

## Pengaruh pemberian mikrokapsul probiotik *Bacillus cereus* P22 dan *Staphylococcus lentus* L1k pada pakan terhadap kinerja pertumbuhan, respons imun, dan resistensi ikan lele, *Clarias gariepinus* Burchell 1822 yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*

[Effects of dietary probiotic microcapsules *Bacillus cereus* P22 and *Staphylococcus lentus* L1k on growth performance, immune response, and resistance of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell 1822 infected with *Aeromonas hydrophila*]

Lilik Setiyaningsih<sup>1✉</sup>, Widanarni<sup>2</sup>, Angela Mariana Lusiastuti<sup>3</sup>, Munti Yuhana<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa Magister, Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup> Departemen Budidaya Perairan, FPIK-IPB

<sup>3</sup> Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor

Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

Jl. Sempur No 1 Bogor 16154

Diterima: 02 Juni 2016; Disetujui: 04 April 2017

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji dosis dan frekuensi pemberian mikrokapsul probiotik melalui pakan terhadap kinerja pertumbuhan, respons imun, dan resistensi ikan lele yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini menggunakan *Bacillus cereus* P22 dan *Staphylococcus lentus* L1k yang telah dienkapsulasi melalui metode *spray draying*. Penelitian ini dilaksanakan selama 56 hari dengan delapan perlakuan dan empat ulangan, terdiri atas perlakuan K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), A (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari) dan F (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali). Ikan diuji tantang dengan *A. hydrophila* pada hari ke 42 dengan kepadatan  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> secara *intramuscular* (kecuali K- diinjeksi dengan *phosphate buffer saline*). Setelah 40 hari pascainjeksi, laju sintasan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antarperlakuan ( $p>0,05$ ). Perlakuan E menunjukkan laju pertumbuhan ( $4,54\pm 0,02\%$ ) dan total probiotik *B. cereus* (P22) dan *S. lentus* (L1k) ( $4,06\pm 0,09$  log CFU g<sup>-1</sup>;  $4,02\pm 0,08$  log CFU g<sup>-1</sup>) tertinggi; sementara perlakuan D memberikan hasil nisbah konversi pakan terbaik ( $1,191\pm 0,013$ ), perlakuan F menunjukkan *total bacterial count* tertinggi ( $7,11\pm 0,53$  log CFU g<sup>-1</sup>). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 2% yang diberikan setiap hari memberikan hasil yang lebih baik dalam meningkatkan laju pertumbuhan, respons imun, dan resistensi ikan lele terhadap *A. hydrophila*.

Kata penting: *A. hydrophila*, *Bacillus cereus*, mikrokapsul probiotik, *Staphylococcus lentus*

### Abstract

The aimed of this research was to evaluate the effects of dietary probiotic microcapsules *B.cereus* P22 and *S. lentus* (L1k) at different dose and frequency on growth performance, immune response and resistance of African catfish infected with *A. Hydrophila*. Probiotics used in this study were *B. cereus* P22 and *S. lentus* L1k encapsulated by spray draying method. The research was carried out for 56 days with eight treatments and four replications. The treatments were K- (negative control), K+ (positive control), A (feed supplemented with 0,5% of microencapsulated probiotic, fed every day), B (feed supplemented with 0,5% of microencapsulated probiotic, fed once every three days), C (feed supplemented with 1% of microencapsulated probiotic, fed every day), D (feed supplemented with 1% of microencapsulated probiotic with an administration once every three days), E (feed with 2% of microencapsulated probiotic with an administration every day) and F (feed with 2% of microencapsulated probiotic with an administration once every three days). On day 42, all of the fish except K- were challenged by intramuscular injection of *A. hydrophila* ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). In 40 days after infection, there were no significant difference on survival rate (SR) between treatments ( $p> 0.05$ ). Treatment E displayed the higher growth rate ( $4,54\pm 0,02\%$ ), total probiotic *B. cereus* (P22) and *S. lentus* (L1k) ( $4.06\pm 0.09$  log CFU g<sup>-1</sup>;  $4.02\pm 0.08$  log CFU g<sup>-1</sup>) than other treatments; whereas treatment D showed the best feed conversion ratio ( $1.191\pm 0.013$ ), and treatment F offered the highest total bacterial count ( $7.11\pm 0.53$  log CFU g<sup>-1</sup>). An administration of 2% microencapsulated probiotic in every day frequency demonstrated the better growth performance, immune response and resistance of African catfish to *A. hydrophila* compare with other treatments.

Keywords: *A. hydrophila*, *Bacillus cereus*, catfish, microencapsulated probiotic, *Staphylococcus lentus*

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: [lilik.setiyaningsih92@gmail.com](mailto:lilik.setiyaningsih92@gmail.com)

## Pendahuluan

*Aeromonas hydrophila* termasuk ke dalam patogen oportunistik yang dapat menyebabkan kematian yang tinggi (80-100%) pada ikan budi daya (Janda & Abbott 2010). Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* dapat mengalami pendarahan pada organ yang terinfeksi sehingga menyebabkan luka. Secara umum gejala klinis yang ditimbulkan pada ikan yang terinfeksi bakteri tersebut adalah penurunan respons terhadap pakan, berenang abnormal, luka kemerahan, sisik lepas, sirip terkikis, kerusakan sel berupa hipertropi dan hiperplasia, kerusakan organ hati dan ginjal (Hardi *et al.* 2014).

Salah satu solusi yang diharapkan sebagai upaya penanggulangan infeksi bakteri *A. hydrophila* adalah pemberian probiotik. Probiotik mampu memberikan efek antimikrobial berupa produksi antibiotik, bakteriosin, enzim (lisozym dan protease) atau hidrogen peroksida (Cruz *et al.* 2012). Bakteri probiotik bersifat kompetitor terhadap patogen dan mampu meningkatkan sistem imun (El- Bouhy *et al.* 2013).

