

PEMANFAATAN BAKTERI DARI USUS IKAN KELABAU (*Osteochilus melanopleurus*) DALAM MENGHADAPI INFEKSI BAKTERI *Pseudomonas* sp.

Utilization of Kelabau Fish (*Osteochilus melanopleurus*) Gut Bacteri Against *Pseudomonas* sp. Infection

Agustina^{1*}, Slamet Budi Prayitno², Agus Sabdono³, Gina Saptiani¹

1 Program Studi Akuakultur, Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman, Jl. Gunung Tabur, Kampus UNMUL Gunung Kelua Samarinda, Kalimantan Timur (75123)

2 Program Studi Akuakultur, Jurusan Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto SH, Kampus Tembalang Semarang, Jawa Tengah (50275)

3 Program Studi Ilmu Kelautan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto SH, Kampus Tembalang Semarang, Jawa Tengah (50275)

*Korespondensi email: agustina@fpik.unmul.ac.id

ABSTRAK

Bakteri *Pseudomonas* sp. cukup banyak ditemukan menginfeksi ikan air tawar yang dibudidayakan di sepanjang Sungai Mahakam Provinsi Kalimantan Timur. Pemanfaatan bakteri dari usus ikan lokal yaitu ikan kelabau (*Osteochilus melanopleurus*) sebagai kandidat probiotik diharapkan lebih aman untuk mengendalikan infeksi tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisa kemampuan empat isolat bakteri dari usus ikan kelabau yaitu BPs1, BPs2, BP3 dan BeP1 secara *in vivo* pada ikan kelabau dalam menghadapi infeksi bakteri *Pseudomonas* sp., yang meliputi tingkat kelangsungan hidup, jumlah bakteri patogen dalam darah dan parameter hematologi ikan kelabau. Ikan kelabau dengan berat $10,23 \pm 0,75$ g masing-masing sebanyak 10 ekor dipelihara dalam akuarium dengan volume 30 L. Ikan diberi pakan komersil yang sebelumnya disemprot dengan isolat bakteri pada konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan dosis 0,05 mL/g, sedangkan perlakuan kontrol pakan diberi larutan Phosphat Buffer Saline dengan dosis yang sama. Ikan diberi pakan tiga kali sehari secara *at satiation* dan penambahan bakteri dalam pakan dilakukan satu kali pada pagi hari. Perlakuan pakan diberikan sampai 13 hari, pada hari ke-14 ikan diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. yang diinjeksikan secara intramuscular dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan dosis 0,1 mL/ ikan. Ikan selanjutnya diamati sampai hari ke-21. Hasilnya menunjukkan bahwa penambahan isolat bakteri dari usus ikan kelabau mampu menekan infeksi *Pseudomonas* sp. Daya lindung terbaik ditunjukkan oleh isolat BPs2 (*Staphylococcus edaphicus* MT 269536) berupa tingkat kelangsungan hidup ikan, jumlah bakteri patogen dalam darah dan parameter hematologi dibanding perlakuan lain terutama kontrol ($p > 0.05$). Berdasarkan hal tersebut bakteri dari usus ikan kelabau berpotensi sebagai probiotik dalam budidaya ikan air tawar.

Kata Kunci: Ikan Kelabau, *Pseudomonas* sp., Probiotik, Parameter Hematologi, Tingkat Kelangsungan Hidup

ABSTRACT

Pseudomonas sp. were found to infect freshwater fish cultured along the Mahakam River, East Kalimantan Province. Utilization of bacteria from kelabau fish gut (*Osteochilus melanopleurus*) as a probiotic candidate is expected to be safer to control the infection. This study was conducted to analyze the in vivo ability of four bacterial isolates from kelabau gut, namely BPs1, BPs2, BP3 and BeP1 against *Pseudomonas* sp. infection kelabau fish weighing 10.23 ± 0.75 g, 10 fish each were reared in an aquarium with a volume of 30 L. The fish were fed commercial feed which was previously sprayed with bacterial isolate at a concentration of 10^6 CFU/mL with a dose of 0.05 mL/g, while the control treatment was given the same dose of Phosphate Buffer Saline solution. Fish were fed three times a day *at satiation* and the addition of bacteria in the feed was done once in the morning. Feed treatment was given up to 13 days, on the 14th day the fish were challenged with *Pseudomonas* sp. injected intramuscularly with a concentration of 10^6 CFU/mL at a dose of 0.1 mL/fish, and then observed until day 21. The results showed that the addition of bacterial from gut of kelabau was able to against *Pseudomonas* sp. The best protection was shown by BPs2 (*Staphylococcus edaphicus* MT 269536) in survival rate, number of pathogenic bacteria in the blood and hematological parameters compared to other treatments, especially controls ($p > 0.05$). Based on this, bacteria from kelabau gut have potential as probiotics in freshwater fish culture.

Keywords: Hematological Parameters, Kelabau Fish, *Pseudomonas* sp., Probiotics, Survival Rate

PENDAHULUAN

Sungai Mahakam yang memiliki panjang sekitar 920 km sudah cukup lama dijadikan sebagai lokasi budidaya ikan dalam keramba. Beberapa jenis ikan air tawar sudah dibudidayakan dalam keramba termasuk jenis ikan lokal antara lain: jelawat dan betutu. Masih banyak ikan lokal yang hidup di Sungai Mahakam yang belum dibudidayakan diantaranya adalah ikan Kelabau (*Osteochilus melanopleurus*), yang termasuk dalam golongan ikan Cyprinid. Ikan kelabau banyak ditemukan di Pulau Sumatera dan Kalimantan dan ikan ini termasuk genus *Osteochilus*. Ikan ini dapat tumbuh baik dengan pemberian pakan buatan dengan komposisi yang kompleks pada wadah budidaya (Mardani., 2014). Hal ini menunjukkan bahwa ikan kelabau memiliki potensi untuk dibudidayakan.

