

Aplikasi Probiotik *Bacillus* NP5 bentuk Segar dan Mikrokapsul untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophilla* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Application of the Fresh Culture and Microencapsulated of Bacillus NP5 Probiotic to Prevent Aeromonas hydrophilla infection on Common Carp (Cyprinus carpio)

¹Widanarni, ²Alit Brilliant, ³Sukenda

¹Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor

²Program Studi Teknologi dan Manajemen Perikanan Budidaya, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Jawa Barat
widanarni@yahoo.com

Diterima/disetujui : 19 Nopember 2014/ 26 Nopember 2014

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effectiveness of fresh culture product and microencapsulated Bacillus NP5 for the growth performance and immune response of common carp infected by Aeromonas hydrophilla. The 5.09 ± 0.01 g common carps were reared in aquarium and fed 3 times a day for 30 days. The dose of probiotic added to feed was 1%. The treatments in this study were positive and negative control (K+ and K-; without probiotic addition), the addition of fresh cultured probiotic (A), and the addition of microencapsulated probiotic (B). Each treatment was repeated in 3 replications. On day 31, the fish of K+, A, and B were injected by 0.1 mL (10⁷cfu/mL) A. hydrophilla. While the fish of K- were injected by phosphate buffer saline (PBS). The post-infection observation was carried out for 14 days. Treatment B showed the better results which were 96% of survival rate, 2.66% of daily growth rate, 1.65 of feed conversion ratio, total bacteria in the intestine and immune response which were better than control.

Keywords: *Bacillus NP5, fresh culture, microencapsulated, Aeromonas hydrophilla, common carp*

PENDAHULUAN

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu komoditas unggulan sektor perikanan budidaya di Indonesia. Namun dalam perkembangannya, produksi ikan mas di Indonesia mengalami penurunan yang disebabkan oleh menurunnya kualitas lingkungan budidaya dan meningkatnya serangan penyakit. Serangan penyakit ini dapat disebabkan oleh infeksi bakteri, parasit, jamur dan virus. Salah satu penyakit yang sering menyerang ikan mas yaitu *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Ikan yang terserang *A. hydrophilla* biasanya mengalami tukak di tubuhnya yang bersifat akut dan dapat menyebabkan kematian 80-90% (Cipriano 2001).

Salah satu upaya yang biasa dilakukan untuk pengobatan ikan yang terserang penyakit yaitu dengan penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik dapat menimbulkan dampak negatif seperti bakteri yang menjadi resisten terhadap antibiotik yang diberikan dan transmisi bakteri resisten dari lingkungan akuakultur apabila dikonsumsi manusia (Lewis 2001), sehingga perlu dilakukan upaya alternatif yang aman untuk menanggulangi penyakit tersebut.

Upaya yang akhir-akhir ini banyak dilakukan untuk pencegahan penyakit adalah dengan aplikasi probiotik karena dianggap lebih aman dan ramah lingkungan. Lazado dan Caipang (2014) menyatakan bahwa probiotik adalah mikroba hidup atau mati, atau bahkan komponen bakteri yang bertindak atas model aksi yang berbeda dalam memberikan efek menguntungkan langsung kepada inang atau lingkungan. Selain itu probiotik juga relatif aman digunakan karena tidak menyebabkan resistensi patogen seperti antibiotik (Guo 2009).

Salah satu bakteri probiotik yang telah diuji mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan ikan nila yaitu bakteri *Bacillus* NP5 (Putra 2010). *Bacillus* NP5 juga terbukti mampu meningkatkan respon imun ikan nila terhadap infeksi *Streptococcus agalactiae* (Tanbiyaskur 2011). Aplikasi probiotik dalam bentuk segar masih memiliki kelemahan seperti proses penyiapan yang relatif rumit dan batas waktu penyimpanan yang relatif singkat serta memungkinkan adanya kerusakan oleh enzim dalam saluran pencernaan. Dengan adanya kekurangan tersebut penggunaan teknik mikroenkapsulasi probiotik diharapkan mampu mengatasi permasalahan tersebut.

