

## **Aplikasi sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda untuk pencegahan vibriosis pada ikan kerapu bebek**

### **Application of synbiotic with different probiotic doses to prevent vibriosis in humpback grouper**

**Dwi Agung Saputra, Sukenda, Widanarni\***

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

\*Surel: widanarni@yahoo.com

#### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the supplementation of synbiotic with different doses of probiotics to prevent vibriosis in humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). Grouper (3.0±0.48 g) fed by control feeds (without supplementation of synbiotic) which were K(-) and K(+), treatment feeds with supplementation of synbiotic with different doses of probiotic (probiotic 10<sup>4</sup> cfu/mL) 1% + prebiotic 2% (P1) v/w, (probiotic 10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotic 2% (P2) v/w, (probiotic 10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotic 2% (P3) v/w for 30 days. After a feeding trial period, there were observation of the bacterial counts in the fish intestine, the fish growth performance and immune response. Then all the grouper were challenged by *Vibrio alginolyticus*, except K (-). This study showed that survival, daily growth and food conversion ratio (FCR) of grouper in treatment P2 ((probiotic 10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotic 2%) and P3 (probiotic (10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotic 2%) were significantly better (P>0.05) than controls. The different doses of probiotic in synbiotic (probiotic 10<sup>4</sup> cfu/mL, probiotic 10<sup>6</sup> cfu/mL and probiotic 10<sup>8</sup> cfu/mL) provided better immune response than controls.

Keywords: synbiotic, *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus* sp., *Cromileptes altivelis*

#### **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji pemberian sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda untuk mencegah penyakit vibriosis pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). Ikan kerapu dengan berat (3,0±0,48 g) diberikan pakan kontrol (tanpa penambahan sinbiotik) K(-) dan K(+), pakan perlakuan dengan penambahan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda: probiotik ((10<sup>4</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) v/w (P1), ((probiotik 10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) v/w (P2), dan ((probiotik 10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) v/w (P3) selama 30 hari. Setelah perlakuan pakan sinbiotik, dilakukan pengamatan terhadap jumlah total bakteri di usus, kinerja pertumbuhan dan respons imun. Kemudian ikan kerapu pada seluruh perlakuan, kecuali kontrol negatif (-) diberi uji tantang dengan *Vibrio alginolyticus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan, laju pertumbuhan harian (LPH), dan rasio konversi pakan (FCR) pada perlakuan P2 ((probiotik 10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan P3 (probiotik (10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) secara signifikan lebih baik (P<0,05) bila dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda (probiotik 10<sup>4</sup> cfu/mL, probiotik 10<sup>6</sup> cfu/mL, dan probiotik 10<sup>8</sup> cfu/mL) juga memberikan respons imun yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol.

Kata kunci : sinbiotik, *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus* sp., *Cromileptes altivelis*

#### **PENDAHULUAN**

Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan laut ekonomis penting baik di pasar lokal maupun internasional. Berdasarkan data KKP (2011), produksi selama periode tahun 2008-2011 meningkat sebesar 52,68% yaitu dari 4.273 ton pada tahun 2008 menjadi 8.112 ton pada tahun 2011. Produksi kerapu pada tahun 2014 diharapkan mencapai 20.000 ton (KKP, 2011).

Salah satu permasalahan dalam budidaya ikan kerapu bebek adalah serangan penyakit vibriosis. Penyebab penyakit vibriosis pada budidaya ikan kerapu bebek diantaranya adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*. Bakteri tersebut dapat mengakibatkan penyakit pada ikan kerapu bebek dengan gejala klinis berupa septicemia, borok pada kulit, hemoragik pada kulit, insang, dan ekor (Austin & Austin, 2007). Penularan penyakit vibriosis dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan.

Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk menekan penyakit vibriosis pada ikan kerapu adalah dengan penggunaan zat antibiotik. Namun, penggunaan bahan antibiotik yang tidak tepat telah banyak diketahui dapat menimbulkan masalah serius berupa resistensi atau daya tahan pada bakteri patogen (Balcazar *et al.*, 2006). Dengan demikian, diperlukan metode alternatif lain untuk mencegah serangan penyakit vibriosis pada ikan.

Aplikasi sinbiotik merupakan salah satu strategi pengendalian biologis yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan resistensi penyakit organisme akuakultur (Cerezuela *et al.*, 2011). Sinbiotik adalah suplemen gizi yang menggabungkan probiotik dan prebiotik, sehingga dapat meningkatkan efek menguntungkan pada inang (Cerezuela *et al.*, 2011). Probiotik merupakan mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan pada inang dengan cara memodifikasi komunitas mikroba, meningkatkan penggunaan pakan atau nilai nutrisi, meningkatkan ketahanan inang terhadap penyakit atau meningkatkan kualitas lingkungan (Verschuere *et al.*, 2000). Prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna yang memberikan efek menguntungkan bagi inang dengan cara merangsang pertumbuhan dan atau aktivitas dari satu atau beberapa bakteri di dalam kolon sehingga dapat meningkatkan kesehatan inangnya (Ringo *et al.*, 2010). Jenis probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Bacillus* sp. (NP5), yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila. Penambahan probiotik NP5 bersama prebiotik dari ubi jalar varietas sukuh (*Ipomoea batatas* L.) pada ikan nila terhadap pertumbuhan, efisiensi pakan, aktivitas enzim, serta respons imun, dan resistensi sedang diuji secara terpisah.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dosis pemberian probiotik maupun prebiotik dalam aplikasi sinbiotik dapat menjadi salah satu faktor pembatas untuk mendapatkan hasil yang optimal pada inang (Cerezuela *et al.*, 2011). Kajian pemberian sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda diharapkan dapat diperoleh dosis optimal yang dapat meningkatkan respons imun dan resistensi ikan kerapu bebek terhadap penyakit vibriosis. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pemberian sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda untuk pencegahan infeksi *V. alginolyticus* pada ikan kerapu bebek melalui pengamatan terhadap performa pertumbuhan, sintasan, dan respons imun pada ikan kerapu bebek.

