

Aplikasi probiotik *Bacillus* untuk pencegahan infeksi *Aeromonas hydrophilla* pada ikan lele

Application of *Bacillus* probiotic to prevent *Aeromonas hydrophilla* infection in *Clarias* sp.

Mohammad Faizal Ulkhaq¹, Widanarni^{1*}, Angela Mariana Lusiastuti²

¹Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

²Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Sempur
Jl. Sempur No.1, Bogor Tengah, Bogor, Jawa Barat 16129

*Surel: widanarni@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to test the effectiveness of a probiotic *Bacillus* for the prevention of motile aeromonad septicemia (MAS) disease caused by *Aeromonas hydrophilla* in African catfish (*Clarias gariepinus*). The study consisted of the inhibition testing of *A. hydrophilla* by *Bacillus* (*in vitro*) and the application of probiotic in African catfish (*in vivo*). The *in vivo* test, consisted of five treatments such as the addition of probiotic *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R, *Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R (Kom), positive control (K+; only added with *A. hydrophilla*) and negative control (K-; without probiotic nor *A. hydrophilla* addition). African catfish (13.35±2.80 g) was maintained in 15 aquariums (40 L in volume) with 30 fishes each for 30 days. Probiotic bacteria was applied in water once a day, whereas pathogenic bacteria *A. hydrophilla* Rif^R (10³ cfu/mL) were added once in earlier treatment (except for the negative control). The result showed that the optimal concentration of *Bacillus* to inhibit *A. hydrophilla* on *in vitro* test was 10⁴ cfu/mL. *In vivo* test showed that the addition of probiotic in media of cultivation could reduce the number of *A. hydrophilla*, improve immune response, and also increase the survival of African catfish compared to positive control. Application of probiotic P4I1 Rif^R showed the highest survival (92.23%) of all treatments.

Keywords: *Bacillus*, *Clarias gariepinus*, motile aeromonad septicemia, probiotic

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas probiotik *Bacillus* dalam pencegahan penyakit motile aeromonad septicemia (MAS) yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophilla* pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Penelitian terdiri atas pengujian penghambatan bakteri probiotik *Bacillus* terhadap *A. hydrophilla* secara *in vitro*, dilanjutkan dengan aplikasi pada budidaya ikan lele dumbo (*in vivo*). Pada uji *in vivo*, penelitian terdiri atas lima perlakuan yaitu budidaya ikan lele dumbo dengan penambahan probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R, kombinasi probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R (Kom), kontrol positif (K+; hanya ditambahkan *A. hydrophilla*) dan kontrol negatif (K-; tanpa pemberian probiotik dan *A. hydrophilla*). Ikan lele dumbo (13,35±2,80 g) dipelihara pada akuarium volume 40 L dengan kepadatan 30 ekor/akuarium selama 30 hari. Bakteri probiotik ditambahkan pada media pemeliharaan ikan setiap hari, sedangkan bakteri patogen *A. hydrophilla* Rif^R (10³ cfu/mL) diberikan sekali pada awal pemeliharaan (kecuali pada kontrol negatif). Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi terbaik pada penghambatan *in vitro* adalah dengan penambahan *Bacillus* 10⁴ cfu/mL. Hasil uji *in vivo* menunjukkan perlakuan penambahan probiotik pada media budidaya efektif dapat menekan jumlah bakteri *A. hydrophilla*, memperbaiki respons imun, dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan lele dumbo dibanding kontrol positif. Perlakuan probiotik P4I1 Rif^R memberikan hasil terbaik dengan tingkat kelangsungan hidup tertinggi yaitu 92,23%.

Kata kunci: *Bacillus*, *Clarias gariepinus*, motile aeromonad septicemia, probiotik

PENDAHULUAN

Ikan lele dumbo dengan nama latin *Clarias gariepinus* merupakan salah satu ikan ekonomis

penting dan termasuk salah satu komoditas perikanan yang sangat dipacu pengembangan budidayanya. Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi adalah melalui

sistem budidaya secara intensif. Namun demikian, penerapan intensifikasi budidaya rentan terhadap serangan penyakit dan dapat menimbulkan kerugian ekonomi. Penyakit yang banyak menyerang ikan lele dumbo antara lain penyakit *motile aeromonad septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (Angka, 2005). Penyakit ini ditemukan sering menyerang ikan lele (*Clarias* sp.) dan jenis ikan air tawar tropis lainnya seperti dari golongan Siluridae, Ictaluridae, Clariidae, serta Cyprinidae. Tingkat kematian pada ikan lele dapat mencapai 80%, bahkan 100% dalam waktu sekitar satu minggu (Dini & Purbomartono, 2009). Beberapa faktor sering dikaitkan dengan terjangkitnya penyakit ini, di antaranya perubahan lingkungan termasuk kepadatan tinggi, temperatur tinggi, rendahnya oksigen terlarut, status nutrisi yang kurang baik, infeksi parasit, dan perubahan fisiologis ikan (Bijanti *et al.*, 2011).

