

**Aplikasi Probiotik, Prebiotik dan Sinbiotik melalui Pakan
untuk Meningkatkan Respon Imun dan Kelangsungan Hidup
Ikan Nila *Oreochromis niloticus* yang Diinfeksi *Streptococcus agalactiae*
(Application of Probiotic, Prebiotic and Synbiotic through Feed for Increasing
Immune Response and Survival Rate of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*
Infected by *Streptococcus agalactiae*)**

Widanarni¹, Achmad Farouq, Munti Yuhana

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB
Kampus Darmaga, Bogor 16680.

¹Korespondensi: widanarni@[yahoo.com](mailto:widanarni@yahoo.com). Telp. 0251-8628755, Fax. 0251-8622941.

Diterima/disetujui : 22 Maret 2014/ 9 April 2014

ABSTRACT

In this study, fish feed supplemented by probiotic, prebiotic and synbiotic were applied to enhance the immune response and survival rate of the fish against Streptococcus agalactiae infection. Treatments used in this study, were as follows: feed containing 1% (v/v) of probiotic (C), feed containing 2% (v/v) of prebiotic (D) and feed containing mixed of 1% (v/v) of probiotic + 2% (v/v) of prebiotic (E, defined as synbiotic). Control fish (both positive, A; and negative, B; treatments) were fed by fish feed without containing neither probiotic nor prebiotic. In this study, test fish used monosex (all male) red tilapia with the average of body weight of 13,43±2,97 gram. The fish were fed by supplemented feed within first 30 days pre injection. After that, the treated fish were challenged by 10⁹ CFU/ml of S. agalactiae. Nile tilapia fed by synbiotic (treatment E) had higher immune response (haemoglobin, neutrofil, and phagocyte indices) than control, but were not significantly different than those of treatment C, and D. After challenged test by S. agalactiae, treatment C, D and E resulted significantly higher resistance than that of control. The survival rate of fish fed by supplemented feed containing probiotic (C), prebiotic (D) and synbiotic (E) were 76%, 76% and 80%, respectively; higher than than positive control (50%). The results showed that addition of probiotic, prebiotic and synbiotic in fish feed could increase immune response and survival rate against S. agalactiae.

Keywords : tilapia, probiotic, prebiotic, synbiotic, *Streptococcus agalactiae*

PENDAHULUAN

Ikan nila *Oreochromis niloticus* merupakan salah satu jenis ikan konsumsi yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Permintaan ikan nila mencakup permintaan pasar domestik maupun dari luar negeri (Amerika dan Eropa). Menurut FAO (2010), menyebutkan bahwa pada tahun 2010 produksi ikan nila secara global telah mencapai 2.5 juta ton dengan nilai lebih dari 4 milyar dolar. Penyakit bakterial merupakan salah satu masalah penting yang sering timbul dalam usaha budidaya ikan air tawar. Salah satu penyakit bakterial yang banyak menyerang ikan nila adalah streptococcosis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*. Menurut Pasnik *et al.* (2009), *S. agalactiae* banyak menyerang ikan baik pada perairan umum maupun pada ikan budidaya. Wabah bakteri *S. agalactiae* bersifat akut dan dapat menyebabkan kematian tinggi hingga mencapai 100% pada ikan budidaya (Hernandez *et al.* 2009).

Penanggulangan penyakit bakterial pada ikan sering kali dilakukan dengan pemberian antibiotik. Akan tetapi, penggunaan antibiotik secara terus menerus, dapat menyebabkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik (Balcazar *et al.* 2006). Selain itu, meningkatnya isu mengenai keamanan pangan dan keamanan lingkungan sering menjadi faktor pembatas dalam penggunaan antibiotik. Penambahan probiotik

merupakan salah satu alternatif yang digunakan untuk pencegahan penyakit. Menurut Merrifield *et al.* (2010), probiotik merupakan makanan tambahan dalam bentuk mikroba hidup yang memberi pengaruh yang menguntungkan bagi inang dengan cara meningkatkan keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan. Sedangkan prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna inang namun memiliki efek menguntungkan dengan menstimulir pertumbuhan secara selektif terhadap aktivitas satu atau lebih bakteri di dalam usus (*Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*), sehingga meningkatkan kesehatan inang (Gibson 2004; Manning *et al.* 2004). Penambahan prebiotik pada pakan akan menstimulasi perbaikan mikroflora normal di dalam saluran pencernaan ikan.

Sinbiotik merupakan kombinasi seimbang dari probiotik dan prebiotik dalam rangka mendukung kelangsungan dan pertumbuhan bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan makhluk hidup (Cerezuela *et al.* 2011). Pemberian probiotik yang diiringi dengan pemberian prebiotik diharapkan akan mampu menstimulir pertumbuhan bakteri probiotik dan bakteri menguntungkan lainnya sehingga akan meningkatkan kesehatan inang. Beberapa studi menunjukkan bahwa pemberian probiotik bersama prebiotik pada inang dapat meningkatkan kelangsungan hidup dan sistem imun inang (Daniels *et al.* 2010; Lin *et al.* 2012). Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik melalui pakan terhadap peningkatan respon imun dan kelangsungan hidup ikan nila yang diinfeksi *S. agalactiae*.

