

TUGAS AKHIR - SB234801

**PENGARUH SUPLEMENTASI PAKAN DENGAN
KANDIDAT PROBIOTIK *Weissella confusa* TERHADAP
RESPON HEMATOLOGI PADA *Clarias gariepinus* YANG
DIINFEKSI PATOGEN *Edwardsiella ictaluri***

AULIYA RAHMA NADHILA

NRP 5005201085

Dosen Pembimbing 1

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP 197006211998022001

Dosen Pembimbing 2

Muhamad Amin, S.Pi.,M.Sc.,Ph.D.

NIP 198110102019083101

Program Studi S1 Biologi

Departemen Biologi

Fakultas Sains dan Analitika Data

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya

2024



TUGAS AKHIR - SB234801

**PENGARUH SUPLEMENTASI PAKAN DENGAN
KANDIDAT PROBIOTIK *Weissella confusa* TERHADAP
RESPON HEMATOLOGI PADA *Clarias gariepinus* YANG
DIINFEKSI PATOGEN *Edwardsiella ictaluri***

AULIYA RAHMA NADHILA

NRP 5005201085

Dosen Pembimbing 1

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP 197006211998022001

Dosen Pembimbing 2

Muhammad Amin, S.Pi.,M.Sc.,Ph.D.

NIP 198110102019083101

Program Studi S1 Biologi

Departemen Biologi

Fakultas Sains dan Analitika Data

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya

2024



FINAL PROJECT - SB234801

**THE EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH
PROBIOTIC CANDIDATES *Weissella confusa*
ON HEMATOLOGICAL RESPONSE IN *Clarias
gariepinus* INFECTED WITH PATHOGEN *Edwardsiella
ictaluri***

AULIYA RAHMA NADHILA

NRP 5005201085

Advisor

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP 197006211998022001

Co-Advisor

Muhammad Amin, S.Pi.,M.Sc.,Ph.D.

NIP 198110102019083101

Bachelor Program of Biology

Department of Biology

Faculty of Science and Data Analytics

Sepuluh November Institute of Technology

Surabaya

2024

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH SUPLEMENTASI PAKAN DENGAN KANDIDAT PROBIOTIK *Weissella confusa* TERHADAP RESPON HEMATOLOGI PADA *Clarias gariepinus* YANG DIINFEKSI PATOGEN *Edwardsiella ictaluri*

TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat
memperoleh gelar S.Si pada
Program Studi S-1 Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Sains dan Analitika Data
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh : **AULIYA RAHMA NADHILA**

NRP. 5005201085

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

- | | | |
|--|--------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si | Pembimbing 1 | |
| 2. Muhamad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D | Pembimbing 2 | |
| 3. Prof. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si | Penguji 1 | |
| 4. Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si | Penguji 2 | |



Mengetahui,
Dekan Departemen Biologi ITS

Prof. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si
NIP. 196911211998022001

SURABAYA

Juli, 2024

APPROVAL SHEET

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC CANDIDATES *Weissella confusa* ON HEMATOLOGICAL RESPONSE IN *Clarias gariepinus* INFECTED WITH PATHOGEN *Edwardsiella ictaluri*

FINAL PROJECT

Submitted to fulfill one of the requirements

for obtaining a degree S.Si at

Bachelor program of Biology

Departement of Biology

Faculty of Science and Data Analytics

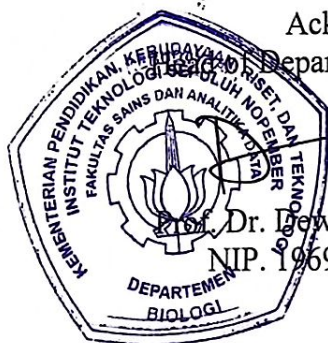
Sepuluh November Institute of Technology

By : **AULIYA RAHMA NADHILA**

NRP. 5005201085

Approved by Final Project Examiner Team :

- | | | |
|--|------------|---|
| 1. Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si | Advisor |  |
| 2. Muhamad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D | Co-Advisor |  |
| 3. Prof. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si | Examiner |  |
| 4. Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si | Examiner |  |



Acknowledged,
Department of Biology ITS

Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si
NIP. 196911211998022001

SURABAYA

Juli, 2024

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama mahasiswa / NRP : Auliya Rahma Nadhila / 5005201085
Program studi : S1 Biologi
Pembimbing / NIP : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si /
197006211998022001
Muhammad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D /
198110102019083101

Dengan ini menyatakan bahwa Tugas Akhir dengan judul **“PENGARUH SUPLEMENTASI PAKAN DENGAN KANDIDAT PROBIOTIK *Weissella confusa* TERHADAP RESPON HEMATOLOGI PADA *Clarias gariepinus* YANG DIINFEKSI PATOGEN *Edwardsiella ictaluri*”** adalah hasil karya sendiri, bersifat orisinal, dan ditulis dengan mengikuti kaidah penulisan ilmiah.

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan yang berlaku di Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Surabaya, 1 Agustus 2024

Mengetahui,

Dosen Pembimbing 1



Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
NIP. 197006211998022001

Dosen Pembimbing 2



Muhamad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 198110102019083101

Mahasiswa,



Auliya Rahma Nadhila
NRP. 5005201085

ORIGINALITY STATEMENT

The undersigned:

Student / NRP : Auliya Rahma Nadhila / 5005201085
Study program : Bachelor Program of Biology
Advisor / NIP : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si /
197006211998022001
Muhammad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D /
198110102019083101

Hereby declare that the Final Project entitled "**EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC CANDIDATES *Weissella confusa* ON HEMATOLOGICAL RESPONSE IN *Clarias gariepinus* INFECTED WITH PATHOGEN *Edwardsiella ictaluri***" is the result of my own work, is original, and is written by following the rules of scientific writing.

If in the future there is any discrepancy with this statement, then I am willing to accept sanctions in accordance with the applicable provisions at the Sepuluh November Institute of Technology.

Surabaya, 1 Agustus 2024

Acknowledged,

Advisor 1



Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
NIP. 197006211998022001

Advisor 2



Muhamad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 198110102019083101

Student,



Auliya Rahma Nadhila
NRP. 5005201085

ABSTRAK

PENGARUH SUPLEMENTASI PAKAN DENGAN KANDIDAT PROBIOTIK *Weissella confusa* TERHADAP RESPON HEMATOLOGI PADA *Clarias gariepinus* YANG DIINFEKSI PATOGEN *Edwardsiella ictaluri*

Nama Mahasiswa / NRP : Auliya Rahma Nadhila / 5005201085
Departemen : Biologi FSAD - ITS
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si
Muhamad Amin, S.Pi., M.Sc., Ph.D

Abstrak

Salah satu penyakit yang paling banyak mempengaruhi produktivitas ikan lele (*C. gariepinus*) adalah *Enteric Septicaemia of Catfish* (ESC) yang disebabkan oleh bakteri *E. ictaluri*. Penyakit ini menyebabkan kerusakan di organ vital serta kematian ikan lele hingga 50%. Pengobatan dilakukan menggunakan berbagai jenis antibiotik yang memberikan efek samping residu antibiotik penyebab resistensi. Banyak dikembangkan alternatif pengobatan yang aman bagi kesehatan konsumen, salah satunya penggunaan probiotik. Penelitian sebelumnya diketahui *W. confusa* memiliki potensi dalam menangani *E. ictaluri* secara *in vitro*. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengamatan respon imun *C. gariepinus* yang diinfeksi *E. ictaluri* setelah pemberian pakan tersuplementasi *W. confusa* selama 30 hari dengan beberapa dosis perlakuan (K1=10⁴ CFU/mL, K2=10⁶ CFU/mL dan K3=10⁸ CFU/mL) untuk mempelajari pengaruhnya terhadap respon hematologi berupa kadar eritrosit, leukosit dan diferensial leukosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi *W. confusa* berpengaruh nyata terhadap kadar eritrosit, leukosit, dan monosit pada *C. gariepinus* yang terinfeksi *E. ictaluri*. Secara khusus, pengaruh suplementasi bakteri probiotik *W. confusa* pada perlakuan K3 konsentrasi sebesar 10⁸ CFU/mL yang memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kontrol, pada jumlah rata-rata eritrosit mendekati normal sebesar 1,294x10⁶ sel/mm³ dan kenaikan leukosit yang tidak jauh tinggi dari kadar leukosit normal yaitu, sebesar 309.090 sel/mm³. Pada analisis diferensial leukosit didapatkan peningkatan monosit yang berpengaruh nyata terhadap kontrol pada perlakuan K2 dan K3 konsentrasi sebesar 10⁶ CFU/mL dan 10⁸ CFU/mL. Hasil penelitian ini menunjukkan suplementasi *W.confusa* pada pakan ikan dapat menjadi alternatif profilaksis dalam manajemen penyakit di lingkungan akuatik.

Kata kunci: *Clarias geriepinus*, *Edwardsiella ictaluri*, Hematologi, *Weissella confusa*

ABSTRACT

THE EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC CANDIDATES *Weissella confusa* ON HEMATOLOGICAL RESPONSE IN *Clarias gariepinus* INFECTED WITH PATHOGEN *Edwardsiella ictaluri*

Student Name / NRP : Auliya Rahma Nadhila / 5005201085
Department : Biology FSAD - ITS
Advisor : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Sc
Muhamad Amin, S.PI., M.Sc., Ph.D

Abstract

One of the most common diseases affecting catfish (*C. gariepinus*) productivity is Enteric Septicaemia of Catfish (ESC) caused by *E. ictaluri* bacteria. This disease causes damage to vital organs and catfish mortality of up to 50%. Treatment is carried out using various types of antibiotics that give side effects of antibiotic residues that cause resistance. Many alternative treatments have been developed that are safe for consumer health, one of which is the use of probiotics. Previous research found that *W. confusa* has the potential to treat *E. ictaluri* in vitro. Therefore, in this study, the immune response of *C. gariepinus* infected with *E. ictaluri* was observed after feeding *W. confusa* supplementation for 30 days with several treatment doses to study its effect on hematological responses in the form of erythrocyte, leukocyte and leukocyte differential levels. The results showed that *W. confusa* supplementation had a significant effect on the levels of erythrocytes, leukocytes, and monocytes in *C. gariepinus* infected with *E. ictaluri*. In particular, the effect of supplementation of probiotic bacteria *W. confusa* in the K3 treatment at a concentration of 10^8 CFU/mL which gave a significant effect ($p < 0.05$) against the control, on the average number of erythrocytes close to normal at $1,294 \times 10^6$ cells/mm³ and an increase in leukocytes which is not much higher than normal leukocyte levels, namely, 309.090 cells/mm³. In the leukocyte differential analysis, it was found that the increase in monocytes had a significant effect on the control in the K2 and K3 treatments with concentrations of 10^6 CFU/mL and 10^8 CFU/mL. The results of this study indicate that *W.confusa* supplementation in fish feed can be an alternative prophylaxis in disease management in aquatic environments.

Keywords: *Clarias geriepinus*, *Edwardsiella ictaluri*, Hematologist, *Weissella confusa*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir yang berjudul **“Pengaruh Suplementasi Pakan Dengan Kandidat Probiotik *Weissella confusa* Terhadap Respon Hematologi pada *Clarias gariepinus* yang Diinfeksi Patogen *Edwardsiella ictaluri*”**. Penyusunan laporan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan ketulusan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing 1 dan Bapak Muhamad Amin, S.Pi.,M.Sc.,Ph.D. selaku dosen pembimbing 2 atas segala bimbingan serta ilmu yang diberikan selama penelitian. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan bapak dan ibu dengan balasan terbaik.
2. Ibu Prof. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji 1 dan Ibu Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si selaku dosen penguji 2 atas segala saran dan masukan yang membangun untuk penulis.
3. Kedua orangtua dan saudara penulis atas dukungan dan doanya.
4. Kepada semua pihak yang turut mendukung kelancaran penelitian.

Penulis menyadari bahwa meskipun dalam penyusunannya telah diusahakan semaksimal mungkin, penulisan tugas akhir ini masih memiliki banyak kekurangan sehingga besar harapan penulis untuk dapat menerima kritik maupun saran agar kedepannya dapat menjadi lebih baik lagi.

Surabaya, Juli 2024

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
APPROVAL SHEET	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
ORIGINALITY STATEMENT	i
ABSTRAK.....	ii
ABSTRACT.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	9
1.1 Latar Belakang.....	9
1.2 Rumusan Masalah.....	10
1.3 Batasan Masalah.....	10
1.4 Tujuan.....	10
1.5 Manfaat.....	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Ikan Lele (<i>C. gariepinus</i>).....	11
2.2 Probiotik.....	13
2.3 Bakteri Asam Laktat (BAL).....	14
2.4 Respon Imun.....	17
2.5 <i>Weissella confusa</i>	18
2.6 <i>Edwardsiella ictaluri</i>	19
2.7 Hematologi pada Ikan.....	21
2.8 Eritrosit.....	22
2.9 Leukosit.....	22
BAB 3 METODOLOGI.....	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.3 Metode Penelitian.....	24
3.3.1 Persiapan Kultur dan Stok Probiotik <i>Weissella confusa</i>	24
3.3.2 Persiapan dan Kultur Stok Bakteri <i>Edwardsiella ictaluri</i>	24
3.3.3 Re-konfirmasi Aktivitas Antimikroba <i>Weissella confusa</i> terhadap <i>Edwardsiella ictaluri</i>	25