Upaya manajemen penyakit MAS pada budidaya ikan umumnya menggunakan antibiotik yaitu kloramfenikol dan oksitetrasiklin dengan dosis 5–7 g dalam 100 kg pakan (Igbinsosa *et al.*, 2012). Penggunaan bahan antibiotik yang tidak tepat telah diketahui dapat menimbulkan masalah serius berupa resistensi pada bakteri patogen (Balcazar *et al.*, 2006). Selain itu, penggunaan antibiotik juga dapat mencemari lingkungan perairan, dan berdampak pada kesehatan manusia dengan adanya residu kimia dari antibiotik pada produk perikanan yang dikonsumsi (Sukenda *et al.*, 2008). Salah satu alternatif yang dapat dipilih untuk pencegahan penyakit ini adalah dengan aplikasi probiotik.

Probiotik umumnya didefinisikan sebagai mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memodifikasi komposisi bakteri dalam saluran pencernaan hewan akuatik, air, dan sedimen serta dapat digunakan untuk suplemen pakan yang dapat meningkatkan kesehatan inang dan berperan sebagai agen biokontrol (Flores, 2011). Salah satu jenis bakteri yang banyak dimanfaatkan sebagai probiotik dalam akuakultur adalah genus *Bacillus* (Hong *et al.*, 2004). Sorokulova *et al.* (2007) menyatakan bahwa probiotik dari golongan *Bacillus* telah banyak diaplikasikan untuk kepentingan bioteknologi termasuk jenis enzim dan asam amino yang dihasilkan serta produksi antibiotik untuk fermentasi dan pengendalian patogen. Menurut Murilio dan Villamil (2011), aktivitas penghambatan *Bacillus* terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* dikarenakan bakteri ini menghasilkan

enzim antara lain esterase lipase, *leucine arylamidase*, *acid phosphatase*, lipase, dan Naphthol-AS-BI-phospholidase. Hasil penelitian Ravi *et al.* (2007) menyebutkan bahwa probiotik dari jenis *Paenibacillus* spp., *Bacillus cereus* dan *Paenibacillus polymyxa* yang diaplikasikan lewat air dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio* pada larva udang windu (*Penaeus monodon*). Hasil penelitian Luis-Villasenor *et al.* (2011) menyebutkan bahwa empat strain *Bacillus* yang diisolasi dari saluran pencernaan udang putih sehat dan diaplikasikan melalui air pada konsentrasi 10^5 cfu/mL dapat meningkatkan kesehatan larva udang putih (*Litopenaeus vannamei*). Wijaya (2011) menyatakan bahwa probiotik *Bacillus* P4I1 yang diaplikasikan pada media budidaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada konsentrasi 10^9 cfu/mL menunjukkan nilai kelangsungan hidup sebesar 51,67% lebih tinggi dibandingkan kontrol (21,67%) setelah diinfeksi dengan *Streptococcus agalactiae*. Penelitian mengenai aplikasi probiotik *Bacillus* sebagai biokontrol patogen pada budidaya ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas probiotik *Bacillus* dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dan mencegah serangan penyakit MAS.

BAHAN DAN METODE

Persiapan isolat probiotik dan patogen

Isolat probiotik yang digunakan merupakan kelompok bakteri *Bacillus* yang terdiri atas probiotik *Bacillus* P4I1 yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan *Bacillus* P4I2 yang diisolasi dari lingkungan budidaya ikan lele (*Clarias* sp.), sedangkan patogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. hydrophila* AH26. Seluruh isolat bakteri merupakan koleksi dari Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar, Bogor. Sebelumnya, seluruh isolat bakteri dikarakterisasi berdasarkan morfologi, fisiologi dan sifat biokimia, serta diberi penanda resisten rifampicin (RifR) dengan dosis 100 µg/mL. Bakteri dikultur pada media *trypticase soy broth* (TSB) sebanyak 25 mL di dalam *water bath shaker*, 160 rpm selama 24 jam pada 29 °C. Kultur sel dipanen dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, suspensi bakteri dicuci sebanyak dua kali dengan *phosfat buffer saline* (PBS; NaCl 0,8 g, KH₂PO₄ 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,5 g, KCl 0,2 g dan akuades 1000 mL). *Total plating count*

(TPC) bakteri dilakukan setelah pemanenan dan ditentukan menggunakan metode cawan sebar (Madigan *et al.*, 2011). Selanjutnya, dilakukan pengenceran berseri yang disesuaikan dengan dosis percobaan.

Uji penghambatan bakteri probiotik terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

Uji *in vitro* dilakukan untuk mengetahui potensi bakteri probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R dan gabungannya (*Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R) dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*. Kombinasi perlakuan pada uji *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 1.

Setiap kombinasi bakteri pada perlakuan A, B, C, dan D diinokulasikan pada masing-masing median TSB dengan volume 10 mL (Bernard *et al.*, 2013) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28 °C. Penghitungan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan metode hitungan cawan

(Madigan *et al.*, 2011). Media yang digunakan berupa media Rhimler Shotts medium (media R-S) yang merupakan media selektif untuk *A. hydrophila*. Perlakuan E dihitung pada media TSA (*trypticase soy agar*) menggunakan metode *dual culture* untuk mengetahui aktivitas gabungan antibakteri probiotik bersifat antagonis atau sinergis (Kalaiselvi & Panneerselvam, 2011).