Mikroenkapsulasi probiotik merupakan proses penjeratan zat-zat sensitif atau bahan inti (bakteri probiotik) oleh polimer pelindung sebagai agen pengkapsulasi dengan hasil berbentuk serbuk. Probiotik disalut lapisan tipis atau bahan penyalut (kriogenik) dengan metode tertentu yang diharapkan mampu meningkatkan masa simpan dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih mudah dalam penggunaan, penanganan, dan pengemasan. Salah satu teknik yang digunakan yaitu teknik *spray drying* (semprot kering) yang cukup luas digunakan dalam menyalut bakteri probiotik. Mikroenkapsulasi bermanfaat untuk mempertahankan viabilitas dan melindungi bakteri probiotik dari kerusakan akibat kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan seperti suhu dan pH (Kailasapathy 2002). Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas pemberian probiotik *Bacillus* NP5 bentuk segar dan mikrokapsul terhadap kinerja pertumbuhan dan respons imun ikan mas yang diinfeksi *A. hydrophilla*.

BAHAN DAN METODE

Kultur bakteri probiotik *Bacillus* NP5

Bakteri probiotik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Bacillus* NP5 yang diberi penanda resisten antibiotik rifampisin (*Bacillus* Rf^R). *Bacillus* Rf^R dikultur pada media *Trypticase Soy Broth* (TSB) 50 ml secara aseptik, kemudian diinkubasi pada *waterbath-shaker* selama 24 jam pada suhu 29 °C dengan kecepatan 140 rpm. Suspensi *Bacillus* Rf^R dari volume 50 ml, kemudian dikultur pada media TSB 500 ml dengan perbandingan volume yang digunakan 1:10 dan diinkubasi selama 18 jam (Putra 2010). Selanjutnya kultur probiotik dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit sehingga diperoleh biomassa probiotik segar.

Mikroenkapsulasi Probiotik

Pembuatan mikrokapsul probiotik dilakukan berdasarkan metode Capela *et al.* (2006). Biomassa probiotik segar *Bacillus* NP5 diresuspensikan ke dalam larutan maltodekstrin 10% steril dengan perbandingan 1:1 dari volume medium yang digunakan pada produksi biomassa probiotik. Campuran dihomogenisasi, kemudian dikeringkan dengan alat BUCHI mini *spray dryer* pada suhu inlet 120-130°C dan suhu outlet 60°C.

Persiapan wadah, media pemeliharaan, dan hewan uji

Wadah yang digunakan akuarium kaca berdimensi 60 cm x 40 cm x 40 cm. Media pemeliharaan ikan mas menggunakan air tawar yang sebelumnya telah didesinfeksi dengan larutan klorin 30 ppm, diaerasi kuat selama 24 jam dan kemudian dinetralkan dengan larutan Na-thiosulfat 10 mg/L untuk menghilangkan residu klorin. Setiap akuarium diisi dengan air sebanyak 96 L.

Ikan mas yang digunakan berasal dari petani ikan di daerah Cihideung, Bogor. Sebelum perlakuan ikan mas diadaptasikan terlebih dahulu selama 2 minggu dan diberi pakan komersil sebanyak 3 kali dalam sehari pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00 WIB.

Persiapan pakan uji

Pakan yang digunakan yaitu pellet komersil dengan kadar protein 30%. Persiapan pakan uji dilakukan dengan cara menambahkan masing-masing 1% kultur segar probiotik dan 1% mikrokapsul probiotik serta masing-masing 2% putih telur sebagai *binder* ke pakan. Selanjutnya pakan diaduk hingga merata dan dikeringanginkan selama 15 menit.

Percobaan probiotik pada ikan mas

Percobaan ini terdiri dari 4 perlakuan dengan tiga ulangan yaitu: K- (pakan tanpa probiotik dan tanpa ujiantang), K+ (pakan tanpa probiotik dan diujiantang), A (pakan dengan probiotik segar dan diujiantang), dan B (pakan dengan probiotik mikrokapsul dan diujiantang). Ikan mas dengan bobot rata-rata 5,09±0,01 g sebanyak 15 ekor per akuarium dipelihara selama 30 hari. Frekuensi pemberian pakan 3 kali sehari dengan metode *ad satiation* pada pukul

08.00, 12.00, dan 16.00 WIB. Kualitas air dijaga dengan dilakukan penyiponan dan penggantian air setiap dua hari sekali sebanyak 50-60% dari total volume akuarium

Uji tantang

Bakteri patogen yang digunakan dalam uji tantang yaitu *A. hydrophila*. Satu hari setelah akhir perlakuan probiotik (hari ke-31), sebanyak 10 ekor ikan dari setiap ulangan diinjeksi *A. hydrophila* 10^7 cfu/ml sebanyak 0,1 ml secara *intraperitoneal*, kecuali K- yang diinjeksi dengan PBS. Pengamatan terhadap ikan yang mati dilakukan setiap hari selama 14 hari.