Serangan penyakit menjadi satu masalah yang dihadapi oleh pembudidaya ikan dalam keramba di daerah ini. Kasus kematian ikan banyak terjadi saat masuk musim hujan. Hal ini merupakan akibat dari ketidakseimbangan antara kondisi lingkungan, ketahanan tubuh ikan dan berkembangnya mikroorganisme patogen. Menurut penelitian Apriani *et al.*, (2021), populasi mikroba yang ada di perairan tersebut mengalami peningkatan terutama kelompok yang bersifat fakultatif seperti *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* pada saat yang bersamaan dengan menurunnya kualitas air dalam wadah budidaya.

Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, penyakit yang sering terjadi pada ikan-ikan yang dibudidayakan dalam keramba di daerah ini adalah penyakit bakterial antara lain disebabkan oleh *Pseudomonas* sp. (Agustina *et al.*, 2014). Bakteri *Pseudomonas* sp. ditemukan

pula pada ikan budidaya di berbagai stadia umur. Injeksi dengan dosis 10^{10} CFU/ml suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan kematian sebanyak 80 % pada ikan nila (Hardi, 2012). Bakteri ini menghasilkan produk ekstraselular (Extracellular Product atau ECP) dan produk intraselular (Intracellular Product atau ICP) yang mampu menyebabkan perubahan tingkah laku dan patologi anatomi pada ikan yang diinfeksi. Perubahan tingkah laku berupa perubahan pola renang, mata mengalami eksophthalmia serta perubahan pada beberapa organ dalam seperti ginjal dan hati (Hardi, 2014).

Pemanfaatan bakteri atau mikroflora yang berasal dari saluran pencernaan ikan sudah banyak dilakukan dan dikenal sebagai probiotik. Probiotik dalam akuakultur didefinisikan sebagai sel mikroba (terutama bakteri) yang berperan dalam keseimbangan sistem pencernaan ikan dan berperan positif dalam meningkatkan kesehatan ikan, melalui peningkatan pemanfaatan nutrisi, pencegahan infeksi dari mikroba patogen melalui kompetisi dalam pelekatan, aktivitas bakterisidal, netralisasi toksin, sampai pada peningkatan sistem imunitas ikan (Hoseinifar et al., 2018). Penelitian mengenai bakteri menguntungkan yang berasal dari saluran pencernaan organisme akuatik dalam mengendalikan infeksi bakteri patogen sudah dilakukan. Hasilnya menunjukkan bahwa bakteri yang berasal dari saluran pencernaan organisme akuatik memiliki kemampuan menekan pertumbuhan bakteri patogen, aman bagi organisme akuatik serta lingkungan perairan, selain itu mampu mengendalikan infeksi bakteri patogen melalui peningkatan sistem imunitasnya, bahkan mampu meningkatkan pertumbuhannya Talpur et al., (2014); Araujo et al., (2015). Penelitian mengenai komposisi mikroflora dalam usus ikan kelabau serta kemampuannya dalam mengendalikan infeksi bakteri patogen secara *in vitro* sudah dilakukan (Agustina et al., 2018) dan aman diaplikasikan pada ikan mas (Agustina et al., 2019), sedang di pihak yang lain meningkatnya kegiatan budidaya beberapa jenis ikan air tawar di Kabupaten Kutai Kartanegara memiliki potensi terjadinya serangan infeksi oleh *Pseudomonas* sp. Potensi isolat bakteri dari usus ikan kelabau sebagai kandidat probiotik secara *in vivo* perlu dilakukan dalam upaya pengendalian kesehatan ikan budidaya.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini terdiri dari tahap persiapan dan pelaksanaan atau pemeliharaan yang dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman selama 3 bulan.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari akuarium dengan ukuran 40x30x30 cm 16 buah, dissecting set (alat bedah), petridish, tabung reaksi, erlenmeyer, mikro pipet dan jarum ose, hot plate, magnetic stirrer, homogenizer, inkubator, sentrifuge, autoclave dan oven, syringe disposable 26 Gx1/2" ukuran 1 mL, tabung mikrohematokrit dan mikrohematokrit sentrifuge hemositometer, mikropipet, mikrotube, gelas obyek dan gelas penutup, thermometer, DO-meter, pH-meter, dan amonia teskit, dan mikroskop merk Olympus BX41.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: ikan kelabau berukuran sekitar $10,23 \pm 0,75$ g sebanyak 200 ekor berasal dari BBAT Mandiangin Kalimantan Selatan, isolat bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1, isolat bakteri usus ikan kelabau BPS1, BPS2, BP3 dan BeP1,

larutan PBS (Phosphate Buffered Saline), media Tryptic Soy Agar (TSA), media Tryptic Soy Broth (TSB), media Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP), pakan ikan terapung merk PF 1000 dengan kandungan protein sebesar 39-41%, akuades, antikoagulan Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 8,5%, alkohol 70%, larutan Hayem, larutan Turk's digunakan untuk preparasi darah ikan.

Rancangan Percobaan

Uji ini menggunakan desain eksperimental laboratorium lima dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan terdiri dari empat isolat bakteri usus ikan kelabau, yaitu BPS1 (*Staphylococcus edaphicus*), BPS2 (*Bacillus paramycooides*), BP3 (*B. albus*), BeP1 (*B. albus*) dan kontrol (larutan PBS).

Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian diuraikan sebagai berikut:

Persiapan media dan wadah pemeliharaan

Air tawar dari PDAM kemudian ditampung dalam bak penampungan sementara dan diaerasi selama 36 jam untuk menghilangkan chlorin dan diendapkan selama 24 jam. Akuarium wadah ikan stok dan percobaan dicuci bersih dengan sabun lalu direndam dengan $KmnO_4$ 7%, kemudian dibilas dan direndam dengan air bersih selama 24 jam serta dikeringkan. Air dimasukkan ke dalam akuarium dan diaerasi, sehingga siap digunakan untuk percobaan.

Persiapan hewan uji

Ikan yang sampai di laboratorium dimasukkan ke dalam akuarium stok untuk diadaptasikan selama 72 jam. Ikan diuji screening dengan merendamnya dalam larutan formalin 20 ppm selama 15 menit. Ikan diadaptasikan kembali selama tiga jam, kemudian diseleksi dengan memilih ikan yang sehat sebagai hewan uji.

Persiapan pakan uji

Masing-masing isolat bakteri diinkubasi dalam media TSB selama 24 jam pada suhu 30 °C. Sel-sel yang dipanen kemudian dibilas dan disuspensikan kembali dalam phosphate buffer saline (PBS). Setiap suspensi bakteri (0,1 ml) mengandung sekitar 10^6 CFU/ml, sebagaimana ditentukan oleh metode standar plate count (Gupta et al., 2014). Suspensi bakteri disemprotkan sebanyak 0,05 mL/g ke dalam pakan perlahan, campur bagian demi bagian. Pakan komersial yang disemprot dengan PBS yang steril sebagai pakan kontrol. Pakan yang sudah disemprot dikeringanginkan selama 30 menit agar meresap ke dalam pakan dan tidak larut dalam air ketika pakan diberikan pada ikan.

Pemeliharaan hewan uji dan ujiantang dengan patogen

Ikan diberi pakan tiga kali sehari secara *at satiation* dan pemberian pakan perlakuan satu kali pada pagi hari. Pemberian pakan sesuai perlakuan dilakukan selama 13 hari pemeliharaan, pada hari ke-14 ikan diuji tantang dengan *Pseudomonas* sp. PS-1, suspensi bakteri lalu diinjeksikan secara intramuscular dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan dosis 0,1 mL/ekor, sebelumnya ikan dibius dengan cara direndam dalam air dingin (es) dengan suhu sekitar 10 °C selama 15-20 menit. Pembiusan juga dilakukan pada saat pengambilan darah ikan untuk pengamatan. Ikan dipelihara setelah uji tantang dan dilakukan pengamatan sampai hari ke-21. Kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan setiap hari sekali pada pagi hari dan menambahkan air baru sejumlah yang dibuang saat penyiponan.

Parameter Penelitian dan Analisis Data

Parameter penelitian terdiri dari:

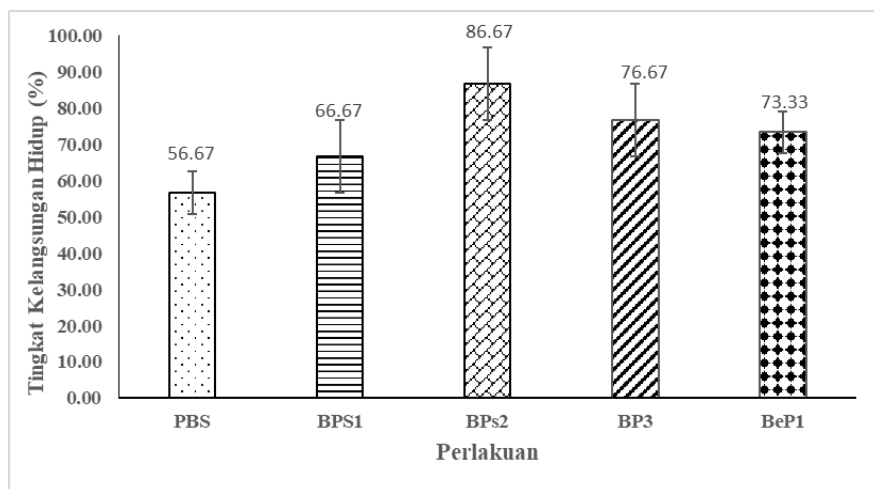
- a. Tingkat kelangsungan hidup benih ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp., data dikumpulkan pada hari ke-15 sampai ke-21. Data berupa persentase jumlah ikan yang hidup di akhir penelitian.
- b. Jumlah bakteri patogen dalam darah ikan kelabau, data dikumpulkan pada hari ke-15, 17, 19 dan 21. Data berupa jumlah total koloni bakteri diukur berdasarkan metode Total Plate Count.
- c. Kadar hemoglobin, data dikumpulkan pada hari ke-0, 7, 15 dan 21. Pengukuran hemoglobin dilakukan dengan menggunakan Hemoglobinometer Sahli dan nilai hemoglobin dibaca dalam satuan g/dL (Simanjuntak et al., 2018).
- d. Kadar hematokrit, data dikumpulkan pada hari ke-0, 7, 15 dan 21. Pengukuran hematokrit menggunakan pipet kapiler hematokrit dan melihat hasilnya dengan membaca skala tabel hematokrit dinyatakan dalam persentase (Zuhrawati, 2014).
- e. Total eritrosit, data dikumpulkan pada hari ke-0, 7, 15 dan 21. Perhitungan dilakukan pada 5 kotak kecil hemasitometer, \sum eritrosit = \sum sel eritrosit yang terhitung $\times 10^4$ sel/mm³ (Pal & Pal, 2006).
- f. Total leukosit, data dikumpulkan pada hari ke-0, 7, 15 dan 21. Perhitungan dilakukan pada kotak besar hemasitometer, \sum leukosit = \sum sel leukosit terhitung $\times 50$ sel/mm³ (Pal & Pal, 2006).
- g. Parameter kualitas air, berupa suhu; pH; oksigen terlarut dan Total Amoniak Nitrogen (TAN) diamati pada hari ke-0, 10 dan 21.