Desain penelitian pada uji *in vivo*

Ikan uji yang digunakan adalah ikan lele dumbo dengan panjang 12,69±0,94 cm dan berat 13,35±2,80 g. Percobaan dilakukan pada akuarium berukuran 60x70x40 cm³ dengan volume air 40 L dan kepadatan 30 ekor/akuarium. Pemberian probiotik pada media pemeliharaan (10⁴ cfu/mL), dilakukan setiap hari pada pagi hari selama 30 hari. Bakteri patogen *A. hydrophila* Rif^R diberikan pada media pemeliharaan (kecuali kontrol negatif), sebanyak satu kali pemberian (10³ cfu/mL) pada awal pemeliharaan (H0). Pakan

Tabel 1. Kombinasi perlakuan uji penghambatan bakteri probiotik terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

Perlakuan	Probiotik (cfu/mL)		<i>A. hydrophila</i> Rif ^R (cfu/mL) (Al Harbi & Uddin, 2010)
	P4I1 Rif ^R	P4I2 Rif ^R	
A	10 ³	-	10 ³
	10 ⁴	-	
	10 ⁵	-	
	10 ⁶	-	
B	-	10 ³	10 ³
	-	10 ⁴	
	-	10 ⁵	
	-	10 ⁶	
C	10 ³	10 ³	10 ³
	10 ⁴	10 ⁴	
	10 ⁵	10 ⁵	
	10 ⁶	10 ⁶	
D (K+)	-	-	10 ³
E	10 ⁴	10 ⁴	10 ³

Tabel 2. Kombinasi perlakuan aplikasi probiotik *Bacillus* secara *in vivo* pada budidaya ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*)

Perlakuan	Probiotik (cfu/mL)		<i>A. hydrophila</i> Rif ^R (cfu/mL) (Al Harbi & Uddin, 2010)
	P4I1 Rif ^R	P4I2 Rif ^R	
P4I1	10 ⁴	-	10 ³
P4I2	-	10 ⁴	10 ³
Kom	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
K+	-	-	10 ³
K-	-	-	-

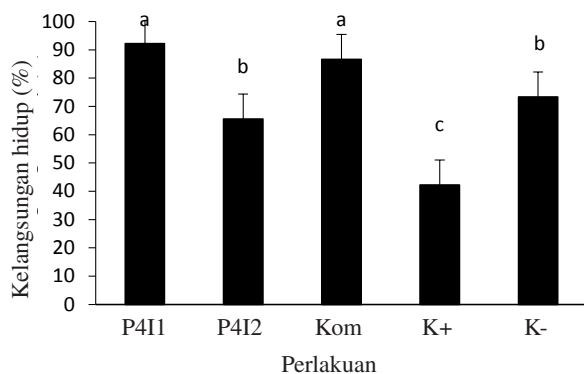
berupa pelet komersial dengan kadar protein 36% diberikan secara *at satiation* setiap pagi dan sore hari. Selama pemeliharaan, akuarium tidak disifon dan tidak dilakukan pergantian air. Pengujian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan tiga kali ulangan (Tabel 2). Kontrol positif hanya ditambahkan *A. hydrophila* Rif^R sedangkan pada kontrol negatif tidak ditambahkan probiotik maupun *A. hydrophila* Rif^R.

Parameter penelitian

Parameter yang diamati pada uji *in vivo* adalah tingkat kelangsungan hidup, gambaran darah, dan total bakteri dalam air. Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung berdasarkan persentase jumlah ikan yang hidup di akhir masa pemeliharaan dibanding dengan jumlah ikan pada saat tebar (Effendi, 2002). Pengambilan sampel darah dan total bakteri di air dilakukan setiap minggu pada hari ke-0, tujuh, 14, 21, dan 28. Gambaran darah yang diamati pada penelitian ini adalah total eritrosit, hematokrit, total leukosit, dan diferensial leukosit (Blaxhall & Daisley, 1973), kadar hemoglobin (Collier, 1944). Total bakteri di air dihitung menggunakan metode *total plate count* (Al Harbi & Uddin, 2010). Media yang digunakan adalah media TSA untuk menghitung *total viable bacterial count* (TBC), R-S untuk total bakteri *A. hydrophila*, dan TSA+rifampicin 100 µg/mL untuk total bakteri *A. hydrophila* dan probiotik *Bacillus* Rif^R.

Analisis data

Analisis data uji *in vivo* dilakukan dengan dua metode yaitu analisis statistik pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan analisis



Gambar 1. Kelangsungan hidup ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) pada perlakuan probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R, Kom (*Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R) dan kontrol. Huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$).

deskriptif. Perangkat lunak IBM SPSS 16.0 digunakan untuk analisis statistik. Apabila berbeda nyata, maka akan dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test* (DMRT). Analisis statistik digunakan untuk analisis data tingkat kelangsungan hidup dan gambaran darah ikan, sedangkan analisis deskriptif digunakan untuk data kelimpahan bakteri pada air.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Uji penghambatan bakteri probiotik terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

Hasil uji penghambatan bakteri probiotik *Bacillus* Rif^R terhadap *A. hydrophila* Rif^R dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi terbaik dari probiotik *Bacillus* Rif^R dan gabungan keduanya setelah diuji tantang dengan *A. hydrophila* Rif^R secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 10⁴ cfu/mL, ditunjukkan dengan kepadatan *A. hydrophila* Rif^R yang tumbuh pada perlakuan setelah diinkubasi (10⁴ cfu/mL) lebih rendah dibandingkan kepadatan *A. hydrophila* Rif^R yang tumbuh pada kontrol positif (K+) (10¹⁰ cfu/mL). Hasil tersebut kemudian dijadikan acuan pada pengujian probiotik secara *in vivo*. Pada hasil pengujian kombinasi isolat probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R dan *Bacillus* P4I2 Rif^R pada media TSA (perlakuan E), tidak menunjukkan adanya aktivitas antagonis yang ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambat yang dihasilkan. Oleh karena itu, kedua isolat probiotik dapat digunakan secara bersamaan untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* Rif^R.