Probiotik dalam bentuk kultur sel memiliki keterbatasan dalam masa penyimpanan dan mudah rusak oleh pengaruh lingkungan (Weinbreck *et al.* 2010). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan viabilitas probiotik adalah melalui penggunaan teknologi mikroenkapsulasi yang merupakan teknik pengemasan bahan dalam bentuk partikel mikro dan nano. Mikroenkapsulasi dapat melindungi bahan sensitif dari kelembaban, panas, cahaya atau oksidasi (Jafari *et al.* 2008). Menurut Jyothi *et al.* (2010) proses kering (*spray drying*) merupakan metode mikroenkapsulasi yang tergolong murah dibandingkan dengan metode lainnya dan mampu menghasilkan serbuk kualitas tinggi untuk produksi skala besar.

Penggunaan dosis dan frekuensi pemberian probiotik yang tepat berhubungan dengan nilai ekonomis dan diharapkan mampu menekan biaya produksi yang dikeluarkan selama masa pemeliharaan. Dosis pemberian mikrokapsul probiotik *S. lentus* pada pakan sebesar 0,5%, 1% dan 2% sebelumnya pernah dilaporkan oleh Rahmawati (2015). Pemberian mikrokapsul probiotik *S. lentus* dengan dosis berbeda menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap laju pertumbuhan dan efisiensi pakan pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang terinfeksi *S. agalactiae*. Beberapa penelitian lain mengenai dosis probiotik juga pernah dilaporkan (Bagheri *et al.* 2008, Utami *et al.* 2015). Munaeni *et al.* (2014) menyatakan bahwa pemberian mikrokapsul sinbiotik *Bacillus* sp. NP5 RfR dan oligosakarida dengan frekuensi yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap laju pertumbuhan dan respons imun pada udang vaname yang terinfeksi *Vibrio harveyi*. Namun penelitian mengenai gabungan dosis dan frekuensi mikrokapsul probiotik multispecies untuk pengendalian *A. hydrophila* pada ikan lele belum pernah dilakukan.

Penggunaan probiotik multispecies diketahui memiliki efektivitas yang lebih tinggi dalam menghambat penyebaran beberapa jenis penyakit bakterial (Welker & Lim 2011). Pada penelitian ini probiotik multispecies *B. cereus* dan *S. lentus* digunakan untuk mengendalikan infeksi *A. hydrophila* pada ikan lele.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji dosis dan frekuensi pemberian mikrokapsul probiotik melalui pakan terhadap kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistensi ikan lele yang diinfeksi *A. hydrophila*.

## Bahan dan metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2015-Januari 2016 di Instalasi Penelitian

dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan (IP4I) (Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor) dan Laboratorium Terpadu SEAFast, Institut Pertanian Bogor. Bakteri probiotik yang digunakan adalah *B. cereus* (P22) ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) dan *S. lentus* (L1k) ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) dengan penanda molekuler resisten antibiotik (Rifampisin untuk P22 dan Chloramphenicol untuk L1k) dan dimikroenkapsulasi sesuai dengan metode Zubaidah *et al.* (2015). Bakteri *A. hydrophila* yang digunakan merupakan koleksi Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan (IP4I) Bogor.

Penelitian ini terdiri atas delapan perlakuan dengan empat ulangan, yaitu K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), A (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan+ mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan+mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari sekali) dan F (pakan +mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali). Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Pakan yang digunakan merupakan pakan komersial dengan kadar protein sebesar 30%. Mikrokapsul probiotik ditambahkan ke dalam pakan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan dan dilakukan proses pelapisan (*coating*) menggunakan 2% putih telur. Pakan dikering udarkan dan disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 4°C.

Ikan lele yang digunakan adalah galur mutiara dengan bobot rata-rata 3,72±0,505 g. Ikan dipelihara pada bak berukuran 60×70×40 cm<sup>3</sup> berisi 60 liter air dan kepadatan 15 ekor tiap bak. Pemberian pakan dilakukan sebanyak tiga kali sehari, frekuensi pemberian pakan yang mengandung mikrokapsul probiotik sesuai dengan perla-

kuan dan diberikan secara *ad satiation* selama 40 hari masa pemeliharaan. Ikan diuji tantang dengan *A. hydrophila* pada hari ke 42 dengan kepadatan  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> sebanyak 0,2 ml ekor<sup>-1</sup> menggunakan *syringe* steril secara *intramuscular* (kecuali K- diinjeksi dengan *phosphate buffer saline* PBS), ikan diberi pakan perlakuan selama 14 hari pascauji tantang. Pengamatan sintasan pascauji tantang dilakukan dengan mengamati kematian setiap hari selama 14 hari. Kualitas air selama masa pemeliharaan diukur menggunakan *water quality checker*.

Parameter yang diamati selama masa pemeliharaan meliputi kinerja pertumbuhan, respons imun, jumlah total bakteri di usus ikan uji dan jumlah total bakteri *A. hydrophila* di organ target. Pascauji tantang *A. hydrophila*, parameter yang diamati meliputi respons imun, laju sintasan, dan jumlah total bakteri *A. hydrophila* di organ target.

#### Kinerja pertumbuhan

Parameter kinerja pertumbuhan yang diamati meliputi laju sintasan (*survival rate*), laju pertumbuhan spesifik (*specific growth rate*), dan nisbah konversi pakan (*feeding conversion rate*).

