

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

RESPONS IMUNITAS BENIH LOBSTER, *Panulirus homarus* DENGAN PENGGUNAAN PROBIOTIK PADA PAKAN MOIST

Haryanti¹⁾, Sari Budi Moria Sembiring²⁾, Sudewi³⁾, Zeny Widiastuti⁴⁾,
Nyoman Adiasmara Giri⁵⁾, dan Ketut Sugama⁶⁾

Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan

(Naskah diterima: 21 November 2016; Revisi final: 10 Maret 2017; Disetujui publikasi: 20 Maret 2017)

ABSTRAK

Pemeliharaan benih lobster *P. homarus* masih menghadapi beberapa permasalahan, di antaranya infeksi penyakit bakteri (*red body disease*) dan mortalitas yang tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji respons imunitas benih lobster *P. homarus* yang diberi pakan pelet basah (moist diets) dengan penambahan probiotik. Pemeliharaan benih lobster dilakukan secara individu (1 ekor/keranjang). Lama pemeliharaan selama tiga bulan. Bobot awal puerulus *P. homarus* adalah $0,37 \pm 0,05$ g. Perlakuan meliputi pemberian pakan moist yang ditambahkan (A) ragi *Saccharomyces cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, *Alteromonas* sp. BY-9 dan *Bacillus cereus* BC, dan (C) tanpa probiotik. Respons imunitas dianalisis dengan RT-qPCR melalui tujuh gen target terkait ekspresi imunitas, setelah diuji tantang dengan *Vibrio harveyi* (penyebab *red body disease*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan benih lobster sebesar (A) 32,22%; (B) 29,63%; dan (C) 33,33%. Pertumbuhan panjang dan bobot benih lobster tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Respons imunitas benih lobster *P. homarus* pada perlakuan A dan B menunjukkan nilai ekspresi imun yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan C (tanpa probiotik). Ekspresi gen penyandi anti lipopolisakarida (ALFH-1) meningkat pada (A) rata-rata sebesar 3,44 kali dan (B) 3,25 kali dibandingkan dengan perlakuan C (2,43 kali). Kelipatan ekspresi profenoloksidase (proPO) benih lobster meningkat pada perlakuan A (penambahan ragi) rata-rata sebesar 5,27 kali, sedangkan pada perlakuan B (kombinasi probiotik) sebesar 12,92 kali. Ekspresi *Clotting* sistem (transglutaminase, clotting protein) dan *antioxidant defense mechanism* (glutathione peroxidase/GPO) dan SAA juga mengalami peningkatan pada perlakuan A dan B.

KATA KUNCI: benih lobster; *Panulirus homarus*; probiotik; ekspresi terkait imunitas

ABSTRACT: *Immunity response of juvenile spiny lobster, Panulirus homarus with probiotic supplementation on moist diets. By: Haryanti, Sari Budi Moria Sembiring, Sudewi, Zeny Widiastuti, Nyoman Adiasmara Giri, and Ketut Sugama*

A number of contrains including disease infections and significant mortality have been occurring in lobster aquaculture. The aim of this research was to observe the immune response of juvenile lobster P. homarus culture fed by moist pellet supplemented with probiotic. Experimental juveniles were reared in individual system (one juvenile/basket). The experiment was conducted for three months. The treatments comprised (A) whole cell of yeast Saccharomyces cerevisiae, (B) combination of probiotics Alteromonas sp. BY-9 and Bacillus sp. BC, and (C) without probiotic as control. Initial weight of juveniles were 0.37 ± 0.05 g. Immunity responses were analyzed using seven immunity related genes expression by RT-qPCR. The results showed that the survival rate of juvenile for treatments A, B, and C were 32.22%, 29.63%, and 33.33% respectively. The weight and length gain of the juvenile were not significantly different ($P > 0.05$) among treatments. Based on immunity related gene expression analysis, it revealed that A and B treatments have shown differences in the increament of immunity responses. Expressions of ALFH-1 genes were increased on (A) treatment with average of 3.44 fold and (B) treatment (3.25 fold) and higher than C treatment (2.03 fold). Prophenoloxidase (ProPO) expression was increase average up to 5.27 fold on A (yeast supplemented) treatment and B (combination of probiotic) were 12.92 fold. Gene expression on Clotting system (transglutaminase, clotting protein) and antioxidant defense mechanism (glutathione peroxidase/GPO) was increased on A and B treatments.

KEYWORDS: puerulus; probiotics; *Panulirus homarus*; immunity - related gen expression

Korespondensi: Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Br. Gondol, Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja, Bali 81101, Indonesia.
Tel. + (0362) 92278
E-mail: haryanti@indosat.net.id

PENDAHULUAN

Lobster merupakan komoditas ekspor yang dieksploitasi dari penangkapan di laut. Hingga kini belum ada hatcheri di Indonesia yang berhasil memproduksi larva (puerulus) atau benih (post puerulus). Di samping metode pembenihan yang belum dikuasai, juga diperlukan waktu yang panjang untuk memelihara larva (6-9 bulan) sehingga dirasakan tidak ekonomis. Tingginya permintaan ekspor benih lobster, menyebabkan penangkapan benih di alam dilakukan secara intensif.

Budidaya lobster dengan keramba jaring apung (KJA) telah dilakukan di beberapa daerah di Indonesia: Lombok, Bima, Sape, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Aceh (Ujung Batee) dengan kontribusi sebesar 2,67% (308 ton/tahun) dari total produksi budidaya (Priyambodo, 2014). Sementara, Vietnam merupakan negara dengan perkembangan budidaya lobster yang pesat sejak tahun 2005. Produksi tahunan lobster dihasilkan secara konsisten mencapai 1.500 ton dengan bobot 300-500 g/ekor (*P. ornatus*) (Anh & Jones, 2014).

Tingkat keberhasilan pemeliharaan lobster di Indonesia masih rendah, terutama pemeliharaan pada tingkat puerulus hingga menjadi juvenil dengan sintasan hanya sekitar 20%-50% (Shanks *et al.*, 2014). Hal yang sama juga dialami dalam pemeliharaan dari juvenil hingga ukuran konsumsi. Lobster *P. homarus* yang dipelihara dari ukuran juvenil 2 cm hingga 200 g selama enam bulan, hanya diperoleh sintasan < 50%. Namun, pembudidaya lobster *P. ornatus* di Vietnam selama delapan bulan pemeliharaan dari juvenil 2 cm hingga 350 g dapat memperoleh sintasan hingga 90%, bila sistem pemeliharaan dan nutrisinya baik (Priyambodo & Sarifin, 2009; Anh & Jones, 2014). Mortalitas yang masih tinggi tersebut disebabkan oleh sifat kanibalisme atau infeksi penyakit, stres transportasi, kualitas air, dan manajemen pemeliharaan yang belum standar. Beberapa penyakit pada spiny lobster di antaranya adalah *milky hemolymph disease* (Anonymous, 2007, Nunan *et al.*, 2010), *red body disease*, *black gill disease*, *red tail disease* (Sields, 2011), dan WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) (Clark *et al.*, 2013). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mencegah terjadinya infeksi penyakit, di antaranya dengan perbaikan mutu lingkungan dan penyediaan pakan dengan formulasi yang memadai. Hasil penelitian pengaruh parameter lingkungan dan lama penampungan terhadap respons imun pada *P. homarus* dan *P. cygnus* menunjukkan bahwa perubahan ekstrem lingkungan dan efek penampungan (empat hari) dapat menginduksi perubahan imunitas lobster (Verghese *et al.*, 2007).

Informasi tentang penambahan dan penggunaan imunostimulan pada pemeliharaan benih lobster dalam budidaya masih terbatas. Komponen yang sering digunakan pada upaya peningkatan kesehatan dan pencegahan penyakit pada krustasea adalah imunostimulan (β -glucan). Kemampuan imunostimulan dalam meningkatkan respons kekebalan tubuh nonspesifik memperlihatkan hasil positif pada krustasea. Kerentanan terhadap infeksi mikroba sangat berhubungan dengan *immuno* kompetensi dan kemampuan untuk menolak mikroorganisme tersebut (Hauton *et al.*, 2013, Jimenez-Vega *et al.*, 2004).

