

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI IMUNOSTIMULAN  
*Saccharomyces* sp. DAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. TERHADAP RESPON  
IMUN NONSPESIFIK DAN KELANGSUNGAN HIDUP IKAN NILA,  
*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Nadia Asmara  
1714111020**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2021**

## ABSTRAK

### EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI IMUNOSTIMULAN *Saccharomyces* sp. DAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. TERHADAP RESPON IMUN NONSPESIFIK DAN KELANGSUNGAN HIDUP IKAN NILA, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Oleh

NADIA ASMARA

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan komoditas ikan air tawar dunia yang toleran terhadap kondisi budi daya yang kurang baik tetapi rentan terserang penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila*. Pencegahannya dapat memberikan imunostimulan berupa campuran probiotik pada pakan seperti *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kinerja dari kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan probiotik *Bacillus* sp. dengan dosis yang berbeda terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diuji tantang dengan menggunakan *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini dilakukan di Instalasi Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, Jawa Barat pada September-Desember 2020. Rancangan percobaannya terdiri dari lima perlakuan dengan tiga ulangan. Setiap perlakuan diamati selama 30 hari untuk melihat gejala klinis, diferensial leukosit, aktifitas fagositosis dan tingkat kelangsungan hidup ikan. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan pakan komersial yang dicampur *Saccharomyces* sp. 1,5% + *Bacillus* sp. 1% dapat meningkatkan kinerja respon imun nonspesifik dan tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila* memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap parameter pengamatan. Berdasarkan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaplikasian kombinasi *Saccharomyces* sp. 1,5 % dan *Bacillus* sp. 1 % dalam budi daya ikan nila.

**Kata kunci :** *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp., diferensial leukosit, probiotik, respon imun, *Saccharomyces* sp., tingkat kelangsungan hidup

## ABSTRACT

### THE EFFECTIVITY OF IMMUNOSTIMULANT COMBINATION *Saccharomyces* sp. AND PROBIOTIC *Bacillus* sp. FOR NONSPECIFIC IMMUNE RESPONSE AND SURVIVAL OF NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

By

NADIA ASMARA

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a global freshwater fish commodity that has tolerant of unfavorable cultivation conditions but vulnerable to disease caused by *Aeromonas hydrophila*. The prevention could be provided by immunostimulant mixture of probiotics in feed such as *Saccharomyces* sp. and *Bacillus* sp. The study intended to examine the performance of the combination of immunostimulant *Saccharomyces* sp. and probiotic *Bacillus* sp. with different doses on the survival rate of Nile tilapia which was infected using *Aeromonas hydrophila*. This study was conducted at Research Installation for Fish Disease Control, Depok, West Java in September-December 2020. The experimental design had consisted of five treatments with three replications. Each treatment was observed for 30 days to see clinical symptoms, leucocyte differential, phagocytic activity and survival rate. The results showed that the treatment of commercial feed mixed with *Saccharomyces* sp. 1.5% + *Bacillus* sp. 1% could be improved the performance of the nonspecific immune response and the survival rate of Nile tilapia infected with *Aeromonas hydrophila* and gave a significant effect ( $P < 0.05$ ) on the observed parameters. Based on the results of the study, it was necessary to conduct further research on the application of the combination of *Saccharomyces* sp. 1.5% and *Bacillus* sp. 1% in tilapia cultivation.

**Key words :** *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp., immune response, leucocyte differential, probiotics, *Saccharomyces* sp., survival rate

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI IMUNOSTIMULAN  
*Saccharomyces* sp. DAN PROBIOTIK *Bacillus* sp. TERHADAP RESPON  
IMUN NONSPESIFIK DAN KELANGSUNGAN HIDUP IKAN NILA,  
*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

Oleh

**Nadia Asmara**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
**SARJANA PERIKANAN**

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2021**

Judul : **EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI  
IMUNOSTIMULAN *Saccharomyces* sp. DAN  
PROBIOTIK *Bacillus* sp. TERHADAP  
RESPON IMUN NONSPESIFIK DAN  
KELANGSUNGAN HIDUP IKAN NILA,  
*Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758)**

Nama Mahasiswa : **Nadia Asmara**

NPM : 1714111020

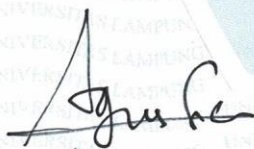
Program Studi : **Budidaya Perairan**

Jurusan : **Perikanan dan Kelautan**

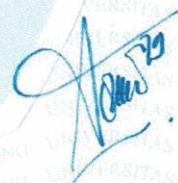
Fakultas : **Pertanian**

**MENYETUJUI**

1. **Komisi Pembimbing**

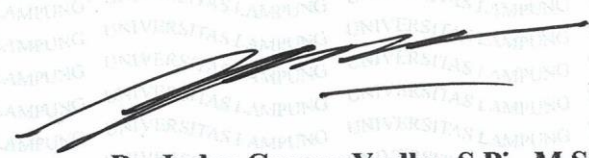


**Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P**  
NIP. 19840805 200912 1 003



**Dr. Desy Sugiani, M.Si**  
NIP. 19791208 200502 2 001

2. **Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan**

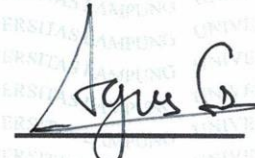


**Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si**  
NIP. 19700815 199903 1 001

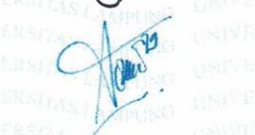
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P.**

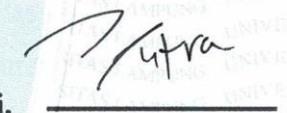


**Sekretaris : Dr. Desy Sugiani, M.Si.**



**Penguji**

**Bukan Pembimbing : Dr. Yudha T. Adiputra, S.Pi., M.Si.**



**2. Dekan Fakultas Pertanian**



**Prof. Dr. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**

961020 198603 1 002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 19 Juli 2021**

## PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis, skripsi/laporan akhir ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana/Ahli Madya) baik di Universitas Lampung maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan tim pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan naskah, dengan naskah disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandar Lampung, 20 Agustus 2021  
Yang Membuat Pernyataan,



Handwritten signature of Nadia Asmara.

Nadia Asmara  
NPM. 1714111020

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Tanjung Karang pada tanggal 30 Juni 1999 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Muhammad Nasir dan Ibu Eva Indra Wati. Pendidikan yang pernah ditempuh oleh penulis yaitu TK Harapan Jaya Lampung Selatan pada tahun 2004-2005, SDN 2 Rajabasa pada tahun 2005-2011, SMPN 22 Bandar Lampung pada tahun 2011-2014, dan SMAN 16 Bandar Lampung pada tahun 2014-2017. Pada tahun 2017 penulis melanjutkan pendidikan kejenjang Perguruan Tinggi Negeri melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) di Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Pada tahun 2020 penulis melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik Periode I selama 40 hari di Desa Sri Menanti, Kecamatan Air Hitam, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung. Pada tahun yang sama di bulan Juni hingga Juli, penulis melakukan Praktik Umum (PU) di Balai Benih Ikan (BBI) Natar, Lampung Selatan selama 40 hari dengan laporan akhir berjudul “**Manajemen Pembenihan Ikan Mas Koki (*Carassius sp.*) di Balai Benih Ikan (BBI) Natar**”. Pada tahun yang sama juga penulis melakukan penelitian pada bulan September hingga Desember di Instalasi Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, Jawa Barat dengan judul “**Efektivitas Pemberian Kombinasi Imunostimulan *Saccharomyces sp.* dan Probiotik *Bacillus sp.* Terhadap Respon Imun Nonspesifik dan Kelangsungan Hidup Ikan Nila, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).**”



## **PERSEMBAHAN**

**Dengan penuh rasa syukur berkat rahmat dan hidayat ALLAH SWT., saya persembahkan skripsi ini untuk kedua orang tua saya yaitu Papi dan Mamiku yang tercinta**

**Papi Muhammad Nasir dan Mami Eva Indra Wati**

**Mereka adalah orang tua yang sangat saya sayangi dan cintai atas segala keikhlasan disetiap pengorbanan, dukungan, do'a yang tidak pernah putus untuk serta memenuhi segala kebutuhan untuk pendidikanku tanpa lelah dan pamrih untuk anak perempuanmu ini sehingga mendapatkan gelar sarjana.**

**Kakakku yaitu Rizki Nindia Putri, A.Md., juga adikku Muhammad Ridho Ficardo, terima kasih sudah menjadi kakak dan adikku yang mewarnai hidup penulis di dunia dan yang selalu memberikan doa, menemaniku dan selalu menjadi penyemangatku.**

**Sahabat dan teman-temanku yang menyayangiku dan selalu memberikan semangat, dukungan dan doa.**

**Almamater tercinta, Universitas Lampung.**

"Boleh jadi kamu membenci sesuatu padahal ia amat baik bagimu,  
dan boleh jadi pula kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk  
bagimu, Allah mengetahui sedang kamu tidak mengetahui."

(Al-Baqarah: 216)

"Kau tak akan pernah mampu menyeberangi lautan  
sampai kau berani berpisah dengan daratan."

(Christopher Columbus)

*"Always be cool as hell."*

*(Nadia Asmara)*

"Setiap hal yang ingin dicapai selalu ada pengorbanannya.

Jadi, apa pengorbananmu?"