Analisis data

Sintasan

Penghitungan jumlah ikan yang hidup dilakukan pada akhir perlakuan probiotik dan akhir uji tantang. Sintasan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Effendi 1997):

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : Sintasan (%)

N_t : Jumlah ikan pada akhir pemeliharaan (ekor)

N_o : Jumlah ikan pada awal pemeliharaan (ekor)

Laju Pertumbuhan Harian

Laju pertumbuhan harian dihitung dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Huissman (1987):

$$\alpha = \left[\sqrt[t]{\frac{W_t}{W_o}} - 1 \right] \times 100\%$$

Keterangan:

α : Laju pertumbuhan harian (%)

W_t : Bobot rata-rata ikan pada akhir pemeliharaan (g)

W_o : Bobot rata-rata ikan pada awal pemeliharaan (g)

t : Periode pemeliharaan

Konversi pakan

Konversi pakan selama pemeliharaan dihitung menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Goddard (1996):

$$FCR = \frac{F}{B_t + B_m - B_o}$$

Keterangan:

FCR : Konversi pakan

F : Jumlah pakan (g)

B_t : Biomassa ikan pada akhir pemeliharaan (g)

Bm : Biomassa ikan yang mati selama pemeliharaan (g)

Bo : Biomassa ikan pada awal pemeliharaan (g)

Total Bakteri dan *Bacillus* Rf^R di Usus

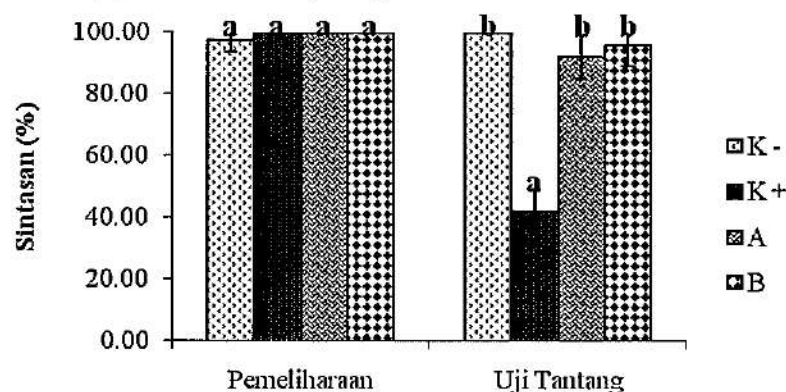
Penghitungan total bakteri dan *Bacillus* NP5 Rf^R diusus dilakukan dengan metode hitungan cawan sebar (Madigan *et al.* 2003). Penghitungan bakteri dilakukan pada awal dan akhir pemeliharaan. Usus ikan sebanyak 0.1 g digerus dan dihomogenisasi dalam 0.9 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) steril. Setelah itu dilakukan pengenceran berseri kemudian sebanyak 0.05 ml campuran diambil dan disebar merata pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA). Media yang digunakan yaitu TSA untuk total bakteri dan TSA + rifampisin 50 µg/ml untuk total bakteri *Bacillus* NP5 Rf^R.

Respons imun

Respons imun ikan mas diamati melalui parameter gambaran darah, yang meliputi total eritrosit, leukosit, hematokrit, differensial leukosit, dan aktivitas fagositik. Respons imun ikan diamati pada akhir perlakuan probiotik dan akhir ujiantang. Darah ikan diambil dengan menggunakan syringe melalui pembuluh *vena caudal*. Pengukuran kadar hematokrit dan aktivitas fagositik dilakukan berdasarkan metode Anderson dan Siwicki (1993). Jumlah eritrosit dan leukosit dihitung berdasarkan metode Blaxhall dan Daisley (1973). Differensial leukosit dihitung berdasarkan metode Amlacher (1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintasan ikan mas setelah 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik berkisar antara 98-100% dan tidak berbeda nyata ($P>0.05$) antar perlakuan (Gambar 1). Setelah diuji tantang dengan *A. hydrophila*, sintasan ikan mas pada perlakuan A (92%) dan perlakuan B (96%), yang berbeda nyata ($P<0.05$) terhadap perlakuan K+ (42%).