Laju sintasan dihitung menggunakan persamaan menurut Effendie (1997):

$$SR = N_t/N_o \times 100$$

Keterangan: S = laju sintasan (%), N<sub>t</sub> = jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor), N<sub>o</sub> = jumlah ikan yang hidup pada awal uji tantang (ekor)

Penghitungan laju pertumbuhan spesifik pada masa pemeliharaan sebelum uji tantang menggunakan persamaan Giri *et al.* (2013):

$$SGR = 100 \times \frac{\ln W_e - \ln W_s}{t}$$

Keterangan: SGR= laju pertumbuhan spesifik (%), W<sub>e</sub>= rata-rata bobot ikan pada akhir penelitian (g), W<sub>s</sub>= rata-rata bobot ikan pada awal penelitian (g), t= lama pemeliharaan (hari)

Nisbah konversi pakan pada masa pemeliharaan sebelum uji tantang dihitung menggunakan rumus Zonneveld *et al.* (1991):

$$FCR = F / (B_t + B_m - B_o)$$

Keterangan: FCR= nisbah konversi pakan, F = jumlah pakan yang diberikan (g),  $B_t$  = biomassa ikan pada akhir pemeliharaan (g),  $B_m$ = biomassa ikan yang mati selama pemeliharaan (g),  $B_o$ = biomassa ikan pada awal pemeliharaan (g)

#### Respons imun

Parameter respons imun yang diamati yaitu kadar hematokrit (Hc), kadar hemoglobin (Hb), aktivitas fagositosis (AF), dan ledakan respiratori (*respiratory burst* RB).

Kadar Hc diukur menggunakan tabung mikrohematokrit. Darah dimasukkan ke dalam tabung mikro hematokrit secara kapiler hingga mencapai  $\frac{3}{4}$  bagian tabung. Ujung tabung yang telah berisi darah ditutup menggunakan cryotoceal dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama lima menit. Panjang darah yang mengendap dan panjang total volume darah pada tabung diukur untuk menunjukkan nilai kadar Hc. Kadar Hc dihitung dengan rumus (Anderson & Siwicki 1995):

$$Hc = (a/b) \times 100\%$$

Keterangan: a = panjang darah yang mengendap, b = panjang total volume darah pada tabung

Penghitungan kadar AF dilakukan untuk menentukan persentase aktivitas sel-sel fagosit. Darah sampel sebanyak 50  $\mu$ l dimasukkan ke dalam *ependorf*. Patogen sebanyak 50  $\mu$ l dihomogenkan ke dalam *ependorf* dan diinkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang. Suspensi darah sebanyak 5  $\mu$ l diteteskan pada gelas objek dan dibuat preparat ulas. Preparat ulas dikering udarakan, lalu difiksasi dengan metanol selama 5-10 menit dan dikering udarakan. Kemudian dilanjutkan perendaman dengan giemsa selama 10-15 menit. Preparat tersebut dibilas dengan akuades dan dikering udarakan, kemudian dilakukan

pengamatan secara mikroskopis. Penghitungan dilakukan dengan pengamatan terhadap sel-sel yang memfagosit bakteri hingga 100 sel (Anderson & Siwicki 1995).

Kadar Hb diukur menggunakan metode Sahli. Darah yang telah ditampung dihisap dengan menggunakan pipet sahli sampai skala 20 mm<sup>3</sup> atau pada skala 0,2 ml. Ujung pipet kemudian dibersihkan dengan tisu. Darah yang telah dihisap ke dalam pipet dipindahkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi HCl 0,1 N sampai skala 10 (merah), larutan tersebut diaduk dan dibiarkan selama 3-5 menit. Akuades ditambahkan sampai warna darah dan HCl tersebut nampak seperti warna larutan standar yang ada di dalam Hb-meter tersebut. Skala yang terbentuk dibaca dengan mencocokkan permukaan cairan dengan skala tabung Sahli pada skala jalur gr % (kuning). Skala tersebut menunjukkan banyaknya hemoglobin dalam gram 100 ml<sup>-1</sup> darah (Wedemeyer & Yasutake 1997).

Pengukuran RB atau uji *nitroblue tetrazolium* (NBT) dilakukan untuk melihat produksi radikal oksigen dari fagosit sel yang berperan melawan patogen. Darah ikan sampel diambil sebanyak 50  $\mu$ l, dimasukkan ke dalam *microplate* dan diinkubasi di dalam inkubator bersuhu 37°C selama satu jam. Darah kemudian dibuang dan dibilas menggunakan 100  $\mu$ l PBS sebanyak tiga kali hingga darah dalam lubang *microplate* hilang. Larutan NBT dimasukkan ke dalam lubang *microplate* sebanyak 50  $\mu$ l lalu diinkubasi kembali selama satu jam pada suhu 37°C. Satu jam setelah inkubasi larutan NBT dibuang dan dibilas dengan metanol 100% sebanyak 50  $\mu$ l selama dua-tiga menit, kemudian ditambahkan kembali metanol 30% sebanyak 50  $\mu$ l dan dilakukan sebanyak tiga kali, *microplate* kemudian dikering-anginkan selama  $\pm$  15 menit. Larutan KOH 60  $\mu$ l dan DMSO 70  $\mu$ l dimasukkan ke dalam lubang

*microplate* dan dibaca di *microplate reader* untuk mendapatkan hasil.

#### *Jumlah total bakteri di usus ikan uji*

Total bakteri serta total probiotik P22 dan L1k di dalam usus diamati pada awal dan akhir pemeliharaan. Usus ikan diambil kemudian dihomogenkan dalam larutan PBS. Parameter yang diamati adalah *Total Viable Bacterial Count* (TBC) dan total probiotik. Media yang digunakan berupa media TSA (*Tryptic Soy Agar*) untuk TBC dan media TSA+antibiotik (Rifampisin untuk P22 dan Chloramphenicol untuk L1K). Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 48 jam. Populasi masing-masing probiotik dihitung dengan cara *Total Plate Count* (TPC).