Strategi untuk mengontrol penyakit infeksi meliputi peningkatan kondisi lingkungan, penggunaan benih sehat, serta peningkatan daya tahan terhadap penyakit dengan menggunakan probiotik. Zokaefar *et al.* (2012), Karla *et al.* (2011), dan Li *et al.* (2009), menyatakan bahwa penggunaan probiotik pada udang *L. vannamei* dapat meningkatkan performa pertumbuhan, enzim pencernakan, resistensi penyakit, *immune gene expression*, dan mengurangi prevalensi infeksi virus atau bakteri. Hasil uji tantangan terhadap *Vibrio fluvialis* pada *Homarus americanus* menunjukkan nilai transkripsi respons protein antimikroba meningkat 17 kali (CIEark, 2013; Beale *et al.*, 2009).

Efek protektif dan menguntungkan dari mikroba atau probiotik disinyalir dapat berperan sebagai imunostimulan, imunostimulator, suplemen pakan, dan bahan aditif. Manfaat mikroba atau probiotik sudah banyak dilaporkan antara lain untuk mencegah penyakit infeksi pada pemeliharaan krustasea dari stadia larva, juvenil hingga ukuran konsumsi, serta untuk menjaga kualitas air (Fu *et al.*, 2011; Luis-Villasenor *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009; Balcazar *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007).

Oleh karena itu, pola ekspresi gen yang berhubungan dengan imunitas merupakan *transcriptional* respons terhadap infeksi penyakit. Pengaruh bahan suplemen (imunostimulan) akan berhubungan dengan sifat genotipe dan terekspresi pada sifat fenotipe, yaitu dengan menunjukkan kondisi sehat atau sakit.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian yang berhubungan dengan respons imunitas lobster menjadi pilihan untuk mendapatkan benih yang sehat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi tentang respons imunitas benih lobster *P. homarus* yang diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan probiotik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk peningkatan produksi lobster melalui penyediaan benih lobster yang sehat pada perikanan budidaya yang dikembangkan di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Pemeliharaan Benih *P. homarus*

Benih lobster diberi pakan *moist* pelet dengan perlakuan penambahan *whole cell* (A) ragi, *S. cerevisiae*; (B) kombinasi probiotik (*Alteromonas* sp. BY-9 dan *Bacillus cereus* BC), dan (C) tanpa probiotik. Masing-masing bahan probiotik dicampurkan dalam pakan *moist* pelet. Ukuran rata-rata bobot benih yang digunakan adalah $0,37 \pm 0,05$ g dan panjang total $2,34 \pm 0,25$ cm. Pemeliharaan benih lobster dilakukan secara individu (1 ekor/keranjang), setiap perlakuan menggunakan satu set rangkaian keranjang (terdiri atas sembilan keranjang) dan diulang dua kali. Keranjang berbentuk bulat (diameter 20 cm, tinggi 30 cm) dan diapungkan dalam bak beton volume 5 m³. Setiap keranjang diberikan *shelter* berupa pipa PVC dan waring yang dibentuk seperti kipas untuk persembunyian benih lobster. Benih lobster dipelihara selama tiga bulan. Percobaan dengan rancangan acak lengkap dan dianalisis dengan ANOVA. Selama pemeliharaan dilakukan pembersihan sisa-sisa makanan, pergantian air dengan sistem mengalir. Pengamatan pertumbuhan panjang dan bobot, serta sintasan dilakukan setiap bulan, dan penghitungan hemosit dilakukan pada awal dan akhir pemeliharaan.

Pembuatan Pakan *Moist* Pelet

Persentase bahan baku untuk pembuatan pakan *moist* adalah tepung pelet udang (24,77%); tepung rebon (24,77%); cumi dan udang segar masing masing (24,77%); serta perekat (CMC) (0,74%); dan vitamin mix (0,19%). Campuran tersebut ditambahkan mikroba ragi (100 mL, kepadatan 10¹¹ sel/mL), sedangkan untuk perlakuan kombinasi probiotik (*Alteromonas* sp. BY-9 dan *Bacillus cereus* BC), pakan *moist* ditambahkan probiotik tersebut masing-masing 50 mL dengan kepadatan 10¹² sel/mL). Setelah tercampur, bahan digiling untuk menghasilkan *moist* pelet. Hasil pakan *moist* tersebut selanjutnya dikeringanginkan selama tiga jam dan disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 5-6°C. Pembuatan pakan *moist* dilakukan secara berkala untuk menghindari terjadinya penurunan nilai nutrisi. Komposisi proksimat pakan *moist* tertera pada Tabel 1.

Penghitungan Hemosit

Hemolim dikoleksi pada benih lobster dari *ventral-sinus cavity* menggunakan jarum 25 gauge dan *syringe* 1 mL yang berisi senyawa *anticoagulant* dingin (2% NaCl; 0,1 M glucose; 30 mM Na citrat; 26 mM asam citrat; 10mM EDTA). Pengambilan hemosit hanya dilakukan pada awal dan akhir perlakuan sebanyak tiga ekor setiap perlakuan. Penghitungan total hemosit

dilakukan dengan mengambil hemolim (10 µL) dan dihitung menggunakan hemositometer di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Status Imunitas

Pengamatan status imun dilakukan dengan membandingkan tingkat ekspresi mRNA pada hemosit benih lobster pada awal dan akhir perlakuan. Analisis ekspresi gen imunitas menggunakan RTq-PCR. Pengamatan respons imun dilakukan dengan ujiantang dengan *V. harveyi* penyebab *red body disease* secara kohabitasi. Ujiantang dilakukan selama 96 jam dengan interval waktu pengambilan hemolim setiap 24 jam.

Ekspresi Gen Terkait Imunitas

Isolasi Total RNA dan Sintesis cDNA

Hemolim yang telah dikoleksi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet hemosit yang diperoleh dicuci satu kali dengan larutan *anticoagulant* dingin dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan yang sama. Selanjutnya dilakukan ekstraksi total RNA menggunakan larutan *lysis RNA extraction* dengan metode IQ-2000 yang telah dimodifikasi.

Sintesis cDNA (*complementary DNA*) dilakukan dengan menggunakan *Agilent Affinity Script qPCR cDNA Synthesis* kit. Volume reaksi 20 µL yang terdiri atas 10,0 µL *first strand 2x master mix*; 3,0 µL *oligo (dT) primer*; 1,0 µL *affinity script RT*; dan 3,0 µg total RNA. Larutan dalam mikrotub diinkubasi berturut-turut pada suhu 25°C selama lima menit, 42°C (15 menit) dan 95°C selama lima menit. Larutan cDNA selanjutnya diletakkan dalam es untuk menghentikan reaksi sintesis dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis berikutnya.

Analisis RT-qPCR pada Gen yang Terkait dengan Imunitas *P. homarus*

Analisis profil status imun menggunakan metode ekspresi transkripsi gen yang terkait dengan imunitas secara kuantitatif dengan RT-qPCR dan primer spesifik mengikuti Wang *et al.* (2010) dan Clark (2013). Analisis *Pro PO*, *Glutathione Peroxidase (GPo)*, *Clotting Protein* dengan metode Wang *et al.* (2010), sedangkan ALFH-1, ALFH-2, SAA-Serum Amyloid Protein A mengikuti Clark (2013) seperti tertera pada Tabel 2. Internal kontrol menggunakan 18SrRNA. Analisis RT-qPCR dilakukan menggunakan ABI PRISM 7500 sistem deteksi *sequens* dengan 5x *Hot Firepol Evagreen qPCR mix (ROX)*. Volume reaksi untuk amplifikasi cDNA sebanyak 20,0 µL dengan final konsentrasi 1x *hot Master mix (Rox)*, pasangan primer F/R 10 pmol (Tabel 2) masing-masing 250 nM, *NFW (Nuclease Free Water)*

Tabel 1. Komposisi proksimat pakan moist yang digunakan untuk pemeliharaan benih lobster *P. homarus*

Table 1. Proximate composition of moist diet used for rearing juvenile of lobster *P. homarus*

Komposisi proksimat Proximate composition	Perlakuan (Treatments)		
	A	B	C
Air (Moisture)	9.57	9.18	10.34
Protein	50.35	49.41	48.87
Lemak (Fat)	6.31	6.12	6.03
Abu (Ash)	12.18	12.41	12.18

ditambahkan hingga volume 20 µL dan cDNA (0,01 ng/µL). Kondisi suhu *cycling* untuk RT-qPCR terdiri atas suhu awal denaturasi 95°C (15 menit) diikuti dengan 95°C (15 detik) dan suhu *annealing* 60°C (30 detik) sebanyak 40 siklus dan suhu ekstensi akhir 60°C selama satu menit.