Uji *in vivo*

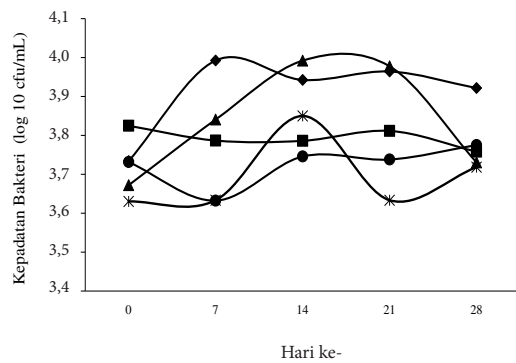
Berdasarkan pengamatan tingkat kelangsungan hidup ikan selama 30 hari perlakuan (Gambar 1), diketahui bahwa perlakuan dengan pemberian probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R dan perlakuan kombinasi probiotik (*Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R) menunjukkan tingkat kelangsungan hidup yang berbeda nyata dibandingkan perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R, serta kontrol negatif (K-) dan kontrol positif (K+) ($P<0,05$). Selain itu, perlakuan pemberian probiotik *Bacillus* P4I2 Rif^R juga menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$) terhadap kontrol (+).

Total bakteri dalam air

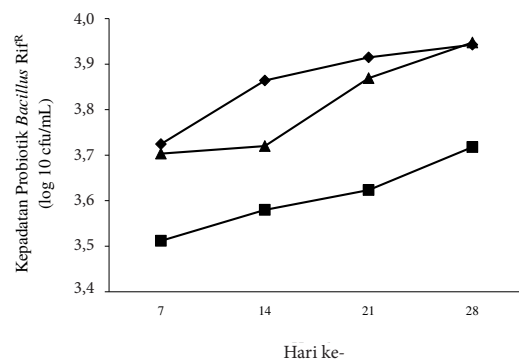
Hasil penghitungan jumlah bakteri probiotik dan patogen dalam air dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil penghitungan TBC, diketahui

Tabel 3. Pengujian bakteri probiotik terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

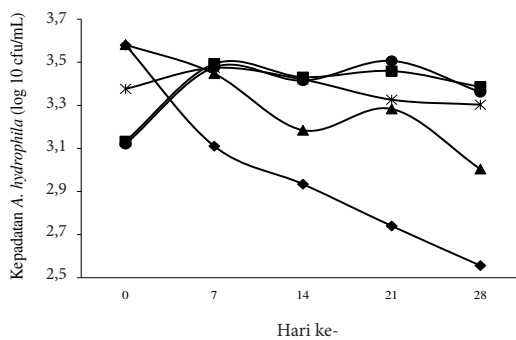
Perlakuan	Probiotik (cfu/mL)		<i>A. hydrophila</i> Rif ^R (cfu/mL)*	<i>A. hydrophila</i> Rif ^R (cfu/mL)**
	P4I1 Rif ^R	P4I2 Rif ^R		
A	10 ³	-	10 ³	10 ¹⁰
	10 ⁴	-		10 ⁴
	10 ⁵	-		10 ⁶
	10 ⁶	-		10 ⁸
B	-	10 ³	10 ³	10 ¹⁰
	-	10 ⁴		10 ⁶
	-	10 ⁵		10 ⁶
	-	10 ⁶		10 ⁸
C	10 ³	10 ³	10 ³	10 ¹⁰
	10 ⁴	10 ⁴		10 ⁴
	10 ⁵	10 ⁵		10 ⁴
	10 ⁶	10 ⁶		10 ⁸
D (K+)	-	-	10 ³	10 ¹⁰
E	10 ⁴	10 ⁴	-	Tidak bersifat antagonistik



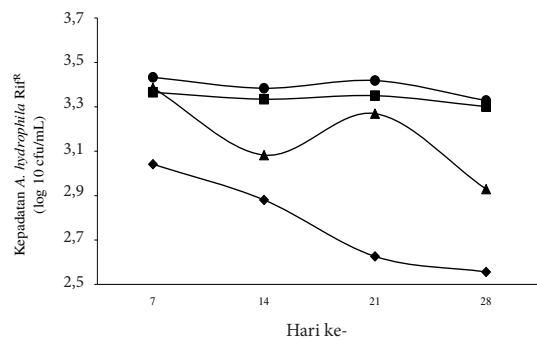
(a)



(b)



(c)