METODOLOGI

1.1 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Wadah pemeliharaan yang digunakan adalah akuarium berukuran 65x30x35 cm³ sebanyak 15 buah. Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila merah monoseks jantan dengan bobot rata-rata 13,43±2,97 gram sebanyak 225 ekor. Ikan-ikan tersebut didatangkan dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor. Ikan dipelihara dengan kepadatan 15 ekor per akuarium dengan suhu stabil antara 28-30 °C dalam ruangan tertutup. Kualitas air tandon yang digunakan pada penelitian ini memiliki DO (*Dissolve Oxygen*) 5.1 mg/l, pH 6.7, dan amonia 0,32 ppm. Air pemeliharaan disifon dan diganti setiap hari sebanyak 60%.

1.2 Persiapan Probiotik dan Prebiotik

Probiotik yang digunakan adalah bakteri *Bacillus* sp NP₅ yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila (Putra 2010). Probiotik dikultur pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) sebanyak 25 ml selama 16-18 jam menggunakan *waterbath shaker* dengan kecepatan 160 rpm. Suspensi sel kemudian disentrifugasi pada 5.000 rpm dan dicuci dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) steril sebanyak 2 kali. Jumlah sel bakteri pada suatu sampel diketahui dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media tersebut dikalikan dengan faktor pengencerannya dengan satuan CFU/ml (Madigan *et al.* 2003).

Proses ekstraksi prebiotik dilakukan mengacu pada metode Muchtadi (1989). Sebanyak 10 gram tepung kukus ubi jalar varietas sukuh disuspensikan ke dalam 100 ml etanol 70% dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 jam. Selanjutnya, suspensi tersebut disaring dengan menggunakan kertas saring steril. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *evaporator vacuum* pada suhu 40 °C. Hasil dari pemekatan selanjutnya diencerkan dengan menggunakan akuades steril hingga mencapai kadar TPT (Total Padatan Terlarut) sebesar 5% (Marlis 2008). Penambahan probiotik dan prebiotik dilakukan dengan cara penyemprotan menggunakan *syringe* secara merata ke pakan dengan penambahan kuning telur sebanyak 2% (v/v) yang berfungsi sebagai binder (Wang 2007).

1.3 Rancangan Penelitian

Pakan perlakuan yang digunakan berupa pakan buatan dari Laboratorium Nutrisi Ikan, Departemen Budidaya Perairan, FPIK-IPB. Pakan mengandung protein sebesar 23%, lemak 8% dan BETN 43% (pakan berbasis tinggi karbohidrat). Pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali sehari secara *ad satiation*. Perlakuan yang diberikan ke ikan uji yaitu :

- Perlakuan A : Ikan diberi pakan uji dan diinfeksi *S. agalactiae* (kontrol positif).
 Perlakuan B : Ikan diberi pakan uji dan disuntik PBS (kontrol negatif).
 Perlakuan C : Ikan diberi pakan uji dengan penambahan probiotik 1% (v/v) dari bobot pakan (Wang 2007) dan diinfeksi *S. agalactiae*.
 Perlakuan D : Ikan diberi pakan uji dengan penambahan prebiotik 2% (v/v) dari bobot pakan (Grisdale *et al.* 2008) dan diinfeksi *S. agalactiae*.
 Perlakuan E : Ikan diberi pakan uji dengan penambahan probiotik 1% (v/v) dan prebiotik 2% (v/v) dari bobot pakan dan diinfeksi *S. agalactiae* (Putra 2010).

1.4 Uji Tantang dengan *Streptococcus agalactiae*

Bakteri *S. agalactiae* didapatkan dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor. *S. agalactiae* dikultur pada media selektif BHI (*Brain Heart Infusion*). Ikan diuji tantang dengan menyuntikkan biakan *S. agalactiae* dengan kepadatan 10^9 CFU/ml pada bagian dorsal dengan dosis 0,1 ml/10 gram bobot ikan. Pengamatan setelah uji tantang dilakukan selama kurun waktu 10 hari.

1.5 Parameter Pengamatan

Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan

Tingkat kelangsungan hidup ikan (*Survival*) dihitung dari persentase jumlah ikan yang hidup di akhir masa pemeliharaan dibanding dengan jumlah ikan pada saat tebar. Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung dengan rumus (Effendie 1979) :

$$Survival = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

N_t : Populasi saat t (ekor)

N_0 : Populasi awal (ekor)

Gambaran Darah Ikan

Pengamatan gambaran darah ikan dilakukan sebanyak 3 kali, yaitu sebelum perlakuan pakan, setelah selesai perlakuan pakan dan pada hari ke-5 pasca uji tantang. Darah ikan diambil melalui vena caudal menggunakan *syringe* yang telah dibilas dengan larutan antikoagulan, natrium sitrat ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$). Pengamatan gambaran darah ikan meliputi kadar hemoglobin, hematokrit, eritrosit, leukosit, diferensial leukosit serta indeks fagositik.