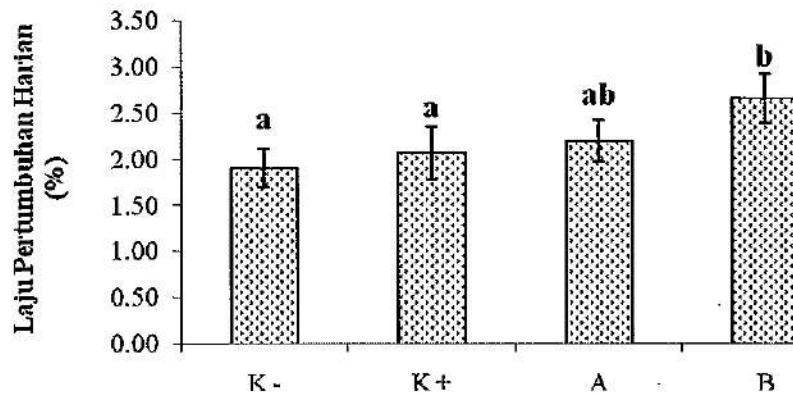
* Huruf *superscript* yang berbeda pada grafik yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)

** K+ (kontrol positif). K- (kontrol negatif). A (probiotik segar). B (probiotik mikrokapsul).

Gambar 1 Sintasan ikan mas setelah 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik dan setelah uji tantang dengan *A. hydrophila*

Laju Pertumbuhan Harian

Laju pertumbuhan harian (LPH) selama 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik berkisar antara 1.91-2.66% (Gambar 2). LPH tertinggi terdapat pada perlakuan B (2.66 %), tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan A (2.20%), namun berbeda nyata ($P<0.05$) terhadap K- (1.91%) dan K+ (2.07%).



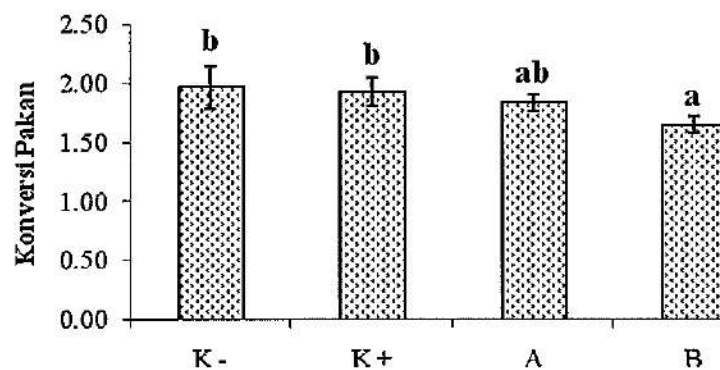
* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)

** K+ (kontrol positif). K- (kontrol negatif). A (probiotik segar). B (probiotik mikrokapsul).

Gambar 2 Laju pertumbuhan harian ikan mas selama 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik

Konversi Pakan

Konversi pakan ikan mas selama 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik berkisar antara 1,65-1,97 (Gambar 3). Konversi pakan terendah terdapat pada perlakuan B (1.65%), tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan A (1.84%), namun berbeda nyata ($P<0.05$) terhadap K- (1.97) dan K+ (1.93).



* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)

** K+ (kontrol positif). K- (kontrol negatif). A (probiotik segar). B (probiotik mikrokapsul).

Gambar 3 Konversi pakan ikan mas selama 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik

Total Bakteri dan *Bacillus* NP5 Rf^R di Usus

Total bakteri dan total probiotik *Bacillus* NP5 Rf^R di usus sebelum dan setelah pemeliharaan dengan perlakuan probiotik disajikan pada Tabel 1. Total bakteri pada perlakuan A dan B lebih tinggi (3.00×10^{12} cfu.g⁻¹ dan 2.86×10^{12} cfu.g⁻¹) dibanding kontrol yang berada pada kisaran $5.02 \times 10^7 - 2.42 \times 10^8$ cfu.g⁻¹. Sementara total *Bacillus* NP5 Rf^R hanya ditemukan pada perlakuan A dan B dengan jumlah masing-masing 1.40×10^{10} cfu.g⁻¹ dan 1.34×10^{12} cfu.g⁻¹.

Tabel 1 Total bakteri dan *Bacillus* NP5 Rf^R di usus

Perlakuan	Total Bakteri sebelum Perlakuan (cfu.g ⁻¹)	Total Bakteri setelah Perlakuan (cfu.g ⁻¹)	Total <i>Bacillus</i> NP5 Rf ^R setelah perlakuan (cfu.g ⁻¹)
K-	3.13×10^7	2.42×10^8	0
K+	3.13×10^7	5.02×10^7	0
A	3.13×10^7	3.00×10^{12}	1.40×10^{10}
B	3.13×10^7	2.86×10^{12}	1.34×10^{12}

* K+ (kontrol positif). K- (kontrol negatif). A (probiotik segar). B (probiotik mikrokapsul).