Uji one way ANOVA digunakan untuk menganalisis pengaruh jenis isolat bakteri usus ikan kelabau terhadap tingkat kelangsungan hidup, jumlah bakteri dan parameter hematologi. Uji Tukey (BNJ) pada taraf uji 5% selanjutnya digunakan untuk mengetahui rata-rata perbedaan jenis isolat bakteri usus ikan kelabau yang diberikan. Parameter kualitas air diuji secara deskriptif dalam bentuk tabel.

HASIL

Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap kelangsungan hidup ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey (BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Tingkat kelangsungan hidup tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan bakteri *Staphylococcus edaphicus* (BPs2), diikuti oleh *Bacillus paramycooides* (BP3), *B. albus* (BeP1), *B. albus* (BPs1) dan kontrol (PBS), masing-masing sebesar 86,67%, 76,67%, 73,33%, 66,67% dan 56,67% (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan atau suplementasi pakan dengan bakteri dari usus ikan kelabau selama 13 hari perlakuan lebih mampu melindungi ikan dari infeksi bakteri patogen tersebut, dibanding kontrol. Ikan kelabau mengalami kematian sekitar 24 jam setelah diinjeksi atau diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. Pada perlakuan kontrol ikan yang mati lebih banyak dibanding pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau. Tingkat kelangsungan hidup tertinggi pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau *S. edaphicus* menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut mampu melindunginya dari infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 lebih baik dari perlakuan lainnya, terutama kontrol.

Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap jumlah bakteri dalam darah ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey (BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan setiap waktu pengamatan. Kemampuan bakteri *S. edaphicus* (BPs2) untuk melindungi ikan kelabau dari infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 pada uji ini dikaitkan dengan jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 dalam darah ikan kelabau lebih rendah dengan kisaran $1,15-14,27 \times 10^5$ CFU/mL, dibanding perlakuan lain terutama ikan kelabau pada perlakuan kontrol dengan kisaran jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 dalam darah $11,64-18,03 \times 10^5$ CFU/ml (Tabel 1).



Gambar 1. Tingkat kelangsungan hidup benih ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1

Tabel 1. Rerata Jumlah Bakteri Patogen dalam Darah Ikan Kelabau setelah diinfeksi Bakteri Patogen *Pseudomonas* sp. PS-1 selama Pengamatan

Perlakuan	Jumlah Bakteri dalam Darah Ikan ($\times 10^5$ CFU/ml) Hari ke-			
	15	17	19	21
PBS	$18,03 \pm 1,58^b$	$15,75 \pm 1,51^b$	$12,81 \pm 1,45^b$	$11,64 \pm 0,57^b$
BPs1	$14,56 \pm 1,02^a$	$9,74 \pm 1,15^a$	$3,34 \pm 0,94^a$	$1,86 \pm 0,37^a$
BPs2	$14,27 \pm 1,26^a$	$6,23 \pm 0,99^a$	$1,82 \pm 0,63^a$	$1,15 \pm 0,74^a$
BP3	$13,84 \pm 1,63^a$	$9,52 \pm 0,88^a$	$3,18 \pm 0,99^a$	$2,48 \pm 0,79^a$
BeP1	$14,28 \pm 0,29^a$	$7,65 \pm 1,79^a$	$2,71 \pm 1,09^a$	$1,33 \pm 0,63^a$

Keterangan: Nilai rerata yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95% ($P > 0,05$)

Parameter hematologi ikan kelabau mengalami perubahan setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. Parameter kadar hemoglobin, kadar hematokrit dan total eritrosit mengalami penurunan setelah infeksi, sebaliknya total leukosit mengalami peningkatan. Kadar hemoglobin, kadar hematokrit dan total eritrosit, perlakuan PBS paling rendah dibanding perlakuan lain sampai hari ke-21 (Tabel 2).

Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap kadar hemoglobin ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey (BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Sehari setelah uji tantang kadar hemoglobin mengalami penurunan, tertinggi

pada perlakuan *S. edaphicus* dan terendah pada perlakuan kontrol, masing-masing sebesar $6,75 \pm 0,25$ g/dL dan $4,58 \pm 0,52$ g/dL.

Kadar hemoglobin mengalami peningkatan pada pengamatan hari ke-21. Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap kadar hematokrit ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey (BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Kadar hematokrit ikan kelabau sehari setelah uji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 mengalami penurunan, tertinggi pada perlakuan *S. edaphicus* dan terendah pada perlakuan kontrol, masing-masing sebesar $16,67 \pm 1,53\%$ dan $6,83 \pm 0,76\%$. Pada pengamatan hari ke-21 kadar hematokrit ikan kelabau terlihat meningkat.