Penghitungan ΔCt dari *threshold* siklus PCR (Ct) gen yang diuji dinormalisasi secara relatif terhadap Ct 18sRNA (internal kontrol) pada sampel yang sama. Nilai $\Delta\Delta Ct$ dihitung dari ΔCt (kelompok sampel yang

diuji) $-\Delta Ct$ (ekspresi awal). Representasi kelipatan relatif yang berbeda terhadap ekspresi awal dapat dihitung dengan $2^{-\Delta\Delta Ct}$

HASIL DAN BAHASAN

Performa Pertumbuhan dan Sintasan Benih Lobster *P. homarus*

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pemeliharaan benih lobster, *P. homarus* secara individu

Tabel 2. Sekuens primer yang digunakan untuk analisis gen terkait dengan imunitas benih lobster *P. homarus* dengan RT-qPCR

Table 2. Primer sequence that were used for immune – related gen analysis of juvenile *P. homarus* by RT-qPCR

Sistem imun Immune system	Target gen Gene target	Nama Name	Primer	Sequence (5"-3")	Bank gen Gene bank
proPO activating system	Prophenoloxidase	proPO	proPO-F/R	F:GAGATCGCAAGGGGAGAACTG R:CGTCAGTGAAGTCGAGACCA	EF 565469
Clotting System	Transglutaminase	Tgase	Tgase-F/R	F:CCTCAGGATCTCCTTCACCA R:TTGGGAAAACCTTCATTTTCG	EE 572305
Antimicrobial peptide system	Clotting protein	CP	CP-F/R	F:TCTTTGCGCAGTTGGTGATC R:TGAGGTGACCGAGTGCAAAA	DQ984182
Antioxidant defense mechanism	Glutathione peroxidase	Gpo	GPO-F/R	F:TTTTTCCGTGCAAAAAGGAC R:TAATACGCGATGCCCTAAC	AY 973252
Anti-Lipopoly-sacharide		ALFHa-1	ALFHa-1F/R	F:CAGTCGTTCTGGTGTGTTGGGAA R:TTGTTGGGCATCCCTCTCGGTTAT	EU625516
		ALFHa-2	ALFHa-2F/R	F:AGACTACCACTGACTTCGTGAGGA R:TCTCGGGATGATCCGTTAACACCT	FC556430
Serum amyloid protein	SAA	SAA	SAA F/R	F:TACCACTACCAGCACTCATCACCT R:TCAAACACAGAGAATAGGCACGGG	EH116055
Internal control	18s RNA	18s	18s-F/R	F:AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA R:AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA	AF 186250

memberikan laju pertumbuhan bobot dan panjang yang tidak berbeda ($P > 0,05$) seperti terlihat pada Gambar 1. Hasil pengamatan bobot akhir benih lobster yang diberi pakan *moist* dengan penambahan ragi (A), kombinasi probiotik (B), dan tanpa probiotik (C) masing-masing sebesar $3,77 \pm 1,72$ g; $3,29 \pm 2,06$ g; dan $3,47 \pm 1,4$ g. Sementara, pertambahan bobot benih lobster selama tiga bulan pemeliharaan adalah (A) 3,4 g; (B) 2,92 g; dan (C) 3,1 g.

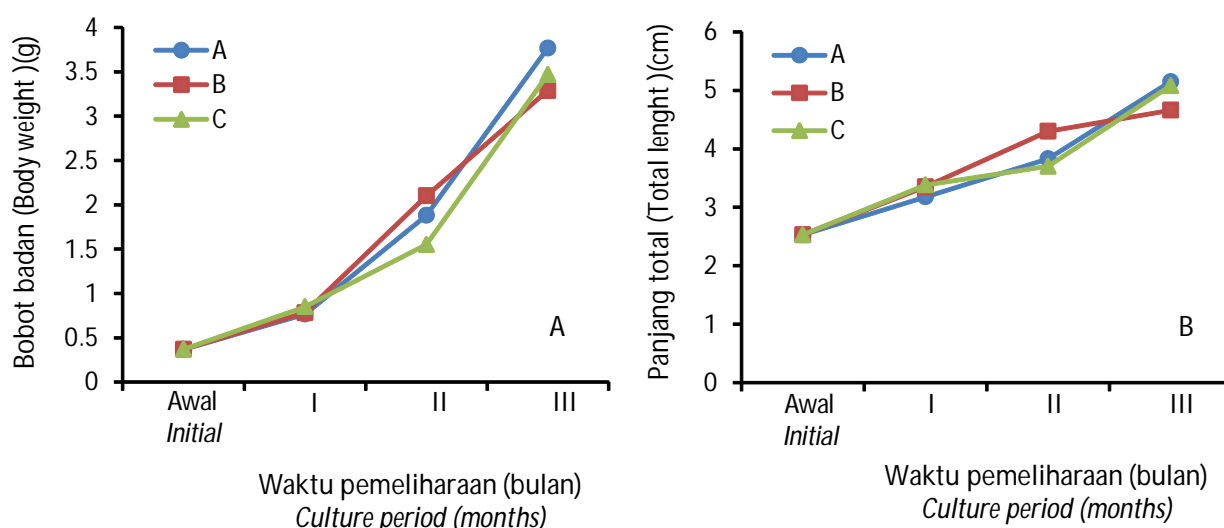
Bila dilihat dari komposisi proksimat pakan *moist* pelet, penambahan ragi *S. cerevisiae* mempunyai kandungan protein 50,35% dibandingkan pakan *moist* yang ditambahkan kombinasi probiotik (49,41%) dan tanpa probiotik (48,87%). Perbedaan kandungan protein yang relatif kecil (0,5%-1,5%), kemungkinan menyebabkan tidak adanya perbedaan pertumbuhan bobot dan panjang pada benih lobster. Selain itu, diduga efek *mode of action* probiotik yang diberikan tidak terekspresi terhadap performa pertumbuhan dan sintasan, namun terlihat pada imunitas. Oelschlaeger (2010) menyatakan bahwa di antara *mode of action* probiotik dapat untuk memodulasi pertahanan usus host (lobster) meliputi *innate* maupun *acquired* sistem imun dan aksi ini sangat penting untuk mencegah dan terapi infeksi penyakit dan *treatmen* inflamasi sistem pencernaan. Hasil penelitian Jayakumar *et al.* (2011) menyatakan bahwa formulasi pakan pelet dengan perbedaan tingkat variasi protein yang relatif tinggi (54,9%; 45,92%; dan 35,88%) menghasilkan performa pertumbuhan yang berbeda pada juvenil lobster *P. homarus*. Sementara, hasil penelitian Daniel *et al.*

(2013) dan Daniel *et al.* (2010) menjelaskan tentang studi mengombinasikan probiotik dan prebiotik (*synbiotic*), dan terlihat adanya perubahan spesifik komposisi aktivitas mikroflora dalam *gastrointestinal* yang memberikan keuntungan pada host (lobster) dan kesehatan. Aksi sinergitik tersebut ditunjukkan dari kombinasi *Bacillus spp.* dan *Mannan oligosaccharida* yang merupakan prebiotik dalam pemeliharaan larva lobster *Hommarus gammarus* L. dan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan sintasan.

