

Pengaruh *Bacillus subtilis* Dengan Penambahan Prebiotik Terhadap Total Bakteri Pada Saluran Pencernaan Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus, 1798)

(The Effect of probiotic Bacillus subtilis With Addition of Prebiotics on Total bacteria in the Digestive Tract of Tiger Prawn, Penaeus monodon Fabricus 1798)

Ummu Kaltsum SC^{1*}, Nurul Mutmainnah¹, Yusdalifa Ekayanti Yunus¹, Muhamad Ikbali²

¹ Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah Pare-pare, Sulawesi Selatan, Indonesia

² Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia

korespondensi: ummukaltsum4@gmail.com

Diterima: 03 Oktober 2023; Disetujui; 06 Oktober 2023; Diterbitkan 25 Oktober 2023

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh probiotik *Bacillus subtilis* dengan penambahan prebiotik ubi jalar dan singkong terhadap total bakteri dan total *Vibrio harveyi* pada saluran pencernaan udang windu. Penelitian dilaksanakan di Mini Hatchery Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan dan Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Departemen Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini bakteri *Bacillus subtilis*, udang windu, ubi jalar, singkong dan *Vibrio harveyi*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Pemeriksaan meliputi total bakteri dan total *Vibrio harveyi* pada akhir penelitian Total bakteri pada saluran pencernaan udang yang terbaik diperoleh $12,58 \pm 2,85$ dan total *vibrio harveyi* diperoleh $1,2 \pm 0,27$.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*, singkong, ubi jalar, total bakteri, udang windu

Abstract

This study aims to determine the effect of the probiotic Bacillus subtilis with the addition of sweet potato and cassava prebiotics on total bacteria and total Vibrio harveyi in the digestive tract of tiger shrimp. The research was carried out at the Mini Hatchery of the Faculty of Marine Science and Fisheries and the Laboratory of Parasites and Fish Diseases, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Fisheries, Hasanuddin University. The materials used in this study were Bacillus subtilis bacteria, tiger prawns, sweet potatoes, cassava and Vibrio harveyi. This study used a completely randomized design with 4 treatments and 3 replications. Examinations included total bacteria and total Vibrio harveyi at the end of the study. Total bacteria in the digestive tract of the best shrimp was 12.58 ± 2.85 and total Vibrio harveyi was obtained 1.2 ± 0.27 .

Keyword: *Bacillus subtilis*, sweet potato, cassava, total bacteria, tiger prawn



PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan salah satu jenis komoditi crustacea yang dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia. Berbagai macam kegagalan yang terjadi dalam budidaya udang windu di beberapa daerah di Indonesia menjadi ancaman yang sangat merugikan bagi para pembudidaya. Untuk dapat menghasilkan komoditas udang windu yang unggul dan berkualitas, maka proses dalam pemeliharaan harus memperhatikan aspek internal yang berupa kualitas benih, lingkungan dan faktor eksternal berupa kualitas air budidaya, pemberian pakan, teknologi budidaya serta pengendalian hama dan penyakit (Arsad et al., 2017)

Pengendalian kondisi lingkungan budidaya agar optimal bagi biota yang dibudidayakan sangat dibutuhkan. Salah satu indikator suksesnya suatu produksi budidaya adalah rendahnya tingkat kematian dan tingginya hasil produksi, hal demikian dapat terwujud apabila kondisi lingkungan budidaya mendukung serta sistem imun yang baik terhadap penyakit selama masa pemeliharaan. Sistem imun dipengaruhi dari beberapa faktor yaitu: temperatur, kebiasaan hidup ikan dan Cellmediated immunity (Rahmaningsih, 2018). Sistem imun non-spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme sehingga dapat memberikan respon langsung. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap sistem imun non-spesifik adalah spesies, faktor keturunan dan usia, suhu, pengaruh hormon serta faktor kondisi (Rahmaningsih, S., 2018).

Selama ini masih mengandalkan penggunaan obat dan antibiotik, padahal dengan cara ini banyak menimbulkan masalah yaitu daging ikan yang pernah diterapi dengan beberapa antibiotik tidak diterima di banyak negara, harga obat dan antibiotik yang cukup mahal serta resisten pada bakteri dapat meningkat dengan penggunaan obat secara terus-menerus (Azhar, dan Wirasisya, 2019). Oleh karena itu, Penggunaan probiotik dan prebiotik dapat digunakan sebagai alternatif dalam meningkatkan daya tahan tubuh organisme budidaya serta dapat memperbaiki kualitas suatu perairan (Andriyanto et al., 2010).