#### *Jumlah total bakteri A. hydrophila organ target*

Total bakteri *A. hydrophila* di organ target (ginjal dan hati) diamati pada awal pemeliharaan serta tujuh hari dan 14 hari pascauji tantang. Penghitungan jumlah bakteri dilakukan dengan mengambil sampel ginjal dan hati ikan masing-masing sebanyak 0,1 g. Sampel dihaluskan menggunakan *mortar* dan dihomogenkan dalam 0,9 ml larutan PBS. Media yang digunakan berupa media selektif *A. hydrophila* RS (*Rimler-Shotts*), kemudian dilakukan pengenceran berseri serta penghitungan bakteri dengan metode cawan. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 jam. Jumlah total bakteri *A. hydrophila* dihitung dengan cara *Total Plate Count* (TPC).

#### *Analisis data*

Data total bakteri di usus, total probiotik di usus, dan total *A. hydrophila* di organ target dianalisis secara deskriptif, sedangkan data lainnya dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA) pada selang kepercayaan 95%, data yang berbeda nyata diuji menggunakan uji lanjut Duncan.

## **Hasil**

### *Kinerja pertumbuhan*

Laju sintasan ikan lele pada perlakuan A, B, C, D, E, F dan kontrol selama masa pemeliharaan memiliki kisaran nilai 93,31-97,78% dan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antarperlakuan ( $p > 0,05$ ; Tabel 1). Nilai laju pertumbuhan spesifik tertinggi terdapat pada perlakuan E ( $4,537 \pm 0,018\%$ ), tidak berbeda nyata dengan perlakuan D ( $p > 0,05$ ; Tabel 1) namun berbeda nyata dengan perlakuan lain ( $p < 0,05$ ; Tabel 1). Perlakuan D menunjukkan nilai FCR terendah ( $1,191 \pm 0,013$ ), tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ; Tabel 1) dengan perlakuan C ( $1,242 \pm 0,062$ ) dan F ( $1,25 \pm 0,034$ ) namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ; Tabel 1).

Total bakteri pada saluran pencernaan selama masa pemeliharaan 40 hari pada perlakuan F ( $7,11 \pm 0,53 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) diketahui memberikan hasil tertinggi (Tabel 2). Total probiotik *B. Cereus* (P22) dan *S. lentus* (L1k) tertinggi dihasilkan oleh perlakuan E ( $4,06 \pm 0,09 \log \text{CFU g}^{-1}$ ;  $4,02 \pm 0,08 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) (Tabel 2). Total bakteri di usus pada seluruh perlakuan probiotik diketahui memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan kontrol (Tabel 2).

### *Respons imun*

Pemberian probiotik dengan dosis dan frekuensi berbeda diketahui memberikan pengaruh terhadap parameter gambaran darah. Setelah masa pemeliharaan selama 40 hari, kadar hematokrit (Hc), hemoglobin (Hb), aktivitas fagositosis (AF), dan ledakan respiratori (RB) pada perlakuan pemberian probiotik menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibanding kontrol ( $p < 0,05$ ) (Gambar 1a, 1b, 1c, dan 1d). Fluktuasi nilai pada parameter gambaran darah terjadi pascauji tantang (Gambar 1a, 1b, 1c dan 1d), hal tersebut diduga berkaitan dengan status kesehatan ikan.

Tabel 1 Laju sintasan (SR), laju pertumbuhan spesifik (SGR), dan nisbah konversi pakan (FCR) ikan lele yang diberi probiotik dengan dosis dan frekuensi berbeda

Perlakuan	SR (%)	SGR (%)	FCR
K	93,31±6,67 <sup>a</sup>	3,681±0,000 <sup>a</sup>	1,750±0,070 <sup>d</sup>
A	93,33±6,67 <sup>a</sup>	4,143±0,016 <sup>b</sup>	1,340±0,004 <sup>b</sup>
B	97,78±3,85 <sup>a</sup>	4,361±0,077 <sup>c</sup>	1,441±0,036 <sup>c</sup>
C	97,78±3,85 <sup>a</sup>	4,367±0,101 <sup>c</sup>	1,242±0,062 <sup>ab</sup>
D	93,33±6,67 <sup>a</sup>	4,433±0,003 <sup>cd</sup>	1,191±0,013 <sup>a</sup>
E	97,78±3,85 <sup>a</sup>	4,537±0,018 <sup>d</sup>	1,462±0,004 <sup>c</sup>
F	95,55±3,85 <sup>a</sup>	4,195±0,055 <sup>b</sup>	1,244±0,034 <sup>ab</sup>

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Duncan;  $p < 0,05$ ). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku. K (kontrol tanpa pemberian probiotik), A (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari) dan F (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali).

Tabel 2 *Total bacterial count* (TBC) dan *total probiotic count* (TPC) P22 & L1k pada saluran pencernaan ikan lele yang diberi probiotik dengan dosis dan frekuensi berbeda