Kadar Hemoglobin (Hb)

Penghitungan kadar hemoglobin dilakukan dengan metode Sahli (Wedemeyer dan Yasutake 1977). Darah sampel dihisap dengan menggunakan pipet Sahli hingga skala 20 mm³ atau pada skala 0,2 ml. Darah dalam pipet dipindahkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi HCl 0,1 N hingga skala 10 (merah) dan dihomogenisasi. Setelah itu, akuades ditambahkan ke dalam tabung tersebut hingga warna darah berubah menjadi warna larutan standar yang ada dalam Hb-meter. Skala hemoglobin ditentukan berdasarkan skala jalur g% (kuning) yang menunjukkan banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 ml darah.

Kadar Hematokrit

Kadar hematokrit diukur berdasarkan metode Anderson dan Siwicki (1993). Darah diambil sebanyak $\frac{3}{4}$ bagian tabung. Ujung tabung yang telah berisi darah ditutup dengan *crytoceal* dengan cara menancapkan ujung tabung tersebut ke dalam *crytoceal* kira-kira sedalam 1 mm sehingga terbentuk sumbat *crytoceal*. Setelah itu, tabung mikrohematokrit tersebut disentrifugasi selama 5 menit pada 5.000 rpm. Panjang bagian darah yang mengendap (a) dan panjang total volume darah yang terdapat di dalam tabung (b) diukur dengan menggunakan penggaris. Kadar hematokrit merupakan banyaknya sel darah (digambarkan dengan padatan atau endapan) dalam cairan darah. Kadar hematokrit darah dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar hematokrit} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Jumlah Eritrosit

Jumlah eritrosit dihitung menurut Blaxhall dan Daisley (1973). Darah sampel diambil dengan menggunakan pipet yang berisi bulir pengaduk warna merah hingga skala 0,5 (pipet untuk mengukur sel darah merah). Lalu ditambahkan larutan hayem hingga skala 101. Jumlah sel darah merah dihitung pada *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop pada perbesaran 400 kali. Jumlah sel darah merah dihitung dengan rumus :

$$\Sigma \text{eritrosit} = \text{rata-rata } \Sigma \text{sel terhitung} \times \frac{1}{\text{vol. kotak besar}} \times \text{pengencer}$$

Jumlah Leukosit

Jumlah leukosit dihitung menurut Blaxhall dan Daisley (1973). Darah sampel diambil dengan menggunakan pipet yang berisi bulir pengaduk warna putih hingga skala 0,5 (pipet untuk mengukur sel darah putih). Lalu ditambahkan larutan turk hingga skala 11. Jumlah sel darah putih dihitung pada *haemocytometer* dengan bantuan dengan mikroskop pada perbesaran 400 kali. Jumlah sel darah putih dihitung dengan rumus :

$$\Sigma \text{leukosit} = \text{rata-rata } \Sigma \text{sel terhitung} \times \frac{1}{\text{vol. kotak besar}} \times \text{pengencer}$$

Diferensial Leukosit

Diferensial leukosit dihitung menurut Amlacher (1970). Sampel darah dibuat preparat ulas pada gelas objek dan dikering udarakan. Preparat ulas yang telah kering lalu difiksasi dalam larutan metanol selama 5-10 menit. Setelah itu, preparat ulas dikering udarakan dan direndam dalam larutan Giemsa selama 10-15 menit. Preparat ulas dibilas dengan akuades dan dikeringudarakan. Setelah itu, preparat ulas dapat diamati di bawah mikroskop. Persentase sel-sel leukosit dihitung dengan cara mengamati jumlah sel-sel limfosit, monosit, neutrofil dan trombosit hingga berjumlah 100 sel. Masing-masing jenis leukosit yang terhitung dikelompokkan dan dihitung berdasarkan jenisnya dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ limfosit} = \frac{\Sigma \text{limfosit}}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ monosit} = \frac{\Sigma \text{monosit}}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ neutrofil} = \frac{\Sigma \text{neutrofil}}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ trombosit} = \frac{\Sigma \text{trombosit}}{100} \times 100\%$$

Indeks Fagositik

Aktivitas fagositik diukur menurut Anderson dan Siwicki (1993). Sebanyak 50 μl sampel darah dan 50 μl suspensi *Staphylococcus aureus* (10^7 sel/ml) dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian, suspensi dihomogenisasi dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 20 menit. Sebanyak 5 μl suspensi dibuat preparat ulas darah, dan difiksasi dalam larutan metanol selama 5-10 menit. Setelah itu, preparat ulas dikeringudarakan lalu direndam dalam larutan Giemsa selama 10-15 menit. Preparat ulas dibilas dengan akuades dan dikeringudarakan. Setelah itu, preparat ulas dapat diamati di bawah mikroskop. Persentase sel-sel fagositik dihitung dengan mikroskop dan dihitung

jumlah sel yang memfagosit bakteri hingga berjumlah 100 sel dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Indeks fagositik} = \frac{\sum \text{sel fagosit}}{100} \times 100\%$$