## BAHAN DAN METODE

### Persiapan prebiotik

Produksi prebiotik meliputi pembuatan tepung kukus ubi jalar (Nuraida *et al.*, 2008), ekstraksi oligosakarida (Nuraida *et al.*, 2008), pengukuran total padatan terlarut (TPT) oligosakarida (Savic *et al.*, 2010), dan analisis oligosakarida dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Kolom yang digunakan dalam HPLC adalah *carbohydrate coloumn* (4,6x250 mm<sup>2</sup>), ukuran partikel 4 µm dengan *refractive index detector* dan berlaju alir (*flow rate*) 2 mL/menit, dengan standar gula fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), dan inulin. Pada prebiotik dengan TPT 5% mengandung FOS 1,015%, GOS 1,448% dan inulin 1,115%.

### Persiapan bakteri probiotik

Bakteri probiotik yang digunakan adalah NP5, yang merupakan bakteri dari genus *Bacillus*. Bakteri NP5 dibuat resisten terhadap antibiotik Rifampisin sebagai penanda molekuler (NP5R) melalui mutasi spontan mengacu pada metode yang digunakan Widanarni *et al.* (2003). Bakteri probiotik dikultur pada media *sea water complete* (SWC)-broth (5 g *bactopeptone*, 1 g *yeast extract*, 3 mL *gliserol*, 750 mL air laut, dan 250 mL akuades) 25 mL di dalam *waterbath shaker*, 160 rpm selama 24 jam pada 29 °C. Kultur sel dipanen dan disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, suspensi bakteri dicuci sebanyak dua kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS). *Total plate count* (TPC) bakteri ditentukan dengan metode cawan sebar (Madigan *et al.*, 2003) menggunakan media SWC setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

### Persiapan pakan uji

Perlakuan sinbiotik (probiotik 1% (v/w) + prebiotik 2% (v/w)) diberikan ke ikan melalui pakan berupa pakan komersial dengan kandungan protein 45% dan *binder* berupa putih telur sebanyak 2% (v/w) dari bobot pakan. Bakteri probiotik NP5 ditambahkan ke pakan dengan konsentrasi berbeda. Pakan untuk kontrol juga ditambahkan putih telur 2% tanpa penambahan sinbiotik. Pembuatan pakan perlakuan dilakukan dengan menyemprotkan sinbiotik sesuai dosis perlakuan pada pakan ikan setiap pagi hari.

### Uji *in vivo* pada ikan kerapu

Ikan kerapu berukuran 3,00±0,48 g, dipelihara pada akuarium volume 40 L dengan padat tebar 8

ekor/akuarium. Ikan kerapu dipelihara selama 30 hari dengan perlakuan sinbiotik yang diberikan melalui pakan. Jumlah pakan yang diberikan adalah 7–8% biomasa ikan per hari dengan frekuensi pemberian pakan tiga kali sehari, yaitu pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00 WIB. Untuk menjaga kualitas air, akuarium disifon dan dilakukan pergantian air sebanyak 30% dari total volume akuarium, dua kali sehari.

Setelah itu, perlakuan dilanjutkan dengan ujiantang menggunakan bakteri *V. alginolyticus* melalui injeksi intramuskular. Bakteri *V. alginolyticus* yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Kesehatan Ikan, IPB yang sebelumnya telah ditentukan LD50-nya sebesar  $10^6$  cfu/mL sebanyak 0,1 mL/ekor. Pengamatan ujiantang dilakukan selama enam hari dan ikan diberi pakan komersil tanpa penambahan sinbiotik. Penelitian ini terdiri atas lima perlakuan dan tiga ulangan, yaitu:

- K(-) : Pemberian pakan tanpa penambahan sinbiotik dan diinjeksi PBS
- K(+) : Pemberian pakan tanpa penambahan sinbiotik dan diinfeksi *V. alginolyticus*
- P1 : Pemberian pakan dengan penambahan sinbiotik (probiotik ( $10^4$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*
- P2 : Pemberian pakan dengan penambahan sinbiotik (probiotik ( $10^6$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*
- P3 : Pemberian pakan dengan penambahan sinbiotik (probiotik ( $10^8$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*

#### Parameter uji

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi total bakteri dan total probiotik NP5R, performa pertumbuhan dan respons imun ikan. Penghitungan bakteri dilakukan dengan metode hitungan cawan (Madigan *et al.*, 2003). Media yang digunakan adalah media SWC untuk penghitungan total bakteri dan SWC ditambah Rifampisin (50 ug/mL) untuk probiotik NP5R. Parameter performa pertumbuhan yang diamati berupa laju pertumbuhan harian (LPH) dan rasio konversi pakan (FCR).