Probiotik merupakan organisme hidup yang mampu memberikan efek yang menguntungkan kesehatan inangnya dengan memperbaiki keseimbangan bakteri dalam usus. Bakteri yang biasa digunakan pada probiotik berasal dari genus *Lactobacillus*, *Bacillus*,

Streptococcus, *Nitrosomonas*, dan *Nitrobacter*. Pengaruh bakteri probiotik terhadap pertumbuhan diduga terjadi karena adanya pengontrolan keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan, meningkatkan penyerapan nutrisi pakan dan perbaikan nutrisi pakan (Praditia, 2009). Supaya probiotik tumbuh baik di saluran cerna udang maka dibutuhkan prebiotik sebagai nutrisi. Prebiotik umumnya merupakan karbohidrat (poli- dan oligosakarida) yang tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan inang tetapi dapat meningkatkan pertumbuhan inang, pemanfaatan nutrisi, dan kesehatan dengan cara meningkatkan jumlah bakteri bermanfaat di dalam saluran pencernaan (Ringo & Song, 2016). Oligosakarida adalah banyak ditemukan pada biji-bijian, kacang-kacangan, dan umbi-umbian. Berbagai jenis umbi-umbian seperti ubi jalar, singkong, talas, kedelai, pisang dan bawang merah mengandung prebiotik (Winarno & Fernandes, 2007). Tingginya kandungan karbohidrat tidak tercerna seperti serat pangan pada produk olahan umbi-umbian seperti ubi jalar dan ubi kayu (singkong) memungkinkan untuk dikembangkan sebagai bahan pangan sumber prebiotik. Ubi jalar memiliki kandungan nutrisi tertinggi dengan protein, serat, kalsium dan kadar besi tetapi kandungan abu, lemak, fosfor dan zinc relative rendah (Bekele & Bekele, 2018). Beberapa penelitian menemukan bahwa ubi jalar mengandung oligosakarida tidak tercerna (non-digestible oligosaccharides [NDOs]) diantaranya rafinosa dan sukrosa yang berfungsi sebagai prebiotik (Marlis 2008; Putra 2010; Haryati & Supriyati, 2010). Sedangkan Ubi kayu memiliki beberapa keunggulan, diantaranya adalah kadar gizi makro (kecuali protein) dan mikrotinggi, kadar glikemik dalam darah rendah, kadar serat pangan larut tinggi, dalam usus dan lambung berpotensi menjadi prebiotik (Widowati & Margiono, 2016).

Berdasarkan uraian di atas tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh probiotik *Bacillus subtilis* dengan penambahan prebiotik dari jenis umbi-umbian berbeda terhadap total bakteri pada usus pencernaan dan total bakteri *vibrio harveyi*.

DATA DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Desember 2022 dengan lokasi uji coba perlakuan di Mini Hatchery Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan dan Pengamatan



total bakteri dan total *Vibrio harveyi* di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Departemen Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin Makassar.

Persiapan Penelitian

Probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* yang berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, kemudian bakteri ditumbuhkan kembali pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C untuk dijadikan stok. Semua proses penelitian dilakukan secara aseptik dan dilakukan dalam bilik laminar untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain.

- Penambahan bakteri probiotik pada pakan

Sebelum dicampur ke pakan, sebanyak 2 sampai 3 ose bakteri dari media TSA kemudian ditumbuhkan lagi pada media *Trypticase Soy Broth* (TSB) dalam Erlenmeyer 500 mL dan diinkubasi di *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 29°C dengan kecepatan 140 rpm, kemudian disentrifius selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Bakteri probiotik yang didapatkan selanjutnya ditimbang dan dicampur ke dalam pakan sesuai perlakuan.

Setelah itu, pencampuran probiotik dalam pakan mengacu pada metode Aslamsyah (2006) yaitu bakteri terlebih dahulu diencerkan dengan *Buffer Peptone Water* dan minyak ikan (dengan perbandingan 1 mL probiotik : 3 mL *Buffer Peptone Water* : 1 mL minyak ikan). Campuran ini kemudian disemprotkan pada pakan secara merata dengan menggunakan sprayer.