(Kenshi D. Irano)

## SANWACANA

Puji syukur kehadirat Allah SWT., yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Pemberian Kombinasi Immunostimulan *Saccharomyces* sp. dan Probiotik *Bacillus* sp. Terhadap Respon Imun Nonspesifik dan Kelangsungan Hidup Ikan Nila, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).” Shalawat serta salam penulis curahkan kepada Nabi Muhammad SAW., yang telah memberikan petunjuk kepada kita semua melalui Al-qur’an dan Al-hadist. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung.

Selama proses penyelesaian skripsi, penulis telah memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak terutama kedua orang tua saya, Bapak Muhammad Nasir dan Ibu Eva Indra Wati yang telah menjadi orangtua terhebat, terima kasih atas segala kasih sayang, do’a, dukungan, serta motivasi sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Maka dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
2. Bapak Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si., selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
3. Ibu Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D., selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
4. Bapak Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P., selaku Pembimbing Utama yang telah memberikan ilmu, kritik saran, arahan, dan waktu untuk selalu membimbing penulis sehingga proses penyelesaian skripsi berjalan dengan sebaik-baiknya;

5. Ibu Dr. Desy Sugiani, M.Si., selaku Pembimbing Kedua dan pembimbing lapangan penulis selama penelitian atas ilmu, motivasi, bantuan, dukungan, arahan, kritik saran, dan waktu yang diberikan sehingga mempermudah proses penyelesaian skripsi;
6. Bapak Dr. Yudha Trinoegraha Adiputra, S.Pi., M.Si., selaku Pembimbing Akademik dan Pembahas Ujian Skripsi yang telah meluangkan waktu dan memberikan ilmu, dorongan, motivasi, arahan, kritik dan saran serta masukan dalam proses penyelesaian skripsi;
7. Seluruh peneliti dan staff di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Depok, Jawa Barat;
8. Seluruh dosen dan staff Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung yang sudah turut membantu kelancaran selama penyelesaian skripsi serta yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menempuh pendidikan;
9. Kakak dan adikku, Rizki Nindia Putri, A.Md., dan Muhammad Ridho Ficardo yang telah memberikan dukungan, doa, semangat dan hiburan dikala penulis merasa jenuh mengerjakan skripsi;
10. Sahabatku tercinta Mitha Laras Wati, Septa Lia Ariska, Syifa Nurshiyam, Diana Fadhillah, Muhammad Muttaqin, Virelly Aidhil Sachputa Pane dan Ria Ayu Windia yang selalu mendengar keluh kesah penulis, memberikan doa, semangat, dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Teman penelitianku dan seperjuanganku selama berada di kota Depok, Inas Aufa Azmi, Azzahra Ayu Gigantia, dan Annisa Shafira Zahra, terima kasih sudah banyak mewarnai hari-hari penulis selama menjalani penelitian. Penulis sangat beruntung mengenal kalian;
12. Teman terdekatku selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung, Mega Cania dan Zevinna Kurnia Widyanto. Terima kasih sudah menemani penulis selama empat tahun lamanya berbagi kisah dan keluh kesah bersama;
13. Teman seperjuanganku di Budidaya Perairan angkatan 2017, serta seluruh keluarga Flying Dutchman'17 yang tidak dapat disebutkan satu persatu;
14. Teman terkasihku, Diah Anika Fahrani, Wahyu Devariani, Kirana Mutiara Suni dan Millatul Husniyah, terima kasih sudah menjadi temanku selama

bertahun-tahun dan memberikan banyak sekali dukungan, nasihat juga motivasi kepada penulis;

15. Sahabat terbaik yang pernah penulis dapatkan dalam hidup, Kenshi Darambi Irano, yang motivasinya sampai saat ini masih penulis terapkan di kehidupan sehari-hari. *Rest in Peace*. Semoga kamu ditempatkan di tempat terbaik oleh Allah SWT. dan semoga kita dapat bertemu kembali;
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih atas bantuan dan dukungannya;
17. Almamater tercinta, Universitas Lampung;
18. Terakhir, untuk diriku sendiri. Terima kasih sudah bertahan sampai sejauh ini. Tetap terus berjuang hingga mencapai garis akhir!

Semoga Allah SWT., membalas semua kebaikan dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak sekali kekurangan, akan tetapi penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi yang membaca maupun bagi penulis serta manfaat untuk ilmu pengetahuan.

Bandar Lampung, 20 Agustus 2021

Penulis,

Nadia Asmara

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xix
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
1.3 Manfaat Penelitian .....	3
1.4 Kerangka Pikir .....	3
1.5 Hipotesis .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	7
2.1.1 Klasifikasi Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	7
2.1.2 Morfologi Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	8
2.1.3 Habitat dan Penyebarannya .....	9
2.1.4 Kebutuhan Nutrisi Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	10
2.2 Sistem Imun Nonspesifik .....	10
2.3 Imunostimulan .....	11
2.4 Probiotik .....	12
2.5 <i>Bacillus</i> sp. ....	12
2.6 <i>Saccharomyces</i> sp. ....	13
2.7 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	13
2.8 Diferensial Leukosit.....	15

2.8.1 Limfosit .....	15
2.8.2 Monosit .....	15
2.8.3 Neutrofil .....	15
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
3.1 Waktu Penelitian .....	16
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	16
3.2.1 Alat Penelitian .....	16
3.2.2 Bahan Penelitian .....	16
3.3 Rancangan Penelitian .....	17
3.4 Prosedur Penelitian .....	18
3.4.1 Tahap Persiapan .....	18
3.4.1.1 Persiapan Wadah Pemeliharaan .....	18
3.4.1.2 Pembuatan Media Padat TSA ( <i>Trypticase Soy Agar</i> ) dan PCA ( <i>Plate Count Agar</i> ) .....	19
3.4.1.3 Pembuatan Media Cair TSB ( <i>Trypticase Soy Broth</i> ) dan PBS ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) .....	19
3.4.1.4 Kultur <i>Bacillus</i> sp. ....	20
3.4.1.5 Kultur <i>Staphylococcus</i> sp. ....	20
3.4.1.6 Penyiapan Pakan Perlakuan .....	20
3.4.2 Tahap Penelitian .....	21
3.4.2.1 Pemberian Pakan .....	21
3.4.2.2 Pengambilan Sampel Darah Ikan .....	21
3.4.2.3 <i>Total Plate Count</i> (TPC) .....	21
3.4.2.3.1 Sampel Cair .....	22
3.4.2.3.2 Prosedur .....	22
3.4.2.3.3 Pembacaan dan Perhitungan Koloni pada Cawan Petri .....	22
3.5 Persen Fagositosis (PP) dan Indeks Fagositosis (IP) .....	23
3.6 Diferensial Leukosit .....	24
3.6.1 Pembuatan Preparat .....	24
3.6.2 Pengamatan Diferensial Leukosit .....	24
3.7 Uji Tantang .....	24

3.8 Tingkat Kelangsungan Hidup .....	25
3.9 Analisis Data .....	25
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Hasil.....	26
4.1.1 Gejala Klinis .....	26
4.1.2 Diferensial Leukosit .....	27
4.1.3 Aktifitas Fagositosis .....	32
4.1.4 Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan .....	34
4.2 Pembahasan .....	36
4.2.1 Gejala Klinis .....	36
4.2.2 Diferensial Leukosit .....	36
4.2.3 Aktifitas Fagositosis .....	38
4.2.4 Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan .....	40
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>42</b>
5.1 Simpulan .....	42
5.2 Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>49</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram kerangka pikir penelitian .....	4
2. Ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	7
3. Tata letak akuarium penelitian .....	18
4. Gejala klinis infeksi <i>A. hydrophila</i> pada ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	26
5. Perbedaan sel limfosit, monosit dan neutrofil di bawah mikroskop 400 x .....	28
6. Jumlah limfosit dalam 100 sel .....	29
7. Jumlah monosit dalam 100 sel .....	30
8. Jumlah neutrofil dalam 100 sel .....	31
9. Persen fagositosis ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	32
10. Indeks fagositosis ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	33
11. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) sebelum ujiantang (%) .....	34
12. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) sesudah ujiantang (%) .....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perlakuan pada penelitian .....	4
2. Profil diferensial leukosit .....	28
3. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan media kultur bakteri .....	50
2. Kultur bakteri <i>Bacillus</i> sp.....	51
3. Penyiapan pakan perlakuan .....	52
4. Pengambilan darah ikan .....	53
5. Pembuatan preparat apus darah.....	54
6. Preparasi aktivitas fagositosis .....	55
7. Hasil statistik profil leukosit .....	56
8. Hasil statistik limfosit .....	57
9. Hasil statistik monosit .....	58
10. Hasil statistik neutrofil .....	59
11. Hasil statistik persen fagositosis .....	60
12. Hasil statistik indeks fagositosis .....	61
13. Hasil statistik tingkat kelangsungan hidup ikan awal .....	62
14. Hasil statistik tingkat kelangsungan hidup ikan akhir .....	63

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Indonesia merupakan salah satu komoditas unggulan dalam bisnis ikan air tawar di dunia sehingga memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi (Diansari *et al.*, 2013). Berdasarkan data *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2020) menempatkan ikan nila di urutan ketiga setelah koi (*Ctenopharyngodon idellus*) dan mola (*Hypophthalmichthys molitrix*) sebagai contoh sukses perikanan budi daya dunia. Beberapa keunggulan yang dimiliki oleh ikan nila antara lain adalah mudah berkembang biak, pertumbuhannya relatif cepat dan toleran terhadap kondisi budi daya yang kurang baik (Rustikawati, 2012).