Pengamatan respons imun dibagi menjadi dua periode. Pengamatan pertama dilakukan setelah 30 hari perlakuan sinbiotik dan kedua dilakukan pada akhir ujiantang atau tujuh hari pascainfeksi

*V. alginolyticus*. Parameter respons imun ikan kerapu yang diukur terdiri atas total eritrosit, total leukosit, kadar hemoglobin menggunakan sahinometer (Wedemeyer & Yasutake, 1977), kadar total hematokrit dan aktivitas fagositosis (Maqsood *et al.*, 2010), aktivitas *respiratory burst* (Pieters *et al.*, 2008), dan diferensial leukosit (Davis *et al.*, 2008).

#### Analisis data

Analisis data dilakukan dengan dua metode yaitu analisis deskriptif dan analisis statistik pada selang kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan satu faktor menggunakan *statistical software* IBM SPSS ver. 17.0. Apabila berbeda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Analisis deskriptif digunakan untuk data kelimpahan bakteri pada usus, sedangkan analisis statistik digunakan untuk data performa pertumbuhan, respons imun, dan sintasan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kelimpahan bakteri di usus

Penggunaan sinbiotik dalam meningkatkan populasi bakteri menguntungkan di dalam saluran pencernaan ikan kerapu dapat diketahui dari hasil penghitungan kelimpahan bakteri di usus. Hasil pengamatan kelimpahan bakteri di usus ikan kerapu selama penelitian disajikan pada Tabel 1.

Hasil penghitungan total bakteri pada perlakuan sinbiotik menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding kontrol, kecuali perlakuan P1. Jumlah bakteri tertinggi terdapat pada perlakuan sinbiotik P3 diikuti dengan perlakuan P2, dan terendah pada perlakuan P1. Pada hasil penghitungan bakteri probiotik NP5R, diketahui bahwa perlakuan sinbiotik dosis P3 menunjukkan nilai tertinggi yaitu sebesar  $6,62 \times 10^3$  cfu/g, diikuti perlakuan dosis P2 dan P1 masing-masing  $9,34 \times 10^2$  cfu/g dan  $7,69 \times 10^1$  cfu/g. Sementara itu, pada kontrol tidak ditemukan bakteri NP5R. Hasil ini menunjukkan bahwa probiotik NP5R yang diberikan bersama prebiotik mampu tumbuh dan memanfaatkan prebiotik pada usus ikan serta diduga dapat menstimulasi sistem imun ikan kerapu bebek. Delcenserie *et al.* (2008) berpendapat bahwa rangsangan sistem imun oleh probiotik mampu menstimulasi makrofag dan meningkatkan aktivasi proliferasi sel limfosit.

Pemberian prebiotik melalui pakan juga diduga telah menstimulir pertumbuhan bakteri

Tabel 1. Kelimpahan bakteri pada usus ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*)

Perlakuan	Total bakteri (cfu/g)	Total probiotik NP5R (cfu/g)
K (-)	2,91 x 10 <sup>6</sup>	0
K (+)	2,89 x 10 <sup>6</sup>	0
P1	2,31 x 10 <sup>6</sup>	7,69 x 10 <sup>1</sup>
P2	5,60 x 10 <sup>6</sup>	9,34 x 10 <sup>2</sup>
P3	6,62 x 10 <sup>6</sup>	6,62 x 10 <sup>3</sup>

Keterangan: K (-): tanpa penambahan sinbiotik dan diinjeksi PBS; K (+): tanpa penambahan sinbiotik dan diinfeksi *Vibrio alginolyticus*; P1: (probiotik (10<sup>4</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P2: (probiotik (10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2% dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P3: (probiotik (10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*.

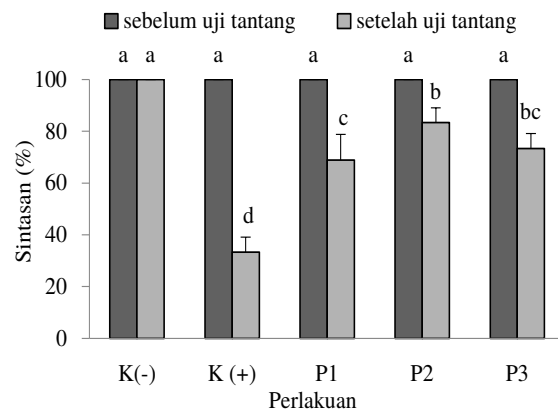
probiotik NP5R dan bakteri menguntungkan lainnya di dalam saluran pencernaan, sehingga populasi bakteri pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi dibanding perlakuan kontrol. Menurut Ringo *et al.* (2010), prebiotik oligosakarida dapat meningkatkan kesehatan dan keberadaan bakteri usus yang menguntungkan serta menekan bakteri yang berpotensi merusak, sehingga kelangsungan hidup ikan meningkat. Dalam penelitian ini, peran probiotik belum dilakukan dengan *monitoring* secara langsung terhadap total bakteri patogen atau yang merugikan, melainkan dengan pengamatan kelangsungan hidup, performa pertumbuhan, dan respons imun ikan.