- Rancangan Penelitian

Penelitian didesain dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diuji cobakan pada penelitian ini adalah:

A: Kontrol (tanpa probiotik dan prebiotik)

B: Pemberian probiotik tanpa penambahan prebiotik

C: Probiotik dengan penambahan prebiotik ubi jalar 20%

D: Probiotik dengan penambahan prebiotik singkong 20%

Parameter Pengamatan

- **Perhitungan Total Bakteri Pada Usus**

Perhitungan total bakteri dilakukan pada akhir pemberian perlakuan dengan metode hitungan cawan sebar. Usus udang windu pada setiap perlakuan dengan bobot 0,1 gram dimasukkan ke dalam Eppendorf, kemudian digerus dan dihomogenkan dengan larutan fisiologis lalu dilakukan pengenceran serial (4 kali pengenceran) dalam larutan fisiologis sebanyak 0,9 ml. Setiap pengenceran di vortex sebelum dimasukkan kedalam media pengenceran berikutnya agar homogen. Lalu disebar 100 µl kedalam cawan petri yang telah berisi 15-20 ml media Nutrien Agar yang dibuat dengan dua kali ulangan tiap pengenceran. Setelah itu diinkubasi pada suhu 30^o C dengan posisi terbalik selama 24 jam untuk menghitung total bakteri. Perhitungan jumlah koloni dari 25-250 koloni menggunakan rumus (Fardiaz, 1993 dalam Damongilala, 2009):

$$\text{Total bakteri} = \text{Jumlah koloni bakter} \times \frac{1}{\text{Pengeceran}}$$

- **Jumlah Total *Vibrio harveyi***

Menghitung total bakteri *Vibrio harveyi* dilakukan setelah ujiantang dengan metode *Total plate Count* (TPC) dengan melihat koloni bakteri yang terbentuk dicawan petri. Perhitungan dilakukan pada akhir ujiantang untuk mengetahui jumlah koloni bakteri *Vibrio* pada udang.

Hepatopancreas dari berbagai udang sampel diambil dan dikultur di media agar TCBS dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian dihitung menggunakan rumus Buller (2004) sebagai berikut:

$$\text{Kepadatan populasi (CFU/ml)} = N \times \frac{100 \text{ ml}}{V} \times D$$

Keterangan: N: Jumlahkoloni pada petri disk

V: Volume sampel

D: Tingkat pengenceran

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Total Bakteri di Usus Udang Windu

Hasil rata-rata total bakteri di usus udang windu setelah pemberian perlakuan terlihat pada Table 1.

Tabel 1. Total bakteri di usus udang windu

Perlakuan	Total Bakteri ($\times 10^6$ CFU/mL) \pm SD
A	5,06 \pm 3,98 ^a
B	8,03 \pm 7,39 ^{ab}
C	11,92 \pm 2,21 ^{ab}
D	12,58 \pm 2,85 ^b

Kode yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$)

2. Total Bakteri *Vibrio* spp

Hasil rata-rata total bakteri di usus udang windu setelah ujiantang perlakuan terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Total bakteri *Vibrio harveyi* pada udang windu setelah ujiantang

Perlakuan	Total Bakteri ($\times 10^3$ CFU/mL) \pm SD
A	2,7 \pm 1,34 ^a
B	1,9 \pm 1,16 ^a
C	1,5 \pm 1,27 ^a
D	1,2 \pm 0,27 ^a

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa masing-masing antar perlakuan yang diberikan pada udang windu tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) pada Total Bakteri *Vibrio harveyi*.

Peran probiotik membantu proses perombakan nutrisi yang terjadi didalam usus pencernaan sehingga mudah diserap oleh udang. Probiotik yang berisikan bakteri baik berkerja melalui mekanisme perombakan senyawa kompleks menjadi lebih sederhana (Husin, 2017). Bakteri probiotik menghasilkan enzim yang dapat mengurai senyawa kompleks menjadi lebih sederhana, dengan cara menghidrolisis nutrient pada pakan (Arief et al., 2014).