Besarnya sintasan benih lobster yang dipelihara secara individu pada pemberian pakan *moist* dengan penambahan ragi (A), kombinasi probiotik (B), dan tanpa probiotik (C), masing-masing sebesar 32,22%; 29,63%; dan 33,33%. Hal ini tidak menunjukkan perbedaan nyata ($P > 0,05$). Mortalitas terjadi karena kegagalan pada saat benih lobster mengalami pergantian kulit. Sifat karnivor pada benih lobster sangat dominan sesuai dengan kondisi di alam. Kebiasaan memangsa hewan hidup (ikan atau krustasea kecil) menjadikan benih lobster relatif sulit untuk dialihkan ke makanan buatan (*artificial diet*).

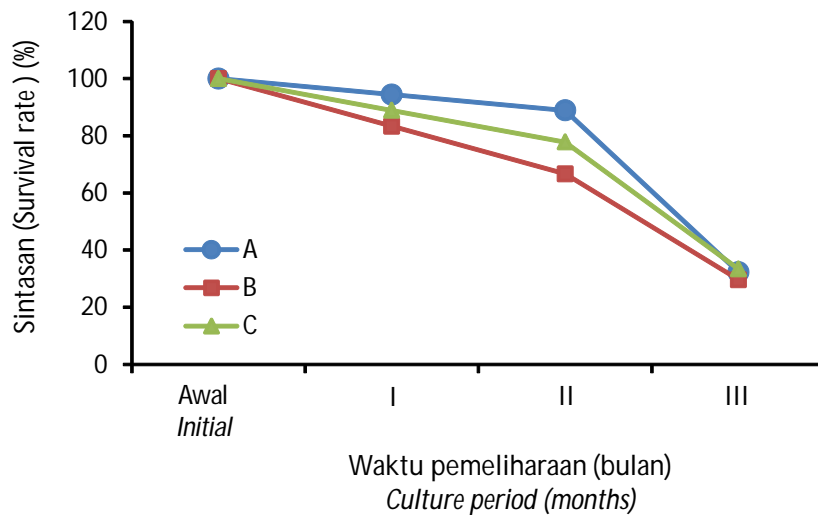
Total Hemosit

Hasil pengamatan total hemosit pada benih lobsters terlihat bahwa pemberian *moist* pelet dengan penambahan probiotik maupun tanpa probiotik, memberikan jumlah hemosit yang berbeda. Pada perlakuan A (pakan *moist* yang ditambah ragi *S. cerevisiae*) tertinggi dalam menghasilkan hemosit ($196,5 \times 10^4$ sel/mL) (Gambar 3), sedangkan jumlah



Gambar 1. Keragaan (A) pertumbuhan bobot (g) dan (B) panjang total (cm) benih lobster *P. homarus* yang dipelihara secara individu dengan pakan *moist* yang ditambah (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 1. Growth performance of body weight (g) and total length (cm) juvenile of spiny lobster *P. homarus* reared with individually system and fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae* (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic

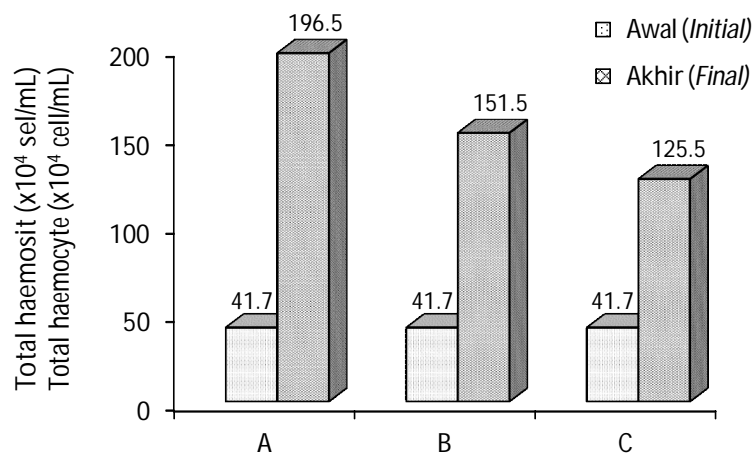


Gambar 2. Sintasan (%) benih lobster *P. homarus* yang dipelihara secara individu dengan pakan moist yang ditambahkan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 2. Survival rate (%) of juvenile spiny lobster, *P. homarus* reared with individual system and fed with moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae* (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic

hemosit terendah pada perlakuan C (tanpa probiotik). Peran ragi *S. cerevisiae* dengan dinding sel yang mengandung β (1,3 dan 1,6) glukana dapat sebagai *imunomodulator* untuk meningkatkan jumlah dan kemampuan sel T, sel B (pada ikan), sel hemosit (pada krustasea) dan makrofag dalam rangka melawan infeksi penyakit. Hemosit berperan penting dalam meregulasi respons imun pada krustasea, walaupun

pengukurannya akan lebih kompleks dengan perbedaan jenis kelamin dan ukuran lobster yang diamati (Huu & Jones, 2014). Pada krustasea, hemosit terlibat dalam reaksi pertahanan tubuh (*immediate defense reaction*), seperti modulasi, enkapsulasi, dan fagositosis. Selain itu, hemosit membantu pada perbaikan jaringan yang rusak pada tubuh melalui proses regenerasi dan penyembuhan.



Gambar 3. Total hemosit ($\times 10^4$ sel/mL) benih *P. homarus* dengan pemberian pakan moist pelet yang ditambahkan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 3. Total hemocytes ($\times 10^4$ cell/mL) of juvenile lobster *P. homarus* reared with fed of moist diet supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) probiotic, and (C) without probiotic

Status Imun Benih Lobster *P. homarus*

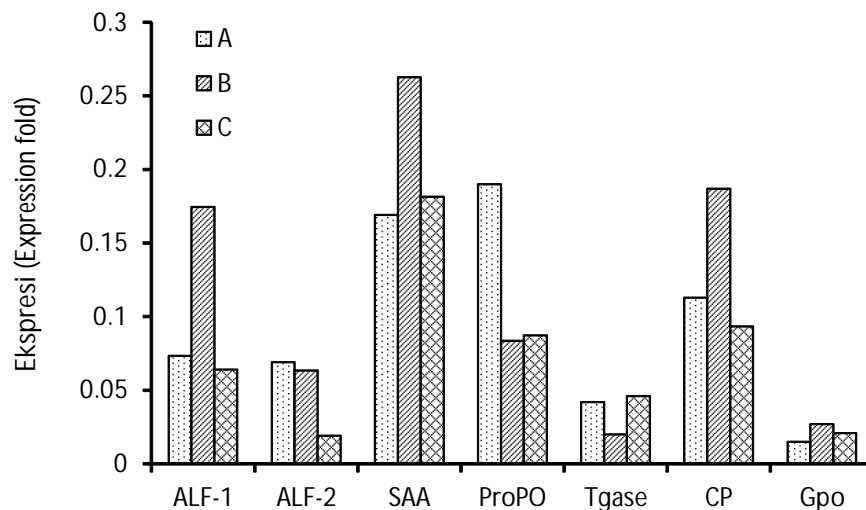
Hasil analisis ekspresi gen yang terkait imunitas dengan target gen ALF-1, ALF-2, SAA, ProPO, Tgase, CP, dan GPO pada benih lobster sebelum diuji tantang dengan *V. harveyi* tertera pada Gambar 4. Analisis ekspresi gen dilakukan pada akhir penelitian.

