, 2019) Peningkatan AF karena pada dinding sel bakteri *Bacillus* sp. D2.2 terdapat peptidoglikan yang mampu menstimulan dan mengaktifkan sel-sel fagosit (Ramadhani, 2017; Rengpipat *et al*., 2000).

Bioflok pada pencernaan udang melepaskan zat di saluran pencernaan yang berpotensi merangsang respon fagositosit. Beberapa jenis bakteri menguntungkan seperti *Bacillus* sp. (Zhao *et al*., 2012) di bioflok yang masuk dalam saluran pencernaan menyebabkan perubahan mikrobiota endogen dan meningkatkan imun inang (Li *et al*., 2009). Komponen mikroba (polisakarida) dan senyawa bioaktif (karotenoid) yang ada di bioflok (Ju *et al*., 2008) dapat menimbulkan efek stimulasi kekebalan terus menerus selama udang mengonsumsi bioflok (Xu & Pan, 2013). Penurunan aktivitas fagositosis setelah infeksi disebabkan oleh pengurangan sel fagosit dalam hemolim karena sebagian besar sel fagosit rusak selama proses fagositosis dalam memerangi bakteri (Xu & Pan, 2013).

Gambar 3. Indeks Fagositosis (IF) Udang Vaname

Persentase indeks fagositisis menunjukkan peningkatan setelah perlakuan dan setelah uji tantang (Gambar 3). Sebelum perlakuan nilai IF berkisar 1,15-1,203 dan tidak berbeda nyata antar perlakuan (p=0,528). setelah perlakuan kisaran nilai IF meningkat signifikan (p=0,025) terhadap perlakuan control dan setelah uji tantang juga meningkat signifikan (p=0,012) dengan nilai IF tertinggi yaitu pada perlakuan C yaitu 1,517. Indeks fagositosit menunjukkan kemampuan sel-sel fagosit dalam melawan patogen yang masuk ke dalam tubuh.

Nilai indeks fagositosis mengalami peningkatan setelah pemberian perlakuan dan setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* menunjukkan pemberian bioflok dan probiotik pada pakan mampu meningkatkan IF udang. Komponen dinding sel dari bakteri probiotik seperti β-glukan, peptidoglikan, dan lipopolisakarida terkait sebagai imunostimulan (Gullian *et al*., 2004). Dalam sel hemosit terdapat ProPO (profenoloksidase), aktivasi proPO menjadi PO (fenoloksidase) melibatkan enzim *proPO activating system* yang diaktifkan oleh komponen dinding sel bakteri tersebut (Sritunyaluckasana & Soderhall, 2000). Peningkatan aktivitas fenoloksidase meningkatkan kemampuan udang untuk mengenali dan melawan patogen yang masuk ke dalam tubuh, menunjukkan bahwa sistem kekebalan udang meningkat juga. Nilai IF lebih tinggi setelah infeksi, hasil serupa juga pada penelitian Rengpipat *et al*. (2000) dimana indeks fagosit udang vaname setelah infeksi atau pada pengobatan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

***Differensial Haemocyte Count* (DHC)**

Jenis sel hemosit yang diamati adalah hialin, semigranular, dan granular. Persentase sel hialin sebelum perlakuan tidak menunjukkan perbedaan signifikan (p=0,678). Setelah pemberian perlakuan mengalami peningkatan yang signifikan berkisar (p=0,02) dengan persentase tertinggi pada perlakuan C yaitu 57,33% (Tabel 1). Setelah uji tantang atau infeksi patogen persentase sel hialin mengalami penurunan yang signifikan (p=0,000) dengan persentase tertinggi juga perlakuan C yaitu 21,67%.