Respons imun

Respons imun ikan mas setelah 30 hari pemeliharaan dengan perlakuan probiotik dan pasca ujiantang ditunjukkan melalui parameter gambaran darah (Tabel 2). Total eritrosit dan leukosit ikan mas setelah 30 hari perlakuan probiotik tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) antar perlakuan. Pada akhir ujiantang, total eritrosit pada semua perlakuan mengalami penurunan dengan nilai terendah pada perlakuan K+ (1.16×10^6 sel mm⁻³) serta berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap semua perlakuan. Total leukosit tertinggi setelah ujiantang terdapat pada perlakuan A (8.07×10^6 sel mm⁻³), diikuti perlakuan B (7.93×10^6 sel mm⁻³) dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan K+. Hematokrit ikan mas pada perlakuan A, B, dan K+ lebih tinggi ($P < 0.05$) dibanding perlakuan K-. Setelah ujiantang, persentase hematokrit pada perlakuan A dan B lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan K+. Differensial leukosit ikan mas yang diamati meliputi sel monosit, neutrofil dan limfosit. Persentase sel monosit ikan mas setelah perlakuan probiotik menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) pada semua perlakuan. Setelah ujiantang, monosit tertinggi terdapat pada perlakuan K+ dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan A dan B.

Jumlah neutrofil pada perlakuan A dan B selama pemeliharaan dan pasca ujiantang lebih rendah dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan K+. Jumlah limfosit tertinggi setelah perlakuan probiotik terdapat pada perlakuan B, sedangkan setelah ujiantang, jumlah limfosit pada perlakuan A dan B lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan K+. Aktivitas fagositik pada perlakuan A dan B selama pemeliharaan dan setelah ujiantang lebih tinggi dan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan K+, dan K-

Tabel 2 Respon imun ikan mas setelah 30 hari perlakuan probiotik dan pasca uji tantang dengan *A. hydrophila*

Parameter	Waktu	Perlakuan			
		K-	K+	A	B
Total eritrosit (10^6 sel mm^{-3})	Pemeliharaan	1.42 ± 0.03 ^a	1.43 ± 0.12 ^a	1.56 ± 0.11 ^a	1.54 ± 0.11 ^a
	Uji Tantang	1.30 ± 0.04 ^b	1.16 ± 0.02 ^a	1.27 ± 0.07 ^b	1.27 ± 0.06 ^b
Total leukosit (10^6 sel mm^{-3})	Pemeliharaan	3.07 ± 0.55 ^a	3.10 ± 0.36 ^a	3.67 ± 0.40 ^a	3.87 ± 0.60 ^a
	Uji Tantang	4.13 ± 0.35 ^a	5.57 ± 0.49 ^b	7.93 ± 0.15 ^c	8.07 ± 0.15 ^c
Hematokrit (%)	Pemeliharaan	30.43 ± 0.56 ^a	32.09 ± 0.41 ^b	31.81 ± 0.23 ^b	32.40 ± 0.53 ^b
	Uji Tantang	30.80 ± 0.53 ^c	25.21 ± 0.37 ^a	27.90 ± 0.30 ^b	27.46 ± 0.56 ^b
Monosit (%)	Pemeliharaan	1.67 ± 0.58 ^a	1.67 ± 0.58 ^a	2.67 ± 0.58 ^a	2.67 ± 0.58 ^a
	Uji Tantang	2.00 ± 0.00 ^a	4.00 ± 1.00 ^b	1.67 ± 0.58 ^a	1.33 ± 0.58 ^a
Neutrofil (%)	Pemeliharaan	8.00 ± 1.00 ^b	7.67 ± 1.15 ^b	5.67 ± 0.58 ^a	5.00 ± 1.00 ^a
	Uji Tantang	3.33 ± 0.58 ^a	10.00 ± 1.00 ^c	2.33 ± 0.58 ^a	2.67 ± 0.58 ^a
Limfosit (%)	Pemeliharaan	90.33 ± 0.58 ^a	90.67 ± 0.58 ^{ab}	91.67 ± 0.58 ^{ab}	92.33 ± 1.53 ^c
	Uji Tantang	94.67 ± 0.58 ^b	86.00 ± 0.00 ^a	96.00 ± 1.00 ^c	96.00 ± 0.00 ^c
Aktivitas fagositik (%)	Pemeliharaan	20.74 ± 1.28 ^a	20.74 ± 1.28 ^a	34.72 ± 2.41 ^b	34.72 ± 2.41 ^b
	Uji Tantang	22.22 ± 0.00 ^a	40.39 ± 0.68 ^b	56.09 ± 0.91 ^c	55.75 ± 1.31 ^c