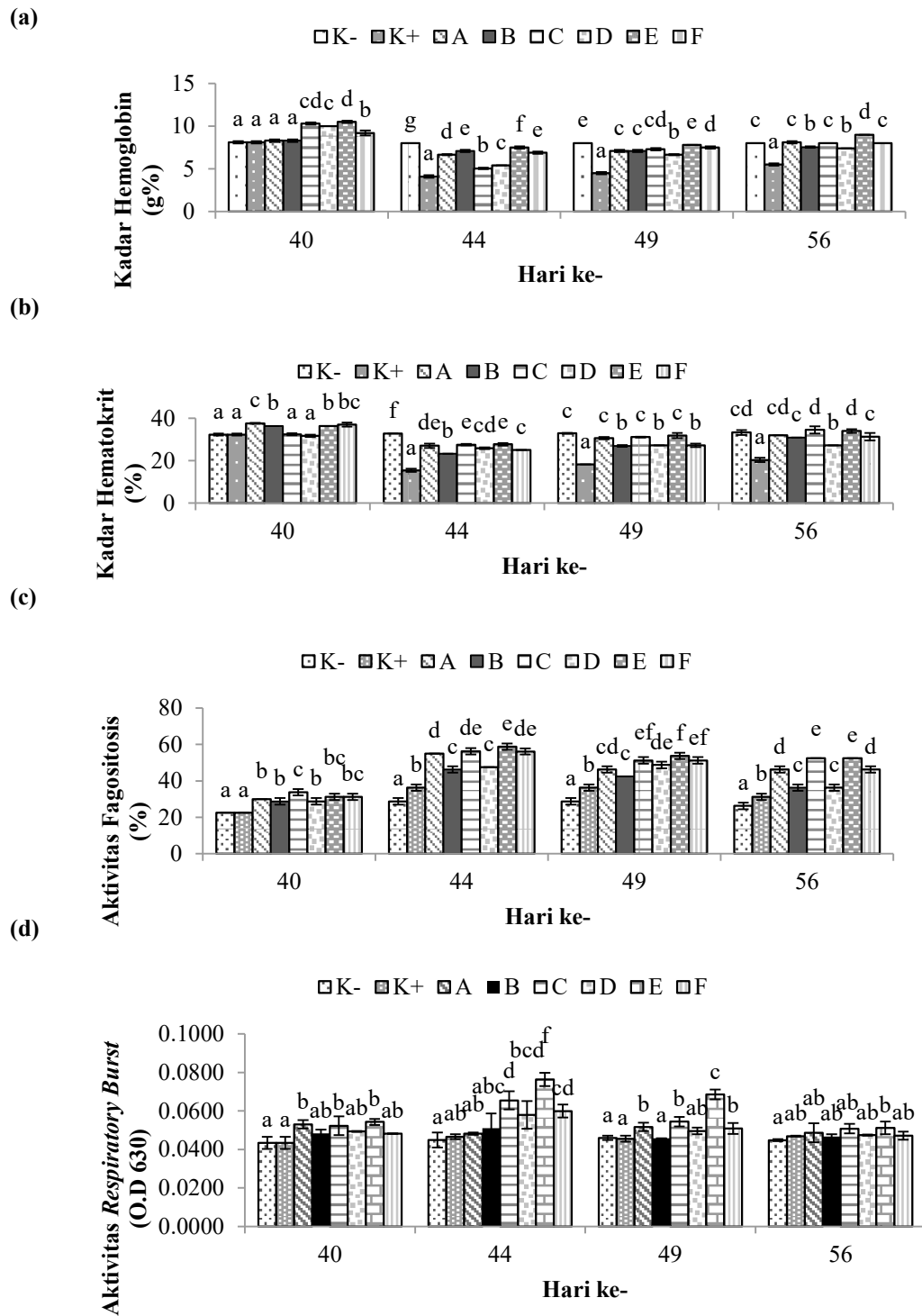
Perlakuan	TBC (log CFU g <sup>-1</sup> )	TPC (log CFU g <sup>-1</sup> )	
		P22	L1k
K	6,37±0,16	0,00±0,00	0,00±0,00
A	6,81±0,51	3,12±0,16	3,04±0,06
B	6,42±0,16	3,06±0,08	3,54±0,08
C	6,84±0,08	3,85±0,07	3,49±0,16
D	6,57±0,23	3,10±0,15	3,47±0,01
E	6,99±0,83	4,06±0,09	4,02±0,08
F	7,11±0,53	3,65±0,08	3,88±0,05

Keterangan: K+ (kontrol positif), A (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari) dan F (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali).

Kadar Hc dan Hb menurun pada hari ke 44 dan meningkat kembali pada hari ke 49 dan 56. Kadar Hb tertinggi pada akhir pemeliharaan dan pascauji tantang ditunjukkan oleh perlakuan E (Gambar 1a) berbeda nyata dengan seluruh perlakuan ( $p < 0,05$ ). Nilai Hc tertinggi pada hari ke 44 dan 49 dihasilkan oleh perlakuan E (27,70±0,61; 31,83±1,25) tidak berbeda nyata dengan perlakuan A, dan C ( $p > 0,05$ ) namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ). Nilai Hc tertinggi pada hari ke 56 ditunjukkan oleh perlakuan C (34,52±1,69) tidak berbeda nyata

dengan perlakuan A dan E ( $p < 0,05$ ) namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p > 0,05$ ).

Pascauji tantang, nilai AF dan RB meningkat pada hari ke 44 kemudian menurun kembali pada hari ke 49 dan 56. Nilai AF tertinggi pada hari ke 44 ditunjukkan oleh perlakuan E (58,75±1,77) tidak berbeda nyata dengan perlakuan C dan F ( $p > 0,05$ ) namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ). Nilai RB tertinggi pada hari ke 44 dihasilkan oleh perlakuan E (0,076±0,004) berbeda nyata dengan seluruh perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ).



Gambar 1 Kadar hemoglobin (a), kadar hematokrit (b), aktivitas fagositosis (c), aktivitas ledakan respiratori (d) ikan lele yang diberi probiotik dengan dosis dan frekuensi yang berbeda pada akhir pemeliharaan (hari ke-40) dan pascauji tantangan (hari ke- 44, 49 dan 56). Huruf yang berbeda di setiap batang hari yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Duncan;  $p < 0,05$ ). K+ (kontrol positif), A (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari) dan F (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali).