Meskipun ikan nila dikenal memiliki kemampuan beradaptasi terhadap kualitas air rendah, namun beberapa jenis penyakit masih dapat menyerang ikan nila yang dibudidayakan. Salah satu penyakit yang cukup sering menyerang ikan nila adalah *motile aeromonas septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* (Plumb dan Hanson, 2011). Infeksi *A. hydrophila* dapat menimbulkan penyakit dengan gejala di antaranya: kulit mudah terkelupas, bercak merah pada seluruh tubuh, insang berwarna kebiruan atau pucat, *exophthalmia* (bola mata menonjol keluar), sirip punggung, sirip dada, sirip perut, dan sirip ekor terlepas, terjadinya peradangan pada anus, dan hilang nafsu makan (Mulia, 2003). Penanggulangan penyakit bakterial pada ikan biasanya dilakukan juga dengan pemberian antibiotik tetapi pengobatan dengan antibiotik saat ini sudah dibatasi karena dapat menyebabkan efek residu pada tubuh ikan, resistensi, keracunan, dan dapat memengaruhi lingkungan sekitar (Brogden *et al.*, 2014). Upaya terbaik yang dapat

dilakukan untuk mencegah serangan penyakit pada ikan adalah meningkatkan kekebalan tubuh (imunitas) dengan memberikan imunostimulan (Lengka, 2013).

Banyak metode dan bahan imunostimulan yang digunakan untuk meningkatkan imunitas ikan. Salah satunya penggunaan probiotik pada pakan, aplikasi penggunaan probiotik yang diberikan pada pakan juga merupakan salah satu cara untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan (Azhar, 2013). Verschuere *et al.*, (2000) dalam Umasugi (2018) menyatakan bahwa probiotik merupakan mikroba hidup yang memberikan keuntungan bagi inangnya dengan mengatur keseimbangan dalam pencernaan, meningkatkan efisiensi pakan, meningkatkan respon imun inang serta memperbaiki kualitas lingkungan serta meningkatkan kemampuan penyerapan usus sehingga dapat menekan populasi patogen.

Beberapa mikroorganisme yang telah banyak digunakan sebagai probiotik di antaranya adalah ragi (Akhter *et al.*, 2015). Jenis ragi yang mengandung imunostimulan adalah ragi roti (*Saccharomyces* sp.) yang dapat meningkatkan pencernaan pakan dan protein sehingga menghasilkan pertumbuhan dan efisiensi pakan yang lebih baik (Wache *et al.*, 2006). Penambahan ragi roti pada pakan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan pengambilan pakan serta meningkatkan respon imun nonspesifik ikan nila (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008). Selain itu, penambahan imunostimulan probiotik *Bacillus* sp. pada pakan ikan nila secara umum mampu meningkatkan jumlah populasi bakteri usus dan daya cerna ikan (Rusdani *et al.*, 2016).

Penelitian sebelumnya menggunakan kombinasi probiotik sebagai imunostimulan yang diujikan ke beberapa jenis ikan di antaranya adalah penelitian oleh Lusiastuti (2017) menggunakan kombinasi probiotik mikroenkapsulasi *Bacillus cereus* ND2 dan *Staphylococcus lentus* L1K yang diujikan pada lele (*Clarias gariepinus*), hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi probiotik mikroenkapsulasi *Bacillus cereus* ND2 dan *Staphylococcus lentus* L1K pada pakan lebih efektif dengan dosis 2% dalam meningkatkan tingkat kelangsungan hidup hingga 97,33%, biomassa dan respon imun ikan terhadap *A. hydrophila*. Berdasarkan itu maka penelitian

dengan pemberian dua kombinasi imunostimulan yaitu *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. ini diharapkan diperoleh dosis yang optimal untuk meningkatkan respon imun nonspesifik dan tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diuji tantang dengan *A. hydrophila*.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menguji kinerja kombinasi probiotik *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dengan dosis berbeda terhadap respon imun nonspesifik dan tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*.
2. Menemukan dosis terbaik imunostimulan dari kombinasi *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. untuk ketahanan ikan nila terhadap infeksi *A. hydrophila*.

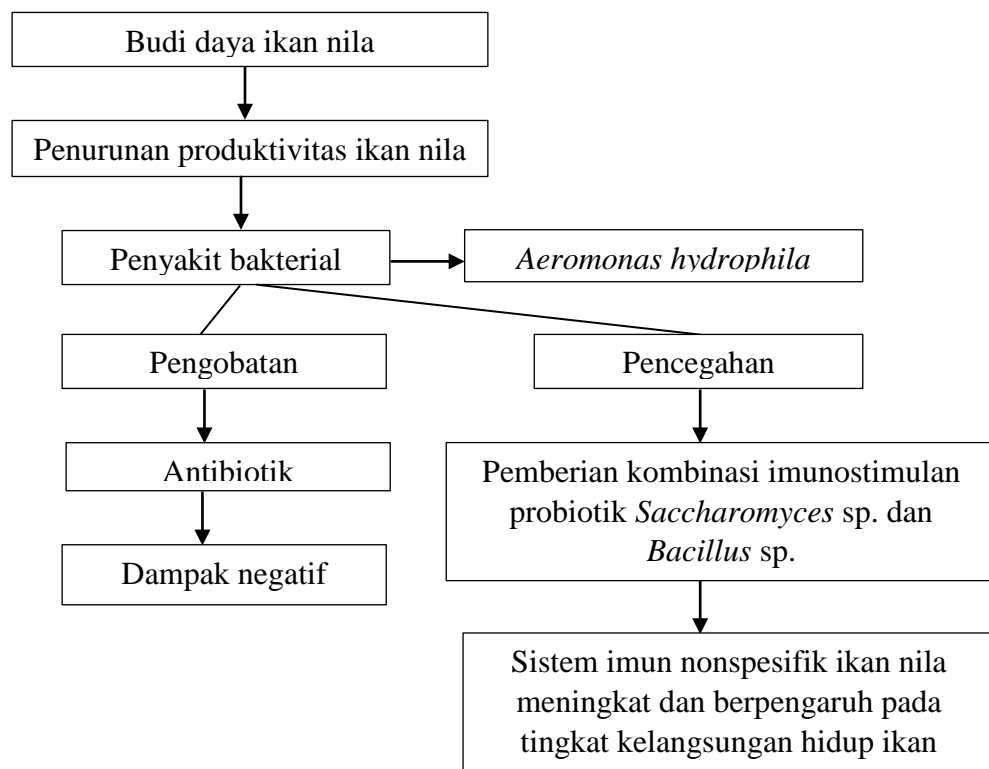
## 1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dalam kegiatan akukultur mengenai kombinasi imunostimulan yang aman digunakan untuk meningkatkan imunitas ikan serta pencegahan serangan infeksi *A. hydrophila* pada ikan nila.

## 1.4 Kerangka Pikir

Penyakit MAS merupakan salah satu kendala terbesar dalam dunia budi daya ikan nila karena dapat menyebabkan mortalitas yang tinggi. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi infeksi *A. hydrophila*, salah satunya dengan menggunakan antibiotik yang sebenarnya dapat membuat bakteri patogen menjadi resisten dan residu pada ikan dan berbahaya apabila dikonsumsi manusia sehingga untuk mengurangi penggunaan bahan tersebut dalam pencegahan dan penanganan infeksi *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan memberikan imunostimulan untuk

meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan nila. Salah satu cara pemberian imunostimulan pada ikan adalah menggunakan kombinasi dari dua probiotik yang dicampurkan ke dalam pakan. Kombinasi imunostimulan yang dapat digunakan adalah probiotik *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. Penelitian terhadap penggunaan kombinasi *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam upaya mengontrol penyakit dalam aktivitas budi daya ikan nila, dipandang penting untuk dilakukan. Dari dua kombinasi imunostimulan yang berbeda ini diharapkan dapat diperoleh dosis paling optimal untuk meningkatkan respon imun dan ketahanan ikan nila terhadap penyakit (Gambar 1).



Gambar 1. Diagram kerangka pikir penelitian.

### 1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Limfosit

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap limfosit.

$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap limfosit.

## 2. Monosit

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap monosit.

$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap monosit.

## 3. Neutrofil

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap neutrofil.

$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap neutrofil.

## 4. Persen Fagositosis (PP)

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap persen fagositosis (PP).



$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap persen fagositosis (PP).

#### 5. Indeks Fagositosis (IP)

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap indeks fagositosis (IP).

$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap indeks fagositosis (IP).

#### 6. Tingkat Kelangsungan Hidup

$$H_0 = 0$$

Pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. yang berbeda dalam pakan tidak berbeda nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila.

$$H_1 \neq 0$$

Minimal ada satu pengaruh kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. dalam pakan yang berbeda nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

#### 2.1.1 Klasifikasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)



Gambar 2. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Ikan nila merupakan jenis ikan yang memiliki toleransi tinggi terhadap kondisi lingkungan dengan kualitas air yang rendah dan sering kali ditemukan hidup normal pada habitat-habitat yang ikan dari jenis lain tidak dapat hidup. Klasifikasi ikan nila berdasarkan Saanin (1995) adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Sub-filum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Ordo	: Percomorphii
Famili	: Cichlidae
Genus	: <i>Oreochromis</i>
Spesies	: <i>Oreochromis niloticus</i>

Ikan nila memiliki bentuk tubuh memanjang dan pipih ke samping serta memiliki warna putih kehitaman atau kemerahan. Ikan nila berasal dari Sungai Nil dan danau-danau sekitarnya. Sekarang ikan ini telah tersebar ke negara-negara di lima benua yang beriklim tropis dan subtropis. Di wilayah yang beriklim dingin, ikan nila tidak dapat hidup baik (Sugiarto, 1988).