Tabel 1. Pengamatan *Differensial Haemocyte Count* (DHC)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tipe sel | Perlakuan | Pengamatan |
| Sebelum perlakuan (H0) | Setelah perlakuan (H7) | Setelah uji tantang (H21) |
| Hialin | K− | 43,67±3,79a | 46,33±1,53a | 41±2c |
| K+ | 40,33±2,08a | 44±3a | 14,33±1,53a |
| A | 42,67±4,51a | 47,67±6,11a | 15,67±4,51ab |
| B | 44,67±4,16a | 50±5,29a | 20±3,61ab |
| C | 42±3,61a | 57,33±2,08b | 21,67±4,13b |
| Semi granular | K− | 33,33±3,06a | 32,67±4,16ab | 34,67±3,06a |
| K+ | 32,67±1,53a | 27,67±2,08a | 43,67±5,51b |
| A | 30,33±6,51a | 35,33±1,53b | 38±3,61ab |
| B | 33±4a | 35,33±4,04b | 33±5,29a |
| C | 29,67±6,66a | 33±1ab | 31±2,65a |
| Granular | K− | 23±1a | 21±2,65b | 24,33±4,16a |
| K+ | 27±2,65a | 28,33±2,08c | 42±5,57b |
| A | 27±6,24a | 17±6,08b | 46,33±3,06b |
| B | 22,33±3,06a | 14,67±1,53ab | 47±6,24b |
| C | 28,33±3,06a | 9,67±2,52a | 47,33±3,06b |

Keterangan:

\* K- (tanpa perlakuan dan uji tantang), K+ (tanpa perlakuan namun dilakukan uji tantang), A (Probiotik pakan), B (Bioflok), dan C (Probotik pakan dan bioflok)

\* Tanda notasi yang mengandung huruf yang berbeda pada pengamatan hari yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata (p≤0,05)

Persentase sel semi granular sebelum pemberian perlakuan dan setelah adanya perlakuan tidak berbeda nyata (p=0,826; p=0,073). Setelah diuji tantang persentase sel semi granular menunjukkan perbedaan nyata (p=0,03) yang berkisar antara 31−43,67% (Tabel 1).

Persentase sel granular sebelum perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (p=0,238), setelah pemberian perlakuan sel granular mengalami penurunan yang signifikan (p=0,001) dengan nilai terendah pada perlakuan C yaitu 9,67%. Setelah infeksi bakteri mengalami peningkatan yang signifikan (p=0,000). peningkatan tertinggi pada perlakuan C yaitu 47,33%. Persentase sel granular mengalami penurunan setelah pemberian perlakuan dan peningkatan pascainfeksi bakteri patogen (Tabel 1).

Sel hemosit merupakan salah satu mekanisme pertahanan seluler utama dalam krustasea. Sel hemosit dibagi menjadi 3 tipe sel yaitu sel hialin, semi granular, dan granular (Johansson *et al*., 2000). Pada penelitian ini, setelah pemberian perlakuan bioflok dan probiotik sel hialin dan semi granular udang mengalami peningkatan, namun pada sel granular mengalami penurunan. Sebaliknya pasca infeksi bakteri *V. harveyi* sel granular mengalami peningkatan dan sel hialin mengalami penurunan. Hal tersebut terjadi karena sel-sel tersebut memiliki fungsi berbeda yang memainkan peran dalam respon pertahanan seluler seperti fagositosis, enkapsulasi, dan melanisasi. Sel hialin berperan dalam proses fagositosis; sel semi granular berperan dalam proses enkapsulasi, sedikit dalam fagositosis, penyimpanan dan pelepasan proPO, serta sitotoksisitas; dan sel granular berperan dalam penyimpanan dan pelepasan proPO, dan sitotoksisitas (Johansson *et al*., 2000). Fungsi sel granular menghasilkan enzim phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan saat terjadinya serangan patogen, sel granular dan semi granular akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity,* dan lisis terhadap material asing, serta melanisasi (Sitti *et al*., 2019).