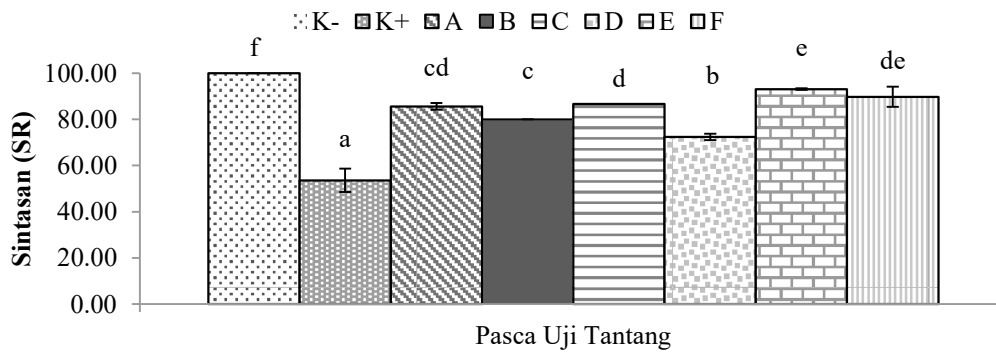
Total *A. hydrophila* di organ target pada awal pemeliharaan untuk seluruh perlakuan menunjukkan hasil  $<2,00 \pm 0,00 \log \text{CFU g}^{-1}$ . Kemampuan bakteri probiotik dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui dari total *A. hydrophila* pada organ target. Total *A. hydrophila* di organ ginjal dan hati terendah pada hari ke-49 dihasilkan oleh perlakuan E ( $3,65 \pm 0,49 \log \text{CFU g}^{-1}$ ;  $3,75 \pm 0,21 \log \text{CFU g}^{-1}$ ), se-

dangkan total *A. hydrophila* di organ hati dan ginjal terendah pada hari ke-56 dihasilkan oleh seluruh perlakuan probiotik dengan frekuensi pemberian setiap hari yaitu perlakuan A, C, E ( $<2,00 \pm 0,00 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) (Tabel 3). Total *A. hydrophila* di organ ginjal dan hati pada K- (hari ke-49 dan 56) memiliki nilai  $<2,00 \pm 0,00 \log \text{CFU g}^{-1}$ .

Tabel 3 Total *A. hydrophila* pada organ target ikan lele pasca ujiantang yang diberi probiotik dengan dosis dan frekuensi berbeda

Perlakuan	H49 (log CFU g <sup>-1</sup> )		H56 (log CFU g <sup>-1</sup> )	
	Ginjal	Hati	Ginjal	Hati
K-	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$
K+	$6,31 \pm 1,17$	$6,87 \pm 0,17$	$4,81 \pm 0,29$	$5,34 \pm 0,62$
A	$4,95 \pm 0,06$	$4,05 \pm 0,21$	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$
B	$5,45 \pm 0,02$	$4,57 \pm 0,13$	$3,84 \pm 0,34$	$3,89 \pm 0,16$
C	$4,21 \pm 0,19$	$3,88 \pm 0,39$	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$
D	$5,29 \pm 0,02$	$3,93 \pm 0,21$	$3,80 \pm 0,28$	$3,89 \pm 0,16$
E	$3,65 \pm 0,49$	$3,75 \pm 0,21$	$<2,00 \pm 0,00$	$<2,00 \pm 0,00$
F	$5,05 \pm 0,57$	$4,41 \pm 0,21$	$3,54 \pm 0,34$	$3,65 \pm 0,49$

Keterangan: K+ (kontrol positif), A (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari), dan F (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali).



Gambar 2 Laju sintasan ikan lele pasca ujiantang *A. hydrophila*. Huruf yang berbeda di setiap bar menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Duncan;  $p < 0,05$ ). K+ (kontrol positif), A (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi setiap hari), B (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 0,5% frekuensi tiga hari sekali), C (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi setiap hari), D (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 1% frekuensi tiga hari sekali), E (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi setiap hari), dan F (pakan + mikrokapsul probiotik dosis 2% frekuensi tiga hari sekali).



*Laju sintasan pascauji tantang*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh perlakuan probiotik memberikan tingkat sintasan yang lebih baik dibandingkan kontrol positif ( $p < 0,05$ ) (Gambar 2). Perlakuan E ( $93,10 \pm 0,33\%$ ) memberikan hasil laju sintasan yang lebih tinggi, tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan perlakuan F ( $89,77 \pm 4,38\%$ ) namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ).

*Kualitas air*

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kualitas air selama masa pemeliharaan adalah suhu  $26-30^{\circ}\text{C}$ , oksigen terlarut  $4-5,93 \text{ mg L}^{-1}$ , amoniak  $0,016-0,673 \text{ mg L}^{-1}$ , dan pH  $5,5-7,0$ .

**Pembahasan***Kinerja pertumbuhan*

Laju pertumbuhan spesifik meningkat seiring dengan peningkatan dosis pemberian probiotik, kecuali pada perlakuan F ( $4,195 \pm 0,055$ ) yang mengalami penurunan. Penurunan nilai laju pertumbuhan spesifik pada perlakuan F tersebut diduga terjadi karena adanya penurunan frekuensi pemberian mikrokapsul probiotik pada dosis tinggi (2%). Pada dosis tinggi (2%) bakteri probiotik bekerja lebih efektif dalam meningkatkan nilai laju pertumbuhan spesifik apabila diberikan dengan frekuensi tinggi (setiap hari). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Zubaidah *et al.* (2015) bahwa semakin tinggi dosis sinbiotik *Bacillus* sp. yang diberikan maka laju pertumbuhan semakin meningkat. Peningkatan frekuensi pemberian probiotik pada dosis yang rendah (0,5%) mengakibatkan penurunan laju pertumbuhan, pada dosis sedang (1%) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, sedangkan pada dosis tinggi (2%) menunjukkan adanya peningkatan laju pertumbuhan. Probiotik yang diberikan pada dosis sedang (1%) dengan frekuensi pemberian probiotik tiga hari

sekali menunjukkan nilai nisbah konversi pakan terbaik.