Ikan nila mempunyai nama ilmiah *Oreochromis niloticus* dan dalam bahasa Inggris dikenal sebagai *nile tilapia*. Ikan nila bukanlah ikan asli perairan Indonesia, melainkan ikan introduksi (ikan yang berasal dari luar Indonesia, tetapi sudah dibudidayakan di Indonesia). Bibit ikan ini didatangkan ke Indonesia secara resmi oleh Balai Penelitian Perikanan Air Tawar pada tahun 1969 dari Taiwan ke Bogor. Setelah melalui masa penelitian dan adaptasi, kemudian ikan ini disebarluaskan kepada petani di seluruh Indonesia (Wiryanta, 2010).

Ikan nila merupakan jenis ikan air tawar yang mempunyai nilai konsumsi yang cukup tinggi. Ikan nila banyak dibudidayakan karena mempunyai daging sisi badan yang cukup tebal. Ikan nila memiliki keunggulan yang komparatif yaitu pembudidayaannya yang relatif cepat dibandingkan dengan jenis ikan lain. Hal ini disebabkan sifat ikan nila yang mudah berkembang biak dan pertumbuhan yang cepat (Cholik, 2005).

### **2.1.2 Morfologi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

Ikan nila memiliki lima buah sirip, yaitu sirip punggung (*dorsal fin*), sirip dada (*pectoral fin*), sirip perut (*ventral fin*), sirip anus (*anal fin*), sirip ekor (*caudal fin*). Pada sirip punggung, sirip perut, dan sirip ekor terdapat jari-jari lemah. Matanya berukuran besar dan menonjol dengan tepi berwarna putih. Gurat sisi (*linea lateralis*) terputus di bagian tengah tubuh, kemudian berlanjut lagi tetapi letaknya lebih ke bawah dibanding dengan garis memanjang di atas sirip dada. Jumlah sisik pada gurat sisi ada 34 sisik (Ciptanto, 2010).

Sirip punggung, sirip perut, dan sirip dubur ikan nila mempunyai jari-jari lemah tetapi keras dan tajam seperti duri. Sirip punggung memanjang dari bagian atas tutup insang hingga bagian atas sirip ekor dan berwarna hitam. Sirip dada ada sepasang dan tampak hitam. Sirip perut berukuran kecil, sirip anus dan sirip ekor ada satu buah, sirip anus berbentuk agak panjang, sedangkan sirip ekor berbentuk bulat. Bagian pinggir sirip punggung berwarna abu-abu atau hitam (Suryani, 2006).

### **2.1.3 Habitat dan Penyebarannya**

Ikan nila merupakan ikan konsumsi yang umum hidup di perairan tawar, terkadang ikan nila juga ditemukan hidup di perairan yang agak asin (payau). Ikan nila dikenal sebagai ikan yang bersifat *euryhaline* (dapat hidup pada kisaran salinitas yang lebar). Ikan nila mendiami berbagai habitat air tawar, termasuk saluran air yang dangkal, kolam, sungai dan danau. Ikan nila dapat menjadi masalah sebagai spesies invasif pada habitat perairan hangat, tetapi sebaliknya pada daerah beriklim sedang karena ketidakmampuan ikan nila untuk bertahan hidup di perairan dingin, yang umumnya bersuhu di bawah 21°C (Harrisu, 2012).

Ikan nila dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada lingkungan perairan dengan kadar oksigen terlarut antara 2,0-2,5 mg/l. Secara umum nilai pH air pada budi daya ikan nila antara 5-10 tetapi nilai pH optimum adalah berkisar 6-9. Ikan nila umumnya hidup di perairan tawar seperti sungai, danau, waduk, rawa, sawah dan saluran irigasi, memiliki toleransi terhadap salinitas sehingga ikan nila dapat hidup dan berkembang biak di perairan payau dengan salinitas 20-25‰ (Setyo, 2006). Penyebaran ikan nila dimulai dari daerah asalnya yaitu Afrika bagian Timur, seperti Sungai Nil (Mesir), Danau Tanganyika, Chad, Nigeria dan Kenya. Ikan jenis ini dibudidayakan di 110 negara. Di Indonesia, ikan nila telah dibudidayakan di seluruh provinsi (Suyanto, 2010).

#### **2.1.4 Kebutuhan Nutrisi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

Kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan oleh ikan nila yaitu protein, karbohidrat, dan lemak. Kandungan nutrisi yang tidak tepat dapat mempengaruhi pertumbuhan seperti kurangnya protein yang menyebabkan ikan hanya menggunakan sumber protein untuk kebutuhan dasar dan kekurangan untuk pertumbuhan. Kandungan protein yang berlebih, menyebabkan protein akan terbuang dan menyebabkan bertambahnya kandungan amoniak dalam perairan. Kebutuhan nutrisi ikan akan terpenuhi dengan adanya protein dalam pakan. Protein merupakan kompleks yang terdiri dari asam amino esensial yang merupakan senyawa molekul mengandung gugus fungsional amino ( $\text{NH}_2$ ) maupun karboksil ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) dan nonesensial (*National Research Council, 1977*).

Ikan nila memakan makanan alami berupa plankton, perifiton dan tumbuh-tumbuhan lunak seperti hidrila dan ganggang sutera. Pada masa pemeliharaan, ikan nila dapat diberi pakan buatan dalam bentuk pelet yang mengandung protein antara 20-25% (Kordi, 2013). Pada masa pemeliharaan tersebut ikan nila sangat responsif terhadap pakan buatan baik pelet terapung maupun pelet tenggelam (Cholik, 2005). Pemberian pakan untuk benih ikan dilakukan 3-4 kali dalam sehari, yaitu pada pagi, siang dan sore hari. Jumlah pakan yang diberikan untuk benih berukuran 5-7 cm adalah sebanyak 4-7% dari total berat tubuh ikan (Kordi dan Ghufuran, 2013).

#### **2.2 Sistem Imun Nonspesifik**

Ikan nila memiliki sistem kekebalan tubuh spesifik dan nonspesifik. Sistem imun spesifik yaitu sistem imun yang berasal dari substansi asing. Substansi asing yang digunakan pada penelitian ini yaitu probiotik. Probiotik dapat berinteraksi secara langsung dalam sel untuk membantu mengaktifkan sistem imun nonspesifik (Syakuri *et al.*, 2003).

Sistem pertahanan nonspesifik merupakan pertahanan bawaan yang mampu mengenali setiap benda asing yang masuk dalam tubuh ikan dan berusaha untuk memusnahkan benda asing tersebut, termasuk benda asing adalah molekul patogen. Kekebalan nonspesifik ini bisa dirangsang dengan pemberian suatu substansi yang mampu dikenali oleh sistem pertahanan tubuh ikan sebagai materi asing. Substansi yang mampu meningkatkan respon kekebalan ini biasa disebut dengan imunostimulan (Hastuti, 2008). Pertahanan imun nonspesifik merupakan sistem pertahanan pertama yang meliputi pertahanan mekanik dan kimiawi serta respon seluler yang melibatkan sel-sel yang mampu memfagosit (makrofag dan kelompok granulosit). Erickson dan Hubbard (2000) menyatakan bahwa peningkatan sistem pertahanan imun nonspesifik di antaranya fagositosis terjadi akibat adanya lipopolisakarida atau peptidoglikan atau keduanya yang dilepaskan secara terus menerus oleh bakteri.

### **2.3 Imunostimulan**

Imunostimulan didefinisikan sebagai suatu bahan yang digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan aktivitas sistem kekebalan dan meningkatkan resistensi terhadap patogen, selain juga meningkatkan kelulushidupan organisme budi daya ketika terserang patogen yang berbahaya. Pemberian imunostimulan biasanya dilakukan dengan injeksi ataupun secara oral, walaupun dikatakan bahwa efek yang lebih bagus didapatkan pada pemberian dengan jalan injeksi, namun demikian injeksi lebih membutuhkan tenaga dan waktu yang banyak (Smith *et al.*, 2003).

Imunostimulan penting untuk mengontrol penyakit ikan dan berguna pada budi daya ikan. Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budi daya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Imunostimulan meningkatkan daya tahan terhadap penyakit infeksi, bukan karena meningkatnya respon imun spesifik tapi oleh meningkatnya mekanisme pertahanan nonspesifik (Sakai, 1999).

## 2.4 Probiotik

Probiotik adalah mikroba hidup yang yang dapat diformulasikan ke dalam berbagai jenis produk termasuk makanan, obat-obatan, dan suplemen makanan. Spesies *Lactobalicus* dan *Bifidobacterium* yang paling sering digunakan sebagai probiotik, namun spesies ragi *Saccharomyces cerevisiae*, beberapa *Escherichia coli* dan *Bacilius* juga digunakan sebagai probiotik (Guarner *et al.*, 2017).