Penurunan persentase sel semigranular dan granular merupakan indikasi peningkatan persentase sel hialin (Maftuch *et al*., 2013). Sel semi granular dan granular merupakan pematangan dari sel hialin. Sel hemosit muda yaitu sel hialin dan perkembangan menjadi sel semi granular dan granular, Sel-sel granular akan menumpuk di jaringan ikat, dan sel-sel semi granular terletak di organ limfoid (Van de braak, 2002). Menurut Aladaileh *et al*. (2007) peningkatan persentase jenis hemosit tertentu disebabkan oleh proliferasi sel yang diinduksi atau diferensiasi sel yang cepat sebagai respon terhadap antigen.

***Total Vibrio Count* (TVC)**

Nilai TVC usus udang sebelum pemberian perlakuan dan uji tantang menunjukkan yaitu berkisar antara 4,62−9,71×105 CFU/ml (Gambar 4). setelah uji tantang dengan adanya perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan (p=0,000) dengan nilai terendah pada perlakuan C yaitu 7,40×105 CFU/ml dan tertinggi perlakuan K+ yaitu 5,547×106 CFU/ml. Vibrio adalah flora dominan setiap fase hidup udang (Hameed *et al*., 2003). Genus yang tumbuh cepat dan mampu mendominasi saluran pencernaan penaeid (Thompson *et al*. 2004). Namun, bakteri ini dianggap sebagai patogen oportunistik untuk udang dalam kondisi stres seperti kekurangan nutrisi, kualitas air yang buruk, dan kekebalan tubuh yang menurun (Thompson *et al*., 2004). Diantara alternatif untuk mengendalikan bakteri tersebut yaitu probiotik dan bioflok yang merupakan teknologi ramah lingkungan saat ini (Emerenciano *et al*., 2017).

Gambar 4. *Total Vibrio Count* (TVC) Udang Vaname

Hasil TVC penelitian ini menunjukkan bahwa udang yang diinfeksi *V. harveyi* dengan pengaplikasian sistem bioflok dan probiotik memiliki nilai TVC yang tidak berbeda nyata dengan udang yang tidak diinfeksi (udang sehat). Hal tersebut menunjukkan bahwa bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 mampu menurunkan *Vibrio* pada usus udang. Mikroorganisme diantaranya *Bacillus* sp. D2.2, yang ada dalam bioflok dapat bertindak melawan bakteri patogen dengan bersaing untuk substrat dan nutrisi, menghasilkan senyawa penghambat, dan mengganggu komunikasi penginderaan kuorum bakteri (Defoirdt *et al*., 2007). Selain itu, bioflok mengandung PHB (Polyβ-hydroxibutyrate) yang cukup untuk melindungi udang yang dibudidayakan dari infeksi oleh bakteri *Vibrio* (Halet *et al*., 2007).

Sistem bioflok sebagai strategi penyediaan probiotik alami secara terus menerus pada media pemeliharaan (Emerenciano *et al*., 2013). Probiotik adalah mikroba aktif yang memiliki efek menguntungkan pada kesehatan inang dengan meningkatkan keseimbangan usus melalui peningkatan nutrisi pakan, proses enzimatik pencernaan, penghambatan mikroorganisme patogen, faktor pemacu pertumbuhan, dan peningkatan respon imun (Verschuere *et al*., 2000). Peningkatan pada udang tanpa perlakuan setelah diinfeksi bakteri *Vibrio* (K+) karena bakteri *V. harveyi* yang dinjeksi pada udang menyebar dan menyebabkan infeksi hingga ke usus udang sehingga berkembang dengan cepat mendominasi mikroflora usus karena tidak ada komponen yang menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio*.