Pemberian mikrokapsul probiotik *B.cereus* P22 dan *S. lentus* L1k diketahui dapat meningkatkan laju pertumbuhan spesifik dan menurunkan nisbah konversi pakan dibandingkan perlakuan kontrol. Peningkatan laju pertumbuhan spesifik dan penurunan nisbah konversi pakan pada perlakuan mikrokapsul probiotik diduga akibat pengaruh dari meningkatnya probiotik *B.cereus* P22 dan *S. lentus* L1k pada saluran pencernaan. Sya'bani *et al.* (2015) menyatakan bahwa pemberian probiotik *Bacillus* sp dan *Staphylococcus* sp. pada media budi daya diketahui mampu memberikan hasil konversi pakan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Menurut Bagheri *et al.* (2008), peningkatan laju pertumbuhan spesifik dan penurunan nilai nisbah konversi pakan pada perlakuan pemberian probiotik *Bacillus* sp. melalui pakan diduga disebabkan oleh peran *Bacillus* sp. dalam membantu memecah protein dan karbohidrat. Balcazar *et al.* (2007) menyatakan bahwa probiotik melalui pakan mampu memodifikasi komposisi mikrobiota sehingga memberikan pengaruh yang baik terhadap sistem pencernaan.

Peningkatan dosis pemberian probiotik mengakibatkan peningkatan total bakteri dan total probiotik pada saluran pencernaan ikan uji. Peningkatan frekuensi pemberian probiotik juga mengakibatkan peningkatan jumlah total bakteri (kecuali pada perlakuan dosis 2%). Pada dosis yang sama, ikan uji yang diberikan dengan frekuensi pemberian tiga hari sekali menunjukkan jumlah probiotik yang lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan frekuensi pemberian setiap hari. Tingginya jumlah probiotik P22 dan L1k di saluran pencernaan pada perlakuan E diduga disebabkan oleh tingginya jumlah sel probiotik yang diberikan pada pakan dengan frekuensi

pemberian yang lebih tinggi. Organisme probiotik diketahui mampu bertahan pada saluran pencernaan apabila diberikan dalam jangka waktu yang lama, sehingga semakin lama waktu pemberian probiotik maka jumlah mikroorganisme dalam saluran pencernaan semakin meningkat (Cruz *et al.* 2012). Peningkatan jumlah total bakteri di saluran pencernaan akibat pemberian probiotik *Bacillus* sp. melalui pakan pada *Oreochromis niloticus* (Utami *et al.* 2015) juga pernah dilaporkan sebelumnya.

#### Respons imun

Suplementasi probiotik memberikan hasil imun yang lebih baik dibanding perlakuan kontrol. Kadar hemoglobin, hematokrit, aktivitas fagositosis dan aktivitas ledakan respiratori pada akhir pemeliharaan serta pascauji tantang menunjukkan bahwa perlakuan probiotik dengan frekuensi pemberian setiap hari menghasilkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan frekuensi pemberian tiga hari sekali. Peningkatan dosis probiotik mengakibatkan peningkatan kadar hemoglobin, aktivitas fagositosis dan aktivitas ledakan respiratori, namun tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan kadar hematokrit. Pemberian probiotik selama masa pemeliharaan diduga berpengaruh terhadap peningkatan beberapa parameter tersebut. Meningkatnya kadar hematokrit mengindikasikan bahwa probiotik yang digunakan efektif dalam meningkatkan status kesehatan ikan (Aly *et al.* 2008). Bakteri probiotik dapat memberikan efek imunostimulan melalui interaksi dengan *Gut associated Lymphoid Tissue* (GALT) sehingga mampu menstimulasi sistem imun (El-Bouhy *et al.* 2013). Pascauji tantang terjadi fluktuasi nilai hematokrit, hemoglobin, aktivitas fagositosis, dan aktivitas ledakan respiratori. Penurunan kadar hematokrit dan hemoglobin pascauji tantang diduga berhubungan dengan

masa inkubasi *A. hydrophila* dan terkait adanya infeksi oleh bakteri tersebut. Penurunan dua parameter ini pascauji tantang menandakan adanya penurunan produksi sel darah merah oleh ginjal (Utami *et al.* 2015) dan lisis pada sel darah merah akibat eksotosin maupun endotoksin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* (Hardi *et al.* 2014).

Meningkatnya aktivitas fagositosis dan ledakan respiratori pascauji tantang mengindikasikan adanya peningkatan respons imun pada ikan uji. Menurut Aly *et al.* (2008), meningkatnya aktivitas ledakan respiratori menandakan adanya peningkatan respons imun non spesifik. Balcazar *et al.* (2007) menyatakan bahwa aktivitas fagositosis merupakan perlawanan awal sebagai respons inflamasi sebelum produksi antibodi, hal tersebut diperantarai oleh sel fagosit seperti neutrofil, monosit, dan makrofag. Fagosit merupakan mekanisme pertahanan yang paling penting terkait dengan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Proses tersebut akan mereduksi  $O_2$  menjadi  $O_2^-$  yang akan menghasilkan enzim katalis dari berbagai produk reaktif oksigen termasuk  $H_2O_2$ , OH, *hypocholous acid*, dan *peroxynitrite* yang berperan sebagai efek antimikroba. Hasil penelitian Biller-Takahasi *et al.* (2013) menunjukkan bahwa aktivitas ledakan respiratori meningkat setelah injeksi *A. hydrophila* pada *Piaractus mesopotamicus*.

Peningkatan dosis dan frekuensi pemberian probiotik pada pakan memberikan pengaruh terhadap penurunan total *A. hydrophila* pada organ target. Semakin tinggi frekuensi pemberian probiotik maka semakin cepat penurunan total *A. hydrophila* pada organ target. Hari ke-56 menunjukkan bahwa seluruh perlakuan probiotik dengan frekuensi pemberian setiap hari dapat menurunkan total *A. hydrophila* hingga  $<2,00 \pm 0,00$  log CFU  $g^{-1}$ . Penurunan total *A. hydrophila* di organ target mengindikasikan adanya upaya perla-

wanan sistem imun pada ikan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* oleh *B. cereus* P22 dan *S. lentus* L1k. *B. cereus* diketahui mampu mengurangi patogenitas dan pertumbuhan *A. hydrophila* (Lalloo *et al.* 2010). Probiotik diketahui memiliki efek antimikroba dengan memodifikasi mikrobiota usus, mensekresi zat antibakteri (bakteriosin dan asam organik) (Cruz *et al.* 2012), berinteraksi dengan sel fagosit dan NK sel dalam meningkatkan respons imun (El-Bouhy *et al.* 2013).