Tabel 2. Parameter Hematologi Ikan Kelabau selama Pengamatan

Perlakuan	Pengamatan Hari ke-				
	0	7	15	17	21
Kadar Hemoglobin (g/dL)					
PBS	$6,92 \pm 0,14^a$	$6,83 \pm 0,38^a$	$4,58 \pm 0,52^a$	$4,08 \pm 0,14^a$	$5,00 \pm 0,50^a$
BPs1	$7,17 \pm 0,76^a$	$7,58 \pm 1,01^a$	$6,25 \pm 0,43^b$	$5,83 \pm 0,29^b$	$7,08 \pm 0,38^{bc}$
BPs2	$7,75 \pm 0,25^a$	$8,17 \pm 0,76^a$	$6,75 \pm 0,25^b$	$6,33 \pm 0,29^b$	$7,42 \pm 0,38^c$
BP3	$6,92 \pm 0,14^a$	$7,08 \pm 0,63^a$	$6,17 \pm 0,52^b$	$5,83 \pm 0,14^b$	$6,17 \pm 0,29^{ab}$
BeP1	$7,17 \pm 0,52^a$	$8,33 \pm 0,76^a$	$6,67 \pm 0,57^b$	$6,17 \pm 0,29^b$	$6,83 \pm 0,58^{bc}$
Kadar Hematokrit (%)					
PBS	$18,00 \pm 2,00^a$	$17,33 \pm 3,06^a$	$6,83 \pm 0,76^a$	$7,00 \pm 1,00^a$	$10,67 \pm 1,15^a$
BPs1	$18,67 \pm 3,06^a$	$18,00 \pm 2,00^a$	$14,33 \pm 1,15^{ab}$	$12,67 \pm 1,53^b$	$14,50 \pm 1,32^b$
BPs2	$18,67 \pm 2,31^a$	$20,00 \pm 4,00^a$	$16,67 \pm 1,53^c$	$16,83 \pm 1,04^b$	$17,83 \pm 1,15^c$
BP3	$17,33 \pm 2,31^a$	$17,33 \pm 1,15^a$	$14,00 \pm 3,46^{bc}$	$13,00 \pm 1,80^b$	$14,67 \pm 0,58^{bc}$
BeP1	$19,33 \pm 1,15^a$	$17,33 \pm 1,15^a$	$14,50 \pm 2,18^{bc}$	$13,33 \pm 2,31^b$	$14,33 \pm 1,53^b$
Total Eritrosit ($\times 10^6$ sel/mm^3)					
PBS	$2,01 \pm 0,04^a$	$1,96 \pm 0,08^b$	$0,97 \pm 0,00^a$	$0,88 \pm 0,01^a$	$0,96 \pm 0,04^a$
BPs1	$2,03 \pm 0,08^a$	$1,72 \pm 0,15^{ab}$	$1,15 \pm 0,15^{ab}$	$0,99 \pm 0,11^{ab}$	$1,18 \pm 0,04^b$
BPs2	$2,01 \pm 0,07^a$	$1,77 \pm 0,17^{ab}$	$1,35 \pm 0,07^b$	$1,20 \pm 0,18^b$	$1,53 \pm 0,10^c$
BP3	$2,01 \pm 0,17^a$	$1,56 \pm 0,13^a$	$1,19 \pm 0,06^{ab}$	$1,08 \pm 0,07^{ab}$	$1,29 \pm 0,07^b$
BeP1	$2,02 \pm 0,04^a$	$1,64 \pm 0,12^{ab}$	$1,10 \pm 0,13^{ab}$	$1,04 \pm 0,03^{ab}$	$1,23 \pm 0,10^b$
Total Leukosit ($\times 10^4$ sel/mm^3)					
PBS	$8,90 \pm 0,23^a$	$9,71 \pm 0,24^a$	$9,90 \pm 0,20^a$	$9,98 \pm 0,17^a$	$10,22 \pm 0,16^a$
BPs1	$8,96 \pm 0,38^a$	$11,33 \pm 0,06^b$	$11,93 \pm 0,88^b$	$12,05 \pm 0,21^b$	$11,84 \pm 0,17^b$
BPs2	$8,73 \pm 0,10^a$	$10,99 \pm 0,37^b$	$12,01 \pm 0,54^b$	$12,16 \pm 0,19^b$	$11,63 \pm 0,13^b$
BP3	$8,79 \pm 0,21^a$	$11,14 \pm 0,28^b$	$12,10 \pm 0,29^b$	$11,82 \pm 0,10^b$	$11,14 \pm 0,51^{ab}$
BeP1	$8,84 \pm 0,24^a$	$11,41 \pm 0,27^b$	$11,69 \pm 0,61^b$	$11,95 \pm 0,13^b$	$11,24 \pm 0,82^{ab}$

Keterangan: Nilai rerata yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95% ($P > 0,05$).

Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap total eritrosit ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey (BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Sehari setelah uji tantang, total eritrosit mengalami penurunan. Perlakuan *S. edaphicus* menunjukkan total eritrosit tertinggi dan perlakuan kontrol terendah, masing-masing sebesar $1,35 \pm 0,07 \times 10^6$ sel/ mm^3 dan $0,97 \pm 0,07 \times 10^6$ sel/ mm^3 . Pada pengamatan hari ke-21 total eritrosit semua perlakuan mengalami peningkatan. Pada pengamatan sehari setelah uji tantang, total leukosit ikan kelabau mengalami peningkatan. Perlakuan pemberian isolat bakteri usus dalam pakan ikan kelabau memberi pengaruh yang nyata terhadap total leukosit ikan kelabau setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Tukey

(BNJ) 5% terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Perlakuan kontrol menunjukkan total leukosit terendah dan perlakuan *S. edaphicus* tertinggi, masing-masing sebesar $9,90 \pm 0,20 \times 10^4$ sel/mm³ dan $12,01 \pm 0,54 \times 10^4$ sel/mm³. Nilai parameter kualitas air berupa suhu, pH, oksigen terlarut dan total amoniak tidak mengalami perubahan yang besar dan tidak mempengaruhi kesehatan ikan kelabau (Tabel 3).