Selain probiotik, peran prebiotik juga mampu meningkatkan populasi bakteri di dalam usus udang windu ditunjukkan dengan total bakteri di usus. Total bakteri di dalam usus udang windu mengalami peningkatan selama pemeliharaan dengan perlakuan probiotik *Bacillus* dan prebiotik singkong dan ubi jalar ungu. Peningkatan total bakteri di dalam usus udang windu dengan penambahan prebiotik pada pakan diduga dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan udang windu, sehingga populasi bakteri di usus udang windu pada perlakuan pemberian bakteri dengan penambahan prebiotik lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan yang tidak diberikan prebiotik.

Keberhasilan probiotik yang ditambahkan prebiotik dari jenis umbi-umbian yakni singkong dan ubi jalar ungu juga mampu merangsang pertumbuhan bakteri di dalam saluran pencernaan udang windu. Prebiotik dari umbi-umbian yang mengandung serat yang tinggi sehingga berpotensi sebagai prebiotik yang jika diberikan bisa langsung dimanfaatkan oleh bakteri yang ada dalam saluran pencernaan udang, sehingga membuat pencernaan udang windu menjadi efektif dan meningkatkan daya tahan tubuh udang windu. Serat pangan larut seperti oligosakarida secara selektif juga digunakan sebagai substrat pertumbuhan mikroba bermanfaat dalam kolon (Bouhnik dkk.,1999) atau biasa disebut sebagai prebiotik. Dari hasil analisis proksimat ubi jalar ungu dan singkong menghasilkan nilai kadar serat yang berbeda. Singkong memiliki nilai kadar serat lebih tinggi yakni 3,06% dibandingkan ubi jalar ungu 2,49%. Kadar serat kasar yang tinggi ini berfungsi sebagai prebiotik yang akan menjadi makanan bagi probiotik untuk kelangsungan hidupnya di saluran pencernaan (Almatsier, 2007) di saluran pencernaan dengan cara menstimulasi sel-sel usus yang sehat, menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri patogen serta menstimulasi respon sistem daya tahan tubuh (Roberfroid, 2000). Beberapa hasil penelitian terkait dengan penggunaan probiotik dan prebiotik yakni hasil penelitian oleh Zokaeifar *et al.*, (2012) bahwa pemberian probiotik *Bacillus subtilis* mampu meningkatkan enzim pencernaan udang vaname, pemberian sinbiotik (kombinasi probiotik *Enterococcus faecium* dan prebiotik fruktooligosakarida) mampu meningkatkan aktivitas enzim pencernaan juvenil ikan mas (Dehaghani *et al.*,2015).

Prebiotik singkong mampu berperan memberikan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri baik di dalam usus sehingga pakan dapat dimanfaatkan dengan baik untuk pertumbuhan. Menurut Song *et al.*, (2014), prebiotik dapat berinteraksi secara langsung dengan reseptor spesifik pada system imun bawaan udang yang disebut *pattern-recognition receptors* (PRR). Hasil ini sejalan dengan berbagai jenis dari genus *Bacillus* yang sudah pernah diuji coba untuk menunjang pertumbuhan dan sintasan ikan, diantaranya *B. subtilis* (Efendi & Yusra 2014; Dhanalakshmi *et al.*, 2015, *B. pumilis* (Rajikkannu *et al.*, 2015).

Pemberian bakteri probiotik tanpa prebiotik dari umbi-umbian mempunyai nilai yang lebih rendah dibandingkan bakteri yang ditambahkan prebiotik karena jumlah bakteri tidak bisa mempertahankan populasi menguntungkan didalam usus yang seharusnya banyak menjadi berkurang dan bakteri yang merugikan jumlahnya meningkat sehingga system imun menurun dan terjadi kematian pada udang windu. Hasil penelitian sebelumnya Ridlo dan Subagiyo (2013) yang juga terkait dengan penggunaan probiotik dan penambahan prebiotik Fruktooligosakarida (FOS) dengan dosis yang tepat mampu meningkatkan pertumbuhan menjadi lebih maksimal.