### Performa pertumbuhan

Parameter produksi budidaya selama masa pemeliharaan dengan perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda dapat dilihat berdasarkan laju pertumbuhan harian (LPH) dan rasio konversi pakan (FCR) (Tabel 2). LPH kerapu bebek setelah pemberian perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda selama 30 hari, menunjukkan bahwa perlakuan P2 (13,29±0,87) dan P3 (12,4±0,79) menghasilkan nilai LPH yang lebih tinggi dan berbeda nyata ( $P<0,05$ ) bila dibandingkan dengan kontrol (9,62±0,98 dan 8,98±1,07). Hal ini membuktikan bahwa penggunaan sinbiotik dapat memacu performa pertumbuhan ikan kerapu bebek. Hasil ini juga berkorelasi positif terhadap nilai FCR. Nilai FCR pada perlakuan kontrol sebesar 2,11±0,49 (K-) dan 1,91±0,31 (K+), lebih tinggi ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan perlakuan sinbiotik P2 (1,13±0,07) dan P3 (1,25±0,13), akan tetapi menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata terhadap perlakuan P1 (2,04±0,57) ( $P<0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian dari perlakuan sinbiotik yang diujikan dapat memberikan pengaruh yang menguntungkan terhadap LPH dan FCR pada ikan kerapu. Beberapa hasil penelitian

melaporkan bahwa penambahan sinbiotik pada pakan dapat memperbaiki pertambahan bobot tubuh, laju pertumbuhan harian (LPH), dan rasio konversi pakan (FCR) pada *Onchorhynchus mykiss* (Mehrabi *et al.*, 2011), *European lobster (Homarus gammarus L)* (Daniels *et al.*, 2010), dan *Siberian sturgeon (Acipenser baerii)* (Geraylou *et al.*, 2013).

Pemberian probiotik NP5 diduga telah meningkatkan aktivitas enzim eksogen sehingga dapat membantu predigestion pakan ikan kerapu. Peningkatan pertumbuhan bakteri probiotik NP5 pada perlakuan sinbiotik diduga juga disebabkan oleh pengaruh dari prebiotik yang diberikan. Prebiotik yang diekstrak dari ubi jalar varietas sukuk secara efektif dapat mendukung pertumbuhan bakteri probiotik. Selain itu, pada penelitian lain juga telah diketahui bahwa



Gambar 1. Sintasan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) pada perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda ( $P<0,05$ ). Keterangan: huruf yang berbeda pada bar yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P<0,05$ ). K (-): tanpa penambahan sinbiotik dan diinjeksi PBS; K (+): tanpa penambahan sinbiotik dan diinfeksi *Vibrio alginolyticus*; P1: (probiotik (10<sup>4</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P2: (probiotik (10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2% dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P3: (probiotik (10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*.



pemberian prebiotik melalui pakan pada *Litopenaeus vannamei* dapat meningkatkan panjang mikrovili usus (Zhang *et al.*, 2012). Panjang mikrovili usus dapat membantu meningkatkan penyerapan nutrisi sehingga dapat memperbaiki performa pertumbuhan pada inang.

### Sintasan

Sintasan atau nilai kelangsungan hidup dari ikan kerapu bebek dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan pengamatan sintasan ikan selama 30 hari perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda, diketahui bahwa semua perlakuan menghasilkan sintasan sebesar 100%. Sementara itu, setelah diuji tantangan dengan infeksi *V. alginolyticus* melalui injeksi, sintasan ikan mengalami penurunan. Sintasan terendah terjadi pada kontrol (+) yaitu sebesar  $33,3 \pm 7,21\%$  yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kontrol (-) sebesar 100% dan seluruh perlakuan sinbiotik dosis P1, P2, dan P3 yaitu  $68,83 \pm 3,61\%$ ,  $83,33 \pm 7,22\%$ , dan  $73,33 \pm 2,62\%$ . Pada penelitian ini, kematian pada ikan kerapu disertai dengan gejala klinis akibat infeksi *V. alginolyticus* seperti borok dan hemoragi pada kulit, insang, dan ekor. Selain itu, tidak adanya kematian pada kontrol (-) juga menunjukkan bahwa kematian ikan kerapu disebabkan oleh *V. alginolyticus* yang diinfeksi secara eksperimental pada penelitian ini. Sintasan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (+) pada seluruh perlakuan sinbiotik mengindikasikan adanya pengaruh sinbiotik terhadap peningkatan resistensi kerapu terhadap infeksi *V. alginolyticus*. Pada penelitian Yunzhang *et al.* (2009), bakteri probiotik jenis *Bacillus* sp. dan *Psychrobacter* pada usus ikan kerapu pinang (*Epinephelus coioides*) dilaporkan dapat menekan pertumbuhan *Vibrio* sp. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan ketahanan dan pertumbuhan ikan kerapu yang lebih baik.