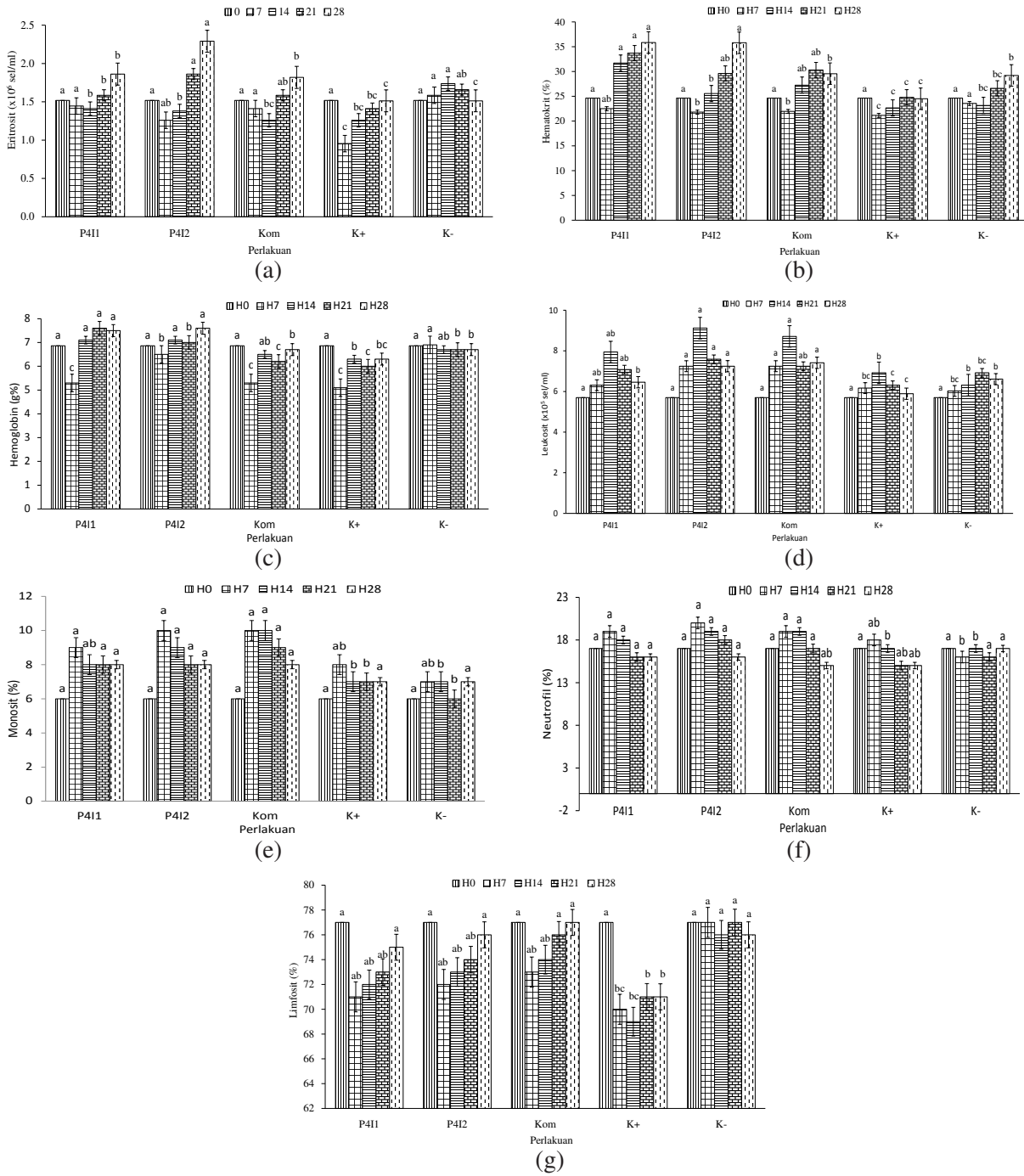
(d)

◆ P4I1 ■ P4I2 ▲ Kom ● K+ * K-

Gambar 2. Kelimpahan (a) total bakteri, (b) total *Bacillus* Rif^R, (c) total *Aeromonas hydrophila*, (d) total *A. hydrophila* Rif^R pada media pemeliharaan ikan lele dumbo (air) pada perlakuan probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R, kombinasi *Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R (kom), kontrol positif dan negatif.

bahwa populasi bakteri air (media pemeliharaan ikan) pada semua perlakuan berada pada kisaran 10³–10⁴ cfu/mL (Gambar 2a). Hasil penelitian menunjukkan bahwa total *Bacillus* Rif^R (Gambar

2b) mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu perlakuan. Total *Bacillus* Rif^R tertinggi terdapat pada perlakuan *Bacillus* P4I1 Rif^R, kemudian diikuti oleh perlakuan kombinasi



Gambar 3. Gambaran darah ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*): (a) eritrosit, (b) hemoglobin, (c) hematokrit, (d) leukosit, (e) monosit, (f) neutrofil, (g) limfosit pada perlakuan probiotik *Bacillus* P411 Rif^R, *Bacillus* P412 Rif^R, Kom (*Bacillus* P411 Rif^R + *Bacillus* P412 Rif^R) dan kontrol. Huruf yang berbeda pada pola yang sama menunjukkan beda nyata (P<0,05).

probiotik (*Bacillus* P411 Rif^R + *Bacillus* P412 Rif^R), dan *Bacillus* P412 Rif^R. Adapun hasil penghitungan populasi *A. hydrophila* (wild type dan Rif^R) pada perlakuan probiotik menunjukkan pola penurunan dari 10^3 cfu/mL pada awal penelitian menjadi 10^2 cfu/mL pada akhir penelitian, sedangkan populasi *A. hydrophila* pada perlakuan kontrol (+) menunjukkan hasil tetap tanpa penurunan (Gambar 2c dan 2d).