Probiotik umumnya berupa kelompok mikroorganisme nonpatogen yang berpengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan saluran pencernaan inangnya, jika dikonsumsi secara rutin dalam jumlah yang cukup. Saluran pencernaan mengandung kelompok probiotik yang mampu menguraikan senyawa-senyawa beracun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak, sehingga konsentrasi dari senyawa-senyawa toksin itu dapat dikurangi atau dieliminasi seluruhnya. Dengan kata lain, derajat kesehatan saluran pencernaan dapat meningkat bila di dalamnya terdapat probiotik dalam jumlah cukup (Schrezenmeir *et al.*, 2001).

## 2.5 *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang yang mempunyai kemampuan membentuk endospora pada kondisi yang kurang menguntungkan. Bakteri ini dapat ditemukan dan dapat diisolasi dari tanah. Bentuk endospora merupakan nilai lebih bagi bakteri yang sangat terkait secara ekologi di dalam tanah. Kemampuannya membentuk endospora menyebabkan bakteri ini relatif lebih tahan terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan misalnya radiasi, panas, asam, disinfektan, kekeringan, nutrisi yang terbatas dan dapat dorman dalam jangka waktu yang lama hingga bertahun-tahun. Struktur spora tidak akan terjadi jika sel sedang berada pada fase pembelahan secara eksponensial tetapi akan dibentuk terutama pada kondisi nutrisi esensial misalnya karbon dan nitrogen terbatas. (Madigan *et al.*, 2000).

Bakteri *Bacillus* sp. merupakan bakteri biokontrol atau merupakan bakteri yang dapat menghambat tumbuhnya bakteri lain, seperti dalam penelitian Aji (2014) bahwa *Bacillus* sp. dapat menghambat tumbuhnya bakteri yang berasal dari Gram positif dan negatif. *Bacillus* sp. dapat bertahan pada kondisi aerob maupun anaerob yang artinya bakteri ini membutuhkan oksigen sebagai penghasil respirasi sel dan dapat pula menghasilkan energi dari oksigen yang dibutuhkan.

## **2.6 *Saccharomyces* sp.**

Ragi roti mengandung probiotik yang berperan dalam pertumbuhan ikan. Pemilihan mikroba untuk probiotik terutama didasarkan pada kemampuannya dalam melekat pada epitel usus, kolonisasi dan melakukan aktivitas metabolik yang menguntungkan inang. Sejumlah prasyarat lain juga harus terpenuhi yaitu nonpatogenik, efektif diterapkan pada berbagai kondisi lingkungan dan dapat hidup dalam berbagai bentuk preparasi, misalnya pada suspensi, dicampur makanan atau *freeze* dan *dried* (Wallace, 2002).

Ragi roti merupakan mikroorganisme aman (*generally regarded as safe*). Mikroorganisme ini menjadi penting di dunia industri fermentasi dan pakan ikan. Saat ini ragi roti tidak saja digunakan dalam fermentasi tradisional, tetapi saat ini penggunaan ragi roti telah menambah sektor-sektor komersial yang penting termasuk makanan, minuman, biofuel, kimia, industri enzim, *pharmaceutical*, agrikultur, dan lingkungan (Waspada dan Rodif, 1991) dalam Pranata (2009).

## **2.7 *Aeromonas hydrophila***

*Aeromonas hydrophila*, merupakan bakteri patogen penyebab penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS), terutama untuk spesies ikan air tawar di perairan tropis. Bakteri ini termasuk patogen oportunistik yang hampir selalu ada di air dan siap menimbulkan penyakit apabila ikan dalam kondisi kurang baik. Penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* berakibat bercak merah pada ikan dan



menimbulkan kerusakan pada kulit, insang dan organ dalam. Penyebaran penyakit bakterial pada ikan umumnya sangat cepat serta dapat menimbulkan kematian yang sangat tinggi pada ikan-ikan yang diserangnya (Kordi dan Ghufuran, 2013).

*Aeromonas hydrophila* dapat hidup di air tawar, air laut maupun air payau. Pada umumnya bakteri ini hidup pada air tawar yang mengandung bahan organik tinggi, bakteri ini juga diakui sebagai patogen dari hewan akuatik yang berdarah dingin. Di daerah tropik, pendarahan pada organ dalam pada ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya muncul pada musim panas (kemarau) karena pada saat itu konsentrasi bahan organik tinggi dalam kolam air. Pada ikan, bakteri ini banyak ditemukan di bagian insang, kulit, hati dan ginjal. Ada pula yang berpendapat bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Irianto, 2006).

Menurut Yardimci *et al.* (2011), *A. hydrophila* termasuk ke dalam kelompok bakteri patogen dengan virulensi yang tinggi. Tingkat virulensi bakteri tersebut ditentukan oleh kemampuan bakteri menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Sebagai faktor-faktor virulensi, kitinase, lecitinase, dan hemolisin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* bekerja dengan mendegradasi jaringan permukaan kulit sisik ikan dan menimbulkan luka serta pendarahan pada ikan inang. Virulensi *A. hydrophila* melibatkan banyak faktor virulensi dan sangat kompleks.

*Aeromonas hydrophila* bersifat patogen, virulensi dan menyebabkan kematian 50% populasi ikan nila. Infeksi yang ditimbulkan pada ikan nila bersifat akut dengan tanda klinis warna kulit menjadi gelap, nafsu makan berkurang, pergerakan ikan abnormal, sisik mudah tanggal, hemoragik pada kulit, pangkal sirip ekor, sirip punggung dan operkulum, pembengkakan pada organ hati dan limpa serta pendarahan pada organ pencernaan (Mangunwardoyo *et al.*, 2010).

## **2.8 Diferensial Leukosit**

### **2.8.1 Limfosit**

Limfosit adalah salah satu indikator pertahanan tubuh dan kekebalan nonspesifik yang berfungsi sebagai pelindung tubuh dan mikroba (Utami *et al.*, 2013). Limfosit berperan menyediakan zat kebal melalui reseptor spesifik pada membran sel untuk sistem pertahanan tubuh (Tauhid *et al.*, 2002).

### **2.8.2 Monosit**

Monosit berperan sebagai pemakan zat-zat asing yang masuk ke dalam tubuh ikan nila dan pemberi informasi tentang serangan penyakit pada leukosit (Utami *et al.*, 2013). Monosit berfungsi sebagai agen makrofag yang bertugas sebagai fagositosis di dalam tubuh ikan nila yang terserang zat asing (Destriana, 2011).

### **2.8.3 Neutrofil**

Karakteristik neutrofil untuk imunologi ikan nila yaitu berperan sebagai penghancur zat asing dalam tubuh ikan melalui proses fagositosis yaitu kemotoksis dimana sel akan bermigrasi menuju partikel, partikel melekat pada sel, partikel ditelan oleh sel, dan di dalam fagolisosom partikel akan hancur oleh lisosim (Tizard, 1988). Neutrofil akan bekerja di dalam tubuh ikan apabila tubuh ikan nila terserang infeksi. Peningkatan jumlah neutrofil dalam tubuh ikan nila merupakan akibat dari mekanisme kekebalan tubuh yang terjadi karena adanya respon tubuh ikan nila terhadap infeksi (Utami *et al.*, 2013). Sel neutrofil akan keluar dari pembuluh darah apabila terjadi infeksi di bagian tubuh ikan yang disebabkan oleh rangsangan kimiawi eksternal atau kemotoksis (Fujaya, 2004).

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada September sampai Desember 2020 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Basah, Instalasi Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, Jawa Barat.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: 15 buah kontainer plastik, waring, suntikan/sprit, kaca preparat, *cover glass*, *slide box*, timbangan digital, *microtube* atau tabung effendorf 2 ml, tabung heparin, gelas ukur, botol kaca, erlenmeyer, baki, sendok, *sprayer*, plastik klip, label, wadah pakan, aluminium foil, sarung tangan, jarum ose, inkubator, bunsen, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vortex, kapas, skopnet, mikropipet, mikrotip 100 µl dan 1000 µl, tisu, sentrifus, plastik *wrapping*, selang aerasi, selang air, mikroskop, pinset, kain lap, *stirrer*, *magnetic stirrer*, *L-glass*, dan *colony counter*.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu 450 ekor ikan nila ukuran 10-15 cm, *Saccharomyces sp.* (ragi roti), *Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, media TSA (*tripticase soy agar*), TSB (*tripticase soy broth*), dan

PCA (*plate count agar*), larutan PBS (*phosphate buffered saline*), *Staphylococcus* sp., pakan komersial, natrium sitrat 3,8 %, alkohol, akuades, pewarna Giemsa, dan metanol.