3.3.4	Pengaplikasian Probiotik <i>Weissella confusa</i> pada Pelet Ikan.....	25
3.3.5	Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Uji.....	26
3.3.6	Uji Tantang.....	26
3.3.7	Proses Pengambilan Sampel Darah.....	26
3.3.8	Pengukuran Kadar Eritrosit dan Leukosit.....	27
3.3.9	Analisis Diferensial Leukosit.....	28
3.4	Analisis Data.....	29
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1	Hasil Uji Re-konfirmasi Aktivitas Antimikroba <i>Weissella confusa</i> terhadap <i>Edwardsiella ictaluri</i>	30
4.2	Analisis Gejala Klinis.....	31
4.3	Analisis Leukosit.....	33
4.4	Analisis Diferensial Leukosit.....	34
4.4.1	Neutrofil.....	35
4.4.2	Eusinofil.....	36
4.4.3	Basofil.....	38
4.4.4	Limfosit.....	38
4.4.5	Monosit.....	39
4.5	Analisis Eritrosit.....	40
4.6	Analisis Parameter Kualitas Air.....	42
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1	Kesimpulan.....	43
5.2	Saran.....	43
	DAFTAR PUSTAKA	44
	LAMPIRAN.....	51
	UCAPAN TERIMA KASIH.....	74
	BIODATA PENULIS	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Clarias gariepinus</i>	11
Gambar 2.2 Perkembangan Morfologi Ikan Lele.	12
Gambar 2.3 Intestinal Ikan Lele (<i>C. gariepinus</i>)	13
Gambar 2.4 Mekanisme Kerja Probiotik	13
Gambar 2.5 <i>Innate and Adaptive Immunity</i>	17
Gambar 2.6 <i>Weissella confusa</i>	19
Gambar 2.7 Mekanisme masuknya patogen <i>E. ictaluri</i> pada usus ikan	21
Gambar 2.8 Sel darah merah dari <i>C. gariepinus</i>	23
Gambar 2.9 Diferensial Leukosit <i>C. gariepinus</i>	23
Gambar 3.1 Ilustrasi Ruang Hitung Haemocytometer dan Pipet Thoma.....	28
Gambar 4.1 Zona hambat yang muncul pada uji rekonfirmasi aktivitas antimikroba.....	30
Gambar 4.2 Perubahan patologi anatomi pasca infeksi <i>E. ictaluri</i>	32
Gambar 4.3 Grafik Data Rata-rata Leukosit	34
Gambar 4.4 Jenis dan kenampakan hasil pengamatan diferensial leukosit	35
Gambar 4.5 Grafik Rata-rata Jumlah Neutrofil	36
Gambar 4.6 Grafik Rata-rata Jumlah Eusinofil	37
Gambar 4.7 Grafik Rata-rata Jumlah Basofil	38
Gambar 4.8 Grafik Rata-rata Jumlah Limfosit	39
Gambar 4.9 Grafik Rata-rata Jumlah Monosit.....	40
Gambar 4.10 Grafik Rata-rata Jumlah Eritrosit	41
Gambar 4.11 Hasil analisis parameter lingkungan selama penelitian	42

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 BAL yang telah diidentifikasi dari gastrointestinal ikan	15
Tabel 2.2 Kadar Leukosit Normal pada Ikan Air Tawar.	22
Tabel 3.1 Rancangan Perlakuan Dosis Probiotik.....	26
Tabel 3.2 Standar optimum parameter kualitas air menurut SNI No. 3 Tahun 2014 tentang produksi ikan lele	26
Tabel 4.1 Tabel Penghambatan CFS <i>W. confusa</i> terhadap <i>E. ictaluri</i>	30
Tabel 4.2 Gejala klinis pada <i>C.gariepinus</i> setelah infeksi <i>E.ictaluri</i>	32

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara maritim memiliki potensi perikanan yang sangat besar (Marsetio, 2017). Salah satu hasil perikanan air tawar yang penting pada sektor ekonomi adalah ikan lele karena permintaannya yang terus meningkat tiap tahunnya. Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) mencatat, produksi ikan lele di Indonesia pada tahun 2021 sebesar 1,06 ton dengan nilai keuntungan mencapai Rp18,93 triliun. Ikan lele populer di Indonesia karena rasanya yang lezat, harganya yang relatif murah, kandungan gizi tinggi, pertumbuhannya tergolong cepat, serta dapat dipelihara di semua wadah budidaya (Nasrudin, 2010). Ikan lele juga toleran terhadap kualitas air yang kurang baik dan relatif tahan terhadap penyakit (Tunde et al., 2016).

Pada produksi ikan lele yang intensif menyebabkan tingginya angka kematian akibat infeksi pada padat penebaran yang kurang memadai. Salah satunya adalah penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* (ESC) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *E. ictaluri*. ESC menyebabkan kerusakan organ vital seperti hati, ginjal, dan otak serta dapat membunuh lebih dari 50% populasi dalam kolam (Kordon A, 2019). Pengobatan yang banyak dilakukan dalam penanganan penyakit infeksi dengan menggunakan berbagai jenis antibiotik yang memberikan efek samping residu antibiotik penyebab resistensi. (A'yunin et al., 2019). Penggunaan antibiotik dengan dosis rendah yang tidak menentu meningkatkan resistensi bakteri patogen. Manusia yang mengonsumsi jenis mikroorganisme resisten secara terus menerus akan mengalami hipersensitifitas bahkan apabila terinfeksi dalam pengobatannya membutuhkan dosis antibiotik lebih besar sehingga penggunaan antibiotik pada ikan secara bebas telah banyak dilarang di beberapa negara (Direktorat Kesehatan Hewan, 1990).

Oleh karena itu, banyak dikembangkan alternatif penanganan yang aman bagi kesehatan konsumen, salah satunya penggunaan probiotik. (Turnbull, 2012). Sesuai konsensus yang dikeluarkan oleh *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang apabila diberikan dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (Salminen, 2021). Sebagian besar probiotik yang digunakan dalam budidaya perairan tidak berasal dari organisme inang perairan melainkan dari sumber terestrial atau lingkungan yang berbeda. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bakteri probiotik yang diisolasi dari organisme perairan menunjukkan kinerja yang lebih baik dalam beradaptasi dengan habitat aslinya (usus ikan). Sesuai dengan karakteristik mikroba yang memperoleh aktivitas tertingginya di habitat aslinya. Sehingga penggunaan probiotik yang di isolasi dari organisme perairan diharapkan lebih mudah terkolonisasi dan bekerja lebih baik (Murall, 2017).

Penelitian sebelumnya diketahui *W. confusa* memiliki potensi dalam menangani *E. ictaluri* secara *in vitro* (Nurhayati et al., 2022). Bakteri *W. confusa* memiliki kapasitas adhesi yang baik pada mukosa usus antara 3,24 – 16,72% bersifat tidak patogen terhadap ikan lele (*C. gariepinus*). Serta berpotensi mencegah penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* (ESC) ditunjukkan dengan diameter zona bening hasil penghambatan terhadap *E. ictaluri* sebesar 13,7 mm. Namun, diperlukan evaluasi penggunaannya secara *in vivo*. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan uji pengaruh efektivitas suplementasi *W. confusa* dengan konsentrasi tertentu dalam pakan ikan terhadap respon hematologi dan resistensi terhadap *E. ictaluri* pada ikan lele (*C. gariepinus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang akan dibahas pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh suplementasi kandidat probiotik *W. confusa* dalam pakan ikan terhadap respon hematologi ikan lele (*C. gariepinus*) yang diinfeksi *E. ictaluri*?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele (*C. gariepinus*) dengan ukuran $\pm 8 - 10$ cm.
2. Pelet yang digunakan adalah pelet komersial yang digunakan di masyarakat.
3. Bakteri yang terkandung di dalam pelet sebelum suplementasi diabaikan.
4. Volume bakteri *E. ictaluri* yang diinjeksikan pada ujiantang untuk semua perlakuan sebesar 100 μL dengan kepadatan $1,0 \times 10^6$ CFU/mL.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh suplementasi pakan dengan kandidat probiotik *W. confusa* terhadap respon hematologi pada *C. gariepinus* yang diinfeksi bakteri patogen *E. ictaluri*

1.5 Manfaat

Berdasarkan latar belakang dan tujuan di atas, maka manfaat dari penelitian ini adalah sebagai bentuk dukungan bagi kemajuan sektor budidaya perikanan dalam penggunaan bakteri probiotik sebagai alternatif profilaksis dalam manajemen penyakit di lingkungan akuatik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Lele (*C. gariepinus*)

Ikan lele merupakan jenis ikan air tawar meskipun dapat dipelihara dan mampu mentolerir keadaan pada lingkungan bersalinitas rendah (air payau). Habitat ikan lele dialam adalah disungai dengan arus air tenang dengan aliran perlahan. Ikan lele bersifat nokturnal dimana aktif mencari makan di malam hari dan cenderung berdiam diri di tempat gelap di siang hari. Di alam ikan lele memijah pada musim penghujan. *C. gariepinus* merupakan hewan omnivora, ikan ini memakan serangga, cacing, gastropoda, krustasea, ikan kecil, dan tanaman air (Warseno, 2018). Morfologi ikan ini memiliki bentuk tubuh memanjang, agak bulat pada bagian tengahnya dan bagian belakang cenderung pipih. Kepala lele pipih dengan panjang hampir seperempat tubuhnya yang dilengkapi dengan mata kecil dan mulut yang lebar yang dilengkapi gigi halus. Disekitar mulutnya terdapat empat sungut peraba (*barbells*) yang berfungsi sebagai alat peraba saat mencari makan atau saat bergerak di tempat gelap. Didekat sungut terdapat organ olfaktori yang berfungsi sebagai indera peraba dan penciuman yang mendukung penglihatan lele yang kurang baik. Warna tubuh *C. gariepinus* adalah abu gelap atau hitam dengan bagian perut berwarna putih atau krem dan memiliki garis longitudinal gelap di sisi kepalanya (Ciptanto, 2010). Ikan lele memiliki sirip punggung dan sirip anus yang kadang menyatu hingga ekor. Terdapat sepasang patil, atau duri tulang tajam pada sirip dadanya (Warseno, 2018). Ikan ini bernafas dengan menggunakan alat pernapasan tambahan berupa labirin selain insang yang menyebabkan ikan ini bisa bernapas secara langsung. *C. gariepinus* merupakan spesies introduksi dari Afrika sejak berpuluh-puluh tahun lalu (Hastuti, 2021). Taksonomi ikan lele dumbo menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysii
Famili	: Clariidae
Genus	: Clarias
Spesies	: <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)

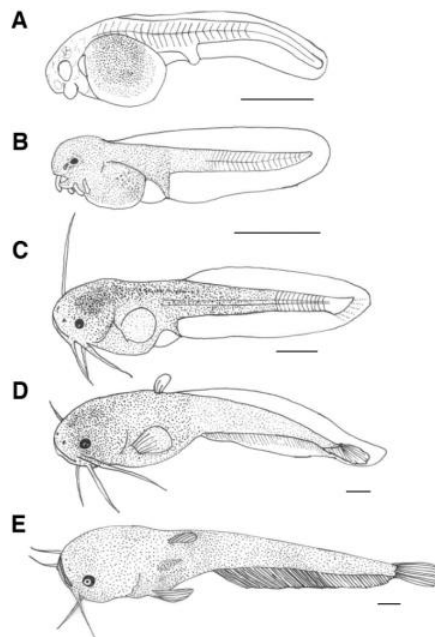


Gambar 2.1 *Clarias gariepinus* (Warseno, 2018)

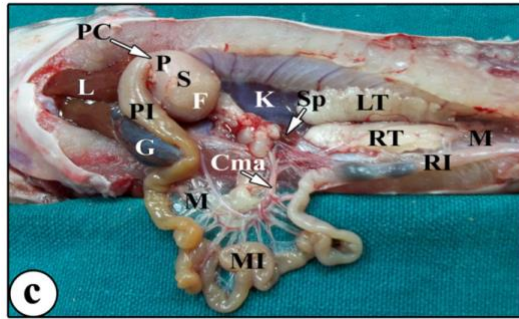
Perbedaan antara spesies jantan dan betina dari ukurannya tidak banyak perbedaan signifikan terkait ukurannya. Namun pada spesies betina apabila telah mencapai kematangan gonad adalah ditandai dengan perut yang melebar dan lembut, apabila diurut akan keluar telur berbentuk bulat utuh, berwarna agak kecoklatan atau hijau kekuningan. Pada spesies jantan kematangan gonad

akan ditandai dengan papilla genital yang dapat dilihat dibagian belakang dekat sirip anus, berwarna merah, meruncing dan menyebar ke arah pangkalan. Kematangan gonad ini terjadi setelah usia ke 12 bulan (Warseno, 2018). Perkembangan ikan yang utama terdiri atas fase telur, larva, juvenil, dan dewasa. Telur ikan lele yang telah dibuahi akan menetas kurang dari 24 jam dan berkembang menjadi larva. Perkembangan larva dibagi menjadi dua tahap yaitu prolarva (usia 0-5 hari) dimana larva masih memiliki kuning telur sebagai cadangan makanan serta belum memiliki kemampuan berenang, kemudian untuk fase postlarva (6-12 hari) cadangan kuning telur telah habis dan mulai memakan makanan serta sirip dorsal dan pektoralnya sudah terbentuk sempurna. Selanjutnya menuju fase juvenile (usia >12 hari) dimana secara morfologinya sudah sempurna seperti indukannya (Mun et al., 2017).

Struktur organ dalam lele tersusun dari berbagai organ pencernaan, seperti usus, empedu, hati, dan lambung. Usus merupakan segmen terpanjang pada saluran pencernaan. Pada ususterdapat muara dari kantung empedu dan pankreas. Empedu merupakan organ berbentuk buah pear berongga yang melekat pada permukaan bawah hati. Berhubungan dengan duktus koledokus melalui duktus sistikus. Fungsi utama kantung empedu adalah menyimpan empedu dan memekatkannya dengan mereabsorpsi racun dalam tubuh ikan. Hati merupakan organ yang paling besar dalam abdomen lele berwarna merah segar (Morina et al., 2017)



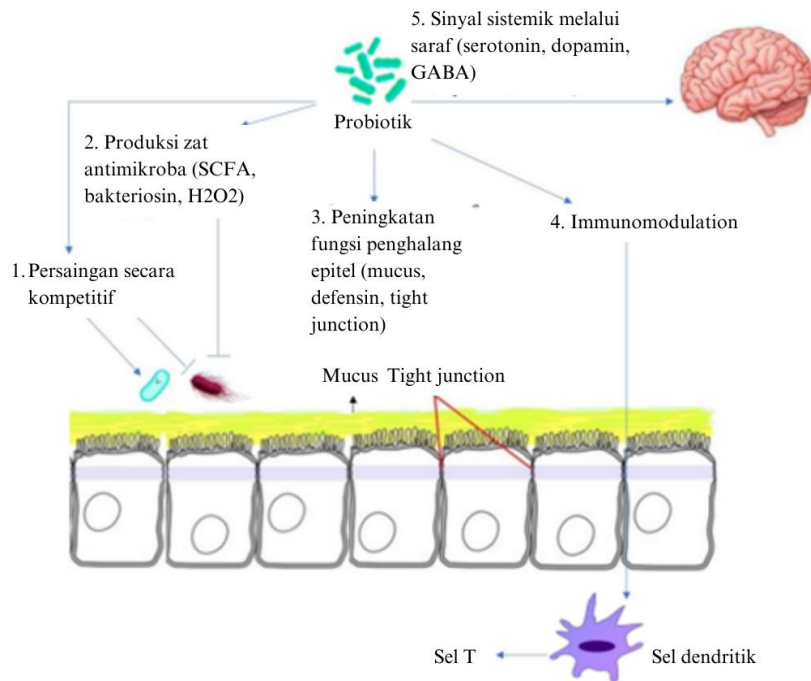
Gambar 2.2 Perkembangan Morfologi Ikan Lele (Mun et al., 2017).