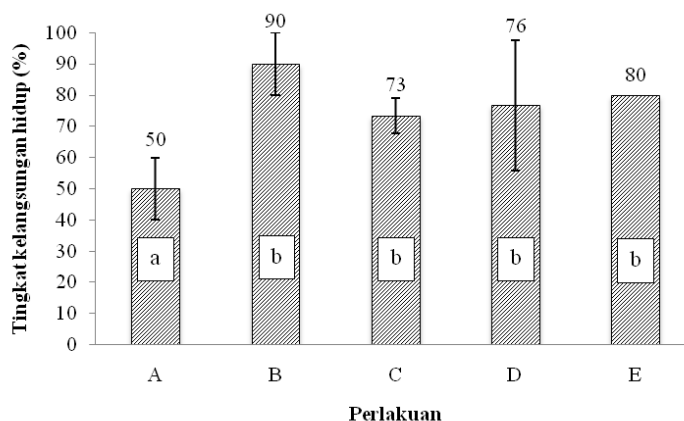
Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode analisis statistik pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor dengan menggunakan *statistical software* IBM SPSS *statistics version* 16.0. Apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan setelah Diuji Tantang

Tingkat kelangsungan hidup ikan setelah diinfeksi *S. agalactiae* (Gambar 1) menunjukkan bahwa perlakuan A (kontrol +) secara signifikan lebih rendah ($P<0.05$) dibanding perlakuan C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik), namun antar perlakuan tidak menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ($P>0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik melalui pakan mampu meningkatkan kelangsungan hidup ikan akibat infeksi *S. agalactiae*. Hasil ini sejalan dengan penelitian Lin *et al.* (2012) yang menjelaskan bahwa penambahan chitosan oligosakarida (prebiotik), *Bacillus coagulans* (probiotik) serta kombinasinya (sinbiotik) memberikan kelangsungan hidup ikan koi yang lebih baik dibandingkan kontrol pasca uji tantang dengan *Aeromonas veronii*. Menurut Zhou *et al.* (2009) probiotik dalam akuakultur dapat bermanfaat dalam mencegah serangan penyakit, meningkatkan kelangsungan hidup serta dapat meningkatkan respon imun ikan. Selain itu, Irianto (2003) juga menjelaskan bahwa mikroflora normal pada saluran pencernaan memiliki fungsi perlindungan yang penting untuk menekan bakteri patogen dan virus, menstimulir daya tahan serta merubah aktivitas metabolik usus. Selain itu, mikroflora normal juga dapat menekan bakteri patogen karena terjadinya kompetisi dalam nutrisi dan tempat pelekatan pada usus.



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

** A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

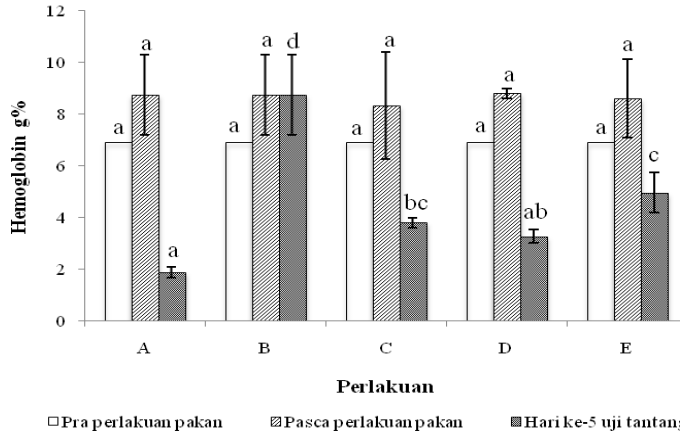
Gambar 1. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

Gambaran Darah Ikan

Kadar Hemoglobin, Kadar Hematokrit, dan Jumlah Eritrosit

Hemoglobin merupakan komponen penting dalam sel darah merah yang berperan dalam proses pengangkutan oksigen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

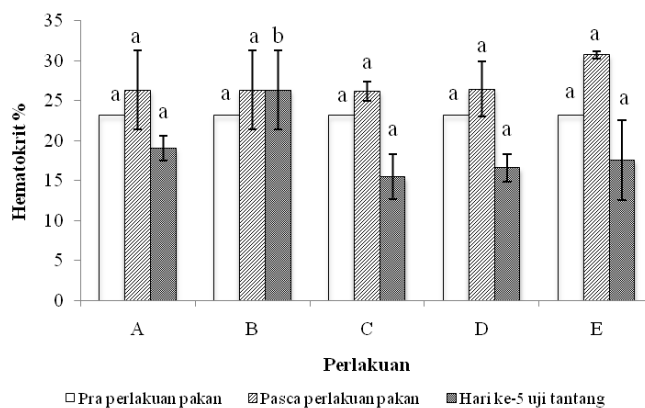
kadar hemoglobin ikan sebelum dan setelah perlakuan pakan tidak berbeda nyata pada semua perlakuan (Gambar 2; $P>0.05$). Setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*, kadar hemoglobin pada semua perlakuan menurun namun pada perlakuan C (probiotik) dan E (sinbiotik) nilainya lebih tinggi dan berbeda nyata ($P<0.05$) terhadap perlakuan A (kontrol +), namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan C (prebiotik) ($P>0.05$).



* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)
 ** A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 2. Kadar hemoglobin ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

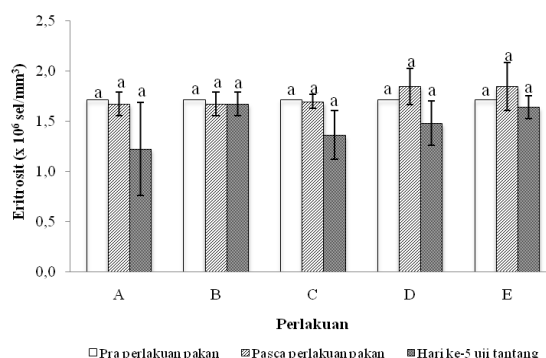
Hasil pengamatan kadar hematokrit menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada semua perlakuan ($P>0.05$), baik pada sebelum dan setelah perlakuan pakan maupun setelah uji tantang (Gambar 3). Kadar hematokrit setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* mengalami penurunan pada semua perlakuan. Talpur dan Ikhwanuddin (2013) menyatakan bahwa rendahnya kadar hematokrit dapat menjadi indikasi ikan terserang anemia, karena ikan berhenti makan akibat stres atau serangan penyakit. Pola penurunan yang sama juga terjadi pada penelitian Talpur *et al.* (2014), yang menjelaskan bahwa kadar hemoglobin dan hematokrit ikan *snakehead* pasca infeksi *A. hydrophila* mengalami penurunan, yang berkaitan dengan penurunan jumlah sel darah merah.



* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)
 ** A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 3. Kadar hematokrit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

Menurut Fujaya (2004), terdapat korelasi antara sel darah merah (eritrosit), hemoglobin dan hematokrit, semakin rendah jumlah sel darah merah, maka semakin rendah pula kandungan hemoglobin dalam darah. Jumlah eritrosit ikan nila pada pra perlakuan pakan, pasca perlakuan pakan, dan hari ke-5 pasca uji tantang dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah eritrosit ikan pada perlakuan prebiotik (D) dan sinbiotik (E) dari sebelum perlakuan pakan dan setelah selesai perlakuan pakan, mengalami peningkatan, dengan jumlah sel darah merah berkisar antara $1.67-1.85 \times 10^6$ sel/mm³ ($P>0.05$). Hasil serupa juga diperoleh Al-Dohail *et al.* (2009), bahwa jumlah sel darah merah ikan *African catfish* mengalami peningkatan setelah pemberian probiotik *L. acidophilus* melalui pakan.



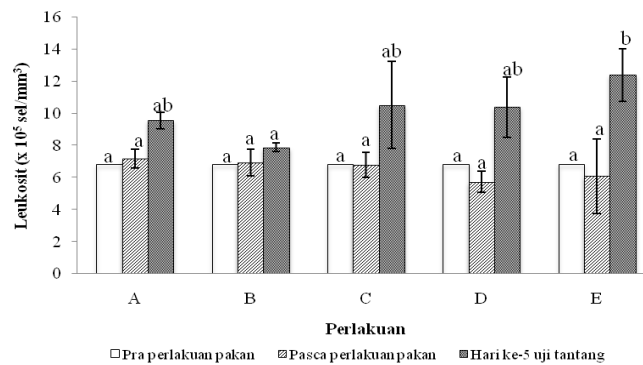
* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 4. Jumlah eritrosit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

Setelah uji tantang jumlah eritrosit mengalami penurunan dengan nilai berkisar $1.23-1.64 \times 10^6$ sel/mm³, namun penurunan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P>0.05$) pada masing-masing perlakuan. Hasil penelitian Talpur *et al.* (2014) menunjukkan bahwa jumlah sel darah merah ikan *snakehead* setelah uji tantang mengalami penurunan dan turunnya jumlah sel darah merah tersebut karena sel darah merah mengalami lisis akibat infeksi bakteri patogen.