### Respons imun

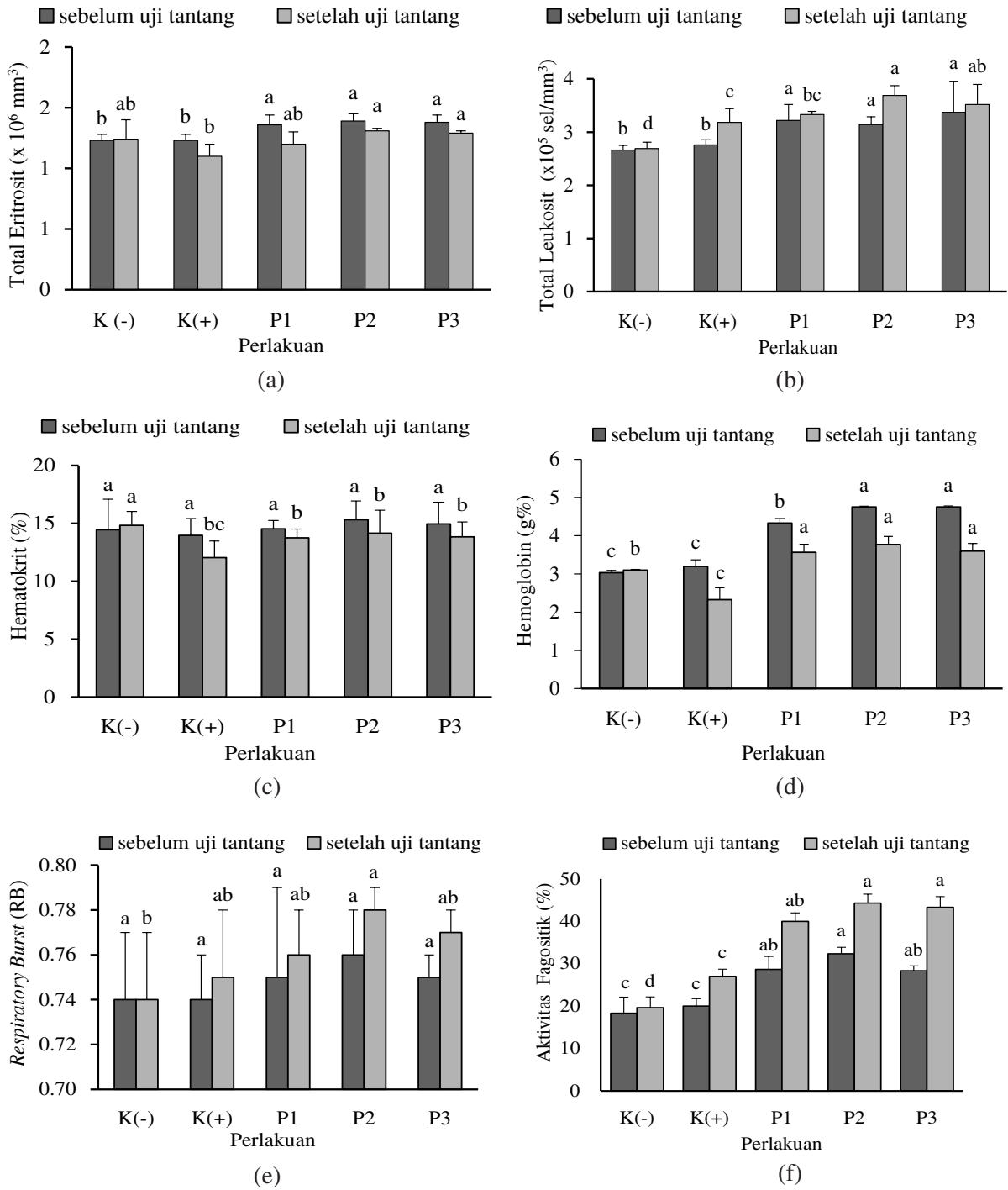
Total eritrosit, total leukosit, kadar hemoglobin (Hb), kadar hematokrit (He), aktivitas *respiratory burst* (RB), dan aktivitas fagositik (AF) ikan kerapu bebek pada akhir perlakuan sinbiotik dan setelah uji tantangan dengan *V. alginolyticus* dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah eritrosit dan kadar Hb pada perlakuan P1, P2, dan P3 setelah 30 hari perlakuan sinbiotik berbeda nyata terhadap kontrol ( $P < 0,05$ ). Setelah ikan diuji tantangan dengan *V. alginolyticus*, jumlah

eritrosit, kadar He, dan kadar Hb pada ikan mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh infeksi *V. alginolyticus* yang merusak sel darah merah (eritrosit), dan menyebabkan septicemia pada ikan kerapu.

Hemoglobin menentukan tingkat ketahanan tubuh ikan karena berfungsi untuk mengikat oksigen dalam darah, dan kadar hemoglobin berkorelasi positif terhadap jumlah eritrosit (Hilman *et al.*, 2005). Namun dengan perlakuan sinbiotik, penurunan kadar eritrosit, He, dan Hb dapat dicegah, sehingga lebih baik dibanding kontrol (+). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kebutuhan oksigen yang tinggi dalam darah (Anderson *et al.*, 2003) yang dibutuhkan untuk *oxygen dependent killing mechanism* yang berperan sebagai pertahanan tubuh saat terjadi infeksi patogen, sehingga eritrosit, He, dan Hb pada perlakuan sinbiotik lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (+). Hasil penelitian Firouzbakhsh *et al.* (2012) melaporkan bahwa penambahan sinbiotik pada pakan menunjukkan konsentrasi Hb *rainbow trout* yang berbeda dibanding kontrol. Hal serupa juga terjadi pada jumlah leukosit, RB dan AF pada tiap perlakuan sinbiotik (P1, P2, dan P3) yang berbeda nyata dengan kontrol ( $P < 0,05$ ). Nilai RB terendah terdapat pada kontrol (+) ( $0,75 \pm 0,03$ ) dan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap perlakuan P2 ( $0,78 \pm 0,01$ ). Nilai RB mempengaruhi persentase AF yang menunjukkan pola peningkatan.