Gambar 2.3 Intestinal Ikan Lele (*C. gariepinus*) (Moawad *et al.*, 2016)

2.2 Probiotik

Probiotik atau “*probiotics*” berasal dari bahasa Yunani “*probos*” yang artinya “untuk hidup”. Istilah ini mula-mula digunakan pada tahun 1965 oleh Lilley dan Stillwell, untuk menjelaskan suatu zat yang disekresikan oleh mikroorganisme yang mampu menstimulasi pertumbuhan. Stark dan Wilkinson (1989) membuat definisi bahwa probiotik ialah suatu produk yang mengandung mikroorganisme hidup non patogen, yang digunakan untuk memperbaiki laju pertumbuhan, efisiensi konversi ransum, dan meningkatkan kesehatan (Soeharsono *et al.*, 2010). Sesuai konsensus yang dikeluarkan oleh *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) pada Oktober 2013, probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup, yang apabila diberikan dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (Salminen, 2021).



Gambar 2.4 Mekanisme Kerja Probiotik (Latif *et al.*, 2023)

Dalam dunia perikanan penggunaan probiotik dalam sejarahnya peneliti Cina mengembangkan penggunaan probiotik untuk mengontrol infeksi oleh mikroba patogen, mengatur mikroflora air, meningkatkan status kesehatan, menguatkan imunitas, mikrobioma usus, dan mengatur dekomposisi zat organik yang tidak diharapkan dan memperbaiki ekologi akuakultur. Mekanisme kerja probiotik dalam akuakultur digunakan untuk menekan dan mencegah berkembangnya organisme patogen. Namun studi mendalam masih terus dikaji mengenai pengaruh probiotik secara *in vivo*, pengembangan teknologi molekuler untuk seleksi probiotik dalam usaha memahami kinerja, komposisi dan fungsi dari probiotik. Efisiensi dari penerapan bakteri probiotik dalam akuakultur ini tetap sangat bergantung pada spesies atau strain bakterinya. Prinsip mekanisme kerja probiotik pada akuakultur sesuai dengan Gambar 2.4 pada umumnya adalah mekanisme eksklusif (*competitive exclusive*) terhadap bakteri patogen misalnya *Pseudomonas* terhadap beberapa jenis *Vibrio* pada udang, pengaktifan respon imun, mengeluarkan substansi antibakteri bisa berupa bakteriosin, dan dekomposisi zat organik yang tidak diharapkan (Soeharso, 2010). Bakteri probiotik menghasilkan bakteriosin, siderophore, lisozim, protease, hidrogen peroksida sebagai upaya menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri probiotik potensial telah diteliti dari banyak sumber, dimana mikroba yang diisolasi dari luar inang (dari lingkungan) disebut "*allochthonous* atau eksogen" sedangkan mikroba yang diisolasi dari dalam inang disebut "*autochthonous* atau indigenus" (El-Saadony et al., 2021). Beberapa bukti penelitian menunjukkan bakteri probiotik yang diisolasi dari organisme perairan menunjukkan kinerja yang lebih baik dalam beradaptasi dengan habitat aslinya (usus ikan). Karakteristik mikroba juga memperoleh aktivitas tertingginya di habitat aslinya. Sehingga penggunaan probiotik yang di isolasi dari organisme perairan diharapkan lebih mudah terkolonisasi dan bekerja lebih baik (Murall, 2017).

2.3 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok heterogen yang secara metabolik dan fisiologis tergolong sebagai bakteri gram positif, katalase negatif, yang terdiri atas kokus atau basil, non-motil yang tersebar di alam pada tanah, air, tanaman, produk susu, dan hewan (Björkroth et al., 2011). Kelompok bakteri ini tidak membentuk spora, sangat fermentatif, termasuk bakteri aerobik fakultatif. Perbedaan penting diantara dua subkelompok BAL terletak pada pola produk yang terbentuk dari fermentasi gula. Kelompok pertama disebut homofermentatif yaitu kelompok yang menghasilkan produk fermentasi tunggal yaitu asam laktat. Kelompok kedua disebut heterofermentatif yaitu BAL selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan produk lain seperti etanol dan CO₂. Bakteri-bakteri filum Firmicutes ini diklasifikasikan berdasarkan morfologi seluler, cara fermentasi glukosa, kisaran suhu pertumbuhan. Genus dalam kelompok bakteri asam laktat ini terdiri atas *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella* (Schillinger et al., 2006).

Bakteri asam laktat ini tidak mampu beradaptasi di lingkungan laut, namun bakteri ini dapat mentoleransi asam dan garam empedu sehingga memungkinkan bertahan hidup dalam sistem pencernaan. Bakteri ini juga mampu berkolonisasi di lendir usus sehingga membantu sistem pencernaan dan mampu meningkatkan pertumbuhan dan imunitas ikan. Bakteri asam laktat ini juga sering diidentifikasi juga sebagai komponen mikrobiota usus anggota genusnya diantaranya *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* dan *Weissella*. Mikrobiota usus ikan secara alamiah memainkan peran penting dalam perkembangan gastrointestinal ikan, membantu fungsi pencernaan, menjaga toleransi mukosa, menstimulasi respon imun inang dan

memberikan tingkat perlindungan terhadap infeksi lambung (Merrifield et al., 2014). Berikut adalah tabel dari beberapa BAL yang telah diidentifikasi dari gastrointestinal ikan:

Tabel 4.1 BAL yang telah diidentifikasi dari gastrointestinal ikan

Spesies	Spesies BAL yang diisolasi	Metodologi	Referensi
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> strain, <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Weissella confusa</i> , dan <i>Weissella cibaria</i> .	Uji fenotip dan molekuler	Wijaya et al., 2022
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus aviaries</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., uncultured <i>Streptococcus</i> sp. dan <i>Streptococcus iniae</i>	<i>Cultured based</i>	Navarrete et al., (2012)
<i>Salvelinus alpinus L</i>	<i>Carnobacterium</i> spp. dan <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Cultured based</i>	Ringo et al., (2002)
Salmo solar	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> dan <i>Weissella cibaria</i>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)</i>	Hovda et al., (2012)

Bakteri probiotik asam laktat (BAL) menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi glukosa. Serta beberapa zat penghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti bakteriosin, *bacteriocin-like inhibitory substance* (BLISs), hidrogen peroksida, diasetil dan karbondioksida (Anjana, 2022). Telah diketahui bahwa asetat menembus membran sitoplasma bakteri dalam bentuk terprotonasi, mentransfer proton ke sitoplasma. Ketika pH ekstraseluler menurun dengan adanya asetat, pH intraseluler mendekati pH ekstraseluler karena adanya keseimbangan. Pada uji motilitas Salmonella tersebut menunjukkan pH intraseluler Salmonella hampir akan mencapai pH supernatan *L. lactis* dengan permeabilisasi asetat. Selain itu, asam laktat diketahui meningkatkan membran permeabilitas bakteri yang dapat berkontribusi pada penghambatan motilitas karena melintasi membran patogen (Nakamura, 2015). Salah satu zat penghambat lain berupa bakteriosin yaitu senyawa antimikroba yang umum diproduksi oleh BAL yang disintesis oleh ribosom. Beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa BAL yang diisolasi dari beragam spesies ikan, organisme akuatik lain, air budidaya dan sedimen memiliki aktivitas antagonis terhadap patogen ikan (Ringø et al., 2018). Bakteriosin dalam aksinya melawan bakteri lain mempunyai kemampuan yang berbeda terhadap spesies target, secara umum komposisi fosfolipid dari galur target dan pH lingkungan mempengaruhi nilai konsentrasi hambat

minimal. Beberapa bakteriosin berinteraksi dengan situs spesifik (protein) pada membran sel sehingga meningkatkan efektivitasnya secara *in vivo*. Ikan bisa menjadi sumber potensial penghasil bakteriosin (bakteriosinogenik) bakteri dan skrining usus mikroorganisme dapat digunakan untuk mendapatkan probiotik sehingga dapat dihindari penggunaan obat antibakteri dalam budidaya (Sahoo et al., 2016).

Bakteri gram positif dan negatif yang ada pada pencernaan hewan memiliki dinding sel dengan dua komponen utama yakni peptidoglikan pada bakteri gram positif dan negatif serta lipopolisakarida yang hanya dimiliki oleh kelompok gram negatif. Jalur aktivasi imunitas nonspesifik dan mekanisme homeostatis oleh bakteri didasarkan oleh komposisi dinding selnya. Selama terjadi infeksi, peptidoglikan dan lipopolisakarida akan dilepaskan secara terus menerus (Hamann et al., 1998). Pelepasan komponen ini merupakan bentuk stimulasi sel yang prosesnya bergantung pada reseptor CD14 pada permukaan sel, reseptor toll ini berperan dalam memberikan sinyal jalur transduksi yang mengontrol ekspresi dari beberapa respon imun yang dapat diinduksi oleh gen dimana berperan penting terkait mikroba patogen (Kopp dan Medzhitov, 1999). Komponen dinding sel bakteri akan mengaktifkan makrofag, endotel sel, sel otot polos, dan neutrofil dimana aktivasi tersebut akan melepaskan berbagai mediator. Seperti contohnya, lipopolisakarida akan mengaktifkan makrofag sehingga sekelompok besar protein dapat diproduksi diantaranya, sitokin, tumor necrosis factor- α (TNF α), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12; metaloprotease seperti elastase dan cathepsin; mediator lipid seperti prostaglandin; serta oksigen reaktif dan nitrogen spesies. Sehingga bakteri probiotik dalam mikroflora usus memiliki pengaruh nyata dalam menginduksi kekebalan spesifik (Erickson et al, 2000).

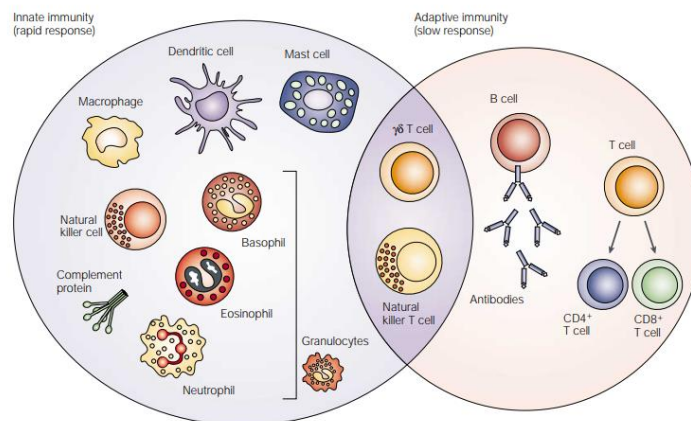
Mekanisme aksi dari antimicrobial peptides (AMPs) dan bakteriosin, terbagi menjadi beberapa mekanisme kerja yang kompleks, yaitu bekerja pada dinding sel, membran sel, intraseluler sel, biofilm dan aktivitas modulasi sistem imun inang. Dinding sel sebagai target potensial, memberikan efek antibakteri terutama mempengaruhi sintesis komponen dinding sel dan menghancurkan struktur dinding sel (Garcia et al., 2019). Pada mekanisme melalui membran sel, AMPs bergabung dengan membran sel melalui aksi fisikomikia sehingga akan terus menerus terakumulasi di membran sel sampai mengalami konformasi struktural, seperti meningkatkan permeabilitas membran dan menyebabkan lisis (Zhang et al., 2021). Mekanisme aksi terhadap intraseluler sel adalah dengan penetrasi langsung atau endositosis, pemberian efek antimikroba ini menargetkan nukleus, organel, atau protein intraseluler lain (Luo et al., 2021). Pada mekanisme aksi penghancuran biofilm yaitu melalui penghambatan quorum sensing (Overhage et al., 2008), penghambatan adhesi sel mikroba, dan mereduksi matriks biofilm (Brancatisano et al., 2014).

Bakteriosin berbeda dengan antibiotik dari sisi sintesis, spektrum anti-mikroba, serta mekanisme kerjanya. Bakteriosin disintesis pada ribosom dan informasi genetiknya ada pada plasmid, sedangkan antibiotik merupakan hasil metabolisme sekunder yang diproduksi multienzim. Antibiotik memiliki spektrum kerja yang lebih luas, dapat bekerja pada beberapa genus bakteri gram positif dan negatif, sedangkan bakteriosin spektrumnya lebih sempit namun lebih efektif melawan sel target dari pada antibiotik, meskipun pada dosis rendah (Gulluceet et al., 2013). Bakteriosin diklasifikasikan menjadi tiga golongan terkait dengan kesamaan molekulnya, yaitu kelompok IIa, Ib, IIb, dan III. Namun, hingga kini belum banyak diisolasi sehingga informasi mengenai bakteriosin ini masih sedikit (Klaenhammer, 1993).

2.4 Respon Imun

Sistem imun merupakan bentuk mekanisme fisiologi yang berfungsi melindungi diri dari benda asing yang masuk ke tubuh, seperti virus, parasit, dan mikroba patogen. Sistem imun memiliki kemampuan khusus dalam mengidentifikasi serta memusnahkan komponen benda asing yang masuk ke tubuh dan berpotensi menyebabkan penyakit (Mescher, 2016). Respon imun adalah reaksi fisiologis maupun patologis melalui mekanisme seluler disebabkan oleh adanya gangguan asing yang masuk ke tubuh, seperti virus, parasit, dan mikroba patogen. Respon imun pada makhluk hidup dibagi menjadi dua jenis, respon imun bawaan (*innate immunity*) dan respon imun adaptif (*adaptive immunity*) (Martini et al., 2019).

Respon imun bawaan (*innate immunity*) adalah mekanisme pertahanan yang bekerja secara non spesifik dengan memberikan respon seluler secara langsung ketika terjadi gangguan asing yang masuk ke tubuh (Widiastuti, 2020). Komponen utama respon imun bawaan adalah pertahanan epitel, makrofag, leukosit, dan polimorfonukleat (Mescher, 2016). Pertahanan sel epitel akan memberikan respon berupa sekresi mukus sehingga gangguan asing yang masuk dapat terperangkap dan tidak dapat masuk ke dalam jaringan organ dibawahnya. Hal ini akan menstimulus sel *natural killer* (NK) untuk mendeteksi komponen gangguan asing untuk selanjutnya memusnahkannya dengan melisiskannya. Setelah itu, tubuh akan menstimulus interferon untuk mengeluarkan sinyal yang mengkoordinasikan sel pertahanan tubuh untuk melepaskan makrofag dan sel limfosit ke tubuh (Martini et al., 2015).



Gambar 2.5 *Innate and Adaptive Immunity* (Dranoff, 2004).