Jumlah Leukosit

Berikut ini merupakan data jumlah sel darah putih (leukosit) ikan nila selama masa pemeliharaan (Gambar 5). Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan jumlah leukosit ikan pada awal tebar dan akhir perlakuan pakan tidak berbeda nyata ($P>0.05$) pada semua perlakuan. Setelah diuji tantang, jumlah leukosit ikan meningkat pada tiap perlakuan namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P>0.05$) pada tiap perlakuan. Menurut Rastogi (1977), jumlah sel darah putih pada ikan berkisar antara 20.000-150.000 sel/mm³. Peningkatan jumlah leukosit ini terkait dengan kinerja sistem imun ikan dalam mereduksi serangan patogen. Semakin meningkatnya serangan patogen maka akan semakin meningkat pula produksi leukosit dalam darah. Hasil penelitian Talpur *et al.* (2014) menunjukkan pasca infeksi *A. hydrophila*, total leukosit ikan *snakehead* mengalami peningkatan dibandingkan dengan sebelum infeksi. Hal ini didukung oleh pernyataan Martin *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa respon ikan terhadap stresor bergantung pada jenis stres yang dialami oleh ikan tersebut, dimana peningkatan jumlah sel darah putih, penurunan kadar hematokrit dan peningkatan neutrofil bergantung pada jenis stres yang dialami. Selain itu, Amlacher (1970) juga menyatakan bahwa darah akan mengalami perubahan serius khususnya apabila terkena penyakit infeksi.

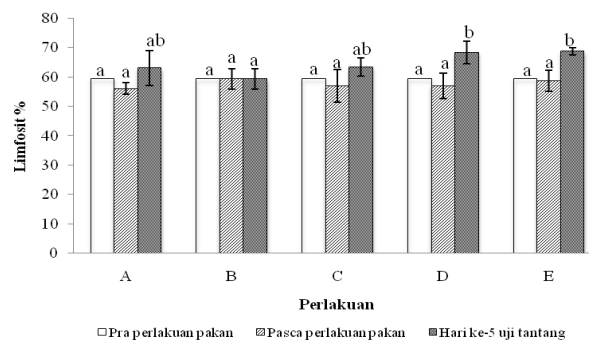


* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 5. Jumlah leukosit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

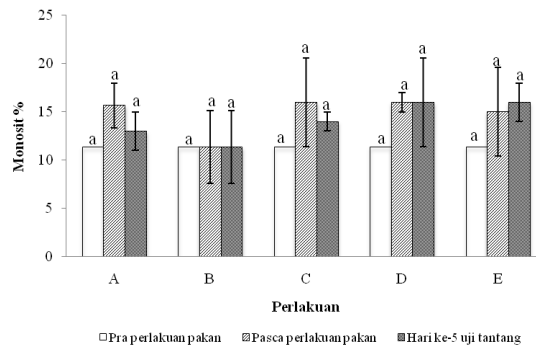
Diferensial leukosit: Limfosit, Monosit, Neutrofil dan Trombosit

Sel darah putih dikelompokkan menjadi dua bagian berdasarkan ada tidaknya granula atau butir-butir dalam sel, yaitu granulosit yang merupakan sel darah putih yang memiliki granula serta sel agranulosit yang merupakan sel darah putih yang tidak memiliki granula dalam selnya (Chinabut *et al.* 1991). Agranulosit terdiri dari limfosit, monosit dan trombosit, sedangkan granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil dan basofil. Menurut Talpur dan Ikhwanuddin (2013) leukosit merupakan pertahanan utama dalam melawan patogen serta dapat meningkat secara cepat ketika terjadi infeksi. Hasil pengamatan diferensial leukosit yang meliputi jumlah limfosit, monosit, neutrofil dan trombosit dalam darah disajikan pada Gambar 6; Gambar 7; Gambar 8; Gambar 9.



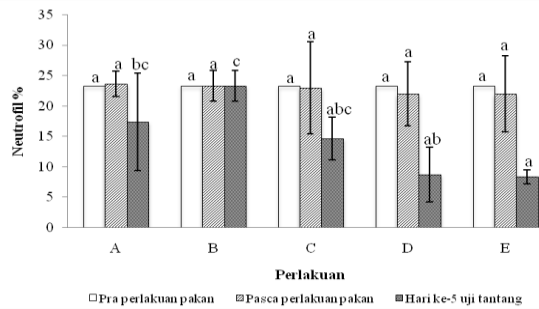
* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 6. Jumlah sel limfosit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*



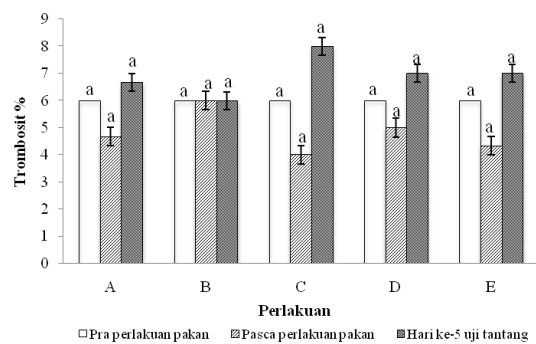
* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 7. Jumlah sel monosit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*



* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 8. Jumlah sel neutrofil ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*



* Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0.05$)
 **A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