***Survival Rate* (SR)**

Hasil SR menunjukkan perbedaan yang signifikan (p=0,01) antar perlakuan. Persentase SR udang yang diberi perlakuan dan diinfeksi bakteri yang tertinggi pada perlakuan kombinasi sistem bioflok dan probiotik pada pakan (C) yaitu 80%, terendah pada perlakuan probiotik pada pakan (A) 63,33%, dan pada perlakuan bioflok (B) yaitu 76,67% (Gambar 5). SR terendah pada udang yang tidak diberi perlakuan (bioflok dan probiotik), namun diinfeksi bakteri *V. harveyi* (K+) yaitu 46,67%.

Gambar 5. SR (%) Udang Vaname

Tingkat kelulushidupan udang yang diuji tantang tertinggi pada perlakuan kombinasi bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan yang menunjukkan mampu melindungi dan memperkecil infeksi *V. harveyi*. Penggunaan *Bacillus* mampu meningkatkan kelangsungan hidup, kekebalan, dan resistensi penyakit udang dalam akuakultur (Decamp *et al*., 2008; Tseng *et al*., 2009). *Bacillus* sp. D2.2 menghasilkan senyawa antibakteri berupa polipeptida yaitu bacitracin (Setyawan *et al*., 2014). Selain itu, pada bioflok terdapat asam lemak rantai pendek sebagai agen biokontrol terhadap pathogen yaitu PHB. Poly-β- hidroksibutirat terdepolimerisasi dalam usus organisme dan telah terbukti mampu melindungi dan mencegah *Artemia franciscana* terhadap infeksi *Vibrio* (Defoirdt *et al*., 2007). Bioflok mampu memblokir *quorum sensing* yang diatur dalam *V. harveyi*. *Quorum sensing* merupakan komunikasi dari sel ke bakteri dengan sinyal kecil molekul yang berperan untuk mengatur virulensi *V. harveyi* (Defoirdt *et al*., 2008). Gangguan *quorum sensing* sebagai alternatif untuk mengendalikan infeksi bakteri patogen dalam akuakultur (Defoirdt *et al*., 2004).

***Relative Percent Survival* (RPS)**

Hasil RPS menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan (p=0,044). Nilai RPS tertinggi pada perlakuan C yaitu 62,5% dan yang terendah pada perlakuan A yaitu 31,25%, sedangkan perlakuan B nilai RPS yaitu 56,25% (Gambar 6).

Gambar 6. RPS (%) Udang Vaname

*Relative Percent Survival* merupakan tingkat perlindungan relatif yang digunakan untuk menunjukkan efektifitaspenggunaan perlakuan terhadap infeksibakteri *Vibrio harveyi* (Wijayanti *et al*., 2018). Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini yaitu pengaplikasian probiotik dan sistem bioflok. Menurut Parenrengi *et al*. (2013), pemberian perlakuan efektif jika nilai RPS > 50%. Pada penelitian ini perlakuan yang dianggap efektif adalah perlakuan bioflok dan kombinasi bioflok dan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan. Nilai RPS terkait dengan mortalitas udang selama pemeliharaan.

**Kualitas Air**

Kualitas air yang diamati selama penelitian adalah suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut (DO), dan Amoniak. Pengukuran dilakukan pada awal, tengah dan akhir penelitian.

Tabel 2. Kualitas air media pemeliharaan udang vaname selama penelitian

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Parameter | Kisaran | Optimal |
| Suhu (0C) | 26−28,1 | 26−32\* |
| Salinitas (ppt) | 27−30 | 10−35\* |
| pH | 6,3−8,3 | 6−8,6\*\* |
| DO | 3,3−6,9 | ≥3\*\* |
| Amoniak | 0,0001−0,009 | ≤0,1\*\* |

Keterangan : \*Supono (2017)

 \*\*Parlina *et al*. (2018)

Kualitas air merupakan salah satu faktor pembatas kelulushidupan udang vaname. Kualitas air media pemeliharaan selama penelitian berada pada kisaran optimal untuk pemeliharaan udang vaname (Tabel 2). Perubahan respon imun spesifik dan tingkat kelulushidupan udang vaname selama kualitas air selama pemeliharaan.