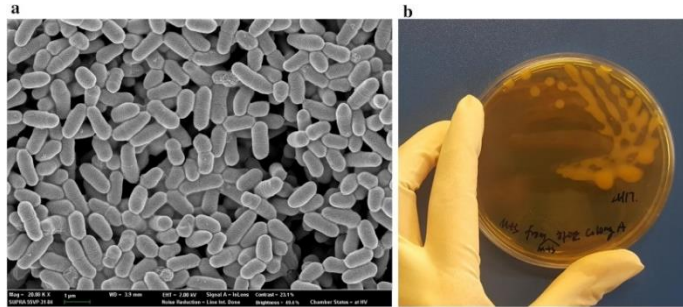
Respon imun adaptif (*adaptive immunity*) merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh yang melibatkan sel limfosit T dan limfosit B. Mekanisme respon imun adaptif dibagi menjadi dua, pertahanan humoral dan pertahanan seluler. Pertahanan humoral akan memediasi molekul yang terkandung dalam darah dan sel limfosit B untuk memproduksi antibodi (Mescher, 2016). Antibodi merupakan plasma darah berupa protein yang mampu bereaksi dengan antigen atau gangguan asing yang masuk dalam tubuh. Pertahanan seluler merupakan respon mediasi oleh limfosit T, ditandai dengan adanya aktivitas fagositosis dalam tubuh (Widiastuti, 2020; Schroeder&Cavacini, 2010).

2.5 *Weissella confusa*

Genus *Weissella* merupakan anggota bakteri asam laktat (BAL) yang baru diusulkan statusnya pada tahun 1993 dan saat ini ada 14 spesies yang telah diakui secara resmi. Seluruh spesies *Weissella* tidak membentuk spora, merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, dan menfermentasikan glukosa melalui jalur fermentasi heterolaktik yang mana menghasilkan asam laktat, etanol, dan karbondioksida sebagai hasil fermentasinya. Bakteri *Weissella* merupakan bakteri aerotoleran (Lee et al., 2012). Genus *Weissella* banyak diisolasi dari sumber yang berbeda seperti tanah, produk dari tumbuhan (dari tebu, makanan fermentasi seperti kimchi), tumbuhan, manusia, hewan, dan ikan. Beberapa strain di *Weissella* banyak yang dikenal sebagai bakteri oportunistik bagi manusia, hewan, dan ikan. Namun beberapa diantaranya seperti *W. confusa* merupakan kandidat probiotik dimana memiliki sifat antimikroba yang telah dibuktikan secara *in vitro* pada beberapa penelitian, memproduksi eksopolisakarida, rentan terhadap antibiotik, daya lekat tinggi pada usus, memiliki toleransi pada pH rendah, garam empedu (*bile salt*), serta suhu panas (Kahyani et al., 2021). Pada penelitian sebelumnya penggunaan mikroorganisme yang berasosiasi dari inang menjadi sumber baru kandidat probiotik untuk budaya perikanan. Bakteri yang berasosiasi dengan inang lebih efektif daripada bakteri yang tidak berasosiasi karena dinilai memiliki manfaat yang optimal pada lingkungan yang sama.

Pada penelitian Wijaya (2022) menunjukkan spesies *W. confusa* JCM 1039 ditemukan dari hasil isolasi saluran pencernaan (gastrointestinal) ikan lele (*C. gariepinus*) liar Sungai Brantas. Pada uji skrining sebagai kandidat bakteri asam laktat ditunjukkan dari hasil menunjukkan pembentukan zona bening pada media MRSA dengan tambahan CaCO_3 sebagai indikator penghasil asam sebagai produk fermentasi (asam laktat atau asam asetat). Potensi antibakteri mencegah penyakit *Enteric Septicaemia of Catfish* (ESC) ditunjukkan dengan diameter zona bening hasil penghambatan terhadap *E. ictaluri* sebesar 13,7 mm. Pada uji simulasi cairan lambung dan usus terlihat viabilitas dari *W. confusa* JCM 1039 yang menunjukkan kelangsungan hidup yang tinggi sehingga memenuhi persyaratan fungsional utama kandidat probiotik yaitu resisten terhadap pH rendah lambung, garam empedu (*bile salt*), dan cairan pankreas. *W. confusa* JCM 1039 juga menunjukkan perhitungan persentase penempelan pada lendir usus ikan yang cukup baik yakni 9,00%. Peptidoglikan pada dinding sel bakteri *W. confusa* juga memiliki peranan penting pada stimulasi imunitas inang (Dworkin, 2014). Beberapa fragmen peptidoglikan selain digunakan dalam komunikasi antar bakteri, juga digunakan oleh eukariota untuk menginisiasi respon imun dan memodulasi respon inflamasi (Royet et al., 2011). *W. confusa* JCM 1039 sensitif terhadap antibiotik erythromycin, oxytetracyclin, dan novobiocin yang menunjukkan bahwa tidak resisten dan aman digunakan sebagai kandidat probiotik. Pada uji patogenitas terhadap ikan lele (*C. gariepinus*) menunjukkan *W. confusa* JCM 1039 aman digunakan sebagai kandidat probiotik untuk organisme perairan (nonpatogenik pada inang) (Nurhayati et al., 2022). Taksonomi *W. confusa* berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: <i>Weissella</i>
Spesies	: <i>Weissella confusa</i> (Holzapfel dan Kandler 1969).



Gambar 2.6 *Weissella confusa* (a) Scanning elektron mikroskop *W. Confusa*. (b) Koloni *W. confusa* dalam MRSA dan 10% sukrosa (Jin et al., 2019).

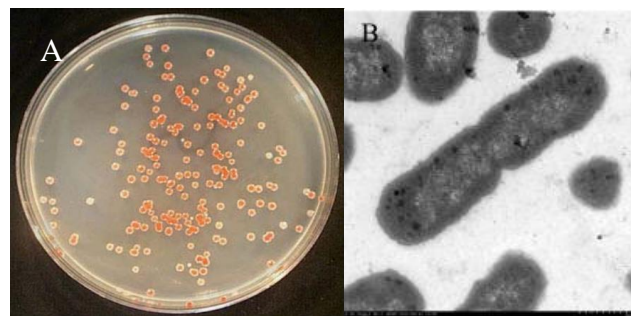
Secara fenotipik sulit membedakan genus *Weissella* dengan *Leuconostoc* atau *Lactobacilli* heterofermentatif. Pengelompokan genus *Weissella* dilakukan berdasarkan teknik taksonomi molekuler. Genus *Weissella* dinamai ahli mikrobiologi Jerman Norbert Weiss atas kontribusinya dalam bidang penelitian bakteri asam laktat. Hingga saat ini terdapat 19 spesies *Weissella* yang tervalidasi. Kunci untuk deskripsi spesies baru ini dalam studi yang relevan adalah sekuens gen 16S rRNA dan analisis hibridisasi DNA, bersama dengan data fenotipik dalam pendekatan taksonomi polifasik. Dengan demikian, spesies *Weissella* dikelompokkan dalam lima cabang filogenetik berdasarkan filogeni 16S, dengan *W. soli*, *W. diestrammenae*, *W. koreensis*, *W. kandleri*, dan *W. oryzae* sebagai anggota cabang pertama, *W. cibaria* dan *W. confusa* sebagai anggota kedua, *W. thailandensis*, *W. hellenica* dan *W. paramesenteroides* di cabang ketiga, *W. ceti*, *W. halotolerans*, *W. viridescens*, *W. minor*, dan *W. uvarum* di cabang keempat, dan *W. beninensis*, *W. fabalis*, *W. fabaria*, *W. ghanensis* di cabang kelima (Fusco et al., 2015).

2.6 *Edwardsiella ictaluri*

E. ictaluri merupakan bakteri gram negatif yang termasuk dalam patogen obligat yang tidak persisten pada lingkungan namun terbukti bertahan di lumpur dan air hingga 90 hari diluar inang ikan lele. *E. ictaluri* awalnya dianggap inang spesifik bagi ikan lele namun baru-baru ini ditemukan juga pada spesies lain. Mikroorganisme ini mampu tumbuh optimal pada suhu 23-30°C dimana kondisi ini juga merupakan standar suhu optimum pertumbuhan ikan lele dimana mendukung penyebaran penyakit. *E. ictaluri* merupakan agen penyebab *Enteric Septicemia of Catfish* (ESC) dimana penyakit ini menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi pada ikan dewasa menyebabkan 15 – 19% dari populasi dan hampir 50% kematian pada fase larva (Suanyuk et al., 2013). Penularan *E. ictaluri* bersifat horizontal melalui konsumsi bakteri yang keluar pada kotoran dari ikan yang terinfeksi dan juga kanibalisme dari ikan yang terinfeksi. Bentuk penyebaran infeksi *E. ictaluri* pada ikan lele biasanya melalui jalur oral dan memasuki aliran darah melalui usus dan menyebar ke berbagai organ dalam. Tanda-tanda klinis infeksi *E. ictaluri* meliputi kelesuan, peningkatan sisik, distensi selom akibat asites, ulserasi kulit, pendarahan pada kulit dekat mata dan opercula, pangkal sirip, dan permukaan ventral perut, juga menyebabkan anemia pada ikan lele ditandai dengan penurunan kadar hemoglobin dan hematokritnya (Esmail et al., 2015). ESC ditandai dengan septikemia timbul dengan cepat, septikemia adalah peristiwa penumpukan bakteri dipembuluh darah sehingga menyebabkan peradangan kemudian menyebabkan perdarahan. Lesi yang terbentuk secara mikroskopis dapat diamati setelah dua hari pasca infeksi. Kemudian mortalitas bisa diobservasi setelah 5 hari pasca infeksi (Booth et al., 2006). Taksonomi bakteri *E. ictaluri* menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Edwardsiella*
 Spesies : *Edwardsiella ictaluri* (Hawke *et al.*, 1981).

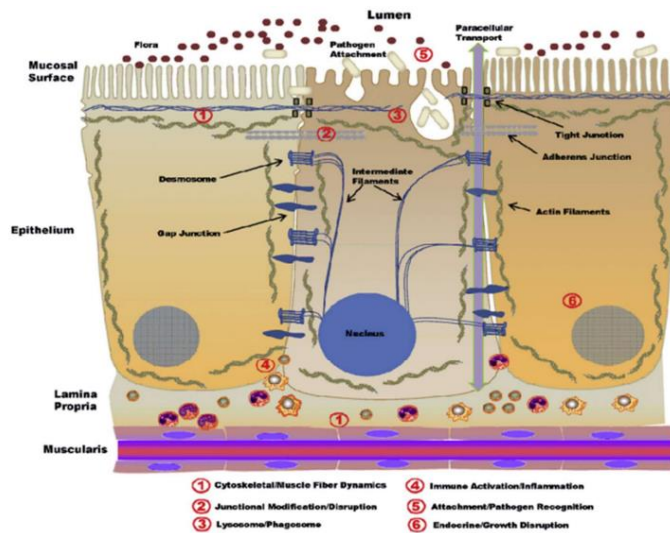
Setiap bakteri patogen invasif memiliki banyak cara berbeda untuk menembus sel inang dan menghindari pembasmian (pada Gambar 2.9). Pada mekanisme infeksi *E. ictaluri* melalui polimerisasi aktin menjadi fibril atau filamen halus yang dinamis yang dimediasi oleh reseptor endositosis sehingga mendorong ekstensi membran sehingga ketika ada adhesi bakteri patogen dipermukaan usus akan mudah masuk. Kumpulan filamen aktin ini juga memfasilitasi masuknya bakteri sebagai reseptor atau titik pelekatan patogen (ditunjukkan nomer 1). *E. ictaluri* juga masuk dengan mengganggu jalur seluler, terjadi disregulasi pada komponen *apical junction complex* yaitu claudins yang merupakan *tight junction* yang mengatur permeabilitas paraseluler epitel sehingga memudahkan akses induksi patogen (ditunjukkan nomer 2). Kemudian apabila invasi *E. ictaluri* tinggi maka pertahanan instaseluler dari pencernaan ikan berupa NADPH yang berperan dalam produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) akan menurun sehingga memungkinkan *E. ictaluri* bertahan dan bereplikasi dalam makrofag (ditunjukkan nomer 3) (Li *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 *Edwardsiella ictaluri* (a) Koloni *E. ictaluri* pada media BHI Agar (Sink, 2004)
 (b) Citraan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) *E. ictaluri* (Wang, 2016).



Gambar 2.8 Infeksi *E. ictaluri* pada *C. gariepinus* (a) Tanda-tanda klinis eksternal khas menunjukkan distensi abdomen, lubang dikepala (panah putih) dan ulserasi pada kulit (panah hitam). (b) Perdarahan pada permukaan ventral. (c) Nodul putih pada hati (bintang putih) (Suanyuk *et al.*, 2013).



Gambar 2.7 Mekanisme masuknya patogen *E. ictaluri* pada usus ikan (Li et al., 2012)

2.7 Hematologi pada Ikan

Profil darah dapat menunjukkan bahwa kualitas air mempengaruhi keadaan fisiologis dimana perubahan fisiologis sekecil apapun akan tercermin dalam satu atau lebih parameter hematologis (Van Vuren, 1986). Profil darah sangat penting dalam indikator perubahan internal serta eksternal ikan. Perubahan yang dapat menyebabkan penyakit dibedakan menjadi dua kategori, non-infeksius (stress, zat toksik, defisiensi nutrisi) dan infeksius (virus, bakteri, parasit, dan protozoa). Perubahan bergantung juga pada spesies, umur, siklus kematangan, dan seksual pemijahan serta penyakit (Golovina, 1996). Pada ikan perubahan pada profil darahnya dikaitkan dengan respon seluruh sistem organ, dimana berpengaruh terhadap kelangsungan hidup ikan, reproduksi, dan pertumbuhan (Lusvoka, 1997). Pada penelitian sebelumnya studi hematologi mengenai efek nutrisi (Rehulka, 2000), penyakit menular, dan polutan (Rehulka 2002).