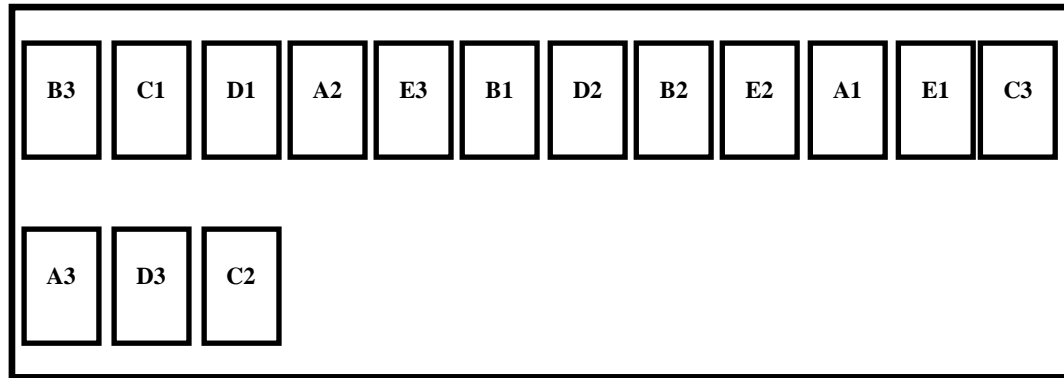
### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan dengan tiga ulangan sehingga terdapat lima belas unit percobaan. Rincian perlakuan pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan pada penelitian

Kode Perlakuan	Keterangan
A	Pakan komersial yang dicampur <i>Saccharomyces</i> sp. 0,5% + <i>Bacillus</i> sp. 1 %
B	Pakan komersial yang dicampur <i>Saccharomyces</i> sp. 1 % + <i>Bacillus</i> sp. 1 %
C	Pakan komersial yang dicampur <i>Saccharomyces</i> sp. 1,5 % + <i>Bacillus</i> sp. 1 %
D	Pakan komersial yang dicampur <i>Saccharomyces</i> sp. 2 % + <i>Bacillus</i> sp. 1 %
E	Pakan komersial tanpa perlakuan (kontrol)

Penempatan kontainer pemeliharaan ikan nila ditentukan secara acak. Ikan nila yang digunakan sebagai hewan uji berukuran panjang 10-15 cm sebanyak 30 ekor ditempatkan pada setiap wadah pemeliharaan. Tata letak wadah pemeliharaan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Tata letak wadah pemeliharaan.

Keterangan :

A1: Perlakuan A ulangan 1	C3: Perlakuan C ulangan 3
A2: Perlakuan A ulangan 2	D1: Perlakuan D ulangan 1
A3: Perlakuan A ulangan 3	D2: Perlakuan D ulangan 2
B1: Perlakuan B ulangan 1	D3: Perlakuan D ulangan 3
B2: Perlakuan B ulangan 2	E1: Perlakuan E ulangan 1
B3: Perlakuan B ulangan 3	E2: Perlakuan E ulangan 2
C1: Perlakuan C ulangan 1	E3: Perlakuan E ulangan 3
C2: Perlakuan C ulangan 2	

Penelitian dilakukan selama satu bulan dengan pemberian pakan yang dicampur dengan *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. berbeda dosis di dua minggu pertama masa pemeliharaan. Pencampuran pakan menggunakan *sprayer* secara merata pada pakan kemudian dibiarkan mengering selama  $\pm$  1 jam. Pemberian pakan dilakukan tiga kali sehari sebanyak 5% dari bobot tubuh per hari. Setelah dua minggu pemeliharaan dengan perlakuan, ikan diuji tantang dengan diinjeksi *Aeromonas hydrophila* virulen.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Tahap Persiapan

##### 3.4.1.1 Persiapan Wadah Pemeliharaan

Wadah pemeliharaan yang digunakan untuk penelitian adalah *container box* plastik berukuran 40 x 30 x 35 cm<sup>3</sup>. Sebelum wadah pemeliharaan digunakan,

dibersihkan terlebih dahulu lalu menggunakan sabun dibilas hingga bersih. Selanjutnya diisi air setinggi 25 cm kemudian dilakukan pengaturan aerasi pada wadah pemeliharaan.

#### **3.4.1.2 Pembuatan Media Padat TSA (*tripticase soy agar*) dan PCA (*plate count agar*)**

Pembuatan media TSA dibuat menggunakan 39 g bubuk TSA Oxoid, sedangkan untuk media PCA menggunakan 21 g bubuk PCA yang semuanya merupakan takaran untuk 1.000 ml akuades. Setelah itu diaduk menggunakan *stirrer* dan tempat larutan ditutup menggunakan aluminium foil agar tidak terkontaminasi, setelah terlarut, larutan tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama  $\pm 20$  menit. Setelah dingin, TSA dan PCA dituang ke cawan petri lalu dibiarkan mengeras dan disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C. TSA akan digunakan sebagai media tempat kultur bakteri *Bacillus* sp. dan PCA digunakan sebagai media kultur untuk perhitungan kepadatan bakteri pada air wadah pemeliharaan (TPC).

#### **3.4.1.3 Pembuatan Media Cair TSB (*tripticase soy broth*) dan PBS (*phosphate buffered saline*)**

Pembuatan media TSB dibuat menggunakan 30 g bubuk TSB Oxoid, sedangkan untuk media PBS menggunakan 8,5 g NaCl yang kemudian dicampurkan ke 1.000 ml akuades dan diaduk menggunakan *stirrer*. Tempat larutan ditutup menggunakan aluminium foil agar tidak terkontaminasi, setelah terlarut, larutan tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama  $\pm 20$  menit. Setelah dingin, larutan TSB dan PBS dituang ke dalam tabung reaksi dengan takaran 10 ml/tabung. TSB digunakan sebagai media tempat kultur isolat *Bacillus* sp. dan PBS digunakan untuk pengenceran.

#### 3.4.1.4 Kultur *Bacillus* sp.

Bakteri *Bacillus* sp. yang diambil berasal dari bakteri yang sudah dikultur sebelumnya di media TSA kemudian diperbanyak dengan menggunakan metode *streak plate* secara penuh pada cawan petri dengan menggunakan media TSA yang baru kemudian disimpan dalam inkubator. Setelah  $\pm$  24 jam dan koloni terbentuk, koloni diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media TSB lalu diinkubasi di dalam inkubator bersuhu 28°C.

#### 3.4.1.5 Kultur *Staphylococcus* sp.

Bakteri *Staphylococcus* sp. yang diambil berasal dari bakteri yang sudah dikultur sebelumnya di media TSA kemudian dikultur kembali menggunakan media TSA yang baru kemudian disimpan dalam inkubator. Setelah 24 jam dan koloni terbentuk, koloni diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media TSB lalu diinkubasi di dalam inkubator bersuhu 28°C. Selanjutnya kultur *Staphylococcus* sp. dilakukan dari media TSB ke TSB lain setiap tiga hari sekali. *Staphylococcus* sp. pada penelitian ini digunakan sebagai antigen pada perhitungan persen fagositosis (PP) dan indeks fagositosis (IP).

#### 3.4.1.6 Penyiapan Pakan Perlakuan

Pakan komersial disiapkan sebanyak 5% dari bobot tubuh ikan dan *Bacillus* sp. serta *Saccharomyces* sp. dicampur merata menggunakan *sprayer* dan dibiarkan mengering  $\pm$  1 jam. Dosis probiotik *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* dihitung berdasarkan rata-rata biomass ikan (g). Semua perlakuan menggunakan dosis *Bacillus* sp. sebanyak 1% atau sebanyak 0,54 ml/akuarium untuk satu kali pemberian pakan. Sedangkan untuk dosis *Saccharomyces* sp. yang digunakan tiap perlakuan berbeda. Pada perlakuan A, dosis *Saccharomyces* sp. yang digunakan sebanyak 0,81 g, perlakuan B dosis *Saccharomyces* sp. yang digunakan sebanyak 1,62 g, perlakuan C dosis *Saccharomyces* sp. yang digunakan sebanyak 2,43 g, perlakuan

D dosis *Saccharomyces* sp. yang digunakan sebanyak 3,24 g. Adapun perlakuan E merupakan kontrol (tanpa penambahan probiotik).

### **3.4.2 Tahap Penelitian**

#### **3.4.2.1 Pemberian Pakan**

Pakan yang diberikan selama pemeliharaan adalah pakan pelet dengan 5 perlakuan berbeda dan dengan frekuensi pemberian pakan tiga kali sehari, yaitu pada pukul 08.00, 12.30 dan 16.30 WIB.

#### **3.4.2.2 Pengambilan Sampel Darah Ikan**

Pengambilan darah ikan nila dilakukan dengan menggunakan alat dan bahan seperti spuit, alkohol 70% yang digunakan untuk mengseptiskan spuit dan bagian tubuh ikan yang akan disuntik, lap basah yang digunakan untuk menutup mata dan tubuh ikan agar tetap tenang ketika diambil darahnya, natrium sitrat 3,8 % untuk mencegah koagulasi pada darah, dan tabung heparin/mikrotube/tabung effendorf untuk menampung darah ikan. Pengambilan darah dimulai dengan meletakkan ikan di atas lap/kain basah kemudian mata ikan ditutup. Selanjutnya diambil spuit dan menusukkannya tepat di *linea lateralis* (LL) dekat pangkal ekor dengan kemiringan spuit 45°. Darah lalu diambil dan ditampung pada tabung heparin atau tabung effendorf.

#### **3.4.2.3 Total Plate Count (TPC)**

Metode *total plate count* (TPC) merupakan suatu metode untuk menghitung jumlah mikroba pada media. Prinsip dari metode hitungan cawan atau *total plate count* (TPC) adalah menumbuhkan sel mikroorganisme yang masih hidup pada media agar, sehingga mikroorganisme akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung tanpa menggunakan mikroskop. Bahan untuk melakukan TPC ini meliputi media PCA dan larutan PBS.