**Kesimpulan**

Pemberian perlakuan probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan dan bioflok mampu memperkecil infeksi bakteri *V. harveyi* pada udang vaname dengan perlakuan terbaik yaitu kombinasi probiotik *Bacillus* sp. D2.2 pada pakan dan bioflok yang dapat meningkatkan *Total Hemocyte Count*, Aktifitas Fagositosit, Indeks Fagositosis, dan *Diferensial Hemocyte Count* paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

**Saran**

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

**Daftar Pustaka**

Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., Raftos, D. A. 2007. Sydney Rock oyster (Saccostrea glomerata) hemocytes: morphology and function. *J. Invertebr. Pathol*. 96: 48–63.

Alavandi, S.V., Manoranjita, V., Vijayan, K.K., Kalaimani, N., & Santiago, T.C. 2006. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. *Lett Appl Microbiol*. 43:566–570.

Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization.* 49: 447-454.

Anderson, D. P., & Siwicki, A. K. 1995. *Basic haematology and serology for fish health program*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines, pp. 185-202.

Austin, B., & Zhang, X.H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol*. 43:119–124.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176 (3-4): 227-235.

Chayati, T. N. 2012. Kinerja Imunitas Udang Vaname *Litopenaeus Vannamei* Dalam Teknologi Bioflok dan Probiotik Terhadap Koinfeksi *Infectious Myonecrosis Virus* dan *Vibrio harveyi*. [*Skripsi*]. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*. 109 (5): 1643-1649.

De Schryver, P., & Verstraete, W. 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 100 (3): 1162–1167.

De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, & Verstraete W. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*. 277 (3-4): 125–137.

Decamp, O., Moriarty, D. J., & Lavens, P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*. 39(4): 334-338.

Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*. 240 (1-4): 69-88.

Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Verstraete, W. 2007. The bacterial storage compound poly‐β‐hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental microbiology*. 9(2): 445-452.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME journal*. 2(1): 19.

Ekasari, J., Azhar, M. H., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*. 41(2): 332-339.

Emerenciano, M., Gaxiola, G., & Cuzon, G. 2013. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now-cultivation and utilization*. 301-328.

Emerenciano, M. G. C., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Miranda-Baeza, A. 2017. Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water Quality; InTech: London, UK*, 91-109.

Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233(1-4): 1-14.

Halet, D., Defoirdt, T., Van Damme, P., Vervaeren, H., Forrez, I., Van de Wiele, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Verstraete, W. 2007. Poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiology Ecology*.60 (3): 363–369.

Harpeni, E., Santoso, L., Supono, Wardiyanto, Widodo, A., & Yolanda, L. 2017. Effects of Dietary Probiotic *Bacillus* sp. D2.2 and Prebiotik Sweet Potato Extract on Growth Performance and Resistance to *Vibrio harveyi* in Pacific White Shirmp *Litopenaeus vannamei*. *Journal Aquacultura* *Indonesiana*. 18: 55-61.

Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Soderhall, K. 2000. Crustacean hemocytesand haemotopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211(4): 213-236.

Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W. C., & David Horgen, F. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research*. 39(2): 118-133.

Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. 2019. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & shellfish immunology*. 94: 175-189.

KKP. 2018. KKP Targetkan Produksi Udang Budidaya Sebanyak 700000 ton Tahun ini. https://industri.kontan.co.id/news/kkp-targetkan-produksi-udang-budidaya-sebanyak-700000-ton-tahun-ini, 15 Agustus 2018.

Li, J., Tan, B., & Mai, K. 2009. Dietary probiotic Bacillus OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 291(1-2): 35-40.

Martin, G. G., & Graves, B. L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of morphology*. 185 (3): 339-348.

[Maftuch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Maftuch%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24058892), Prasetio, E., Sudianto, A., Rozik, M., Nurdiyani, R., Sanusi, E., Nursyam, H., & Fariedah, F. 2013. Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) by intramuscular administration of the outer membrane protein *Vibrio alginolyticus*. *SpringerPlus*. 2(1): 432.