Interpretasi yang tepat dari parameter-parameter profil darah ini membutuhkan nilai referensi yang tepat untuk setiap spesies untuk meminimalkan efek perbedaan spesies. Sejumlah besar spesies ikan (sekitar 23.500 spesies) mencerminkan perbedaan besar dalam nilai hematologi. Kisaran referensi normal parameter hematologi dianggap penting untuk menilai dan memantau status kesehatan ikan (Witeska et al., 2016). Evaluasi analisis hematologi akan meningkatkan budi daya ikan dengan memfasilitasi deteksi dini situasi stres dan/atau penyakit yang dapat memengaruhi kinerja produksi (Rehulka et al., 2004). Studi tentang karakteristik fisiologis dan hematologis spesies ikan yang dibudidayakan merupakan alat penting dalam kemajuan sistem akuakultur, terutama dalam hal deteksi ikan yang sehat versus ikan yang terinfeksi atau stres (Ranzani-Paiva et al., 2003). Pada penelitian ini dilakukan pengamatan kadar eritrosit untuk mengetahui pengaruh penambahan *W. confusa* terhadap penghambatan *E. ictaluri* yang mensekresikan hemolisin sebagai faktor virulensi terpenting bakteri. Pengamatan leukosit dan diferensial leukosit dilakukan untuk mengetahui respon imun bawaan ikan dalam menghadapi infeksi patogen *E. ictaluri* pasca pemberian *W. confusa*.

2.8 Eritrosit

Eritrosit pada ikan biasanya berbentuk lonjong dan berbentuk cakram dengan inti padat. Eritrosit dari kelompok teleostei biasanya berukuran 8 – 15 μm dengan jumlah normal 1,05 – 5,2 $\times 10^6$ sel/ mm^3 . Jumlah eritrosit dapat dievaluasi berdasarkan kebiasaan hidup, lingkungan, invasi patogen, nutrisi dan hormonal. Fungsi eritrosit adalah mengangkut zat melintasi membran sel (oksigen diangkut dengan hemoglobin). Pada penelitian ini kadar eritrosit menjadi acuan bahwa kandungan oksigen dalam darah tercukupi dan nutrisi terpenuhi, dimana selain sebagai sumber energi utama, nutrisi juga menstimulasi pembentukan sel limfosit dan *natural killer* (NK) (Djunaedi, 2007).

2.9 Leukosit

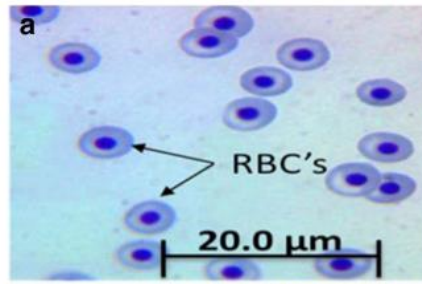
Darah ikan sangat kaya akan leukosit pada teleostei darah, mengandung kurang 20.000-150.000 sel/ mm^3 . Leukosit ikan dibagi menjadi granulosit (neutrofil, eosinofil, dan basofil) dan agranulosit (limfosit, monosit). Pada teleostei banyak leukosit granulosit normal sebesar 4,5-18% dalam darah. Perubahan kadar leukosit dapat menjadi suatu indikator bahwa tubuh sedang melakukan mekanisme pertahanan dalam melawan patogen yang masuk. Diferensial leukosit akan menunjukkan peranan spesifik dan batasan jumlah normal leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati, 2016). Neutrofil pada teleostei berbentuk bervariasi dan bersegregmen, berfungsi sebagai fagosit dan bakteriosidal. Eosinofil berbentuk polimorfonuklear dengan lobus ganda dan sitoplasma dengan granula kemerahan, berperan dalam merespon peradangan dan juga memiliki potensi sebagai bakteriosidal. Basofil merupakan leukosit granular yang jumlahnya paling sedikit dalam darah, berinti lobus banyak dan sitoplasmanya dipenuhi granula. Basofil berperan dalam imunitas terhadap parasit dan merespon alergi. Selanjutnya, untuk leukosit agranula ada limfosit yang memiliki bentuk bulat dengan sitoplasma yang padat. Limfosit dibagi menjadi dua, limfosit T dan limfosit B yang berperan sebagai respon reaksi imunitas. Terakhir ada monosit, berbentuk irregular dengan sitoplasma kebiruan dengan granula halus kemerahan berfungsi sebagai makrofag dalam darah (Fänge, 1992).

Tabel 2.2 Kadar Leukosit Normal pada Ikan Air Tawar (Fänge, 1992).

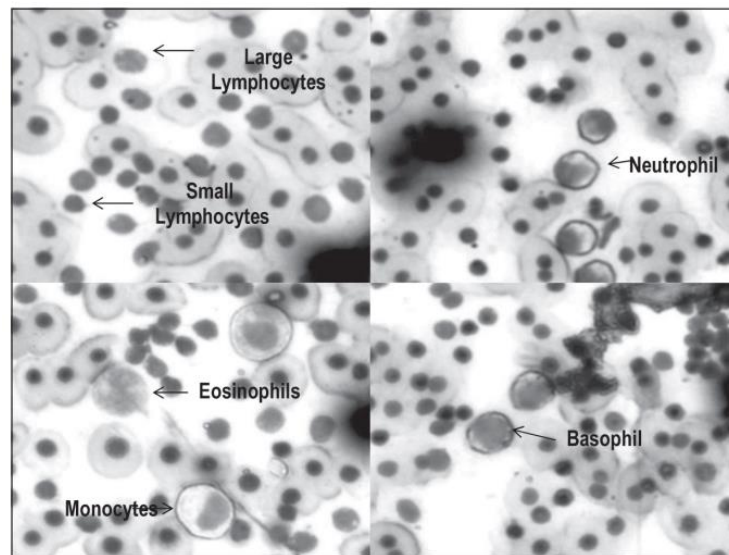
Jenis	Kadar Normal Leukosit				
	Eosinofil	Limfosit	Monosit	Neutrofil	Basofil
<i>C. gariepinus</i>	2,4-8%	60,2-86%	2-3%	6-12%	<1%

Leukosit merupakan komponen seluler utama yang merespon infeksi patogen. Sel prekursor berinti berdiferensiasi menjadi sel di dalam sumsum tulang. Ada 2-3% neutrofil yang berada didalam sirkulasi darah, yang digunakan terutama untuk transportasi ke tempat yang membutuhkan. Sisanya dikumpulkan secara marginal melekat di endotel vaskular dalam jaringan, 90% disumsum tulang, sisanya pada limpa, hati, paru-paru pada jumlah yang lebih kecil ada di saluran pencernaan dan orofaring. Leukosit yang termaginalisasi tersebar endotel jaringan masuk ke sirkulasi diakibatkan oleh endotoksin bakteri. Neutrofil akan langsung beredar ke darah tepi selama 5-9 jam. Neutrofil merespon rangsangan inflamasi akut dengan migrasi ke arah atraktan (kemotaksis) dan berdiapesis ke sel endotel kapiler dan memfagosit agen infeksi secara enzimatik menghancurkan di dalam vakuola sitoplasma. Leukosit bertahan hidup didalam jaringan selama 2-

3 hari. Limfosit akan berdiapedesis ke lokasi inflamasi selama fase kronis. Monosit bertindak sebagai fagosit, akan muncul setelah agen infeksi masuk ke dalam jaringan (Djunaedi, 2007).



Gambar 2.8 Sel darah merah dari *C. gariepinus* (Gabriel et al., 2004)



Gambar 2.9 Diferensial Leukosit *C. gariepinus* (Gabriel et al., 2004)

BAB 3

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2023 – April 2024 di Laboratorium Biosains dan Teknologi Hewan, Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, serta pemeliharaan hewan uji dilakukan di *growing room*, Laboratorium Dasar 2, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan dalam penelitian antara lain akuarium dengan ukuran 60x30x30 cm, aerator, jaring penutup, autoklaf, pinset, papan parafin, bak pewarnaan, pipet thoma, mikropipet, bunsen, inkubator, Hana Kit Amonia, mikrotube, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, *water quality checker* (*Potential Hydrogen* (pH), *Dissolved Oxygen* (DO), dan suhu) syringe 1 mL, mikroskop compound, object glass, cover glass, haemocytometer *Improved Neubauer*, *handtally counter*, pipet tetes, kertas tisu, hand glove, penggaris, alat tulis, spektrofotometer, cawan petri, sentrifuge, dan jangka sorong.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian *C. gariepinus*, pakan ikan juvenile komersil ukuran 2 mm sesuai bukaan mulut ikan juvenil, isolat murni *W. confusa* dan *E. ictaluri*, media *de Man Rogosa Sharpe broth*, alkohol 70%, antikoagulan EDTA, pewarna giemsa, larutan hayem, larutan turk, akuades, media *Mueller Hilton Agar*, media *Tryptic Soy Broth*, agar media, ethanol, dan NaOH 1 M.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Kultur dan Stok Probiotik *Weissella confusa*

Pada penelitian ini digunakan strain bakteri *W. confusa* JCM 1093 yang didapatkan dari Balai Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu (BKIPM) II Surabaya yang diisolasi oleh Wijaya (2022) yang kemudian ditumbuhkan ke media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRS) (68,2 gram/liter) dengan metode *continue streak plate* dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30°C. Kemudian selanjutnya akan dilakukan penentuan usia perlakuan isolat untuk pengaplikasian probiotik pada kurva pertumbuhan. Sebanyak 3-4 ose diinokulasikan dari stok kultur ke media *MRS broth* (55,1 gram/liter) 100 mL dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30°C. Sebanyak 1,5 mL kultur diambil dan dimasukkan kedalam kuvet untuk dilakukan pengukuran *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang pengukuran 600 nm setiap sejam sekali selama 24 jam. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dibuat dengan memasukkan data hasil pengukuran OD yang diperoleh dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan data OD sebagai sumbu y. Saat memasuki fase stasioner, kultur bakteri akan diambil dengan konversi OD₆₀₀ 0,5 setara dengan kepadatan 10⁹ CFU/mL (Hernandez, 2021). Selanjutnya dapat dilakukan pengenceran dengan konsentrasi yang diinginkan.

3.3.2 Persiapan dan Kultur Stok Bakteri *Edwardsiella ictaluri*

Bakteri patogen yang dipakai adalah bakteri *E. ictaluri* yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) II Surabaya. Bakteri diperbanyak pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) (40 gram/liter) diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam. Isolat *E. ictaluri* yang telah diinkubasikan diambil 1 mL ditambahkan

ke media *Tryptic Soy Broth* (TSB) (30 gram/liter) dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30°C. Sebanyak 1,5 mL kultur diambil dan dimasukkan kedalam kuvet untuk dilakukan pengukuran *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang pengukuran 600 nm setiap dua jam sekali selama 24 jam. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dibuat dengan memasukkan data hasil pengukuran OD yang diperoleh dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan data OD sebagai sumbu y. Saat memasuki fase log, kultur bakteri akan diambil dengan konversi OD₆₀₀ 0,1 setara dengan kepadatan 10⁷ CFU/mL (Hoang et al., 2021). Selanjutnya dapat dilakukan pengenceran dengan konsentrasi yang diinginkan.

3.3.3 Re-konfirmasi Aktivitas Antimikroba *Weissella confusa* terhadap *Edwardsiella ictaluri*

Uji re-konfirmasi aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi kertas cakram agar dengan menyiapkan terlebih dahulu *cell free supernatant* (CFS) isolat *W. confusa*. Preparasi CFS dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Amin *et al.*, (2017). Isolat *W. confusa* disubkultur pada 10 ml MRS broth dengan cara mengambil sedikit biakan murni menggunakan ose steril kemudian dimasukkan kedalam tabung yang berisi MRS *broth* (55,15 gram/liter). Tabung yang telah berisi bakteri kemudian diinkubasi pada suhu ruang secara anaerob selama 24 jam tanpa agitasi. Setelah 24 jam, MRSB disentrifugasi menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 15.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan kemudian difilter menggunakan syringe filter dengan ukuran 0,22 µm untuk sterilisasi dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk uji skrining aktivitas antimikroba.

Bakteri *E. ictaluri* yang telah dipersiapkan sebelumnya diambil kepadatan bakteri *E. ictaluri* yang digunakan untuk skrining aktivitas antimikroba menggunakan metode kertas cakram adalah 10⁶ CFU/ml. Tahapan selanjutnya uji aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram (Perez et al., 1990) dengan sedikit modifikasi. Tahap awal disiapkan media Mueller Hinton Agar (21 gram/liter) sebanyak 20 mL yang telah di autoklaf kemudian dituang secara aseptis ke dalam petri steril dan dibiarkan memadat. Bakteri *E. ictaluri* yang telah disiapkan disesuaikan kepekatannya menggunakan dan diambil menggunakan cotton bud steril untuk kemudian digores rata dipermukaan media selanjutnya didiamkan selama 5-10 menit. Setelah bakteri inokulan di MHA kering kemudian letakkan kertas cakram yang telah direndam dalam dalam supernatan. Selanjutnya MHA diinkubasi pada inkubator dengan posisi media diatas secara aerobik pada suhu 30°C selama 48 jam dimana pada studi sebelumnya ditunjukkan bahwa zona hambat tidak berubah antara 24-48 jam tetapi pengukuran zona hambat lebih terlihat terang saat dilihat pada jam ke 48 (Plumb et al., 1995). Perlakuan pada diulang sebanyak 2 kali. Diameter zona bening yang muncul setelah inkubasi kemudian diukur menggunakan jangka sorong. Hasil dari diameter zona bening lebih dari 10 mm dianggap bahwa bakteri *W. confusa* masih memiliki aktivitas antimikroba yang baik.

3.3.4 Pengaplikasian Probiotik *Weissella confusa* pada Pelet Ikan

Isolat *W. confusa* yang telah dipersiapkan sebelumnya akan dilakukan pengenceran sesuai dengan dosis yang akan digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1. Pencampuran pakan dengan bakteri probiotik dilakukan dengan penyemprotan sesuai dengan dosis yang sudah diukur sesuai dengan tabel 3.1 untuk selanjutnya disimpan disuhu 4°C dan preparasi ini akan diulang setiap seminggu sekali.

Tabel 3.1 Rancangan Perlakuan Dosis Probiotik

Perlakuan	Kepadatan Bakteri Probiotik (CFU/mL)	Volume (mL/kg)
Kontrol (K0)	0	0
Perlakuan 1 (K1)	1×10^4	10
Perlakuan 2 (K2)	1×10^6	10
Perlakuan 3 (K3)	1×10^8	10

3.3.5 Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Uji

Ikan lele (*C. gariepinus*) ukuran 7-8 cm yang diperoleh dari tempat pembenihan lele lokal di daerah Rungkut, Surabaya. Sebelum dilakukan pemeliharaan, ikan diaklimatisasi atau diadaptasikan selama 7 hari di dalam akuarium kaca 60 x 30 x 30 bersih dalam kondisi sejuk dan juga rutin diberi pakan komersial sebanyak dua kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari. Penggunaan ukuran 7-8 cm pada penelitian ini di dasarkan pada karakter pertumbuhan *C. gariepinus* pada ukuran 7-8 cm berada di fase pembesaran yaitu panjang tubuh diatas 5 cm (Windriani, 2017). Selanjutnya dilakukan tebar secara acak dalam akuarium sebanyak 20 ekor perakuarium. Masing-masing akuarium dipasok dengan air PDAM yang telah diendapkan selama 7 hari dan dilengkapi sistem aerasi yang baik. Ikan lele (*C. gariepinus*) diberi makan dua kali sehari pada waktu pagi dan sore dengan kolam selama 30 hari. Pemberian pakan dilakukan mengelompokan sesuai dengan perlakuan K0, K1, K2, K3. Pemberian pakan sebesar 3% dari bobot ikan dan jumlah benih lele yang ditimbang setiap tujuh hari sekali. Selama proses pemeliharaan juga akan dilakukan monitoring faktor lingkungan yaitu: suhu, pH, OD dan amonia. Pengecekan suhu, pH, DO dan pengukuran kadar amonia akan dilakukan setiap tujuh hari sekali selama penelitian dengan tujuan pengondisian lingkungan secara optimal selama perlakuan.