### 3.4.2.3.1 Sampel Cair

Sampel (air dari bak pemeliharaan) diambil secara aseptis dan acak sebanyak 1 ml menggunakan pipet steril, lalu ditambahkan 9 ml larutan PBS dihomogenkan selama  $\pm 2$  menit. Homogenat ini merupakan larutan pengencer  $10^{-1}$ . Homogenat diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan PBS untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Dilakukan pengenceran selanjutnya ( $10^{-3}$ ) dengan mengambil 1 ml sampel dari pengenceran  $10^{-2}$  ke dalam 9 ml larutan PBS. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan agar homogen kemudian dilakukan hal yang sama untuk pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$  (sesuai kebutuhan sampel).

### 3.4.2.3.2 Prosedur

Pengenceran dilakukan dengan menggunakan larutan PBS kemudian selanjutnya diambil sebanyak 100-200  $\mu$ l dari setiap pengenceran dan dimasukkan ke dalam media PCA dalam cawan petri steril kemudian diratakan dengan menggunakan *L-glass*. Prosedur ini dilakukan secara duplo (dua kali ulangan) untuk setiap pengenceran. Selanjutnya cawan-cawan tersebut diinkubasikan dalam posisi terbalik dalam inkubator selama  $\pm 24$  jam.

### 3.4.2.3.3 Pembacaan dan Perhitungan Koloni pada Cawan Petri

Koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA dihitung untuk menentukan nilai jumlah total koloni. Perhitungan TPC menggunakan cawan pengenceran yang mengandung 25-250 koloni. Proses penghitungan TPC dilakukan berdasarkan Badan Standar Nasional (2006) yaitu dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$= \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan :

- $\sum C$  : Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung.  
 n1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung.  
 n2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung.  
 d : Pengenceran pertama yang dihitung.

### 3.5 Persen Fagositosis (PP) dan Indeks Fagositosis (IP)

Fagositosis adalah proses dimana sel-sel terlibat dalam penelanan partikel-partikel patogen, dan karena kapasitas sel-sel tersebut maka patogen dapat dimatikan dan dimusnahkan (Desjardins dan Griffiths, 2003). Metode yang digunakan merujuk pada penelitian Sugiani (2012) yang menggunakan metode Zhang *et al.*, (2008) dengan beberapa modifikasi. Suspensi *Staphylococcus aureus* dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian darah sebanyak 200  $\mu$ l ditambah dengan heparin dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Lalu setelah dihomogenkan kemudian diinkubasi selama 30 menit dengan suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Sebanyak 1 ml salin ditambahkan ke dalam tabung dan dihomogenkan. Solusi homogenat disentrifus dengan 3.000 g selama 5 menit, lalu 1 ml supernatan diambil kemudian dibuang, sisa solusi dihomogenkan kembali. Satu tetes homogenat diambil dengan mikropipet untuk dibuat preparat ulas di atas *slide glass*. Preparat difiksasi dengan metanol selama 2-3 menit, kemudian dibilas dengan akuades, lalu preparat dikeringanginkan, tahap akhir preparasi dengan pewarnaan Giemsa. Preparat diamati menggunakan mikroskop. Persen fagositosis (PP) dan indeks fagositosis (IP) dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{PP} = (\text{N1}/100) \times 100$$

$$\text{IP} = \text{N2}/100$$

Keterangan :

- N1 : Total jumlah bakteri yang terfagosit dari 100 fagosit yang dihitung.  
 N2 : Total jumlah fagosit yang melakukan fagositosis secara acak dari 100 fagosit yang dihitung

### **3.6 Diferensial Leukosit**

#### **3.6.1 Pembuatan Preparat**

Sebelum melakukan pengamatan diferensial leukosit, terlebih dahulu dilakukan pembuatan preparat apus darah. Metode yang digunakan berdasarkan Instruksi Kerja Laboratorium Uji dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (2017). Pembuatan preparat apus darah dimulai dari menempatkan setetes darah pada ujung kaca preparat, kemudian menggunakan *slide*/kaca preparat lainnya untuk meratakan darah sehingga nantinya akan terbentuk lapisan rata dan tipis. *Slide* ditahan dengan kemiringan  $30^\circ$  dan dibiarkan darah menyebar hampir ke seluruh *slide*, *slide* didorong maju dengan gerakan yang halus dan tanpa jeda. Kemudian diberi label nama sampel darah dan tanggal pembuatan pada ujung kaca preparat yang bersih. Preparat kemudian dikeringanginkan, setelah itu difiksasi dengan metanol selama 5 menit, dibilas dengan air keran kemudian dikeringanginkan kembali. Selanjutnya diwarnai dengan pewarna Giemsa selama 15 menit dan dicuci dengan air yang mengalir dan dikeringkan di atas kertas tisu.

#### **3.6.2 Pengamatan Diferensial Leukosit**

Pengamatan diferensial leukosit dilakukan dengan cara menghitung jumlah limfosit, monosit, dan neutrofil menggunakan mikroskop setiap 3 hari sekali. Preparat apus darah yang sudah diwarnai dengan pewarna Giemsa diletakkan di atas mikroskop dengan perbesaran 400 x. Setelah sel darah sudah nampak jelas terlihat di mikroskop dilakukan perhitungan jumlah sel darah hingga 100 sel, kemudian hitung jumlah persentase neutrofil, monosit, dan limfosit dalam 100 sel darah tersebut.

### **3.7 Uji Tantang**

Uji tantang dilakukan dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*, dilakukan setelah 14 hari pemberian perlakuan. Uji tantang dilakukan pada semua ikan nila dari setiap perlakuan dengan menyuntikkan bakteri *A. hydrophila* secara intramuskular pada

bagian daging tebal di punggung ikan dengan kepadatan bakteri  $10^{-2}$  CFU/ml sebanyak 0,1 ml/ekor.

### 3.8 Tingkat Kelangsungan Hidup

Pencatatan kematian dilakukan setiap hari untuk mengetahui tingkat kelangsungan hidup atau *survival rate* (SR). Nilai SR diperoleh berdasarkan persamaan yang dikemukakan oleh Zonneveld *et al.*, (1991) yaitu:

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

Keterangan :

SR : Kelangsungan hidup (%).

N<sub>t</sub> : Jumlah ikan pada akhir penelitian (ekor).

N<sub>o</sub> : Jumlah ikan pada awal penelitian (ekor).

### 3.9 Analisis Data

Data hasil pengamatan diferensial leukosit (DL), indeks fagositosis (IP), persen fagositosis (PP), dan *survival rate* (SR) yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis menggunakan uji anova dengan tingkat kepercayaan 95%, apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut Duncan.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

1. Penambahan kombinasi probiotik *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. pada pakan dapat meningkatkan kinerja respon imun nonspesifik dan tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila*.
2. Dosis terbaik imunostimulan dari kombinasi *Saccharomyces* sp. dan *Bacillus* sp. untuk ketahanan ikan nila terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila* adalah *Saccharomyces* sp. 1,5 % dan *Bacillus* sp. 1 % yang dicampurkan ke pakan komersil.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka kombinasi imunostimulan *Saccharomyces* sp. 1,5 % dan *Bacillus* sp. 1 % aman digunakan untuk meningkatkan imunitas ikan serta pencegahan serangan infeksi *A. hydrophila* pada ikan nila.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Tawwab M., Abdel-Rahman AM., dan Ismael NEM. 2008. Evaluation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.
- Aji, M. B. 2014. *Aktivitas Senyawa Antimikroba dari Bakteri Biokontrol D2.2 terhadap Bakteri pada Udang dan Ikan secara in Vitro*. (Skripsi). Universitas Lampung. Lampung. 45 hlm.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., dan Mohsin, M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2) 733-741.
- Azhar, F. 2013. Pengaruh pemberian probiotik dan prebiotik terhadap performa juvenil ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Buletin Veteriner Udayana*, 6(1): 1-9.
- Badan Standar Nasional. 2006. *Cara Uji Mikrobiologi-Bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada Produk Perikanan*. Badan Standar Nasional. Jakarta. 11 hlm.
- Brogden, G., Krimmling, T., Adamek, M., Naim, H.Y., Steinhagen, D., dan Von Kçckritz-Blickwede, M. 2014. The effect of  $\beta$ -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Development Comparative Immunology*, 44: 280-285.
- Cholik, F., A. G. Jagatraya., R. P. Poernomo., dan A. Jauzi. 2005. *Akuakultur: Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa*. Taman Akuarium Air Tawar. Jakarta. 415 hlm.
- Ciptanto, S . 2010. *Top 10 Ikan Air Tawar Panduan Lengkap Pembesaran Secara Organik*. Lily Publisher Yogyakarta. 168 hlm.
- Dangeubun, J.L. dan Metungun, C. 2017. Hematology of *Vibrio alginolyticus* infected humpback grouper *Cromileptes altivelis*, under treatment of *Alstonia acuminata* shoot extract. *AAFL Bioflux*, 10(2): 274-284.