Jumlah eritrosit, hematokrit, dan hemoglobin

Jumlah eritrosit (Gambar 3a) dan kadar hematokrit (Gambar 3b) menunjukkan penurunan pada hari ketujuh dengan nilai terendah terdapat pada perlakuan K(+) yaitu $0,9 \pm 0,09 \times 10^6$ sel/mL dan $21,15 \pm 0,03\%$ serta berbeda nyata (P<0,05) terhadap seluruh perlakuan. Hasil yang sejalan juga terdapat pada nilai hemoglobin (Gambar 3c) yaitu perlakuan kontrol (+) yang menunjukkan

nilai terendah yaitu $5,1 \pm 0,9$ g% dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibanding perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R dan kontrol (-). Setelah itu, jumlah eritrosit, hematokrit dan hemoglobin mengalami peningkatan kembali pada H14 hingga akhir penelitian (H28) dengan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R yaitu $2,29 \pm 0,02 \times 10^6$ sel/mL; $35,8 \pm 3,5\%$; dan $7,60 \pm 0,85$ g% yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan kontrol (+).

Jumlah leukosit

Hasil yang berbeda ditunjukkan pada pengamatan jumlah leukosit (Gambar 3d). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah leukosit pada seluruh perlakuan mengalami peningkatan pada hari ketujuh dan mencapai puncaknya pada hari ke-14. Jumlah tertinggi terdapat pada perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R dengan nilai $9,1 \pm 0,06 \times 10^5$ sel/mL dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibanding kontrol (+) ($6,51 \pm 0,03 \times 10^5$ sel/mL).

Diferensial leukosit

Pengamatan diferensial leukosit menunjukkan bahwa terjadi peningkatan persentase monosit (Gambar 3e) dan neutrofil (Gambar 3f) pada hari ketujuh kemudian menurun kembali pada hari ke-14 hingga hari ke-28. Persentase limfosit (Gambar 3g) menurun pada hari ketujuh dan naik perlahan hingga hari ke-28. Perlakuan probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R, dan kombinasi *Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R menunjukkan persentase diferensial leukosit yang berbeda nyata dibanding kontrol (+) ($P < 0,05$).

Pembahasan

Hasil uji bakteri probiotik terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro* menunjukkan bahwa isolat probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R, *Bacillus* P4I2 Rif^R dengan kepadatan 10^4 cfu/mL dan kombinasi (*Bacillus* P4I1 Rif^R 10^4 cfu/mL + *Bacillus* P4I2 Rif^R 10^4 cfu/mL) mampu menghambat populasi *A. hydrophila* Rif^R. Berdasarkan hasil penelitian, jumlah populasi *A. hydrophila* tanpa pemberian probiotik adalah 10^{10} cfu/mL, sedangkan jumlah populasi *A. hydrophila* pada perlakuan probiotik berada pada kisaran 10^4 – 10^6 cfu/mL. Hal ini diduga disebabkan adanya senyawa ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Bacillus*. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa secara *in vitro*, probiotik *Bacillus* dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* (Sansawat & Thirabuyanon, 2009). Senyawa ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Bacillus*, antara lain esterase lipase, *leucine*

arylamidase, *acid phosphatase*, lipase, naphthol-AS-BI-phospholidase, subtilin, coagulin, surfactin, iturins, dan bacilycin (Murilio & Villamil, 2011; Hong *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa konsentrasi probiotik yang lebih tinggi (10^6 cfu/mL) menghasilkan aktivitas penghambatan yang kurang optimal dibandingkan konsentrasi 10^4 cfu/mL. Hasil yang sama juga diperoleh Widanarni *et al.* (2010) yaitu penambahan bakteri *Vibrio* SKT-b dengan dosis 10^6 cfu/mL menunjukkan nilai kelangsungan hidup larva udang windu (*Penaeus monodon*) yang lebih rendah dibandingkan dosis 10^4 cfu/mL. Nikoskelainen *et al.*, (2001) mengemukakan bahwa penggunaan probiotik dalam dosis tinggi ternyata tidak menjamin perlindungan yang lebih baik terhadap hewan inang. Hal ini diduga karena adanya persaingan nutrisi dan oksigen yang tinggi dalam media sehingga menyebabkan keseimbangan bakteri di dalamnya terganggu.

Secara *in vivo*, probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R menunjukkan tingkat kelangsungan hidup ikan lele dumbo dua kali lebih tinggi dibandingkan K(+). Perbedaan tingkat kelangsungan hidup, diduga disebabkan terjadinya penurunan jumlah bakteri patogen *A. hydrophila* Rif^R pada media pemeliharaan. Perlakuan probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R menunjukkan total *A. hydrophila* yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R dan Kom (*Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R). Selain itu, berdasarkan uji *in vitro* diketahui bahwa *Bacillus* P4I1 Rif^R juga menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi dibanding *Bacillus* P4I2 Rif^R. Hasil penelitian serupa juga ditunjukkan oleh Luis-Villasenor *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa pemberian kombinasi probiotik *Bacillus endophyticus* strain YC3-b dan strain C2-2 dengan konsentrasi 10^5 : 10^5 cfu/mL melalui air menunjukkan tingkat kelangsungan hidup larva *Litopenaeus vannamei* yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian probiotik tunggalnya dengan konsentrasi sama. Hasil penelitian lain juga menyebutkan bahwa probiotik *Bacillus* efektif untuk menurunkan jumlah *A. hydrophila* dan *Vibrio alginolyticus* pada kultur *Branchionus plicatilis* (Murilio & Villamil, 2011) serta mencegah infeksi *Flavobacterium columnare* pada ikan nila (Mohamed & Refat, 2011). Menurut Purivirojkul dan Areechon (2007) *Bacillus* yang diisolasi dari saluran pencernaan udang *P. monodon* dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*, *Streptococcus*