Tabel 0.2 Standar optimum parameter kualitas air menurut SNI No. 3 Tahun 2014 tentang produksi ikan lele

Parameter	Satuan	Kisaran Optimum
Suhu	°C	25-30
pH	-	6,5-8,5
Oxygen Dissolved (Oksigen terlarut)	mg/L atau ppm	>3
Amonia (NH ₃)	mg/L atau ppm	Maksimal 0,1

3.3.6 Uji Tantang

Setelah uji coba pemberian pakan selama 3 minggu, pada kelompok perlakuan K0, K1, K2, K3 disuntik secara intraperitoneal dengan *E. ictaluri* sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan 10^6 CFU/mL. Konsentrasi bakteri ini telah disesuaikan dengan patogenisitas, virulensi, dan tingkat respons imun inang (Suanyuk *et al.*, 2013). Kemudian semua kelompok terus diobservasi selama 3 hari ke depan. Kematian dicatat setiap hari untuk menghitung rata-rata persen kelulusan hidup (*survival rate*) pada setiap perlakuan.

3.3.7 Proses Pengambilan Sampel Darah

Pada hari ketiga pasca injeksi patogen lima ekor dari masing-masing kelompok perlakuan diambil secara acak kemudian dilakukan pengamatan gejala klinis yang nampak pasca uji tantang

untuk selanjutnya sampel darah diambil dari linea lateralis dengan menggunakan syringe steril yang sebelumnya sudah dibilas dengan EDTA-disodium sebagai antikoagulan. Sampel darah yang diambil selanjutnya akan dilakukan pengukuran kadar eritrosit, leukosit, dan diferensial leukosit.

3.3.8 Pengukuran Kadar Eritrosit dan Leukosit

Metode perhitungan total eritrosit menggunakan metode Blaxhall dan Daisley (1973) yaitu dimulai dengan haemocytometer digunakan untuk menghitung kadar eritrosit total (RBC) secara manual. Sampel diambil menggunakan pipet thoma hingga skala 0,5 ml untuk selanjutnya ditambahkan larutan hayem sebagai pengencer hingga skala 101 ml, sehingga akan didapatkan pengenceran darah sebesar 1:200. Suspensi darah sampel dan larutan pengencer yang telah dihomogenkan dengan cara dibolak-balik pada tiga tetes pertama dibuang dan tetes selanjutnya diteteskan ke kamar hitung untuk kemudian diamati dan dihitung secara manual. Jumlah sel darah merah yang dihitung dari empat kisi sudut dan satu kisi tengah (ruang R) (gambar 3.2). Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan garis atas harus dihitung, sedangkan sel yang menyinggung sebelah kanan dan garis bawah tidak di hitung.

Penghitungan kadar leukosit dilakukan dengan mengambil sampel menggunakan pipet thoma sampai skala 0,5 kemudian ditambahkan larutan turk sampai 11 ml, sehingga didapatkan pengenceran sebesar 1:20. Suspensi darah dan larutan turk yang telah dihomogenkan dengan cara dibolak-balik pada tiga tetes pertama dibuang dan tetes selanjutnya diteteskan ke kamar hitung untuk kemudian diamati dan dihitung secara manual. Jumlah sel darah putih yang dihitung ada pada kamar hitung sesuai (ruang W) gambar 3.2. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan garis atas harus dihitung, sedangkan sel yang menyinggung sebelah kanan dan garis bawah tidak di hitung.

Jumlah sel rata-rata per kisi dan faktor pengenceran digunakan untuk menghitung konsentrasi sel. Perhitungan jumlah sel darah adalah sebagai berikut:

$$\text{Jumlah Eritrosit} = n_e \times p \times 50$$

Keterangan:

Jumlah eritrosit satuan sel/mm³

n_e : Jumlah sel darah merah yang terhitung dalam kotak R

p : pengenceran (200)

50 : 1/volume kotak R (4000) dibagi jumlah bujur sangkar (5 kotak R=80)

$$\text{Jumlah Leukosit} = n_L \times p \times 2.5$$

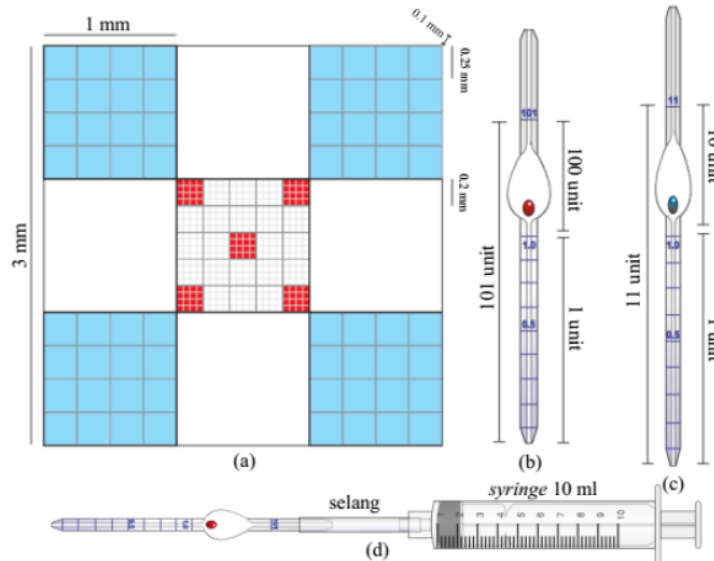
Keterangan:

Jumlah leukosit satuan sel/mm³

n_L : Jumlah sel leukosit yang terhitung dalam 4 kotak W

p : pengenceran (20)

2,5 : 1/volume kotak W (160) dibagi jumlah bujur sangkar (4 kotak R=64)



Gambar 3.1 Ilustrasi Ruang Hitung Haemacytometer dan Pipet Thoma (a) Skala dan ukuran kamar hitung Neubauer dengan kamar hitung eritrosit (merah dan kamar hitung leukosit (biru), (b) pipet thoma eritrosit, (c) pipet thoma leukosit, (d) Modifikasi pipet dengan sambungan selang untuk menghisap darah dengan syringe (Hardian et al., 2020).

3.3.9 Analisis Diferensial Leukosit

Dalam analisis diferensial leukosit digunakan teknik preparat apus darah tepi. Teknik apusan darah tepi, sel yang diamati yaitu leukosit yang terdiri dari 5 jenis di antaranya yakni neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit. Adapun prosedur yang digunakan dalam pembuatan preparat apus darah tepi adalah sebagai berikut. Darah ditetaskan pada kaca preparat. Kemudian kaca preparat baru diletakkan dengan sudut kemiringan 25-30° di atas kaca preparat yang telah ditetaskan darah, lalu ditarik lurus sampai ujung preparate. Langkah selanjutnya yaitu pewarnaan preparate apus darah tepi menggunakan pewarna Giemsa 10%. Preparat apus darah pertama-tama ditetaskan methanol dan dibiarkan mengering selama 5 menit. Lalu larutan pewarna Giemsa 10% ditetaskan ke atas preparat apusan dan dibiarkan selama 45 menit. Setelah mengering, kelebihan pewarna dapat dibilas menggunakan aquades dan dibiarkan mengering hingga seluruh permukaan preparate apusan darah telah kering sempurna. Setelah seluruh preparate kering, maka preparat telah siap untuk diamati di bawah mikroskop dan dianalisis jumlah leukosit diferensial.

Perhitungan leukosit dilakukan daerah hitung dengan memilih sediaan yang cukup tipis dan penyebaran leukosit merata. Perhitungan dimulai dari arah pinggir atas sediaan kemudian ke pinggir bawah. Kemudian dari pinggir bawah geser ke bagian kanan dan geser ke arah atas lagi, perhitungan ini dilakukan secara terus-menerus sampau 100 sel leukosit teramati. Pada mikroskop dengan perbesaran 40x hingga terlihat jumlah dari masing-masing leukosit diferensial kemudian persentase jenis-jenis tersebut leukosit dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase Leukosit Diferensial (\%)} = \frac{\sum \text{Jenis Sel Leukosit}}{100 \text{ sel leukosit yang teramati}} \times 100$$

3.4 Analisis Data

Setelah mendapatkan data total eritosit, leukosit, dan diferensial leukosit akan dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk (signifikasi, $p > 0,05$) apabila data terdistribusi normal dilakukan uji ANOVA One-Way (signifikasi, $p < 0,05$) dan dilanjutkan uji post hoc Duncan. Apabila data tidak terdistribusi normal akan dilakukan uji nonparametrik menggunakan Uji Kruskal Wallis (signifikasi, $p < 0,05$) menggunakan software IBM SPSS Statistic 25. Selanjutnya akan dilakukan uji lanjutan Man Whitney (signifikasi, $p < 0,05$) untuk melihat signifikasi dari masing-masing kelompok perlakuan K1, K2, K3 terhadap kontrol. Semua uji statistik dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

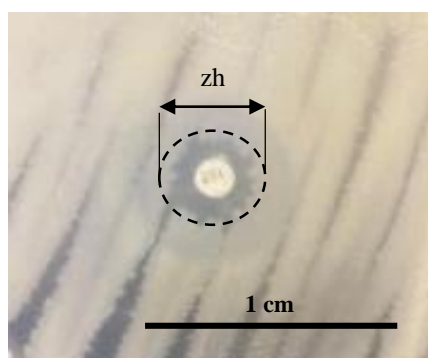
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji Re-konfirmasi Aktivitas Antimikroba *Weissella confusa* terhadap *Edwardsiella ictaluri*

Uji re-konfirmasi aktivitas antimikroba *W. confusa* terhadap *E. ictaluri* bertujuan untuk mengetahui performa *W. confusa* terhadap penghambatan *E. ictaluri* secara *in vitro* setelah preservasi. Aktivitas penghambatan *cell free supernatant* (CFS) *W.confusa* terhadap *E.ictaluri* ditunjukkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Tabel Penghambatan CFS *W. confusa* terhadap *E. ictaluri*

Pengulangan	Diameter (mm)	Rata-rata (mm)
1	4,5	4,95±0,63 mm
2	5,4	



Gambar 4.1 Zona hambat yang muncul pada uji rekonfirmasi aktivitas antimikroba
Keterangan: zh: zona hambat

Zona hambat yang ditunjukkan oleh zona bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang telah direndam dalam supernatan CFS kultur *W. confusa*. Daya hambat ini dihasilkan berasal dari senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh mikroorganisme antara lain zat penghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti eksopolisakarida, bakteriosin, *bacteriocin-like inhibitory substance* (BLISs), karbondioksida, asam laktat, dan CO₂ (Anjana, 2022). Bakteriosin merupakan senyawa peptida yang memiliki kemampuan antimikroba disintesis di ribosom. Bakteriosin pada aksinya melawan bakteri lain mempunyai kemampuan berbeda terhadap spesies target, secara umum komposisi fosfolipid dari jalur target dan pH juga mempengaruhi konsentrasi hambat minimum. Bakteriosin juga berinteraksi dengan situs spesifik (protein pada membran sel) sehingga meningkatkan efektivitasnya secara *in vivo* (Gulluceet et al., 2013). Hanya sedikit pembahasan mengenai bakteriosin yang diproduksi *W. confusa*, bakteriosin yang diproduksi genus *Weissella* adalah weicellicin. Bakteriosin weicellicin pada beberapa penelitian sebelumnya dibuktikan bahwa weicellicin merupakan bakteriosin yang termostabil yaitu masih memiliki aktivitas penghambatan pasca paparan suhu tinggi. Stabil pada pH antara 2-6 dan pada uji enzim lisosim, lipase, katalase, dan litikase (Goh et al., 2015). *W.confusa* juga memproduksi eksopolisakarida jenis dekstran yang dilaporkan memiliki kemampuan melekat pada mukosa usus sehingga meningkatkan kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri didasarkan kemampuan aktivitas antiinfeksi dan meningkatkan sistem imun (Hakim C et al., 2013). Mekanisme penghambatan eksopolisakarida sebagai

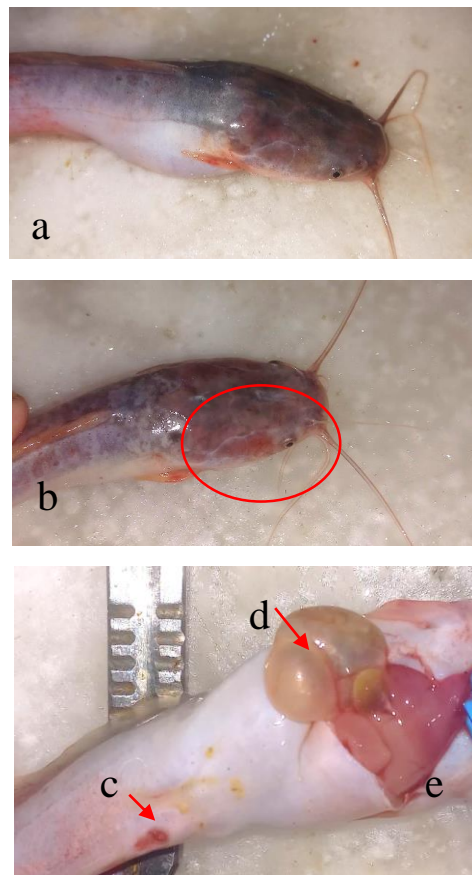
menekan pertumbuhan bakteri didasarkan pada interaksi eksopolisakarida dengan dinding bakteri patogen. Perbedaan muatan dari muatan positif dari eksopolisakarida dan muatan negatif dari dinding sel bakteri patogen menimbulkan interaksi elektrostatis yang mengganggu permeabilitas sehingga menyebabkan hidrolisis dinding sel dan berakibat kebocoran kemudian kematian sel. Penghambatan tersebut dinilai efektif pada bakteri gram negatif dikarenakan memiliki dinding sel yang lebih tipis dari bakteri gram positif (Aullybux et al., 2019). Penghambatan pertumbuhan bakteri *E. ictaluri* juga disebabkan oleh metabolit yang dihasilkan *W. confusa* salah satunya adalah asam laktat yang mengganggu motilitas bakteri. Aktivitas metabolisme bakteri asam laktat efektif menekan patogen karena motilitas bakteri *E. ictaluri* erat kaitannya dengan faktor virulensi bakteri tersebut (Wijaya et al., 2022). Pada penelitian Wijaya (2022) menunjukkan spesies *W. confusa* JCM 1039 ditemukan dari hasil isolasi saluran pencernaan (gastrointestinal) ikan lele (*C. gariepinus*) sehat sebagai bagian dari mikroflora normal. Serta berpotensi mencegah penyakit *Enteric Septicaemia of Catfish* (ESC) ditunjukkan dengan diameter zona bening hasil penghambatan terhadap *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan di atas bakteri *W. confusa* JCM 1093 masih memiliki aktivitas antimikroba yang baik terhadap penghambatan *E. ictaluri* secara in vitro.