Pada Gambar 4 menunjukkan bahwa hasil analisis ekspresi gen yang terkait imunitas pada benih lobster setelah tiga bulan pemeliharaan (sebelum uji tantang) pada perlakuan A (ragi *S. cerevisiae*) dan B kombinasi probiotik (*Alteromonas* sp. BY-9 dan *Bacillus cereus* BC), terlihat lebih tinggi status imunnya pada target gen ALFH_a-1, ALFH_a-2, SAA, ProPO, dan CP dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan probiotik. Tingkat ekspresi mRNA sebagai indikator imunitas pada benih lobster sebelum uji tantang dengan *V. harveyi* masih relatif rendah. Pada benih lobster dengan pakan *moist* yang ditambahkan ragi (A), terlihat kelipatan imunitas dari target gen ALF Ha-1 dan ALFH_a-2 adalah sama (0,07 kali), sedangkan pada target gen SAA, ProPO, dan CP ada peningkatan ekspresi masing-masing 0,17; 0,19; dan 0,11 kali. Sementara, pada target gen Tgase dan GPO menunjukkan ekspresi yang rendah (0,04 dan 0,01 kali). Pada benih dengan perlakuan pakan *moist* pelet yang ditambah kombinasi probiotik (B) menunjukkan ekspresi imunitas yang lebih tinggi pada ALFH_a-1 (0,17 kali), SAA (0,26 kali), dan CP (0,19 kali), sedangkan

pada empat target gen lainnya menunjukkan ekspresi imunitas yang rendah yaitu ALFH_a-2 (0,06 kali), Pro PO (0,08 kali), Tgase (0,02 kali), dan GPO (0,03 kali). Sementara, pada benih lobster yang diberi pakan *moist* tanpa probiotik (C), kelipatan imunitas pada tujuh target gen hanya berkisar antara 0,02-0,13 kali.

S. cereviceae adalah ragi yang tergolong *eukaryote*, mempunyai dinding sel dengan kandungan β (1,3 dan 1,6) glukukan, kitin, dan manoprotein. β (1,3 dan 1,6) glukukan merupakan substansi esensial dan memiliki kemampuan menstimulasi secara nonspesifik terhadap respons imun (imunostimulan). Komposisi kimia ragi *S. cereviceae* terdiri atas protein kasar (50%-52%), karbohidrat (30%-37%), lemak (4%-5%), dan mineral (7%-8%) (Ahmad, 2005). *S. cereviceae* juga mempunyai beberapa enzim dan berfungsi penting di antaranya peptidase, zimase, dan intervasse. Enzim peptidase mempunyai 92 gen dan enzim tersebut yang homolog inaktif sebanyak 32 gen. Adanya β (1,3 dan 1,6) glukukan dapat meningkatkan fungsi imun termasuk fagositosis dan stimulasi RES (*Reticula Endothelial System*) dan enzim dengan gen homolog aktif dapat mengekspresikan peningkatan imunitas (Ahmad, 2005).

Peran *Alteromonas* sp. BY-9 adalah menekan adanya infeksi *Vibrio* (*biological control*) dalam pemeliharaan udang dan kepiting, sehingga media pemeliharaan menjadi sehat. Sementara, *Bacillus cereus* BC merupakan probiotik yang berperan dalam sistem pencernaan,



Gambar 4. Tingkat ekspresi mRNA dari ALFH_a-1, ALFH_a-2, SAA, ProPO, Tgase, CP, dan GPO pada hemosit benih lobster *P. homarus* setelah tiga bulan pemeliharaan (sebelum uji tantang dengan *V. harveyi*). Benih lobster diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 4. Expression value mRNA of ALF-1, ALF-2, SAA, ProPO, Tgase, CP, and GPO on hemocytes of juvenile *P. homarus* after three months reared (before challenge test with *V. harveyi*). Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) probiotic, and (C) without probiotic

sehingga fungsi usus lobster menjadi baik, dimungkinkan tingkat pencernaan lebih efisien. Kombinasi peran inilah yang menyebabkan benih lobster yang selama pemeliharannya menggunakan kombinasi dua jenis probiotik tersebut menunjukkan ekspresi imun yang lebih baik setelah melalui analisis ekspresi gen yang terkait imunitas, walaupun belum diuji tantang dengan *V. harveyi* penyebab *red body disease*.

Sel hemosit dalam hemolim, berimplikasi pada perbedaan respons kekebalan, di antaranya melanisasi dan coagulasi yang dimediasi oleh pelepasan efektor hemosit, seperti prophenoloxidase (proPO) activating sistem, transglutaminase atau *anti microbial peptida*. Dalam sistem *immune-related protein* pada krustasea, dapat digambarkan sebagai *clotting protein*, *lysozyme*, *Lipopolysaccharide agglutinin*, dan β -*glucan-binding protein*.

Mekanisme kekebalan tubuh pada krustasea termasuk lobster tidak seperti pada ikan yang mempunyai sistem imunoglobulin. Imunoglobulin pada krustasea dikenal dengan *Prophenoloxidase Activating* enzim (PPA). PPA merupakan protein yang berlokasi di sel granular hemosit dan dapat diaktifkan oleh lipopolysaccharida (LPS) dan β 1,3-Glucan; yang dapat merangsang prophenoloxidase menjadi phenoloxidase. Sebagai akibat dari perubahan ini akan dihasilkan semacam *Proteine Opsonin Factor* yang dapat menginduksi sel-sel agranuler hemosit untuk melakukan proses fagositosis. Sel hemosit juga melakukan degranulasi dan beberapa protein akan dilepas sebagai respons imun (Van de Braak, 2002).

Ekspresi Gen yang Terkait Imunitas

Anti-Lipopolysaccharida Faktor

Pengujian ekspresi gen imunitas dengan menggunakan RT-qPCR pada benih lobster dimaksudkan untuk mengetahui pengaturan transkripsi gen selama uji tantang dengan menginfeksi *V. harveyi*. Tingkat ekspresi gen mRNA secara individual dari benih lobster dinormalisasi menggunakan 18srRNA sebagai *reference endogenous* (kontrol internal), kemudian diekspresikan terhadap ekspresi dasar pada paparan nol (0) jam. Hasil yang diperoleh disajikan dalam masing-masing pengaturan mekanisme pertahanan pada lobster.

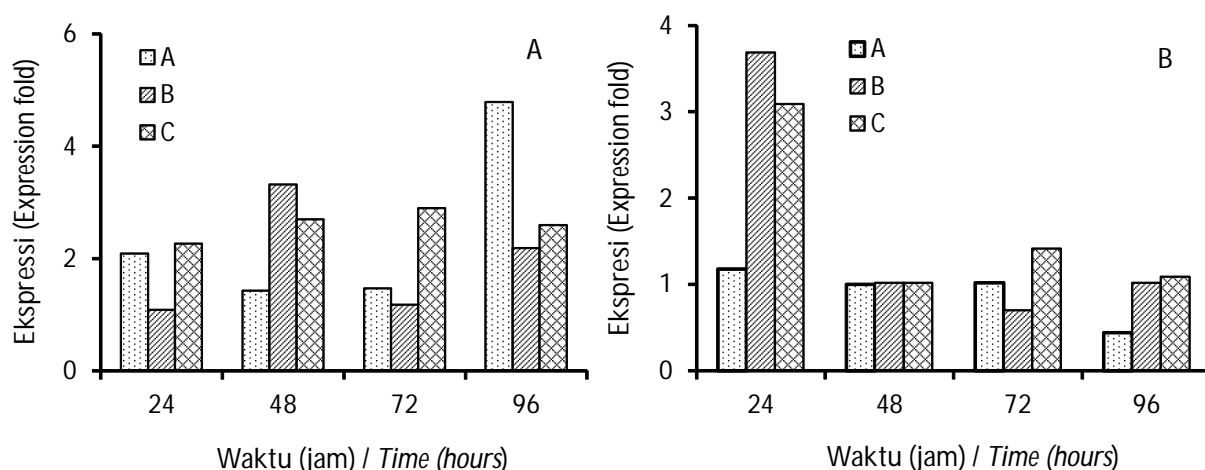
Sistem aktivasi gen ALFHa-1 dan ALFHa-2 (anti-lipopolysaccharida factor) terlihat signifikan terhadap peningkatan regulasi imun pada perlakuan A (pakan *moist* dengan ragi, *S. cerevisiae*) dari 24 jam hingga 96 jam setelah uji tantang. Tingkat transkripsional ALFHa-1 mencapai 2,09 kali (24 jam), dan 4,79 kali (96 jam). Sementara, pada perlakuan B (pakan *moist* dengan