agalactiae, dan *Vibrio harveyi* dalam air. Perlakuan K(-) menunjukkan nilai kelangsungan hidup yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan pemberian probiotik *Bacillus* P4I1 Rif^R dan perlakuan kombinasi probiotik (*Bacillus* P4I1 Rif^R + *Bacillus* P4I2 Rif^R). Hal ini diduga terjadi penumpukan bahan organik dalam media budidaya karena tidak dilakukan penyiponan dan pergantian air selama masa pemeliharaan. Selain itu, pada perlakuan K(-) tidak dilakukan penambahan probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dalam air.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit pada seluruh perlakuan menghasilkan pola yang serupa yaitu terjadi penurunan sampai hari ketujuh kecuali kontrol. Penurunan ini diduga disebabkan adanya produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* antara lain aerolysin dan hemolisin (Yours *et al.*, 2007). Produk ini berkaitan dengan tingkat virulensi bakteri tersebut. aerolysin dan hemolisin menunjukkan aktivitas hemolisis terhadap eritrosit secara *in vitro* (Chirila *et al.*, 2008) dan *in vivo* (Kumar & Ramulu, 2013). Setelah mengalami penurunan, terjadi kenaikan perlahan sampai hari ke-28 dengan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan *Bacillus* P4I2 Rif^R. Meningkatnya jumlah eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit diduga disebabkan oleh aktivitas bakteri probiotik yang diberikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Mocanu *et al.*, (2010) yang menyatakan bahwa probiotik dari jenis *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis* dapat meningkatkan nilai eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum).

Total leukosit, monosit, dan neutrofil menunjukkan peningkatan sampai hari ketujuh dan menurun sampai akhir penelitian pada seluruh perlakuan probiotik dan kontrol. Peningkatan ini terjadi diduga karena ikan telah menunjukkan respons terhadap adanya patogen *A. hydrophila* Rif^R dalam air. Monosit dan neutrofil merupakan sel fagosit yang dapat memfagosit sisa-sisa jaringan dan penyebab penyakit serta berperan dalam pembunuhan dan degradasi mikroorganisme sebagaimana yang dilakukan dalam penyembuhan luka (Rustikawati, 2012; Fraser *et al.*, 2012). Penurunan mulai hari ke-14 sampai akhir penelitian diduga karena populasi *A. hydrophila* Rif^R dalam air sudah terkontrol sehingga tidak memengaruhi kondisi sistem imun ikan. Kamgar dan Ghane (2012) menyatakan bahwa terjadi peningkatan jumlah leukosit pada

ikan *rainbow trout* setelah penambahan *B. subtilis* dan diinfeksi *Streptococcus agalactiae*. Kumar dan Ramulu (2013) menyatakan bahwa terjadi peningkatan jumlah monosit dan neutrofil pada ikan *Pangasius hypophthalmus* yang terinfeksi *A. hydrophila*.

Persentase limfosit menunjukkan hasil berbeda yaitu penurunan sampai hari ketujuh, selanjutnya kenaikan sampai hari ke-28 pada semua perlakuan, kecuali kontrol (-) yang cenderung stabil. Limfosit tidak dapat melakukan proses fagositosis, akan tetapi mempunyai fungsi yang sangat penting dalam imunitas spesifik terhadap benda asing (Parto *et al.*, 2012). Magnadottir (2010) menyatakan bahwa respons imun spesifik oleh limfosit bekerja lebih lambat dibandingkan respon imun nonspesifik oleh makrofag. Hal ini didukung oleh penelitian Khalil *et al.*, (2011) yang menyatakan bahwa penambahan probiotik *Saccharomyces cerevisiae* dapat meningkatkan persentase limfosit dari ikan nila (*Oreochromis niloticus*) setelah diinfeksi oleh *A. hydrophila*.

KESIMPULAN

Pemberian probiotik *Bacillus* P4I1 dengan dosis 10⁴ cfu/mL efektif dapat menekan pertumbuhan *A. hydrophila* dan mencegah penyakit MAS dengan meningkatkan respons imun dan kelangsungan hidup ikan lele dumbo.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Harbi AH, Udin NM. 2010. Bacterial populations of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) cultured in earthen ponds. *Journal of Applied Aquaculture* 22: 187–193.
- Angka SL. 2005. Kajian penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) pada ikan lele dumbo *Clarias* sp.: patologi, pencegahan dan pengobatannya dengan fitofarmaka [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Balcazar JL, de Blas I, Ruiz ZI, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173–186.
- Bernard VH, Nurhidayu A, Ina-Salwany MY, Abdelhadi Y. 2013. *Bacillus cereus*: JAQ04 strain as a potential probiotic for red tilapia; *Oreochromis* species. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 8: 395–400.
- Bijanti R, Yuliani MGA, Tyasningsih W. 2011. Antigenicity protein of *Aeromonas hydrophila*