Meningkatnya nilai RB dapat dikorelasikan dengan peningkatan aktivitas sel fagositik (Rawling *et al.*, 2012). Selanjutnya, aktivasi sel fagosit tersebut akan memicu produksi *anion superoksida* ( $O_2^-$ ) dan turunannya (hidrogen peroksida dan radikal bebas) yang berkaitan dengan konsumsi oksigen yang intens, dimana aktivitas tersebut dapat ditunjukkan melalui nilai RB (Panasiuk *et al.*, 2005, Abreu *et al.*, 2009). Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sinbiotik memberikan pengaruh terhadap AF dan RB yang mengindikasikan adanya peningkatan respons imun ikan kerapu yang diinfeksi *V. alginolyticus*. Hal ini sejalan dengan penelitian Lin *et al.* (2012) yang menunjukkan terjadinya peningkatan nilai AF dan RB pada ikan koi yang diberi kombinasi prebiotik *chitosan oligosaccharides* (COS) dan probiotik *Bacillus coagulans* secara oral. Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian Rodriguez-Estrada *et al.* (2009) bahwa pemberian sinbiotik (*Enterococcus faecalis* dan MOS) dapat meningkatkan sistem imun *rainbow trout*.

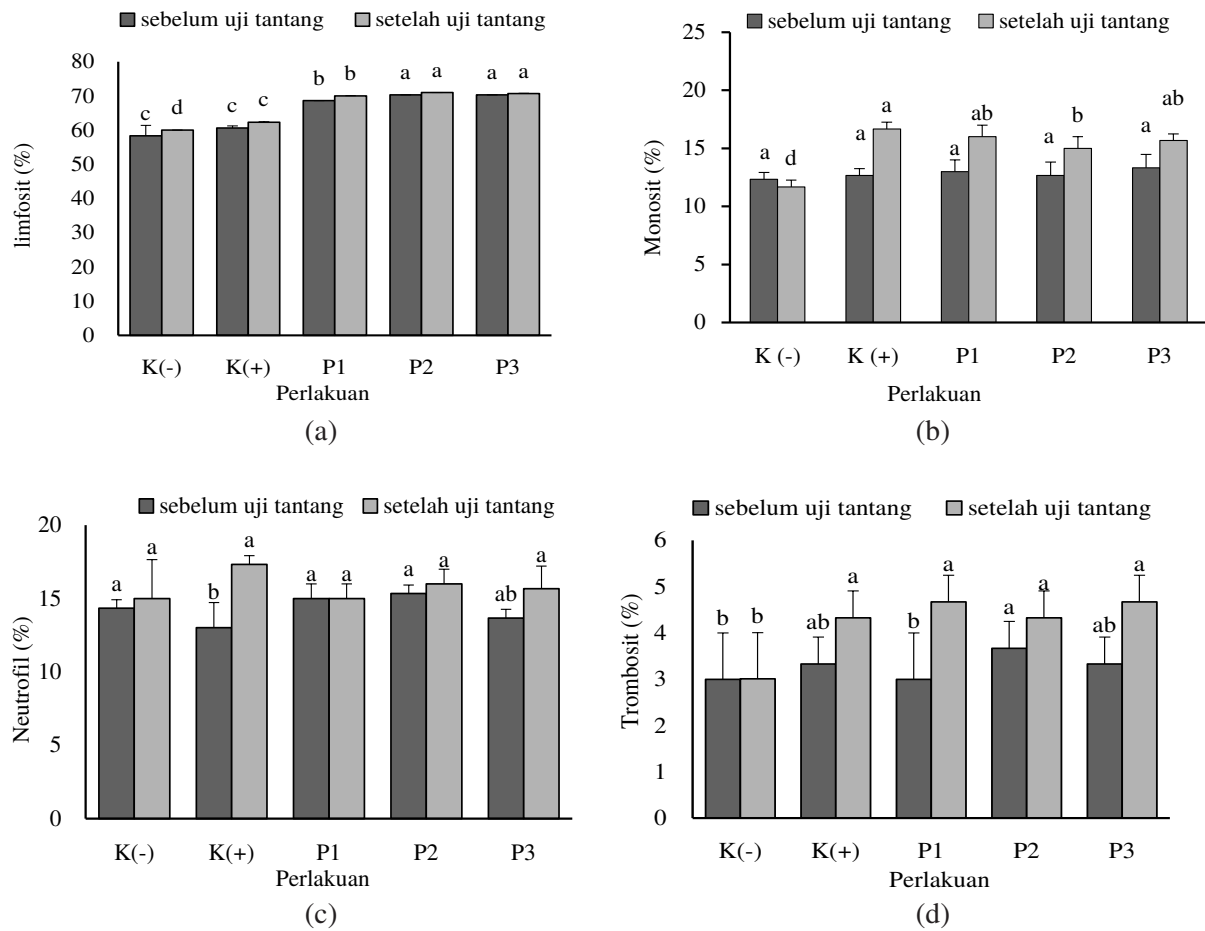


Gambar 2. (a) Total eritrosit, (b) total leukosit, (c) kadar hemoglobin (Hb), (d) kadar hematokrit (He), (e) *respiratory burst* (RB), dan (f) aktivitas fagositik (AF) ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) pada perlakuan sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda. Keterangan : huruf yang berbeda pada *bar* yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05). K (-): tanpa penambahan sinbiotik dan diinjeksi PBS; K (+): tanpa penambahan sinbiotik dan diinfeksi *Vibrio alginolyticus*; P1: (probiotik (10<sup>4</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P2: (probiotik (10<sup>6</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2% dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P3: (probiotik (10<sup>8</sup> cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*.