kombinasi probiotik) terlihat ekspresi imunitas 1,18-3,32 kali (24-48 jam) dan 2,20 kali (96 jam), sedangkan perlakuan C (tanpa probiotik) terlihat kelipatan ekspresi sebesar 2,3-2,9 kali (24-96 jam) setelah uji tantang *V. harveyi* (Gambar 5A). Pada ALFHa-2 ekspresi imunitas benih lobster pada perlakuan (B) dan (C) terlihat lebih tinggi pada 24 jam setelah uji tantang (Gambar 5B). Pemberian pakan *moist* dengan kombinasi probiotik (B) dan tanpa probiotik (C) masing-masing menunjukkan tingkat ekspresi 3,69 dan 3,09 kali pada 24 jam setelah uji tantang. *Anti Lipopolysaccharide Factor* (ALF) merupakan bagian kecil dari protein dasar dan berperan untuk menetralkan lipopolysaccharida (LPS). Peran lain dari ALF adalah terlibat dalam penghambatan infeksi fungi dan bahkan replikasi atau pertumbuhan virus (Wang *et al.*, 2010). Dari hasil ekspresi imun ALFHa-2 pada benih lobster dengan perlakuan A (pakan *moist* dengan ragi, *S. cerevisiae*) menunjukkan nilai kuantitatif yang rendah. Hal ini diduga karena pakan *moist* dengan penambahan ragi diberikan melalui oral, sehingga peningkatan atau penurunan mekanisme pertahanan tubuh tergantung pada jumlah ragi (dengan kandungan β glukosa) yang dikonsumsi. Oleh karena itu, respons terhadap hewan uji sangat bervariasi tergantung pada ada atau tidaknya reseptor yang dikenal oleh komponen glukosa dari β (1,3 dan 1,6) glukosa.

Pro PO Activating System

Sistem aktivasi gen proPO (prophenoloxidase) terlihat signifikan terhadap peningkatan regulasi imun pada perlakuan A (pakan *moist* dengan ragi, *S. cerevisiae*) dan B (pakan *moist* dengan kombinasi probiotik) dari 24, 48, dan 96 jam setelah uji tantang. Tingkat transkripsional proPO pada perlakuan A (pakan *moist* dengan ragi, *S. cerevisiae*) mencapai 6,00 kali (24 jam); 8,59 kali (48 jam) dan 3,42 kali (96 jam), sedangkan pada perlakuan B (pakan *moist* dengan kombinasi probiotik) diperoleh 24,53 kali (48 jam) dan 7,33 kali (96 jam). Sementara, pada perlakuan C (tanpa probiotik) terlihat pada 24 dan 72 jam setelah uji tantang *V. harveyi* mencapai tingkat transkripsi 2,09 dan 4,7 kali (Gambar 6).

Sistem aktivasi proPO pada krustasea merupakan aspek penting dari *innate immunity*, dan tahapan awal dalam mengkatalisa melanisasi pada invertebrata. Wang *et al.* (2010) menyatakan bahwa tingkat ekspresi proPO meningkat pada *Fenneropenaeus chinensis* yang terinfeksi *Vibrio anguillarum*. Peningkatan regulasi proPO merupakan hal yang penting sebagai respons melawan infeksi *Vibrio*. Proses aktivasi sistem ProPO memerlukan partisipasi protease dan mekanisme ini memerlukan ketepatan pengontrolan untuk mencegah kerusakan jaringan. Phenoloxydase diproduksi dari pengaktifan prophenoloxidase (proPO system) sebagai



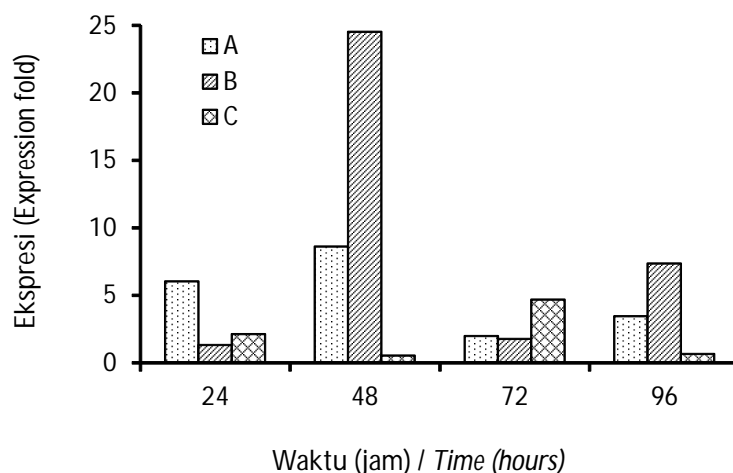
Gambar 5. Tingkat ekspresi mRNA dari *anti-lipopolysaccharide factor* (ALFHα-1 (A) dan ALFHα-2 (B)) dalam hemosit lobster *P. homarus* setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*. Benih lobster diberi pakan moist pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, (C) tanpa probiotik

Figure 5. Expression value mRNA of *anti-lipopolysaccharide factor* (ALFHα-1 (A) and ALFHα-2 (B)) in juvenile lobster *P. homarus* hemocytes after *V. harveyi* challenge test. Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic

fenomena “cascade” dengan beberapa cara untuk performansi fungsi organ.

Sistem imun pada benih lobster sebagaimana pada spesies invertebrata lain, tergantung pada *innate immunity*. *Innate immunity* terbagi dalam pertahanan humoral (mengaktifasi beberapa bagian *proteolytic* seperti

sistem prophenoloxidase/proPO, mekanisme *clotting hemolim*, melanisasi respons imun antimikroba) dan pertahanan seluler (fagositosis, enkapsulasi, degranulasi seluler, dan pelepasan faktor-faktor pertahanan). *Innate immunity* pada invertebrata dimediasi oleh sel hemosit yang bersirkulasi.



Gambar 6. Tingkat ekspresi mRNA dari *proPO activating system* (prophenoloxidase-ProPO) dalam hemosit benih lobster *P. homarus* setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*. Benih lobster diberi pakan moist pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombnasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 6. Expression value mRNA of *proPO activating system* (prophenoloxidase-ProPO) in juvenile lobster *P. homarus* hemocytes after *V. harveyi* challenge test. Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) probiotic, and (C) without probiotic

Hemolymph Clotting Mechanism

Transglutaminase (Tgase) dan *clotting* protein (CP) berperan dalam *clotting* sistem krustasea. Tingkat ekspresi gen Tgase benih lobster dengan pakan *moist* yang ditambahkan ragi, *S. cerevisiae* relatif lebih tinggi 1,25-1,71 kali daripada perlakuan C (pakan *moist* tanpa probiotik) setelah 24-96 jam terpapar hanya 0,84-1,45 kali. Pada pakan *moist* dengan kombinasi probiotik setelah terpapar selama 24, 48, 72 jam hingga 96 jam dengan *V. harveyi* menunjukkan kelipatan ekspresi gen Tgase yang tinggi masing-masing sebesar 1,28; 2,37; 6,36; dan 16,24 kali (Gambar 7A).

Ekspresi gen CP menunjukkan pengaturan imun yang meningkat sejak 24, 48, 72, dan 96 jam setelah uji tantang dengan *V. harveyi* pada pemberian pakan *moist* yang ditambahkan ragi *S. cerevisiae* (Gambar 7B). Kelipatan ekspresi imunitas yang mengkode gen CP sebesar 11,06 kali (24 jam), 14,52 kali (48 jam), 2,30 kali (72 jam), dan 8,2 kali (96 jam). Pada benih lobster yang diberi pakan *moist* dengan kombinasi probiotik dan tanpa probiotik, kelipatan ekspresi gen CP tidak berbeda nyata.