- De, B. C., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Das Mohapatra, P. K., dan Sharma, A. P. 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: Immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3): 921–971.
- Desjardins, M., dan Griffiths, G. 2003. Phagocytosis: latex leads the way. *Current opinion in cell biology*, 15(4): 498-503.
- Destriana, Y. 2011. *Uji Aktivitas Lidah Buaya (Aloe vera) melalui Pakan Komersial sebagai Immunostimulan pada Benih Lele Dumbo (Clarias gariepinus) Terhadap Infeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. (Skripsi). Program Studi Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjajaran. Bandung. 63 hlm.
- Erickson, K.L., dan Hubbard, N. E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr*, 130(2): 403-409.
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan: Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Rini Cipta. Jakarta. 179 hlm.
- Guarner, F., Aamir, G. Khan., G. James., E. Rami., T. Alan., K. Justus., T.L.K. Pedro., A. Juan., F. Richard., S. Fergus., E.S. Mary., dan Hania. 2017. *Probiotics and Prebiotics*. World Gastroenterology Organisation Practice Guideline. 35 hlm.
- Harikrishan, R., Balasundaram, C., dan Heo, M. S. 2010. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5): 868-874.
- Harrysu. 2012. *Budidaya Ikan Nila (Oreochromis niloticus)*. Kanisius. Yogyakarta. 102 hlm.
- Hastuti, S. D. 2008. *Potensi Ekstrak Lidah Buaya (Aloe vera) sebagai Immunostimulant untuk Meningkatkan Sistem Kekebalan Nonspesifik pada Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. 47 hlm.
- Ilmayati, M., 2015. *Differentiation of Leukocytes of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) with Feed Consist of Noni Fruit Flour (Morinda citrifolia L)*. (Disertasi). Faculty of Fisheries and Marine Science University of Riau. Pekanbaru. 24 hlm.
- Irianto, A., Hernayanti, H., dan Iriyanti, N. 2006. Pengaruh suplementasi probiotik a3-51 terhadap derajat imunitas *Oreochromis niloticus* didasarkan pada angka kuman pada ginjal setelah uji tantang dengan *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida achromogenes*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 8(2): 144-152.
- Johnny, F., Zafran, Z., Roza, D., dan Mahardika, K. 2017. Hematologi beberapa spesies ikan laut budidaya. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 9(4): 63-71.

- Kaufman, M.G., Walker, E.D., Odelson, D.A., Klug, M.J. 2000. Microbial community ecology and insect nutrition. *Am Entomol.* 46: 173–184.
- Kordi, K. M., dan Ghufran, H. 2013. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta dan Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hlm.
- Kumar, V., dan Sharma, A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10(1): 325–1.334.
- Lema, B., Natarajan, P., Prabadevi, L., dan Workagegn, K. B. 2021. *Aeromonas septicemia* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research & Development*, 12(3): 1–5.
- Lengka, K. 2013. Peningkatan respon imun nonspesifik ikan mas (*Cyprinus carpio* L) melalui pemberian bawang putih (*Allium sativum*). *Budidaya Perairan*, 1(2) 21-28.
- Lusiastuti, A. M., Andriyanto, S., dan Samsudin, R. 2017. Efektivitas kombinasi probiotik mikroenkapsulasi melalui pakan untuk pengendalian penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* pada ikan lele, *Clarias gariepinus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 12(2): 179-186.
- Lusiastuti, A. M., Maryanti, S. D., dan Purwaningsih, U. P. 2014. Probiotik *Bacillus cereus* untuk pengendalian penyakit *Streptococcosis* pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(1): 109-119.
- Madigan, M. T. 2000. Extremophilic bacteria and microbial diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 24: 3-12.
- Maisyaroh, L. A., Susilowati, T., Alfabetian Harjuno Condro Haditomo, F. B., dan Yuniarti, T. 2018. Effect of mangosteen rind (*Garcinia mangostana*) extract as antibacterial to treat infection of *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Sains Akukultur Tropis*, 2(2): 36–43.
- Mangunwardoyo W., R. Ismayasari., dan E. Riani. 2010. Uji patogenitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* stainer pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2): 145-255.
- Mulia, D.S. 2003. *Pengaruh Vaksin Debris Sel Aeromonas hydrophila dengan Kombinasi Cara Vaksinasi dan Booster terhadap Respons Imun dan Tingkat Perlindungan Relatif pada Lele Dumbo (Clarias gariepinus burchell)*. (Tesis). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 58 hlm.
- National Research Council. 1977. *Nutrient Requirement of Warm Water Fishes*. National Academy Press. Washington DC. 87 hlm.
- Payung, C. N., dan Manoppo, H. 2015. Peningkatan respon kebal nonspesifik dan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui pemberian jahe, *Zingiber officinale*. *e-Journal Budidaya Perairan*, 3(1): 11-18.
- Pranata, A. 2009. *Laju Pertumbuhan Populasi Rotifera (Brachionus plicatilis) pada Media Kombinasi Kotoran Ayam, Pupuk Urea dan Pupuk TSP serta*



- Penambahan Beberapa Variasi Ragi Roti*. (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara. 60 hlm.
- Rusdani, M.M., Sadikin A., Saptono W., dan Zaenal A. 2016. Pengaruh pemberian probiotik *Bacillus* sp. melalui pakan terhadap kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Biologi Tropis*, 16(1): 34-40.
- Rustikawati, I. 2012. Efektivitas ekstrak *Sargassum* sp. terhadap diferensiasi leukosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika*, 3(2): 125-134.
- Saanin, H. 1995. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan 1 & 2*. Penerbit Binacipta. Bandung. 263 hlm.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Schrezenmeir J, dan Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotic-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361-364.
- Setianingsih, F. 2018. *Efektivitas Bakteri Probiotik Bacillus sp. D2.2 dan Ekstrak Tepung Ubi Jalar Sebagai Sinbiotik Terhadap Performa Pertumbuhan Ikan Nila (Oreochromis niloticus)*. (Skripsi). Universitas Lampung. Lampung. 50 hlm.
- Setyawan, A., Harpeni, E., Ali, M., Mariska, D. C., dan Aji, M. B. 2014. Potensi agen bakteri biokontrol indigenous tambak tradisional udang windu (*Penaeus monodon*) di Lampung Timur strain D2.2, terhadap bakteri patogen pada udang dan ikan. *Prosiding Pertemuan Ahli Kesehatan Ikan*, 24-31.
- Setyo, B. P. 2006. *Efek Konsentrasi Kromium ( $Cr^{3+}$ ) dan Salinitas Berbeda Terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan untuk Pertumbuhan Ikan Nila (Oreochromis niloticus)*. (Tesis). Universitas Diponegoro. 75 hlm.
- Smith V J., J H. Brown, dan C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 15: 71-90.
- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Garcia-Gasca, M. T., Abad-Rosales, S. M., Gomez-Gil, B., dan Ayala-Arellano, J. 2018. Virulence of the fish pathogen *Aeromonas dhakensis*: genes involved, characterization and histopathology of experimentally infected hybrid tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129(2): 107-116.
- Sugiani, D. 2012. *Vaksin Bivalen untuk Pencegahan Penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) dan Streptococcosis pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus)*. (Disertasi). Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 163 hlm.
- Sugiarto, 1988. *Teknik Pembenihan Ikan Mujair dan Nila*. CV Simplex. Jakarta. 70 hlm.

- Suryani, E. 2006. *Pedoman dan Simulasi Media Pembelajaran*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 65 hlm.
- Suyanto, R. 2003. *Nila*. Penebar Swadaya. Jakarta. 105 hlm.
- Syakuri, H., Triyanto., dan K.H. Nitimulyo. 2003. Perbedaan daya tahan nonspesifik lima spesies ikan air tawar terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 5(2): 1-10.
- Taukhid., Taufik, P., dan Mundriyanti, H. 2002. Respon histologis tubuh kodok (*Rana catesbeina shaw*) terhadap infeksi bakteri patogen dan potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai imunostimulan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(3): 53-63.
- Taqwdasbriliani, Ertris Bergas, Hutabarat, J., dan Arini, E. 2013. Journal of aquaculture management and technology journal of aquaculture management and technology. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(3): 76–85.
- Tizard, I. R. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner Edisi 2*. Penerbit Universitas Erlangga. Surabaya. 498 hlm.
- Umasugi, A., Tumbol, R. A., Kreckhoff, R. L., Manoppo, H., Pangemanan, N. P., dan Ginting, E. L. 2018. Penggunaan bakteri probiotik untuk pencegahan infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *e-Journal Budidaya Perairan*, 6(2): 39-44.
- Utami, D. T., Prayitno, S. B., Hastuti, S., dan Santika, A. 2013. Gambaran parameter hematologis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan dosis yang berbeda. *Jurnal of Aquaculture Management and Technology*, 2(4): 7-20.
- Wache' Y., Auffray F., Gatesoupe FL., Zurrbonino J., Gayet V., Labbe' L., dan Quentel C. 2006. Cross effect of the strain dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing condition on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 258: 470-478.
- Wallace, R. L. 2002. Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3): 660-667.
- Waspada, Y. S., dan Rodif, M. 1991. Effect of enriched rotifers, *Brachionus plicatilis* on the growth and survival rate of grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, larvae. *Jurnal Penelitian Budidaya Pantai*, 7: 57-66.
- Wiriyanta, B. T. W., Sunaryo, A., dan MB, K. 2010. *Buku Pintar Budi Daya dan Bisnis Ikan Nila*. Agromedia Pustaka. Jakarta, 210 hlm.
- Yardimci B dan Aydin Y. 2011. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Univ Vet Fak Berg*, 58: 47-54.
- Yuliawati, F. 2010. *Efektivitas Ekstrak Meniran (Phyllanthus niruri) sebagai Antibakteri pada Ikan Patin (Pangasianodon hypophthalmus) yang Diinfeksi*

*dengan Aeromonas hydrophila*. (Skripsi). Universitas Lampung. Lampung. 67 hlm.

Zonneveld, N., Huisman, E. A., dan Boon, J. H. 1991. *Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 318 hlm.