Meunpol, O., Loponyosiri, K., & Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 220: 437–448.

Parenrengi, A., Tenriulo, A., & Tampangallo, B. R. 2013. Uji tantang udang windu, *Penaeus monodon* transgenik menggunakan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. *Konferensi Akuakultur Indonesia*. 226-233.

Parlina, I., Nasirin, N., Ihsan, I. M., Suharyadi, S., Syaputra, A., Budiani, S., & Hanif, M. (2018). Perbandingan Pengelolaan Lingkungan pada Budidaya Udang Vaname (Litopenaeus vannamei) dengan Aplikasi Anorganik Chelated dengan Probiotik. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, *19*(1), 33-40.

Permatasari, D. 2017**.** Aplikasi *Bacillus* sp. D2.2 Dalam Sinbiotik Terhadap Respon Imun Seluler Udang Vanname *(Litopenaeus vannamei*). [*Skripsi*]. Universitas Lampung, Lampung.

Ramadhani, I.S., Harpeni, E., Tarsim, & Santoso, L. 2017. Potensi Sinbiotik Lokal Terhadap Respon Imun Non Spesifik Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Depik*. 6(3) : 221-227.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*. 191(4): 271-288.

Rico, R.M., Tapia-Paniagua, S., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., & Morinigo, M.A. 2008. Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *J Appl Microbiol*. 105: 752–760.

Setyawan, A., Harpeni, E., Ali, M., Mariska, D. C., & Aji, M. B. 2014. Potensi Agen Bakteri Biokontrol Indigenous Tambak Tradisional Udang Windu (*Penaues monodon*) di Lampung Timur Strain D2.2, Terhadap Bakteri Patogen Pada Udang dan Ikan. *Prosiding Pertemuan Ahli Kesehatan Ikan 2014*, Serang 11-13 Februari 2014.

Söderhäll, K., & Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*. 10(1): 23-28.

Soto-Rodriguez, S.A., Simoes, N., Roque, A., & Gomez-Gil, B. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*. 258:109–115.

Sitti, S. A., Indriyani, N., & Muhammad, I. 2019. Uji Diferensial Hemosit Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Dibudidayakan Di Sekitar Area Tambang. *Jurnal Media Akuatika*, 4(2).

Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*. 191(1-3): 53-69.

Sritunyalucksana, K., Gangnonngiw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D., & Flegal, T. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Dis. Aquat. Org*. 63: 89-94.

Supono. 2017. *Teknologi Produksi Udang*. Plantaxia, Yogyakarta. 163 hal.

Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(3): 403-431.

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): 339-344.

Van de Braak, C. B. T., Botterblom, M. H. A., Liu, W., Taverne, N., Van der Knaap, W. P. W., & Rombout, J. H. W. M. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & shellfish immunology*. 12 (3): 253-272.

Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp P*enaeus monodon*. L*ett Appl Microbiol*. 36: 83–87.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 655-671.

Vieira, F. N., Buglione, C. C., Mourino, J. P. L., Jatobá, A., Martins, M. L., Schleder, D. D., & Vinatea, L. A. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(3): 631-638.

Wijayanti, A., Dwinitasari, N., Febriyani, U., Harpeni, E., & Wardiyanto. 2018. Analisis Uji Tantang Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang Diberi Bakteri Probiotik *Bacillus* sp. D2.2 dan Ekstrak Ubi Jalar sebagai Sinbiotik. *Biospecies*. 11(2) : 63-71.

Xu, W. J., & Pan, L. Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of Litopenaeus vannamei juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*. 412: 117-124.

Zhao, P., Huang, J., Wang, X. H., Song, X. L., Yang, C. H., Zhang, X. G., & Wang, G. C. 2012. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*. 354: 97-106.