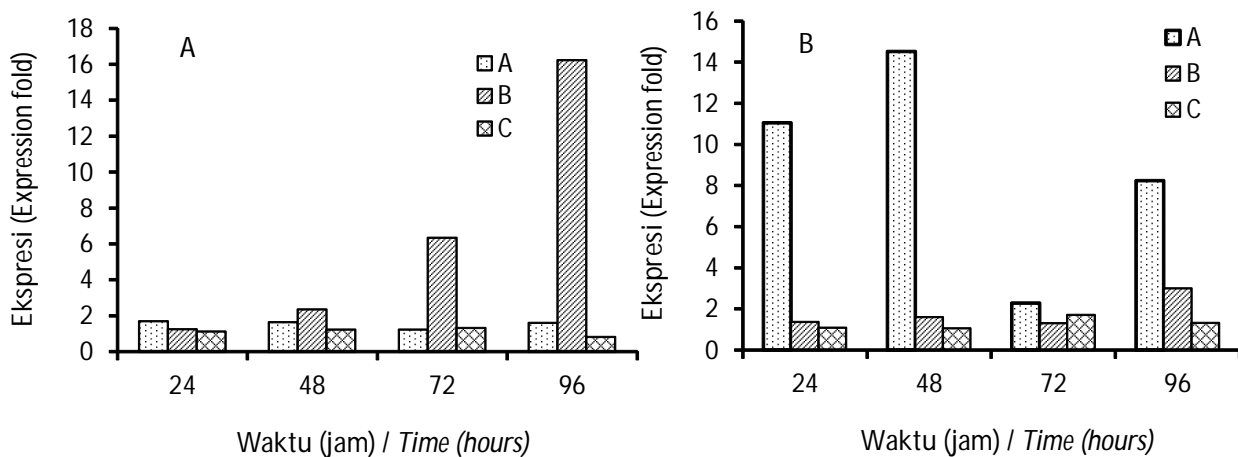
Pada lobster yang mengalami luka, sistem *clotting* protein berperan cepat untuk mencegah hilangnya hemolim. Sistem *clotting* juga terlibat dalam memobilisasi pencegahan tersebarnya patogen melalui *hemocoel*. Sementara, pada transglutaminase (Tgase) berperan dalam memediasi koagulasi hemolim dengan men-*trigger* polimerisasi *clotting* protein. Penggunaan RNA *interferens* menunjukkan bahwa Tgase dan CP berperan dalam pertahanan dan mencegah bakteri

(*V. penaeicida*) dan virus (WSSV) pada udang *P. japonicus* (Maningas *et al.*, 2008).

Antioxidant Defense Mechanism

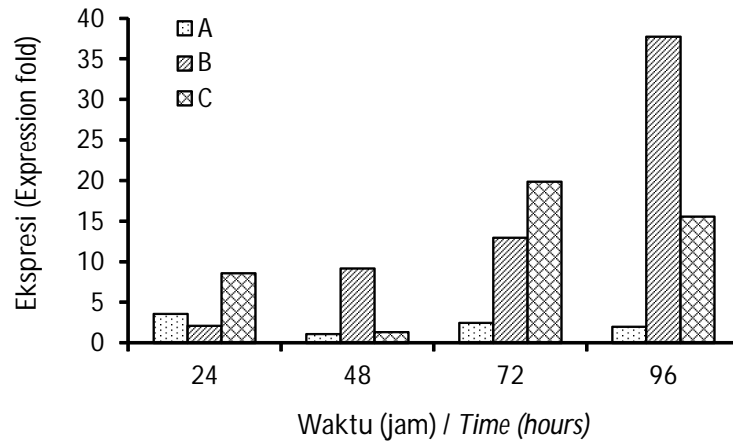
Glutathione peroxidase (GPO) adalah enzim antioksidan yang memediasi kerusakan oksidatif. Tingkat ekspresi imun dengan target gen GPO pada perlakuan A (pakan *moist* dengan penambahan ragi, *S. cerevisiae*) menunjukkan tingkat yang rendah yaitu 3,62 kali (24 jam); 1,15 kali (48 jam); 2,51 kali (72 jam); dan 2,05 kali (96 jam). Sementara, pada perlakuan kombinasi probiotik tingkat ekspresi diperoleh pada 48-96 jam setelah uji tantang dengan *V. harveyi* yaitu 9,22 kali (48 jam); 13,00 kali (72 jam); dan 37,75 kali (96 jam) (Gambar 8). Pada perlakuan C (tanpa probiotik) ekspresi imun yang tinggi terlihat setelah benih lobster terpapar *V. harveyi* 24 jam (8,61 kali), 72 jam (19,9 kali), dan 96 jam (15,61 kali). Gen GPO mentransformasi hidrogenperoksida menjadi air dan oksigen dengan katalisasi sebelum radikal hidroksil dapat dihasilkan. Bila lobster terinfeksi penyakit, maka akan terjadi stres oksidatif.

Pengujian ekspresi gen yang berhubungan dengan imunitas menggunakan target gen yang mengkode *serum amyloid protein* (SAA) menunjukkan ekspresi yang bervariasi (Gambar 9). Pada paparan 24 jam, benih lobster yang dipelihara dengan pakan *moist* pelet dan penambahan ragi *S. cerevisiae* memberikan kelipatan ekspresi yang tinggi (5,07 kali), namun pada 48, 72, dan 96 jam, ekspresi imunitas menurun masing-masing sebesar 2,90; 2,36; dan 3,91 kali. Ekspresi imunitas pada benih lobster yang diberi pakan *moist*



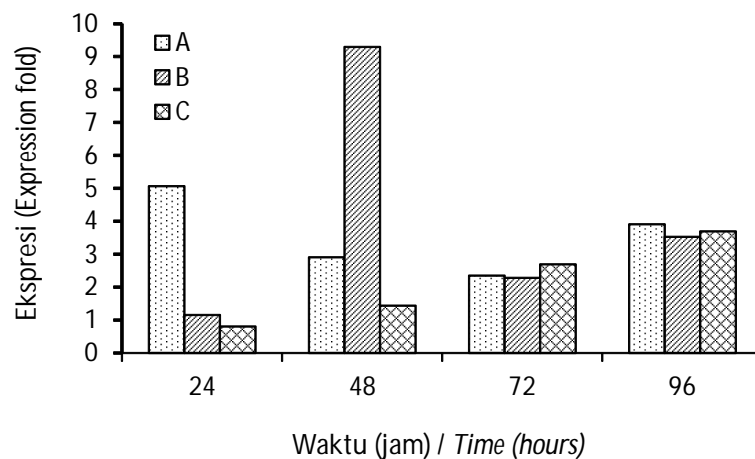
Gambar 7. Tingkat ekspresi mRNA dari *transglutaminase* (Tgase) (A) dan *clotting protein* (CP) (B) dalam hemosit benih lobster, *P. homarus* setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*. Benih lobster diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 7. Expression value mRNA of *transglutaminase* (Tgase) (A) and *clotting protein* (CP) (B) in juvenile lobster *P. homarus* hemocytes after *V. harveyi* challenge test. Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic



Gambar 8. Tingkat ekspresi mRNA dari *glutathione peroxidase* (GPO) pada hemosit benih lobster *P. homarus* setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*. Benih lobster diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 8. Expression value mRNA of *glutathione peroxidase* (GPO) in juvenile lobster, *P. homarus* hemocytes after *V. harveyi* challenge test. Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic



Gambar 9. Tingkat ekspresi mRNA dari *serum amyloid protein* (SAA) pada hemosit benih lobster *P. homarus* setelah diuji tantang dengan *V. harveyi*. Benih lobster diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan (A) ragi *S. cerevisiae*, (B) kombinasi probiotik, dan (C) tanpa probiotik

Figure 9. Expression value mRNA of *serum amyloid protein* (SAA) in juvenile lobster *P. homarus* hemocytes after *V. harveyi* challenge test. Juvenile lobster fed moist diets supplemented with (A) yeast *S. cerevisiae*, (B) combination of probiotic, and (C) without probiotic

dengan kombinasi probiotik pada 48 jam terpapar *V. harveyi* menunjukkan nilai yang tinggi 9,29 kali. Imunitas lobster yang diberi *moist* tanpa probiotik menunjukkan peningkatan imunnya setelah 96 jam (3,7 kali).