Tabel 3. Kisaran Nilai Parameter Kualitas Air selama Pengamatan

Parameter	Pengamatan Hari Ke-			Baku Mutu *)
	0	10	21	
Suhu (°C)	27,4-28,1	27,4-28,5	27,7-29,3	Deviasi 3
pH	6,52-6,61	6,77-6,83	6,66-6,76	6,00-9,00
Oksigen terlarut (mg/L)	5,21-5,46	5,56-5,77	5,30-5,38	4,00
Total Amoniak Nitrogen (mg/L)	0,023-0,026	0,027-0,029	0,020-0,025	-

Keterangan: *) Baku mutu air sungai kelas II untuk budidaya ikan air tawar Perda Kaltim No. 02 tahun 2011

PEMBAHASAN

Tingkat kelangsungan hidup ikan kelabau pada perlakuan pemberian isolat bakteri kandidat probiotik dalam pakannya setelah diuji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 lebih tinggi dibanding dengan perlakuan kontrol. Ikan kelabau mengalami kematian sekitar 24 jam pasca injeksi atau uji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. (PS-1). Pada perlakuan kontrol (PBS) ikan yang mati lebih banyak dibanding pada perlakuan pemberian isolat bakteri dari usus ikan kelabau. Tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi dari perlakuan kontrol menunjukkan bahwa isolat bakteri dari usus ikan tersebut mampu melindunginya dari infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1. Hal ini sejalan dengan jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 yang ditemukan dalam darah ikan kelabau pada perlakuan kontrol lebih tinggi dibanding pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau terutama pada perlakuan *S. edaphicus*. Di dalam tubuh ikan kelabau, proliferasi bakteri patogen ini dihambat oleh bakteri yang berasal dari usus ikan kelabau. Penurunan jumlah bakteri selama pengamatan menunjukkan bahwa ikan memiliki kemampuan untuk menghadapi invasi patogen dari luar. Perlakuan yang diberikan semakin membantu ikan untuk pulih dari infeksi tersebut. Kemampuan menghambat proliferasi bakteri patogen ini menjadi satu diantara beberapa faktor yang mendukung tingkat kelangsungan hidup ikan kelabau, terutama pada perlakuan *S. edaphicus*. Penelitian yang dilakukan oleh Tarnecki et al., (2019) dengan penambahan bakteri probiotik *Bacillus* pada media pemeliharaan larva ikan common snook (*Centropomus undecimalis*), menunjukkan tingkat kelangsungan hidup ikan lebih tinggi 2.5 kali lipat dibanding kontrol tanpa probiotik, jumlah bakteri potensial patogenik kelompok *Vibrio* seperti *Acinetobacter*, *Flavobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Alteromonadaceae*, *Pseudoalteromonas*, dan *Pseudomonas* pun mengalami penurunan. Bakteri probiotik yang diberikan melalui pakan ikan patin (*Pangasianodon hypophthalmus*) menunjukkan hal yang serupa bahwa peningkatan kelangsungan hidup diiringi dengan meningkatnya respon imunitas serta pelekatan bakteri probiotik dalam usus sehingga bermanfaat dalam mengendalikan proliferasi bakteri yang bersifat patogen oportunistik (Haque et al., 2021).

Berdasarkan parameter hematologi, meliputi: kadar hemoglobin, kadar hematokrit, total eritrosit, dan total leukosit selama pemberian isolat bakteri usus kondisi kesehatan ikan berada pada kisaran normal. Perubahan gambaran darah dan kimia darah baik secara kualitatif dan kuantitatif dapat menentukan kondisi ikan atau status kesehatannya (Robert, 2012). Hemoglobin yang terkandung dalam eritrosit berperan dalam mengikat oksigen yang

diperlukan bagi metabolisme seluler semua sel hidup. Salasia *et al.*, (2001) menemukan bahwa kadar hemoglobin pada ikan air tawar berkisar antara 5,05-8,33 g/dL., sementara kadar hemoglobin yang diperoleh pada ikan mas sekitar 5.68 g% atau gram/100 cc darah (Arthanari & Dhanapalan, 2016). Pada uji ini, kadar hemoglobin ikan kelabau awal sekitar 6,92-7,75 g/dL lalu mengalami penurunan setelah uji tantang dengan masing-masing bakteri patogen. Hemoglobin ikan kelabau yang duji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. mengalami penurunan sampai hari ke-17 dan mulai meningkat pada hari ke-21. Pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau menyebabkan kadar hemoglobin ikan kelabau lebih tinggi dibanding ikan pada perlakuan kontrol.

Pada awal uji, kadar hematokrit ikan kelabau sekitar 18,00-19,33%, lebih rendah dibanding dengan kadar hematokrit pada ikan mas sekitar 20,84-22.32%, meskipun kedua jenis ikan ini termasuk dalam famili Cyprinidae (Arthanari & Dhanapalan, 2016). Seperti juga pada parameter total eritrosit dan hemoglobin, kadar hematokrit ikan kelabau juga mengalami penurunan setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. Hal ini menunjukkan adanya indikasi hemolisis pada darah ikan kelabau oleh bakteri *Pseudomonas* sp. Perlakuan *S. edaphicus* menunjukkan kadar hematokrit tertinggi sedangkan perlakuan kontrol terendah Hal ini menunjukkan bahwa pemberian isolat bakteri dari usus ikan kelabau berdampak positif dalam melindungi ikan tersebut menghadapi infeksi bakteri patogen. Ketiga parameter hematologi tersebut berkaitan satu dengan yang lain sebagai gambaran kondisi kesehatan ikan kelabau. Hal ini sesuai dengan pendapat Salasia *et al.*, (2001) bahwa korelasi antara jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit berhubungan dengan status kesehatan, nutrisi dan pertumbuhan ikan.