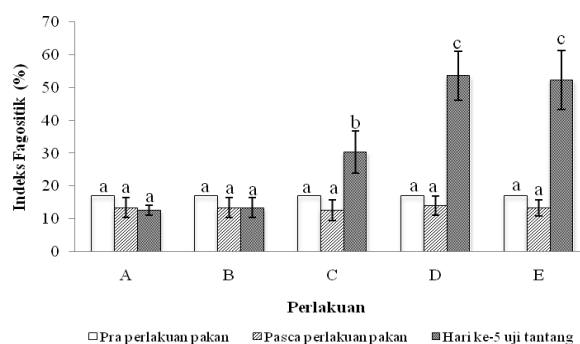
Gambar 9. Jumlah sel trombosit ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah limfosit dan monosit pada masing-masing perlakuan cenderung stabil dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0.05$). Monosit merupakan sel-sel fagositik selain neutrofil yang juga

berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh nonspesifik. Menurut Fujaya (2004), monosit merupakan sel yang lebih kuat dalam memfagosit partikel atau antigen dibandingkan dengan neutrofil. Hal serupa juga dinyatakan Rieger *et al.* (2011) bahwa monosit pada ikan teleostei merupakan sel yang sangat aktif dalam memfagosit antigen dalam tubuh sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap patogen. Setelah uji tantang, jumlah neutrofil pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan, dan pada perlakuan E (sinbiotik) paling rendah dan berbeda nyata ($P < 0.05$) dibandingkan dengan perlakuan A (kontrol +). Hal ini diduga karena ketika pengukuran, yang sedang berperan dalam aktivitas pertahanan didominasi oleh sel monosit. Baratawidjaja (2006) menyatakan, sel neutrofil hanya berada dalam sirkulasi kurang dari 48 jam sebelum bermigrasi dan berpindah sangat cepat ke daerah infeksi. Pendapat tersebut didukung oleh Rieger *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa neutrofil merupakan sel yang pertama kali sampai pada daerah inflamasi serta mengandung zat antimikroba sebagai pertahanan dalam melawan patogen. Trombosit ikan setelah diuji tantang mengalami peningkatan, namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0.05$) pada masing-masing perlakuan. Peningkatan ini terjadi karena kerusakan organ tubuh ikan akibat infeksi patogen. Menurut Angka *et al.* (2004) trombosit dapat meningkat karena adanya hemoragi dan tukak sehingga trombosit diproduksi agar darah membeku guna mencegah pendarahan yang lebih banyak.

Indeks Fagositik

Salah satu upaya dari tubuh ikan untuk mempertahankan diri terhadap serangan patogen adalah dengan menghancurkan patogen tersebut melalui proses fagositik. Berikut ini merupakan indeks fagositik ikan nila selama masa pemeliharaan (Gambar 10). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa indeks fagositik ikan sebelum dan setelah perlakuan pakan tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) pada tiap perlakuan. Setelah diuji tantang, indeks fagositik pada perlakuan C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik) lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap perlakuan A (kontrol +). Selain itu, perlakuan D (prebiotik) dan E (sinbiotik) juga menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata dibanding perlakuan C (probiotik).



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

**A (kontrol +), B (kontrol -), C (probiotik), D (prebiotik) dan E (sinbiotik)

Gambar 10. Indeks fagositik ikan nila selama masa pemeliharaan dan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*

Indeks fagositik mencerminkan tingkat agresifitas dari sel leukosit dalam menghancurkan antigen yang masuk dalam tubuh. Peningkatan indeks fagositik pada perlakuan probiotik, prebiotik dan sinbiotik menunjukkan bahwa penambahan probiotik, prebiotik dan sinbiotik tersebut dapat meningkatkan kinerja leukosit dalam memfagosit antigen yang masuk. Leukosit merupakan sel fagositik yang berperan penting dalam melawan serangan patogen. Mekanisme dasar respon kekebalan untuk memerangi infeksi bakteri yaitu dengan netralisasi toksin/enzim oleh antibodi, pemusnahan oleh antibodi, komplemen dan lisozim, penelanan dan penghancuran bakteri serta penelanan dan penghancuran intraselular bakteri oleh makrofag yang diaktifasi (Tizard 1982). Probiotik, prebiotik, dan sinbiotik berperan secara tidak langsung dalam mereduksi

serangan patogen dengan memperbaiki komposisi mikroflora normal di dalam saluran pencernaan sehingga akan menstimulir perbaikan respon imun ikan.