Respons imun yang terkait dengan gen imunitas pada lobster terhadap infeksi penyakit bakterial akan membantu menjelaskan pengaturan imun inang (lobster) melawan infeksi penyakit tersebut. Penggunaan RT-q PCR untuk mengkarakterisasi

perubahan ekspresi mRNA dari tujuh gen target yang terkait imunitas setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* (penyakit bakterial penyebab *red body disease*) dapat membuktikan implikasi fungsi yang jelas terhadap peran penggunaan probiotik yang berasal dari mikroba terhadap peningkatan respons imunitas. Dari hasil tersebut terbukti bahwa penggunaan ragi, *S. cerevisiae*, probiotik *Alteromonas* sp. BY-9 dan *B. cereus* BC merupakan satu di antara metode pencegahan penyakit infeksi (virus dan bakteri) melalui peningkatan imunitas dalam produksi lobster.

KESIMPULAN

Pertumbuhan bobot, panjang, dan sintasan benih lobster tidak berbeda nyata antar perlakuan. Tingkat ekspresi imunitas terhadap tujuh gen target (ALFHa-1, ALFHa-2, Pro PO, Gpo, CP, SAA, dan GPO) pada benih lobster *P. homarus* yang diberi pakan *moist* pelet dengan penambahan ragi *S. cerevisiae* dan kombinasi probiotik *Alteromonas* sp. BY-9 dan *B. cereus* BC mengalami peningkatan dibandingkan dengan tanpa probiotik setelah uji tantang dengan *V. harveyi* (penyebab *red body disease*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan pendanaan dari DIPA 2015 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut Gondol, Kementerian Kelautan dan Perikanan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua teknisi litkayasa laboratorium bioteknologi dan laboratorium pakan-nutrisi atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, R.Z. (2005). Pemanfaatan khamir *S. cereviceae* untuk ternak. *Wartazoa*, 15(1), 49-55.
- Anh, T.L., & Jones, C. (2014). Status report of Vietnam lobster grow-out. *Proceeding of the International Lobster Aquaculture Symposium*. Lombok, Indonesia, 22-25 April 2014, p. 82-86.
- Anonymous. (2007). Milky haemolymph disease of spiny lobsters (*Panulirus* spp.). *OIE Aquatic Animal Disease Cards*, p. 1-3.
- Balcazar, J.L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D.P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 147-150.
- Beale, K.M., Towle, D.W., Jayasundra, N., Smith, C.M., Siels, J.D., Small, H.J. & Greenwood, S.J. (2009). Anti-polysaccharide factors in the American lobster *Homarus americanus*: Molecular characterization and transcriptional response to *Vibrio fluvialis* challenge. *Comp. Biochem. Physiol Part D Genomic Proteomics*, 3(4), 263-269.
- Clark, K.F. (2013). *Discovery of novel molecular immune mediators in the American lobster (Homarus americanus) during bacterial, eukaryotic parasitic and viral challenges*. Doctor of Philosophy a thesis. University of Prince Edward Island.
- Clark, K.F., Greenwood, S.J., Acorn, A.R., & Byrne, P.J. (2013). Molecular immune response of the American lobster (*Homarus americanus*) to the white spot syndrome virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 114(3), 298-308.
- Daniels, C.L., Marrifield, D.L., Boothroyd, D.P., Davies, S.J., Factor, J.R., & Arnold, K.E. (2010). Effect of dietary *Bacillus* spp. and Mannan Oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L) larval growth performance, gut morphology and gut microbiote. *Aquaculture*, 304, 49-57.
- Daniels, C.L., Marrifield, D.L., Ringo, E., & Davies, S.J. (2013). Probiotic, Prebiotic, symbiotic application for the improvement of larval European lobsters (*Homarus gammarus*) culture. *Aquacult.*, 416-417, 396-406.
- Fu, L.L., Wang, Y., Wu, Z.C., & Li, W.F. (2011). In vivo assesment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 322-323, 33-38.
- Hauton, C., Brockton, V., & Smith, V.J. (2013). Changes in immunity gen expression and resistance to bacterial infection in lobster (*Homarus americanus*) post-larva stage VI following acute or chronic exposure to immunity stimulating compounds. *J. Invertebr. Pathol.*, 114(3), 289-297.
- Huu, H.D., & Jones, C.M. (2014). Effect of dietary mannan oligosaccharide supplementation on juvenile spiny lobster *Panulirus homarus* (Palinuridae). *Aquaculture*, 432, 258-264.
- Jayakumar, V.L., Ramanathan, N., Jeyaseelan, M.J.P., & Athithan, S. (2011). Growth Performance of spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus) administered with formulated pellet feeds. *Indian J. Fish*, 58(3), 95-101.
- Jimenez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G., Soderhall, K., & Vargas-Albores, F. (2004). A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biomedical and Biophysical Research Communication*, 314, 681-687.
- Karla, Y. Leyva-Madriral, Luna-Gonzalez, A., Escobedo-Bonilla, C.M., Jesus, A., Fierro-Coronado, & Maldonado-Mendoza, I.E. (2011). Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence

- of WSSV and IHNV in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental condition. *Aquaculture*, 322-323, 16-22.
- Li, J., Tan, B., & Mai, K. (2009). Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune response and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291, 35-40.
- Luis-Villasenor, I.E., Macias-Rodriguez, M.E., Gomez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., & Campa-Cordova, A.I. (2011). Beneficial effect of four *Bacillus* strain on the larval cultivation of (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 321, 136-144.
- Maningas ,M.B., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T., & Aoki, T. (2008). Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Mol. Immunol.*, 45, 1269-1275.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T., Navarro, S., Redman, R.M., & Lightner, D.V. (2010). Milky hemolymph syndrome (MHS) in spiny lobsters, penaeid shrimp and crabs. *Dis. Aquat. Organ.*, 91(2), 105-112.
- Oelschlaeger, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 57-62.
- Priyambodo, B. (2014). Development of the lobster farming industry in Indonesia. *Proceeding of the International Lobster Aquaculture Symposium*. Lombok, Indonesia, 22-25 April 2014, p. 114-118.
- Priyambodo, B., & Sarifin (2009). Lobster Aquaculture Industry in Eastern Indonesia: Present status and prospects. *Proceeding of an International Symposium*. Nha Trang, Vietnam, 9-10 December 2008, p. 36-45.
- Rodriguez, J., Espinosa, Y., Echeverria, F., Cardenas, G., Roman, R., & Stern, S. (2007). Exposure to probiotics and α -1,3/1,6 – glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to *White Spot Syndrome Virus* challenge and pond culture. *Aquaculture*, 273, 405-415.
- Shanks, S., Bahrawi, S., Priyambodo, B., & Jones, C. (2014). Transport and husbandry of post-plerulus tropical spiny lobster. *Proceeding of the International Lobster Aquaculture Symposium*. Lombok, Indonesia, 22-25 April 2014, p. 55-60.
- Siels, J.D. (2011). Diseases of spiny lobster: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106, 79-91.
- Van de Braak, K. (2002). *Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Dissertation. van Wageningen University. Netherlands, 168 pp.
- Vergheese, B., Radhakrishnan, E.V., & Padhi, A. (2007). Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunology*, 23(5), 928-936.
- Wang, H.C., Tseng, C.W., Lin, H.Y., Chen, I.T., Chen, Y.H., Chen, Y.M., Chen, T.Y., & Yang, H.L. (2010). RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increase mortality and reduces bacterial clearance alter challenge with *Vibrio harveyi*. *Development and Comparative Immunology*, 34, 49-58.
- 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, 349-353.
- Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and diseases resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 683-689.