Pengamatan diferensial leukosit (DL) pada penelitian ini dikelompokkan menjadi empat jenis yaitu, limfosit, monosit, neutrofil, dan trombosit. Hasil perhitungan perbandingan jumlah sel-sel tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil pengamatan DL menunjukkan bahwa jumlah limfosit mengalami kenaikan

pascainfeksi. Perlakuan sinbiotik P1, P2, dan P3 menunjukkan jumlah limfosit yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol (+) (P<0,05). Tingginya jumlah limfosit ini diduga disebabkan oleh pengaruh pemberian sinbiotik dengan dosis berbeda. Pirarat *et al.* (2006), melaporkan bahwa terjadi peningkatan jumlah limfosit pada ikan nila



Gambar 3. Differensial leukosit (DL), (a) limfosit, (b) monosit, (c) neutrofil, (d) trombosit kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) pada perlakuan sinbiotik dengan dosis berbeda. Keterangan: huruf yang berbeda pada bar yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Keterangan: K (-): tanpa penambahan sinbiotik dan diinjeksi PBS; K (+): tanpa penambahan sinbiotik dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P1: (probiotik ( $10^4$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P2: (probiotik ( $10^6$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*; P3: (probiotik ( $10^8$  cfu/mL) 1% + prebiotik 2%) dan diinfeksi *V. alginolyticus*.

(*O. niloticus*) yang diberi perlakuan pakan yang ditambahkan bakteri probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Kontak antara probiotik dengan sel epitel usus (*gut associated lymphoid tissue*; GALT) akan mengaktifkan sitokin sehingga memungkinkan terjadinya komunikasi antarsel untuk mengaktifkan respons imun (*immunoregulator*). Jumlah bakteri probiotik yang cukup pada mukosa usus memberikan efek kompetisi yang baik untuk menekan bakteri patogen (Delgado *et al.*, 2011). Peran sinbiotik dalam penelitian ini selain dapat meningkatkan fungsi pertahanan oleh bakteri probiotik (pemblokkan pada mukosa usus), juga dapat menstimulasi jaringan (GALT) yang dapat meningkatkan sistem imun spesifik dan mengurangi inflamasi yang disebabkan oleh bakteri patogen. Jumlah bakteri probiotik yang optimal akan bersinergi dalam meningkatkan pertahanan sistem imun yang lebih baik. Menurut Nayak (2010), probiotik berinteraksi dengan sel-

sel imun seperti *mononuclear phagocytic cells* (monosit, makrofag) dan *polymorphonuclear leucocytes* (neutrofil) serta sel *natural killer* (NK) untuk meningkatkan respons imun nonspesifik. Hasil pengamatan monosit, neutrofil, dan trombosit menunjukkan terjadinya kenaikan setelah infeksi pada semua perlakuan sinbiotik, akan tetapi tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ). Meningkatnya trombosit (trombositosis) pada ikan merupakan indikator bahwa ikan dalam penyembuhan luka dan respons ikan terhadap *stressor* bergantung pada jenis stres yang dialami oleh ikan tersebut. Peningkatan jumlah sel darah putih dan neutrofil, serta penurunan kadar hematokrit bergantung pada jenis stres yang dialami (Martin *et al.*, 2004).

Peningkatan jumlah tiap-tiap sel leukosit (leukositosis) ini terkait dengan kinerja sistem imun ikan dalam mereduksi serangan patogen. Jumlah tiap-tiap jenis leukosit (neutrofil, monosit, limfosit) dalam sirkulasi darah terbatas, akan

tetapi dapat meningkat jika terjadi peradangan akibat infeksi. Sel-sel yang pertama kali diproduksi dan meningkat dalam jumlah besar pada peradangan adalah neutrofil (Kumar & Sharma, 2010). Menurut Roberts (2012) apabila terjadi infeksi oleh bakteri, monosit dapat meningkat dalam waktu yang singkat ( $\pm 48$  jam). Selain itu, peningkatan trombosit disebabkan adanya hemoragi dan tukak karena trombosit diproduksi agar darah membeku, guna mencegah pendarahan lebih banyak (Angka *et al.*, 2004).