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan ikan mas selama pemeliharaan sangat tinggi (98-100%) dan tidak berbeda antar perlakuan. Setelah uji tantang dengan *A. hydrophila*, sintasan ikan mas yang diberi probiotik, baik dalam bentuk segar maupun mikrokapsul, lebih tinggi dibanding K+. Hal ini diduga bahwa, pemberian probiotik dapat meningkatkan ketahanan ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*. Menurut Gupta *et al.* (2014), bakteri probiotik dapat digunakan sebagai alternatif penggunaan antibiotik dan bahan kimia, dan berfungsi sebagai molekul penginduksi (*alarm molecule*) untuk mengaktifkan sistem kekebalan tubuh. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa sintasan ikan nila yang diberi probiotik *Bacillus* NP5 dan diinfeksi *Streptococcus agalactiae* mencapai 80.56% sedangkan pada kontrol positif hanya 13.89% (Tanbiyaskur 2011). Hal yang sama juga ditemukan pada penelitian Talpur *et al.* (2014) dimana pemberian probiotik *L. acidophilus*, ragi, dan β -glukan secara signifikan memberikan pengaruh positif terhadap sintasan ikan mas setelah uji tantang dengan *A. hydrophila*. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan sintasan ikan mas (Gupta *et al.* 2014), ikan nila, ikan kerapu *Epinephelus bruneus* (Harikrishnan 2010), dan rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Sharifuzzaman 2010).

Pemberian probiotik *Bacillus* NP5 dalam bentuk mikrokapsul menghasilkan laju pertumbuhan dan rasio konversi yang lebih baik dibanding kontrol. Hal ini diduga karena dengan pemberian probiotik tersebut, keberadaan bakteri dalam saluran pencernaan berada pada jumlah dan komposisi yang menguntungkan bagi ikan tersebut. Keberadaan bakteri probiotik dalam saluran pencernaan memberikan efek menguntungkan bagi inang karena bakteri probiotik dapat mensekresikan enzim *exogenous* seperti amilase, lipase, dan protease pada saluran pencernaan ikan. Hasil penelitian Putra (2010) menunjukkan bahwa *Bacillus* NP5 dapat menghasilkan enzim amilase yang dapat meningkatkan aktivitas enzim pencernaan dan pencernaan karbohidrat dari pakan yang diberikan, sehingga protein pada pakan lebih banyak dimanfaatkan untuk

pertumbuhan. Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian Gupta (2014) yang menunjukkan bahwa pemberian probiotik *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformes* dan *Paenibacillus polymyxa* memberikan pengaruh yang signifikan dalam meningkatkan laju pertumbuhan dan menurunkan nilai konversi pakan ikan mas. Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian probiotik telah teruji dapat memberikan pengaruh yang signifikan dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan pada ikan mas (Talpur *et al.* 2014), udang galah *Macrobrachium rosenbergii* (Dash *et al.* 2014), ikan lele dumbo *Clarias gariepinus* (Al-dohail *et al.* 2009), dan ikan *Labeo rohita* (Giri *et al.* 2013).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah perlakuan probiotik, terjadi peningkatan total bakteri pada perlakuan probiotik. Menurut Sanjayasari *et al.* (2010), total bakteri pada usus ikan mas berkisar antara $1.81 - 2.14 \times 10^8$ cfu.g⁻¹. Total bakteri pada perlakuan kontrol berada pada kisaran tersebut, sedangkan pada perlakuan probiotik mencapai $2.86 - 3.00 \times 10^{12}$ cfu.g⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* NP5 yang ditambahkan dapat tumbuh dan berkolonisasi di dalam saluran pencernaan sehingga meningkatkan jumlah bakteri di usus ikan perlakuan probiotik. Jumlah *Bacillus* NP5 di usus pada perlakuan probiotik segar dan mikrokapsul masing-masing mencapai 1.40×10^{10} dan 1.34×10^{10} cfu.g⁻¹. Hasil penelitian Son *et al.* (2009) menunjukkan bahwa penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* dapat meningkatkan populasi bakteri dalam usus ikan *grouper* (*Epinephelus coioides*). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan populasi bakteri di saluran pencernaan larva udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Nimrat *et al.* 2011) dan udang windu (*Penaeus monodon*) (Boonthai 2011). Total *Bacillus* NP5 pada perlakuan probiotik mikrokapsul lebih tinggi dibanding perlakuan probiotik segar diduga karena viabilitas bakteri pada perlakuan probiotik mikrokapsul lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Frazier dan Westhoff (1998) yang menyatakan bahwa enkapsulasi merupakan teknik penyalutan suatu bahan sehingga bahan yang disalut dapat dilindungi dari kerusakan oleh pengaruh lingkungan.