4.2 Analisis Gejala Klinis

Proses infeksi bakteri *E. ictaluri* pada perlakuan K0, K1, K2, K3 yang disuntik secara intraperitoneal sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan 10^6 CFU/mL. Sebelum pengambilan sampel darah, dilakukan pengamatan gejala klinis pasca infeksi. Pengamatan dilakukan pada hari ketiga pasca injeksi patogen. Perubahan tersebut terlihat terlihat pada Gambar 4.2. Ikan lele (*C. gariepinus*) yang diinfeksi bakteri *E. ictaluri* sebelum diambil sampel darahnya menunjukkan beberapa gejala klinis yang ditimbulkan antara lain, meliputi gerak renang vertikal, distensi abdomen akibat asites, ulserasi kulit, pendarahan pada kulit dekat mata dan opercula, pangkal sirip, serta pembengkakan hati dan perubahan warna hati menjadi memucat. Gejala klinis yang nampak sesuai dengan pengamatan oleh Esmail, et al. (2015) yang menyebutkan tanda-tanda klinis infeksi *E. ictaluri* meliputi berenang vertikal, distensi abdomen akibat asites, ulserasi kulit, pendarahan pada kulit dekat mata dan opercula, pangkal sirip, dan permukaan ventral perut. Perdarahan yang dialami ikan lele pasca infeksi disebabkan kerusakan endotel kapiler akibat bakteri yang beredar dipembuluh darah, hal ini membuktikan bahwa *E. ictaluri* bersifat septicemia atau apabila beredar dipembuluh darah akan menyebabkan peradangan hingga perdarahan (Williams et al., 2005). Ikan yang terinfeksi *E. ictaluri* akan mengalami septikemia atau penumpukan bakteri pada pembuluh darah setelah terinfeksi 24 jam (Booth et al., 2006). Gerak renang vertikal diakibatkan oleh adanya kerusakan jaringan otak berupa ensefalitis (peradangan otak) yang merupakan lesi spesifik infeksi *E. ictaluri*, sehingga terjadi perubahan perilaku gerakan renang menjadi tidak normal (gerak renang vertikal) (Koswara, 2009).

Beberapa faktor virulensi dari *E. ictaluri* diantaranya darimampu bertahan dan beradaptasi pada berbagai kondisi inang seperti perubahan temperatur 23-37°C, pH, salinitas, dan tumbuh baik pada beberapa elemen nutrisi zat besi, fosfat, Mg^{2+} . Selain itu, komponen sel berupa flagella sebagai alat gerak, *fimbrial adhesin-like protein*, outer membran protein pada *E. ictaluri* seperti lipopolisakarida juga membantu dalam pelekatan pada membran epitel inang. *E. ictaluri* menghasilkan hemolisin dan kondroitinase yang merupakan faktor virulensi terpenting dari patogenitas bakteri tersebut. Hemolisin merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat toksik dengan melisis membran sel darah merah sehingga menyebabkan perdarahan. Kondroitinase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis jaringan ikat tulang rawan. *E. ictaluri* juga mampu membentuk siderofor dari pemanfaatan zat besi dari nutrisi esensial dan hasil pelisisan hemoglobin oleh hemolisin, siderofor ini merupakan senyawa pengkelat Fe^{3+}

dan mentranspor ke dalam sel. Siderofor berperan dalam pertahanan, adaptasi serta replikasi sel (Park et al., 2012).



Gambar 4.2 Perubahan patologi anatomi pasca infeksi *E. ictaluri*.
Keterangan: (a) Tanda-tanda klinis eksternal khas menunjukkan distensi abdomen (b) Perdarahan pada permukaan kulit dekat mata (c) Ulserasi pada kulit (d) Asites atau penumpukan cairan (e) Warna hati memucat.

Tabel 4.2 Gejala klinis pada *C.gariepinus* setelah infeksi *E.ictaluri*

Perlakuan	Gejala Klinis				
	Kulit	Abdomen	Gerak renang	Asites	Hati
K0	Ada ulserasi dan bercak merah pada kulit	Terjadi distensi	Gerak renang vertikal	Ada	Membesar dan pucat
K1	Ada bercak merah	Terjadi distensi	Gerak renang vertikal	Ada	Membesar dan pucat
K2	Ada bercak merah	Terjadi distensi	Gerak renang vertikal	Ada	Membesar dan pucat
K3	Ada bercak merah	Terjadi distensi	Gerak renang vertikal	Ada	Membesar dan pucat

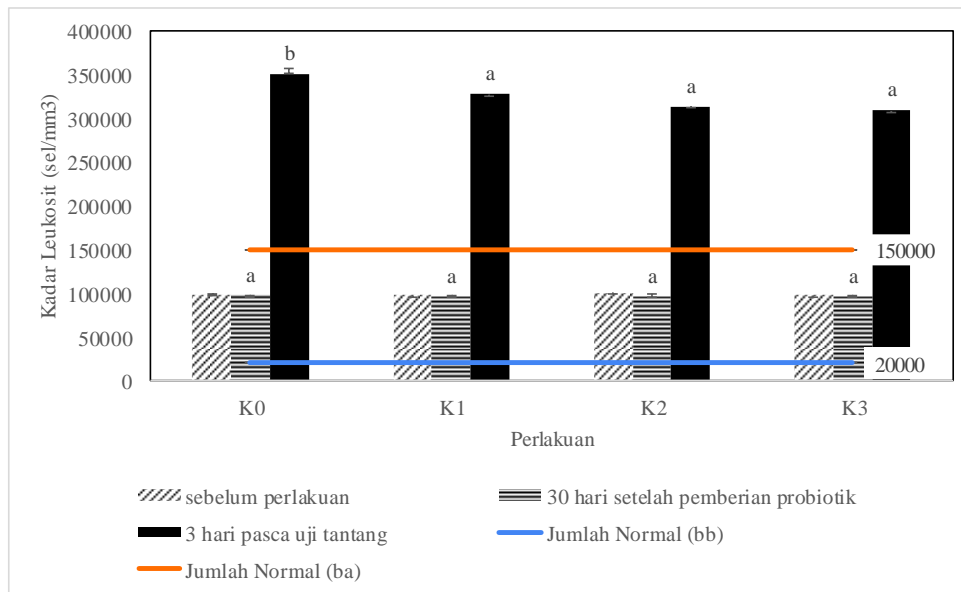
Pada perlakuan K1, K2, dan K3 gejala klinis yang nampak pada permukaan kulit berupa perdarahan yang muncul dipermukaan kulit berbeda dengan perlakuan K0 gejala klinis yang

nampak berupa ulserasi yang muncul pada permukaan kulit. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh situs pelekatan pertama pasca injeksi intraperitoneal adalah adanya pelindung mucus dalam usus. Pada perlakuan K1, K2, K3 dilakukan suplementasi *W. confusa* lewat pakan, eksopolisakarida yang dihasilkan mampu memodulasi sistem imun di usus dengan meningkatkan Ig A sehingga meningkatkan perlindungan di mukosa usus. Pada permukaan dinding sel *W.confusa* selain terbentuk atas peptidoglikan selapis yang tebal tapi juga dibentuk oleh polimer dinding sekunder seperti asam teikoat yang juga merupakan faktor adhesin atau pelekatan pada usus, sehingga epitel usus dapat terlindungi dari pelekatan patogen (Hymes et al., 2016). Dengan beberapa usaha meningkatkan fungsi barrier epitel mampu mencegah translokasi patogen dari usus ke darah. Namun, tetap munculnya gejala klinis lain yang mengindikasikan infeksi patogen berlangsung sehingga infeksi sistemik tetap terjadi (Simon et al., 2011). Pada pengamatan kelangsungan hidup, kelompok yang tidak diberi penambahan probiotik pada pakannya 20% ikan mati tiga hari pasca infeksi. Sedangkan pada kelompok yang diberi penambahan probiotik yaitu pada perlakuan K1, K2, dan K3 tidak ada individu yang mati, analisis kelulusan hidup dapat diobservasi secara optimal setelah 5 hari pasca infeksi (Booth et al., 2006).

4.3 Analisis Leukosit

Peningkatan jumlah leukosit (leukositosis) merupakan respon fisiologis tubuh menghadapi serangan patogen. Kenaikan jumlah leukosit merupakan indikator adanya infeksi yang mengakibatkan inflamasi atau peradangan (Nurhayati et al., 2016). Analisis jumlah leukosit ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, yakni sebelum perlakuan, setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan leukosit didapatkan peningkatan leukosit pada setiap perlakuan pasca uji tantang patogen sangat tinggi melebihi normal diatas 150.000 sel/mm^3 , yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar 351.130 sel/mm^3 , K1 sebesar 327.720 sel/mm^3 , K2 sebesar 313.440 sel/mm^3 , dan K3 sebesar 309.090 sel/mm^3 . Perbandingan data rata-rata leukosit dilakukan dengan membandingkan data jumlah leukosit masing perlakuan, yaitu untuk mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA One-Way dan dilanjutkan post hoc Duncan. Berdasarkan hasil analisis ANOVA didapatkan signifikansi pada data leukosit setelah uji tantang sebesar 0,001 ($p < 0.05$), kemudian dilanjutkan uji Duncan adanya signifikansi pada data perlakuan K0 setelah uji tantang. Data perhitungan statistik tertera ada **lampiran 8**. Hasil rata-rata jumlah leukosit dari tiap perlakuan yang diambil dapat dilihat pada gambar 4.3.

Berdasarkan hasil penelitian yang menunjukkan signifikansi rata-rata jumlah leukosit pasca uji tantang. Peningkatan kadar leukosit yang tinggi disebabkan oleh adanya infeksi sistemik yang dikibatkan oleh *E. ictaluri*. Penginfeksi ini terjadi akibat bakteri patogen masuk dan mampu menembus pertahanan barrier apitel diusus sehingga mengganggu permeabilitas pada *apical tight junction* jaringan sehingga patogen mudah terinduksi ke dalam jaringan. Apabila dilihat pada gambar 4.3 pada dosis pemberian K3 dengan kenaikan leukosit yang memiliki rata-rata paling rendah diantara yang lain yaitu, dengan rata-rata sebesar 309.090 sel/mm^3 . Pemberian bakteri probiotik *W.confusa* mampu berperan sebagai immunomodulator dan memiliki sifat antibakteri terhadap patogen yang masuk kedalam sistem pencernaan, pada penelitian ini *E. ictaluri*. *W. confusa* mensekresikan eksopolisakarida dan dapat menghambat pelekatan patogen di epitel usus (Merrifield et al., 2014).



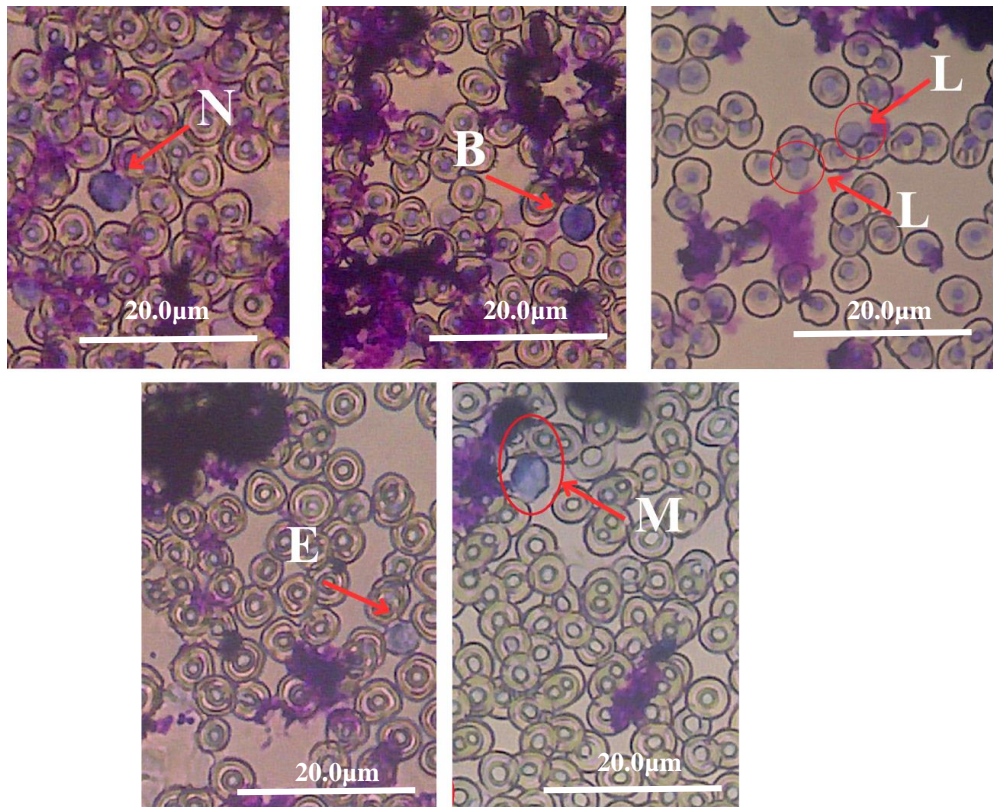
Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%

Gambar 4.3 Grafik Data Rata-rata Leukosit

Kemampuan *W. confusa* sebagai mikroflora normal pada usus ikan juga menjadi faktor mudahnya terkolonisasi dalam usus ikan (Nurhayati et al., 2022). Selain itu, *W. confusa* juga memproduksi bakteriosin, mekanisme kerja penghambatan bakteriosin terhadap bakteri patogen lain adalah menjadikan dinding sel dan membran sebagai target potensial, pada dinding sel bakteri patogen akan mempengaruhi sintesis komponen dinding sel dan menghancurkan struktur dinding sel (Garcia et al., 2019). Namun, mekanisme penghambatan *W.confusa* terhadap infeksi *E.ictaluri* belum dapat mengatasi infeksi sistemik secara optimal, diduga faktor virulensi *E. ictaluri* juga menjadi penyebab infeksi sistemik ini tetap terjadi yang ditandai meningkatnya jumlah leukosit sebagai pertahanan komponen seluler pada respon imun bawaan (*innate immunity*). Sesuai dengan penelitian Simon et al (2011) yang menjelaskan bahwa infeksi *E. ictaluri* mencapai jumlah maksimum pertumbuhannya dari 24 jam pasca infeksi sampai 108 jam pasca infeksi. Serta infeksi sistemik menyebar ke seluruh tubuh 24 jam pasca infeksi.