## KESIMPULAN

Pemberian sinbiotik dengan dosis probiotik  $10^4$ ,  $10^6$ , dan  $10^8$  cfu/mL efektif untuk pencegahan infeksi *V. alginolyticus* pada ikan kerapu bebek melalui perbaikan respons imun dan resistensi ikan. Pemberian sinbiotik dengan dosis probiotik  $10^6$  cfu/mL merupakan dosis terbaik dengan sintasan dan kinerja pertumbuhan tertinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abreu JS, Marzocchi-Machado CM, Urbaczek AC, Fonseca LM, Urbinati EC. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *Brazilian Journal of Biology* 69: 1.133–1.139.
- Anderson RS, Kraus BS, McGladdery SE, Reece KS, Stokes NA. 2003. A thraustochytrid protist isolated from *Mercenaria mercenaria*: molecular characterization and host defense responses. *Fish and Shellfish Immunology* 15: 183–194.
- Angka SL, Priosoeryanto BP, Lay BW, Harris E. 2004. Penyakit *motile aeromonad septicaemia* pada ikan lele dumbo. *Forum Pascasarjana* 27: 339–350.
- Austin B, Austin DA. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4<sup>th</sup> ed. Chichester: Springer.
- Balcazar JL, Ignacio DB, Imanol RZ, David C, aniel V, and Jose LM. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173–186.
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MA. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A Review. *Journal of Aquaculture Research Development* 1: 1–8.
- Daniels CL, Merrifield DL, Boothoryd DP, Davies SJ, Factor JR, Arnold KE. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster *Homarus gammarus* L. larvae growth performance, gut morphology, and gut microbiota. *Aquaculture* 304: 49–57.
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional ecology* 22: 760–772.
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effect of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* 10: 37–54.
- Delgado GTC, Tamashiro WMSC, Junior MRM, Moreno YMF, Pastore GM. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Research International* 44: 3.167–3.173.
- Firouzbakhsh F, Mehrabi Z, Heydari M, Khalesi MK, Tajick MA. 2012. Protective effects of a synbiotic against experimental *Saprolegnia parasitica* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research* 45: 609–618.
- Geraylou Z, Souffreau C, Rurangwa E, Meester LD, Courtin CM, Delcour JA, Buyse J, Ollevier F. 2013. Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotic on the growth performance, non-specific immunity, and gut microbiota on juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Fish and Shellfish Immunology* 35: 766–775.
- Hilman, Robert S, Ault, Kenneth A, Rinder, Henry M. 2005. *Hematology in Clinical Practice: A Guide to Diagnosis and Management*, 4<sup>th</sup> ed. USA: McGraw-Hill Professional.
- KKP. 2011. Proyeksi produksi perikanan budidaya menurut komoditas utama. [www.kkp.go.id](http://www.kkp.go.id) [19 Mei 2011].
- Kumar V, Sharma A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* 10: 1.325–1.334.
- Lin S, Mao S, Guan Y, Luo L, Pan Y. 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi *Cyprinus carpio* koi. *Aquaculture* 342: 36–41.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, 10<sup>th</sup> ed. USA: Prentice-Hall Inc.
- Maqsood S, Singh P, Samoon MH, Balange AK. 2010. Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquaculture Research* 2: 77–85.



- Martin ML, Namura DT, Miyazaki DM, Pilarsky F, Ribero K, De castro MP, De campos CM. 2004. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* exposed to single and consecutive stress of capture. *Animal science* 26: 449–456 .
- Mehrabi Z, Firouzbakhsh F, Jafarpour A. 2011. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Nutrition* 96: 474–481.
- Nayak SK. 2010. Probiotic and immunity. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 2–14.
- Nuraida L, Hana, Dwiari SR, Faridah DN. 2008. Pengujian sifat prebiotik dan sinbiotik produk olahan ubi jalar secara in vivo. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 19: 89–96.
- Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, Radomski K. 2005. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 11: 7.661–7.665.
- Pieters N, Brunt J, Austin B, Lyndon AR. 2008. Efficacy of in feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Journal of Applied Microbiology* 105: 723–32.
- Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 339–347.
- Rawling MD, Merrifield DL, Snellgrove DL, Kuhlwein H, Adams A, dan Davies SJ. 2012. Haemato-immunological and growth response of mirror carp *Cyprinus carpio* fed a tropical earthworm meal in experimental diets. *Fish and Shellfish Immunology* 32: 1.002–1.007.
- Ringo E, Olsen RE, Gifstad TO, Dalmo RA, Amlund H, Hemre GI. 2010. Prebiotic in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16: 117–136.
- Roberts RJ. 2012. *Fish Pathology*, 3<sup>rd</sup> ed. London: Wiley-Blackwell. Hlm. 25–30.
- Rodriguez-Estrada U, Satoh S, Haga Y, Fushimi H, Sweetman J. 2009: Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide, and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Science* 57: 609–617.
- Savic IM, Nikolic GS, Savic IM, Cacic MD. 2010. Conductometric studies on the stability of copper complexes with different oligosaccharides. *Central European Journal of Chemistry* 8: 1.078-1.085.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiological and Molecular Biology* 64: 655–671.
- Wedemeyer GA, Yasutake WT. 1977. *Clinical Methods for the assesment of the effect environmental stress on fish health*. [Technical Papers] USA. Depart. of the Interior Fish and Wildlife Service 89: 1–17.
- Widanarni, Suwanto A, Sukenda, Lay BW. 2003. Potency of *Vibrio* isolates for biocontrol of vibriosis in tiger shrimp *Penaeus monodon* larvae. *Biotropia* 20: 11–23.
- Yunzhang S, Hongliang Y, Zechun L, Jianbo C, Jidan Y 2009. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *African Journal of Microbiology Research* 3: 713–720.
- Zhang J, Liu Y, Tian L, Yang H, Liang G, Xu D. 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenil Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33: 1.027–1.032.