Efektivitas pemberian probiotik dalam meningkatkan respon imun ikan dapat diamati berdasarkan parameter gambaran darah (hematologi). Parameter hematologi sudah banyak digunakan pada berbagai spesies ikan untuk menjelaskan kondisi normal dan kelainan yang mengindikasikan adanya masalah dalam proses fisiologi ikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total leukosit, eritrosit, persentase hematokrit, monosit, dan limfosit serta aktivitas fagositik pada perlakuan probiotik lebih baik dibanding kontrol. Hal ini diduga karena adanya efek imunostimulan dan sifat anti-infeksi dari probiotik yang diberikan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan pemberian probiotik *L. acidophilus* dapat meningkatkan total leukosit dan eritrosit pada ikan *African catfish* (Al-Dohail *et al.* 2009) serta hematokrit pada ikan *rainbow trout* yang diberi probiotik *Lactobacillus rhamnosus* (Panigrahi *et al.* 2010)

Leukosit berfungsi sebagai garis pertahanan pertama tubuh ikan dan dapat meningkat dengan cepat ketika terjadi infeksi (Talpur *et al.* 2014). Setelah ujiantang terjadi peningkatan total leukosit yang signifikan pada perlakuan probiotik. Hal ini menunjukkan pemberian probiotik dapat meningkatkan total leukosit yang merupakan indikator sistem pertahanan tubuh non-spesifik.

Peningkatan leukosit pada ikan yang terinfeksi dapat berfungsi sebagai perlindungan terhadap infeksi patogen (Talpur dan Ikhwanuddin 2013). Hasil ini sejalan dengan penelitian Talpur *et al.* (2014) dimana total leukosit ikan mas yang diberi probiotik *L. acidophilus* meningkat signifikan setelah 2 minggu di uji tantang dengan *A. hydrophila*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa total eritrosit dan hematokrit pada semua perlakuan mengalami penurunan setelah ikan diuji tantang dengan *A. hydrophilla*, namun jumlah eritrosit dan hematokrit pada perlakuan probiotik lebih tinggi dibanding kontrol positif. Hal ini diduga karena adanya peningkatan aktivitas leukositosis atau eritroblastosis sebagai akibat dari infeksi patogen bakteri *A. hydrophilla*. Menurut Talpur dan Ikhwanuddin (2013), penurunan hematokrit merupakan indikasi ikan terkena anemia akibat ikan berhenti makan karena stress atau sakit. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Talpur *et al.* (2014) yang menunjukkan bahwa total eritrosit dan hematokrit ikan mas yang diberi probiotik, setelah uji tantang dengan *A. hydrophila* menunjukkan hasil yang signifikan lebih tinggi dibanding kontrol.

Setelah uji tantang, pada perlakuan kontrol positif terjadi peningkatan neutrofil dan monosit, serta penurunan limfosit yang signifikan dibanding perlakuan probiotik. Hal ini menunjukkan bahwa ikan dalam kondisi sakit. Peningkatan konsentrasi neutrofil ini sesuai dengan fungsinya untuk melawan penyakit yang disebabkan oleh infeksi organisme mikroseluler seperti bakteri dan virus (Chinabut *et al.* 1991). Adanya infeksi *A. hydrophila* mengakibatkan produksi monosit meningkat untuk membunuh bakteri patogen tersebut. Menurut Angka (2004), meningkatnya monosit terjadi karena adanya radang dan monosit berfungsi sebagai makrofag untuk fagositosis.

Aktivitas fagositik berperan dalam aktivasi awal dalam merespon peradangan sebelum produksi antibodi dan berperan penting dalam pertahanan antibakterial (Nayak 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas fagositik pada perlakuan probiotik lebih tinggi dibanding kontrol, baik setelah perlakuan probiotik maupun pasca uji tantang. Hal ini diduga bahwa pemberian probiotik melalui pakan dapat meningkatkan kinerja leukosit dalam memfagosit antigen yang masuk. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Harikrisnan *et al.* (2010) bahwa aktivitas fagositik *kelp grouper* (*Epinephelus bruneus*) yang diberi probiotik *L. sakei* BK 19 menunjukkan hasil yang signifikan lebih tinggi dibanding kontrol setelah 2 minggu diuji tantang dengan *S. iniae*. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian Talpur *et al.* (2014) yang menunjukkan bahwa aktivitas fagositik ikan mas yang diberi probiotik meningkat setelah uji tantang dengan *A. hydrophila*.