Total eritrosit ikan kelabau pada uji respon imunitas mengalami fluktuasi selama pengamatan. Rerata eritrosit ikan kelabau berkisar antara $1,38-1,67 \times 10^6/\text{mm}^3$ pada uji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1, masih berada pada kisaran yang normal sebab eritrosit pada ikan berjumlah sekitar $1,05-3,0 \times 10^6$ sel/mm³ (Roberts, 2012). Total eritrosit ikan kelabau pada uji ini adalah sekitar $2,01 \times 10^6$ sel/mm³, lalu mengalami penurunan pada pengamatan hari ke-15 atau sehari setelah uji tantang sampai pengamatan hari ke-17 dan meningkat pada hari ke-21. Pada perlakuan uji tantang dengan bakteri *Pseudomonas* sp. PS-1 total eritrosit paling rendah pada perlakuan PBS dan tertinggi pada perlakuan BPs2. Secara umum total eritrosit ikan kelabau lebih rendah setelah diuji tantang. Pada penelitian lain, strain bakteri potensial probiotik *W. cibaria* yang diuji pada ikan lele hybrid (*P. reticulatum* x *P. corruscans*) melalui pemberian pakan, mampu meningkatkan jumlah sel eritrosit lebih tinggi dari kontrol setelah diinfeksi *A. hydrophila* (Mouriño et al., 2016).

Total leukosit ikan kelabau di awal uji berkisar antara $8,73-8,96 \times 10^4$ sel/mm³. Kisaran total leukosit ikan kelabau lebih rendah dibanding jumlah leukosit ikan mas yang berkisar $14,10-15,6 \times 10^4$ sel/mm³ darah (Arthanari & Dhanapalan, 2016). Leukosit ikan merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bersifat non spesifik. Pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau, terlihat total leukosit mengalami peningkatan pada hari ke-7 sampai hari ke-17 lalu menurun pada hari ke-21. Pada perlakuan PBS total leukosit meningkat pada hari ke-15 sampai hari ke-21.

Pada hari terakhir pengamatan (hari ke-21) total leukosit pada perlakuan kontrol yang masih meningkat menunjukkan bahwa ikan kelabau pada perlakuan tersebut masih berupaya melawan infeksi bakteri dalam tubuhnya, sedang pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus infeksi oleh patogen sudah mulai berkurang. Peningkatan jumlah leukosit ikan kelabau yang diberi pakan mengandung isolat bakteri ususnya sebagai indikasi bahwa isolat bakteri dari usus tersebut mampu memicu proliferasi sel-sel darah putih dalam jaringan hematopoietik. Sel darah putih memiliki peranan penting dalam sistem imun yakni sebagai pertahanan seluler terhadap infeksi patogen. Leukosit ikan merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bersifat

non spesifik. Perubahan nilai leukosit total dan hitung jenis leukosit bisa menjadi indikator terjadinya penyakit infeksi pada ikan (Roberts, 2012). Pada hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-21, total leukosit pada perlakuan kontrol yang masih meningkat menunjukkan bahwa ikan Kelabau pada perlakuan tersebut masih berupaya melawan infeksi bakteri dalam tubuhnya. Pada perlakuan pemberian isolat bakteri usus, infeksi oleh patogen sudah mulai berkurang berdasarkan penurunan jumlah total leukositnya.

Peningkatan jumlah leukosit ikan kelabau yang diberi pakan mengandung isolat bakteri ususnya sebagai indikasi bahwa isolat bakteri dari usus tersebut mampu memicu sel-sel leukosit dalam jaringan hematopoietik. Leukosit memiliki peranan penting dalam sistem imun yakni sebagai pertahanan seluler terhadap infeksi patogen. Leukosit ikan mas (*C. carpio*) dibagi menjadi tiga jenis utama yakni granulosit (neutrofil atau heterofil, eosinofil, basofil), monosit dan limfosit. Monosit dan granulosit bersifat sangat mobil dan fagositik, sedangkan limfosit tidak bersifat mobil namun berperan memproduksi antibody (Kordon et al., 2018). Hasil penelitian ini sejalan dengan suplementasi bakteri *B. subtilis* pada ikan nila (*O. niloticus*) yang memberikan pengaruh terhadap peningkatan jumlah leukosit dan kemampuan fagositosisnya (Opiyo et al., 2019). Berdasarkan parameter hematologi terutama jumlah leukosit pada uji ini, pemberian isolat bakteri usus ikan kelabau mampu menghambat infeksi bakteri patogen yaitu *Pseudomonas* sp. PS-1 dan melindungi ikan kelabau. Secara umum isolat *S. edaphicus* (BPs2) menunjukkan kemampuan lebih baik dalam melindungi ikan kelabau dari infeksi kedua bakteri patogen tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Istiqomah et al., (2019) menemukan beberapa spesies bakteri *Staphylococcus*, diantaranya *S. edaphicus* yang berpotensi sebagai kandidat probiotik ikan dari saluran pencernaan gurita.

Kemampuan bakteri dari usus ikan kelabau dalam menghambat patogen secara *in vitro* tidak serta-merta menjadikannya mampu melindungi ikan secara *in vivo*. Bakteri *B. albus* (BeP1) dengan zona hambat terbesar dibanding ketiga isolat lainnya (Agustina et al., 2018) tidak menunjukkan kemampuan yang lebih baik pada uji *in vivo*, sebaliknya bakteri *S. edaphicus* mampu melindungi ikan kelabau pada uji secara *in vivo*. Menurut Banerjee & Ray, (2017), kondisi seperti ini memang ditemukan pada beberapa bakteri kandidat probiotik hanya saja penyebabnya masih belum diketahui secara jelas, tetapi hasil seleksi kedua tahap tersebut bisa tetapi hasil seleksi kedua tahap tersebut bisa dijadikan sebagai acuan pemilihan kandidat probiotik pada ikan.