#### *Laju sintasan pascauji tantang*

Pemberian pakan yang mengandung probiotik mampu meningkatkan jumlah total bakteri serta total P22 dan L1k pada saluran pencernaan sehingga dapat menekan infeksi *A. hydrophila* dan mampu meningkatkan sintasan ikan lele. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Nayak (2010) bahwa probiotik mampu menempel di jaringan limfoid usus sehingga mempercepat rangsangan pada makrofag untuk mengetahui keberadaan antigen. Sya'bani *et al.* (2015) menyatakan bahwa pemberian probiotik *Bacillus* sp. dan *Staphylococcus* sp. pada media budi daya diketahui mampu meningkatkan sintasan ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang diinfeksi *A. hydrophila*. Hasil penelitian Khalwan *et al.* (2012) menunjukkan bahwa suplementasi probiotik *Bacillus* sp. dapat menurunkan persentase jumlah kematian pada ikan gurami (*Osphronemus goramy*) yang diinfeksi *A. hydrophila*. Utami *et al.* (2015) menyatakan bahwa suplementasi probiotik mikrokapsul diketahui efektif mengendalikan streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan laju sintasan yang lebih tinggi setelah uji tantang.

#### *Kualitas air*

Hasil pengukuran suhu, oksigen terlarut, pH, dan amoniak selama masa pemeliharaan menunjukkan bahwa kualitas air pada media pemelihan

masih berada pada kisaran normal. Menurut Boyd (1990), nilai kualitas air yang layak untuk ikan air tawar meliputi suhu 24-30°C, pH 6,5-9,5 dan amoniak <0,52 mg L<sup>-1</sup>.

#### **Simpulan**

Suplementasi mikrokapsul probiotik *B. cereus* P22 dan *S. lentus* L1k pada pakan dengan dosis 2% yang diberikan setiap hari menunjukkan hasil yang lebih baik dalam meningkatkan laju pertumbuhan, respons imun, dan resistensi ikan lele terhadap *A. hydrophila*.

#### **Persantunan**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor (BPPBAT) atas sarana prasarana yang mendukung selama pelaksanaan penelitian. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada semua tim yang telah membantu selama penulis melakukan penelitian.

#### **Daftar pustaka**

- Aly SM, Ahmed YA, Abdel-Aziz A. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1-2): 128-136.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Proceeding of the second symposium on disease in Asian Aquaculture, October 25-29. 1993, Phuket, Thailand. pp. 185-202.
- Bagheri T, Hedayati SA, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1): 43-48.
- Balcazar JL, Blas ID, Ruiz-Zarzuola I, Vandrell D, Girones O, Muzquiz JL. 2007. Enhancement of the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria

- against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1): 185-193.
- Biller-Takahasi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2): 425-429.
- Boyd, CE. 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture. 2nd Ed.* Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, AL, USA. 482 p.
- Cruz PM, Ibanez L, Hermosillo OAM, Saad HC. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network*, (1): 1-14.
- Effendie MI. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama, Yogyakarta. 163 hlm.
- El-Bouhy ZM, El-Nobi GA, Hassanin ME, El-Hady MA. 2013. Effects of dietary application of two antagonistic gut-isolated *Bacillus* species on the immune response of *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Zagazig Veterinary Journal*, 41(2): 31-39.
- Giri SS, Sukumaran V, Oviya M. 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(2): 660-666.
- Hardi EH, Pebrianto CA, Hidayanti T, Handayani, R. T. 2014. Infeksi *Aeromonas hydrophila* melalui jalur yang berbeda pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8(2): 130-133.
- Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26(7): 816-835.
- Janda J M, Abbott SL. 2010. Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1):35-73.
- Jyothi NVN, Prasanna PM, Suhas NS, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. 2010. Microencapsulation technique, factors influencing encapsulation efficiency. review. *Journal of Microencapsulation*, 27(3): 187-197.
- Khalwan, Irianto A, Rachmawati FN. 2012. Pengaruh suplementasi *Bacillus* sp. melalui perfiton terhadap jumlah total mikroba intestinal dan gambaran darah ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Bioteknologi*, 9(2): 35-40.
- Laloo R, Moonsamy G, Ramchuran S, Gorgens J, Gardinel N. 2010. Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Journal compilation*, 50(2010): 563–570.
- Munaeni W, Yuhana M, Widanarni. 2014. Effect of micro-encapsulated synbiotic at different frequencies for luminous vibriosis control in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 8(2): 73-80.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.
- Rahmawati FF. 2015. Suplementasi mikrokapsul probiotik melalui pakan sebagai pencegah infeksi streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. 43 p.
- Sya'bani N, Yustiati A, Rustikawati I, Lusiatuti A. 2015. Frekuensi penambahan probiotik *Bacillus* sp. Dan *Staphylococcus* sp. Pada media pemeliharaan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) untuk ketahanan terhadap *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Kelautan*, 6(2): 130-140.
- Utami DAS, Widanarni, Suprayudi MA. 2015. Administration of microencapsulated probiotic at different doses to control streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microbiologi Indonesia*, 9(1):17-24.
- Weinbreck F, Bodnar I, Marco ML. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3): 364-367.
- Welker TL, Lim C. 2011. Use of probiotics in diets of tilapia. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 31(14): 2-8.
- Zubaidah A, Yuhana M, Widanarni. 2014. Encapsulated synbiotic dietary supplementation at different dosages to prevent vibriosis in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Hayati Journal of Biosciences*, 22(4): 163-168.
- Zonneveld N, Huisman EA, Boon JH. 1991. *Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 318 hlm.