Pada penelitian ini, hasil menunjukkan bahwa pemberian prebiotik dan sinbiotik melalui pakan dapat meningkatkan indeks fagositik ikan yang lebih tinggi dibanding perlakuan probiotik. Hal ini diduga disebabkan aplikasi probiotik memiliki kelemahan, yaitu kemampuan *survival*, kolonisasi dan kompetisi nutrisi dari bakteri probiotik yang cukup bervariasi. Hasil penelitian Lin *et al.* (2012), menunjukkan bahwa kombinasi chitosan oligosakarida (COS) dan *B. coagulans* pada ikan koi, secara signifikan dapat meningkatkan *phagocytic capacity* dengan nilai lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan probiotik dan prebiotik. Menurut Lin *et al.* (2012), hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi probiotik dan prebiotik dapat memberikan efek sinergis terhadap peningkatan sistem imun dan resistensi ikan terhadap infeksi patogen. Sedangkan Prebiotik dalam aplikasi sinbiotik bertindak sebagai faktor pemacu pertumbuhan bakteri probiotik yang dapat menghambat patogen dalam usus (Cerezuela *et al.* 2011). Tingginya indeks fagositik pada perlakuan prebiotik, diduga prebiotik telah menstimulir bakteri usus tertentu yang secara selektif memodulasi sitokin dan produksi antibodi.

SIMPULAN

Pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik melalui pakan dapat meningkatkan respon imun dan resistensi ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae* dengan kelangsungan hidup masing-masing 76%, 76% dan 80% dibanding kontrol positif yang hanya 50%.

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.
- Amlacher E, 1970. *Textbook of fish disease*. D.A. Courey and R.L. Herman Translation, T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey, USA.
- Anderson DP, Siwicki AK, 1993. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on disease in Asian Aquaculture “Aquatic Animal Health and Environment”. Phuket, Thailand. 25-29th. October 1993, hlm. 17.
- Angka SL, Priyosoeryanto BP, Lay BW, Haris E. 2004. Penyakit *motile aeromonad septicemia* pada ikan lele dumbo. *Forum Pascasarjana.* 27:339-350.
- Balcazar JL, de Blas I, Ruiz Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114:173e86.
- Baratawidjaja KG, 2006. *Imunologi dasar*. Bratawidjaja KG. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi keenam. Jakarta (ID): UI Pr.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal Fish Biologys.* 5: 577-581.
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban A. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *J. Aquac. Res. Development.* <http://dx.doi.org/10.4172/2155-95546.S1-008>.
- Daniels CL, Merrifield DL, Boothroyd DP, Davies SJ, Factor JR, Arnold KE. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture* 304:49-57.
- Chinabut S, Limsuwan C, Sawat PK. 1991. *Histology of the walking catfish Clarias batrachus*. Department of Fisheries: Thailand.
- Effendie MI. 1979. *Metode biologi perikanan*. Yayasan Dewi Sri Bogor, Bogor.
- Fujaya Y. 2004. *Fisiologi ikan*. Rineka Cipta, Jakarta.
- Gibson GR. 2004. Fibre and effects on probiotics (diet prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements.* 1: 25-31.
- Grisdale HB, Helland SJ, Gatlin. 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharidae, fructooligo-saccharidae or galactooligosaccharidae on

- the growth and feed utilization of atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*. 283: 163-167.
- Hernandez, E. Figueroa J., Ireguei C., 2009. Streptococcosis on red tilapia, *Oreochromis* sp., farm : a case study. *Journal of Fish Disease*, 32: 247-257.
- Irianto A. 2003. *Probiotik akuakultur*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Lin S, Mao S, Guan Y, Luo L, Luo L, Pan L. 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity, and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*. 342–343: 36–41.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. Tenth Edition. Prentice-Hall Inc. USA.
- Marlis A. 2008. Isolasi oligosakarida ubi jalar *Ipomea batata* L. dan pengaruh pengolahan terhadap potensi prebiotiknya. [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Manning TS, Rastall R, Gibson G. 2004. *Prebiotics and lactic acid bacteria*. Di dalam : Salminen S, Wright A dan Ouwehand A, editor. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects 3: 2004*; New York. Marcel Dekker, Inc. hlm 407-418.
- Martin ML, Namura DT, Miyazaki DM, Pilarsky F, Ribero K, De Castro MP, De Campos CM. 2004. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* exposed to single and consecutive stress of capture. *Animal Science*: 449-456.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bogwald J, Castex M, Ringo E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for Salmonids. *Aquaculture*. 302: 1-18.
- Muchtadi D. 1989. Evaluasi Nilai Gizi Pangan. Depdikbud, Dirjen Dikti-PAU, IPB.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH, 2009. Fecal strings associated with *Streptococcus agalactiae* infection in nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Science Journal*: 6-8.
- Putra AN. 2010. Aplikasi probiotik, prebiotik dan sinbiotik untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan ikan nila *Oreochromis niloticus*. [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rastogi SC. 1977. *Essential of animal physiology*. New Age International Limited, New Delhi.
- Rieger AM, Barreda DR. 2011. Antimicrobial mechanism of fish leucocytes. *J. Development and Comparative Immunology*. 35: 1238–1245
- 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*. *Fish Shellfish Immunol*. 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.
- Tizard IR. 1982. *Pengantar imunologi veteriner*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Wang Y. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Panaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259-264.
- Wedemeyer G, Yasutake WT. 1977. Clinical methods for the assesment of the effects of environmental stress on fish health. Technical paper 89, USA. Departement of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- 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.