Parameter kualitas air selama uji dilakukan masih berada di kisaran yang mendukung kehidupan ikan, sehingga perubahan yang terjadi pada beberapa parameter pengamatan seluruhnya dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan bukan karena stress lingkungan (Jahangiri & Esteban, 2018). Kondisi ini penting bagi ikan kelabau sebagai hewan uji agar tubuhnya mampu merespon dan memanfaatkan bakteri usus yang diberikan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang dari penelitian ini maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Pemberian bakteri dari usus ikan kelabau mampu meningkatkan resistensi ikan nila setelah diinfeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp.
2. Isolat BPs2 yakni bakteri *Staphylococcus edapichus* MT269536 memberikan kelangsungan hidup tertinggi, yang didukung dengan rendahnya jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. dalam darah ikan nila.
3. Parameter hematologi menunjukkan bahwa kesehatan ikan nila tidak terganggu dengan pemberian bakteri dari usus ikan kelabau dan lebih cepat pulih setelah diinfeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Republik Indonesia (DIKTI) cq. Penelitian Disertasi Doktor (hibah No. 042.06.1.401516/2018) yang mendanai penelitian ini serta Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman yang telah memfasilitasi penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Pebrianto, C. ., Ma'ruf, M., Susanto, A., & Jannah, M. (2014). Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. pada ikan yang dibudidayakan dalam karamba di Danau Melintang dan Sungai Mahakam Kabupaten Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan XI Hasil Penelitian Perikanan Dan Kelautan.*, 30 Agustus 2014.
- Agustina, Prayitno, S. B., Sabdono, A., & Saptiani, G. (2018). Antagonistic activity of kelabau fish (*osteochilus melanopleurus*) gut bacteria against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. *AACL Bioflux*, 11(6), 1859–1868.
- Agustina, Prayitno, S. B., Sabdono, A., & Saptiani, G. (2019). Pathogenicity assay of probiotic-potential bacteria from the kelabau fish (*Osteochilus melanopleurus*). *AACL Bioflux*, 6(5), 1994–2003.
- Apriani, L., Susanti, N., & Gustriana, G. (2021). Relationship of water quality with bacterial disease in Dumbo catfish (*Clarias gariepinus* L.) in culture ponds in Palembang city. *Indonesian Journal of Tropical Aquatic*, 4(2), 29–42.
- Araujo, C., Munoz-Atienza, E., Nahuelquin, Y., Poeta, P., Igrejas, G., Hernandez, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2015). Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe*, 3(2), 7–14.
- Arthanari, M., & Dhanapalan, S. (2016). Assessment of the haematological and serum biochemical parameters of three commercially important freshwater fishes in river Cauvery Velur, Namakkal district, Tamil Nadu, India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(1), 155–159.
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 72(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0441-8>
- Gupta, A., Gupta, P., & Dhawan, A. (2014). Dietary supplementation of probiotic affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(1), 113–119.
- Haque, M. M., Hasan, N. A., Eltholth, M. M., Saha, P., Mely, S. S., Rahman, T., & Murray, F. J. (2021). Assessing the impacts of in-feed probiotic on the growth performance and health condition of pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) in a farm trial. *Aquaculture Reports*, 20, 100699. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100699>
- Hardi, E. H. (2012). Bacteria levels difference pathogenicity *Aeromonas* sp. and *Pseudomonas* sp. On tilapia. In *Proceeding The International Symposium on Human Development and Sustainable Utilization of Natural Resources in Asian Countries* (9th-12 Juli ed.).
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9(2429), 1–18.

- Istiqomah, I., Isnansetyo, A., Atitus, I. N., & Rohman, A. F. (2019). Isolasi bakteri selulolitik staphylococcus sp. Jc20 dari saluran pencernaan gurita (*Octopus* sp.) untuk kandidat probiotik ikan. *Jurnal Perikanan Universitas Gajah Mada*, 21(2), 93–98.
- Jahangiri, L., & Esteban, M. A. (2018). Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: a review. *Fishes*, 3(33), 1–13.
- Kordon, A. O., Karsi, A., & Pinchuk, L. (2018). Innate responses in fish: antigen presenting cells and professional phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1(8), 1123–1139.
- Mardani. (2014). Pengaruh sumber makanan yang berbeda terhadap pertumbuhan ikan kelabau padi (*Osteochilus melanopleurus*) yang dipelihara dalam hapa di kolam. *Jurnal Ilmu Hewani Tropika*, 3(22–26).
- Mouriño, J. L. P., Pereira, G. do V., Vieira, F. do N., Jatobá, A. B., Ushizima, T. T., Silva, B. C. da, Seiffert, W. Q., Jesus, G. F. A., & Martins, M. L. (2016). Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach. *Aquaculture Reports*, 3, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.001>
- Opiyo, M. A., Jumbe, J., Ngugi, C. C., & Charo-Karisa, H. (2019). Dietary administration of probiotics modulates non-specific immunity and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1624299>
- Pal, G. K., & Pal, P. (2006). *Textbook of Practical Physiology*. Orient Longman Private Limited.
- Roberts, R. J. (2012). *Fish Pathology*. (4th ed). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publications.
- Salasia, S. I. O., Sulanjari, D., & Ratnawati, A. (2001). Studi hematologi ikan air tawar. *Jurnal Biologi*, 2(12), 710–723.
- Simanjuntak, S. B. I., Indarmawan, I., & Wibowo, E. S. (2018). Impact of fed containing different levels of diets supplementation *Spirulina platensis* on growth, haematological, body composition and biochemical parameters, of Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 681–690.
- Talpur, A. D., Munir, M. B., Marry, A., & Hashim, R. (2014). Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in Snakehead (*Channa striata*) Fingerlings. *Aquaculture*, 4(2), 4–20.
- Tarnecki, A. M., Wafapoor, M., Phillips, R. N., & Rhody, N. R. (2019). Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Scientific Reports*, 9(4892), 1–11.
- Zuhrawati, N. A. (2014). Pengaruh peningkatan suhu terhadap kadar hemoglobin dan nilai hematokrit ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Medical Veterinaria*, 8(1), 84–86.