- caused ulcer disease on goldfish *Cyprinus carpio* Linn) using indirect ELISA technique. Poster disampaikan dalam Kongres Nasional Pertama Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia. 26 Maret 2011. Denpasar, Indonesia.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 577–581.
- Chirila F, Fit N, Nadas G, Negrea O, Ranga R. 2008. Isolation and characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain in a carp *Cyprinus carpio* toxemia focus. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 65: 244–247.
- Collier HB. 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Canada Medicine Association Journal* 50: 550–552.
- Dini SM, Purbomartono M. 2009. Penggunaan vaksin polivalen dan vaksin polivalen plus sel *Aeromonas hydrophila* (penambahan vitamin C dan adjuvant) pada lele dumbo *Clarias gariepinus* [Laporan Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIII/1 perguruan Tinggi Anggaran 2008/2009 FKIP]. Purwokerto: Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Effendi MI. 2002. *Biologi Perikanan*. Bogor: Yayasan Pustaka Nusantara.
- Flores ML. 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology* 2: 471–478.
- Fraser TWK, Rønneseth A, Haugland GT, Fjellidal PG, Mayer I and Wergeland HI. 2012. The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon *Salmo salar* L. post-smolts. *Fish & Shellfish Immunology* 33: 60–66.
- Hong HA, Duc LH, Cutting SM. 2004. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 813–835.
- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Review Article of The Scientific World Journal*: 1–13.
- Kalaiselvi S, Panneerselvam A. 2011. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma* sp. against *Sarocladium oryzae* causing sheath rot disease in paddy. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2: 179–183.
- Kamgar M, Ghane M. 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* effect as probiotics on hematological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following experimental infection with *Streptococcus iniae*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2012: 1–9.
- Khalil RH, Saad TT, Elabd YM. 2011. Evaluation of immunomodulatory effects on some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of The Arabian Aquaculture Society* 6: 139–152.
- Kumar MP, Ramulu KS. 2013. Haematological changes in *Pangasius hypophthalmus* infected with *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Food, Agriculture, and Veterinary Sciences* 3: 70–75.
- Luis-Villasenor IE, Macias-Rodriguez ME, Gomez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Cordova AI. 2011. Beneficial effect of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321: 136–144.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2011. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. USA: Prentice-Hall Inc.
- Magnadottir B. 2010. Immunological control of fish disease. *Marine Biotechnology* 12: 361–379.
- Mocanu M, Cristea V, Dediu L, Bocioc E, Grecu RI, Ion S, Vasilean I. 2010. The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). *Lucrari Stiintifice-Sera Zoothenie* 59: 258–263.
- Mohamed MH, Refat NAGA. 2011. Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in tilapia *Oreochromis niloticus* in Sharkia Governorate, Egypt. *Journal of American Science* 7: 244–256.
- Murilio I, Villamil L. 2011. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer *Branchionus plicatilis* cultures. *Journal of Aquaculture Research and Development* 2011: 1–5.
- Nikoskelainen S, Ouwehand A, Salminen S, Bylund G. 2001. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198: 229–236.
- Parto P, Haghghi ZMS, Dehghani H, Aghae SM, Salamat MA. 2012. Morphological characterization of hemocyte in *Himantura walga* (dwarf whipray) in Persian Gulf and Oman Sea. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4: 240–243.
- Purivirojkul W, Areechon N. 2007. Application

- of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius from natural habitat for control bacteria in aquaculture. *Kasetsart Journal - Natural Science* 41: 125–132.
- Ravi AV, Musthafa KS, Jegathammbal G, Kathiresan K, Pandian SK. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Applied Microbiology* 45: 219–223.
- Rustikawati I, 2012. Efektivitas ekstrak *Sargassum* sp. terhadap diferensiasi leukosit ikan nila *Oreochromis niloticus* yang diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika* 3: 125–134.
- Sansawat A, Thirabunyanon M. 2009. Anti-*Aeromonas hydrophila* activity and characterisation of novel probiotics strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo International Journal of Science and Technology* 3: 77–87.
- Saputra HM, Marusin N, Santoso P. 2013. Struktur histologis insang dan kadar hemoglobin ikan asang *Osteochilus hasseltii* di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 2: 138–144.
- Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC. 2007. The safety of two *Bacillus* probiotic strain for human use. *Digestive Diseases and Sciences* 53: 954–963.
- Sukenda, Jamal L, Wahjuningrum D, Hasan A. 2008. Penggunaan kitosan untuk pencegahan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo *Clarias* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7: 159–169.
- Widanarni, Lidaenni MA, Wahjuningrum D. 2010. Pengaruh pemberian bakteri probiotik *Vibrio* SKT-b dengan dosis yang berbeda terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang windu *Penaeus monodon* Fab. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 9: 21–29.
- Wijaya A. 2011. Pengaruh pemberian bakteri probiotik *Bacillus* sp. pada media pemeliharaan terhadap kelangsungan hidup benih ikan nila *Oreochromis niloticus* yang terinfeksi *Streptococcus agalactiae* [Skripsi]. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Yousr AH, Napis S, Rusul GRA, Son R. 2007. Detection of aerolysin and hemolysin genes in *Aeromonas* spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. *ASEAN Food Journal* 14: 115–122.