SIMPULAN

Penambahan bakteri probiotik *Bacillus* NP5 melalui pakan dapat memperbaiki respon imun dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan mas yang diinfeksi *A. hydrophilla*. Hasil terbaik diperoleh pada pemberian *Bacillus* NP5 dalam bentuk mikrokapsul dengan sintasan 96%, laju pertumbuhan harian 2.66%, dan rasio konversi pakan 1.65.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Dohail MA, Hashim R, Aliyu-Paiko M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 fingerling. *Aquac. Res* 40: 1642–1652.
- Anderson, D.P. and Siwicki A.K. 1993. Basic haematology and serologi for fish health program. Paper Presented In Second Symposium on Disease in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and The Environment" Phuket, Thailand. 25-29th October 1993.
- Angka SL, Priyosoeryanto BP, Lay BW, Haris E. 2004. *Penyakit motile aeromonad septicemia pada ikan lele dumbo*. Forum Pascasarjana. 27:339-350.
- Amlacher, E. 1970. Textbook of fish disease. DA Conroy, RL Herman (Penerjemah). New York: TFH Publ. Neptune. 302 pages.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biology* 5:577-581.
- Boonthai T, Vuthiphandchai V, Nimrat S. 2011. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of Black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00865.
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. *Food Research International* 39: 203–211.
- Chinabut S, Limsuwan C, dan Sawat PK. 1991. Histology of the walking catfish *Clarias batrachus*. Thailand: Department of Fisheries. 96 hlm
- Cipriano RG. 2001. *Aeromonas hydrophilla and motile aeromonad septicemia of Fish*. *Fish Disease leaflet of the US fish and wildlife service*. US: Departemen of the Interior. 68:1-24
- Dash G, Raman RP, Prasad KP, Makesh M, Sen S. 2014. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture* 432: 225-236.
- Effendie MI. 1997. *Metode Biologi Perikanan*. Bogor (ID). Yayasan Dewi Sri Bogor.
- Frazier WC, and Westhoff DC. 1998. *Food Microbiology*. 4th ed. New York: Mc Graw Hill Inc.
- Giri SS, Sukumaran V, Oviya M. 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 660-666.
- Goddard S. 1996. *Feed Management in Intensive Aquaculture*. New York (US): Chapman and Hall.
- Guo JJ. 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research*. 40: 609-618.
- Gupta A, Gupta P, Dhawan A. 2014. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. *Fish & Shellfish Immunology* 41: 113-119

- Harikrishnan R, Balasundaram C, Moon-Soo H. 2010. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 1037-1043
- Huissman EA. 1987. Principle of fish production. Department of Fish Culture and Fisheries Aquaculture, Wageningen Agriculture University, The Netherland
- Kailasapathy K. 2002. Mikroencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*. 3:39 -48
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:999-1007.
- Lazado CC, Caipang CMA. 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 39: 78-89
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms Tenth Edition. Prentice-Hall Inc. USA.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and Imunity: A Fish Perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 29:2-14.
- Nimrat S, Boonthai T, Vuthhiphandchai V. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology* 169: 244-258
- Panigrahi A, Kiron V., Satoh S, Watanabe T. 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiol Biochem* 36:969–977
- Putra AN. 2010. Kajian probiotik prebiotik dan sinbiotik untuk pertumbuhan ikan nila *Oreochromis niloticus*. [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sanjayasari D, Astuti DA, Affandi R. 2010. Efektivitas berbagai *growth promoter* terhadap kelangsungan hidup mikroflora saluran pencernaan ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Prosiding Seminar Nasional Ikan VI. 8-9 Juni*. Cibinong: Masyarakat Ikhtologi Indonesia.
- Son CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Chen W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & shellfish Immunology* 26: 691-698.
- Talpur AD, Ikhwanuddin M. 2013. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *FishShellfish Immunology*. 34: 254–264.
- Talpur AD, Munir MB, Mary A, Hashim R. 2014. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead *Channa striata* fingerlings. *Aquaculture* 426-427: 14-20
- Tanbiyaskur. 2011. Efektivitas pemberian probiotik, prebiotik, dan sinbiotik melalui pakan untuk pengendalian infeksi *Sterptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus* [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.