Hasil total bakteri *Vibrio harveyi* pada udang windu mengalami penurunan pada perlakuan pemberian probiotik dengan penambahan prebiotik singkong dan ubi jalar ungu. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik efektif untuk menekan bakteri pathogen di dalam saluran pencernaan udang windu. Bakteri *Vibrio harveyi* dapat menjadi penyebab penyakit yang utama namun sering kali juga bertindak sebagai agen oportunistik pada infeksi sekunder. Bakteri *Vibrio* sebagai penyebab penyakit yang utama dan pertama (Reynaud *et al.*, 2008; Kadriah, 2012). Selain itu, penambahan prebiotik ternyata mampu menekan pertumbuhan pathogen karena bakteri yang secara alami ada dalam tubuh udang windu mampu memanfaatkan prebiotik yang diberikan untuk mendukung pertumbuhannya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian probiotik *Bacillus subtilis* dengan penambahan prebiotik singkong 20% dapat meningkatkan bakteri dalam usus udang windu dan menekan bakteri *vibrio harveyi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriyanto, S., N. Listyanto dan R. Rahmawati. 2010. Pengaruh pemberian probiotik dengan dosis yang berbeda terhadap sintasan dan pertumbuhan benih patin jambal (*Pangasius djambal*). Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur. 117-122.
- Arief, M., N. Fitriani dan S. Subekti. 2014. Pengaruh pemberian probiotik berbeda terhadap pertumbuhan dan efisiensi pakan ikan lele sangkuriang (*Clarias sp.*). Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 6 (1): 49-53.
- Arsad, S., A. Afandy., A. P. Purwadhi., B. Maya, V., D. K. Saputra., N. R. Buwono. 2017 Studi Kegiatan Budidaya Pembesaran Vanname (*L. Vannamei*) Dengan Penerapan Sistem Pemeliharaan Berbeda. Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan. Vol 9. No.1.
- Azhar, F. dan Wirasisya, D. G. 2019. Pelatihan Penanganan *Streptococcus* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Menggunakan Pakan Fermentasi Di Desa Gontoran Lingsar. Jurnal Abdi Insani, Vol 2, No 2, hh 229-240.
- Bekele A., Bekele E., 2018 Proximate and mineral composition variability in Ehtiopian yam (*Dioscorea spp.*). Journal of Food and Nutrition Sciences 6(1):12-17.
- Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Fluorie, B., Bornet, F., dan Rambaud, J. C. 1999. Short Chain- Fructooligosaccharida Administration Dose Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Human. J. Nurt. 129: 133-166.
- Dhanalakshmi G. Reniprabha A. & Chandarakala A. 2015. Studies on the effect of commercial probiotic application in the growth of the fish, *Cyprinus carpio*. International Journal of Advanced Research, 3(8): 708-712.
- Dehaghani PG, Baboli MJ, Moghadam AT, Ziaei-Nejad S, Pourfarhadi M. 2015. Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Czech Journal of Animal Science, 60 (5): 224-232.
- Husin, M. I., Suminto dan A. Sudaryono. 2017. Pengaruh penambahan vitamin c dan probiotik pada pakan terhadap efisiensi pemanfaatan pakan, pertumbuhan, dan kelulushidupan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*). Jurnal Sains Teknologi Akuakultur. 1 (2): 79-87.
- Efendi Y. & Yusra. 2014. *Bacillus subtilis* strain VITNJ1 potential probiotic bacteria in the gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) are cultured in floating net, Maninjau Lake, West Sumatra. Pakistan Journal of Nutrition, 13(12): 710-715.
- Marlis A. 2008. Isolasi oligosakarida ubi jalar (*Ipomoea batatas L*) dan pengaruh pengolahan terhadap potensi prebiotiknya [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Praditia, F. P. 2009. Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik Melalui Pakan Terhadap Pertumbuhan Dan Kelangsungan Hidup Udang Windu (*Penaeus Monodon*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 52 hlm
- Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Deepublish.
- Rajikkannu M., Natarajan N., Santhanam P., Deivasigamani B., Ilamathi J. & Janani S. 2015. Effect of probiotics on the haematological parameters of Indian major carp (*Labeorohita*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(5): 105-109.
- Reynaud Y, Saulnier D, Mazel D, Goarant C, Le Roux F. 2008. Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3.038–3.047.
- Ringo, E., and S. K. Song. 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition* 22:4–24.
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotic: preferential substrat for specific germs. *Am. J. Clin. Nurt.* 73(2); 406S-409S.
- Widowati dan Wargiono. 2016. Nilai Gizi dan sifat fungsional ubi kayu.
- Winarno, F. G dan I. E. Fernandez. 2007. Susu dan Produk Fermentasi. Bogor: M-Brio Press.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4):683-689.