4.4 Analisis Diferensial Leukosit

Analisis diferensial leukosit dilakukan dengan teknik preparat apus darah tepi. Teknik apusan darah tepi, sel yang diamati yaitu leukosit yang terdiri dari 5 jenis di antaranya yakni neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit. Jenis kenampakan hasil pengamatan diferensial leukosit dari penelitian ini dapat dilihat pada gambar 4.4



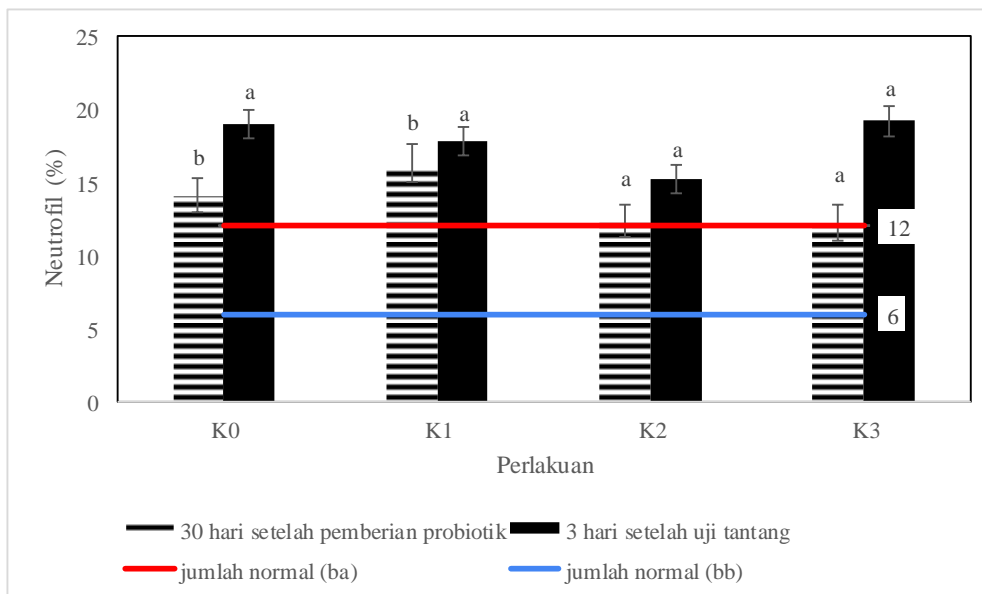
Gambar 4.4 Jenis dan kenampakan hasil pengamatan diferensial leukosit
Keterangan: N: Neutrofil; B: Basofil; L: Small limfosit; E: Eusinoofil; M: Monosit.

Pada Gambar 4.4 pengamatan dilakukan perhitungan leukosit dilakukan daerah hitung dengan memilih sediaan yang cukup tipis dan penyebaran leukosit merata. Perhitungan dimulai dari arah pinggir atas sediaan kemudian ke pinggir bawah. Kemudian dari pinggir bawah geser ke bagian kanan dan geser ke arah atas lagi, perhitungan ini dilakukan secara terus-menerus sampau 100 sel leukosit teramati. Penjelasan mengenai hasil pengamatan dapat dilihat pada subbab berikutnya.

4.4.1 Neutrofil

Analisis neutrofil pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan spesifik diferensial leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati et al., 2016). Analisis jumlah neutrofil ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, yakni setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan neutrofil didapatkan peningkatan neutrofil pada setiap perlakuan pasca uji tantang patogen meningkat melebihi normal diatas 12%, yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar 19%, K1 sebesar 17,8%, K2 sebesar 15,2%, dan K3 sebesar 19,2%.

Perbandingan data rata-rata neutrofil dilakukan dengan membandingkan data jumlah neutrofil masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA One-Way kemudian dilanjutkan dengan post hoc Duncan. Berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan signifikansi pada kadar neutrofil setelah pemberian probiotik pada perlakuan K0 dan K1. Data perhitungan statistik tertera pada **lampiran 9**. Data hasil analisis neutrofil dapat dilihat pada gambar 4.5.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%

Gambar 4.5 Grafik Rata-rata Jumlah Neutrofil

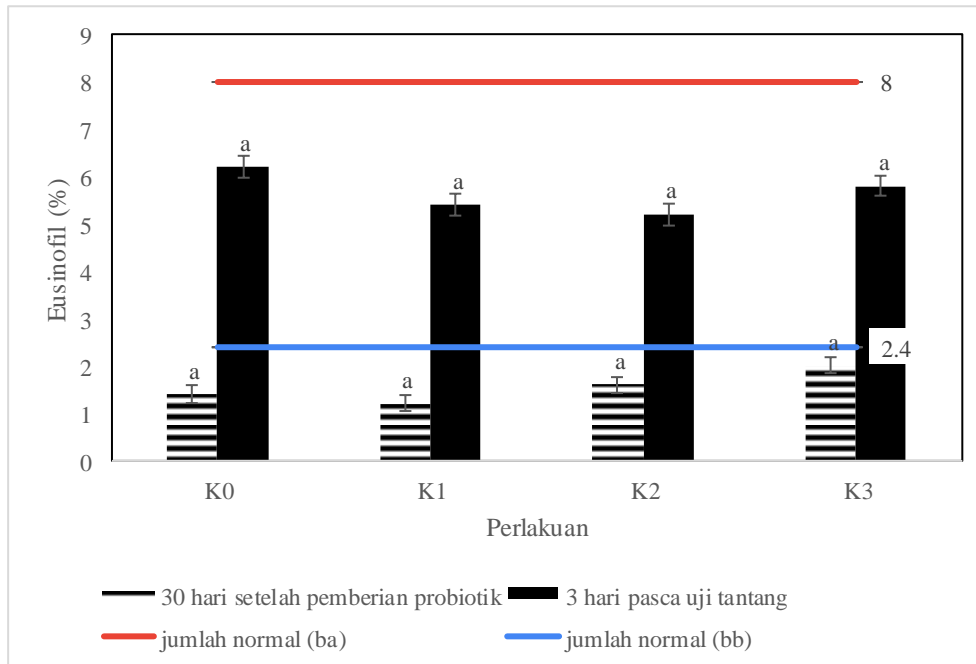
Apabila ditinjau dari kadar neutrofil normal, pada perlakuan K2 dan K3 setelah pemberian probiotik kadar neutrofil masih dalam kadar normal sesuai dengan Fänge (1992) yakni 6-12%. Hal tersebut diakibatkan neutrofil merupakan jenis leukosit yang berumur pendek dan akan mati setelah menjalankan fungsi utamanya sebagai leukosit yang merespon yang pertama kali muncul dalam mempertahankan kekebalan tubuh ikan terhadap semua jenis patogen (Butchmann, 2021). Kenaikan jumlah neutrofil pasca infeksi disebabkan infeksi *E. ictaluri* menyebabkan septikemia timbul dengan cepat, septikemia adalah peristiwa penumpukan bakteri dipembuluh darah sehingga menyebabkan peradangan kemudian menyebabkan perdarahan. Infeksi bakteri *E. ictaluri* menyebabkan banyak peradangan serta perdarahan ditubuh terutama pada hati, ginjal, otak serta permukaan kulit (Booth et al., 2006). Neutrofil merespon langsung dan mengeliminasi patogen, bentuknya yang berlobus dan memanjang memudahkan fagositosis dan pembentukan fagolisosom. Neutrofil akan mendominasi disekitar area infeksi pada kulit, insang, serta organ dalam (Butchmann, 2021). Pada infeksi *E. ictaluri* lesi dan perdarahan akan menyebar dan tampak pada hari kedua infeksi hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan kenaikan jumlah neutrofil pada pengamatan hari ketiga pasca infeksi. Pada perlakuan K1 menunjukkan signifikansi pada data pasca pemberian probiotik menunjukkan peran *W.confusa* sebagai immunomodulator, yaitu mampu memunculkan respon aktivasi sistem imun yang dapat ditoleransi. Beberapa reseptor patogen seperti *Toll-like Reseptor* (TLRs) yang diekspresikan dalam tingkat rendah oleh enterosit dan *Antigen Presenting Cell* (APCs dendritik dan makrofag) pada membran apikal epitel sel usus sehingga mendorong toleransi terhadap peptidoglikan yang diekspresikan dinding bakteri *W.confusa* dan meningkatkan kadar neutrofil pada darah yang berfungsi sebagai perespon langsung dan pengeliminasian bakteri patogen (Mazmanian et al., 2005).

4.4.2 Eusinoofil

Analisis eusinoofil pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan spesifik diferensial leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati et al., 2016). Analisis jumlah eusinoofil ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji

tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan eosinofil masih pada batas normal dibawah 8%.

Perbandingan data rata-rata eosinofil dilakukan dengan membandingkan data jumlah eosinofil masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan menunjukkan bahwa pada perlakuan K0, K1, K2, dan K3 tidak menunjukkan signifikansi. Data perhitungan statistik tertera pada **lampiran 10**. Data hasil analisis eosinofil dapat dilihat pada gambar 4.6.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%

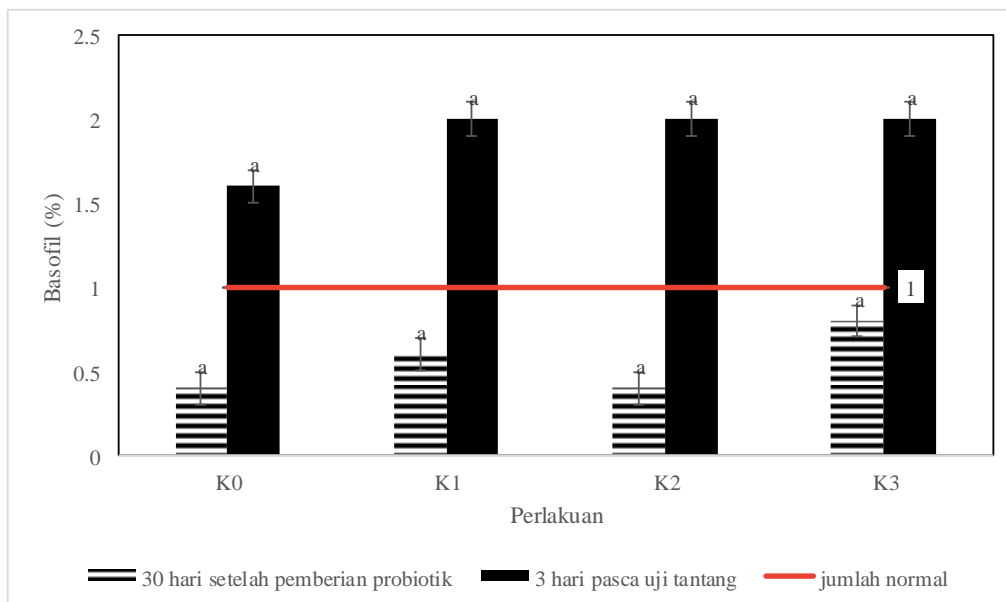
Gambar 4.6 Grafik Rata-rata Jumlah Eusinofil

Apabila ditinjau dari kadar eosinofil normal, pada tiap perlakuan K0, K1, K2 dan K3 setelah pemberian probiotik dan setelah uji tantang kadar eosinofil masih dalam kadar normal sesuai dengan Fänge (1992) yakni 2,4-8%. Eusinofil merupakan leukosit yang berperan utama pada respon imun terhadap infeksi parasit (cacing) dan merespon alergi. Eusinofil akan bergerak dari pembuluh darah menuju jaringan yang terinfeksi untuk bereaksi parasit melalui pelepasan molekul efektor granular toksik yang kemudian menyebabkan kerusakan larva (De Krömer et al., 1995). Selain pengetahuan mengenai fungsi eosinofil yang berperan dalam mengatasi infeksi parasit atau reaksi alergi, eosinofil juga berperan secara aktif dalam merespon rangsangan tidak spesifik seperti infeksi, alergi, tumor dan lainnya melalui pengaturan homeostasis imun dan menekan respon proinflamasi dengan mengeluarkan molekul spesifik (Ondari et al., 2021) Molekul spesifik yang disekresikan seperti protein granula yang merupakan molekul sitotoksik, selain itu eosinofil juga melepas berbagai sitokin, kemokin, mediator lipid dan neuromodulator. Eusinofil juga secara langsung berinteraksi dengan sel T dan sel mast (Rothenberg et al., 2006). Pada infeksi akibat bakteri patogen dalam usus, eosinofil berperan sebagai mediator utama pemeliharaan homeostasis pada mukosa usus. Eusinofil bekerja sama dengan mikroflora usus untuk memaksimalkan fungsi penghalang epitel yang normal. Namun tidak ada bukti khusus bahwa eosinofil dapat secara khusus menetralkan infeksi bakteri (Ondari, 2021)

4.4.3 Basofil

Analisis basofil pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan spesifik diferensial leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati et al., 2016). Analisis jumlah basofil ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, yakni setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan basofil didapatkan peningkatan basofil pada setiap perlakuan pasca uji tantang patogen meningkat melebihi normal diatas 0%, yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar 1,6%, K1 sebesar 2%, K2 sebesar 2%, dan K3 sebesar 2%.

Perbandingan data rata-rata basofil dilakukan dengan membandingkan data jumlah basofil masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan uji lanjutan Mann Whitney untuk membandingkan perlakuan K1, K2, dan K3 dengan K0 (kontrol). Berdasarkan hasil uji Man Whitney menunjukkan bahwa antara perlakuan K0 dengan K1, K0 dengan K2, dan K0 dengan K3 tidak menunjukkan signifikansi. Data perhitungan statistik tertera pada **lampiran 11**. Data hasil analisis basofil dapat dilihat pada gambar 4.7.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji Kruskal Wallis dan uji lanjutan mann-Whitney dengan tingkat kepercayaan 95%

Gambar 4.7 Grafik Rata-rata Jumlah Basofil

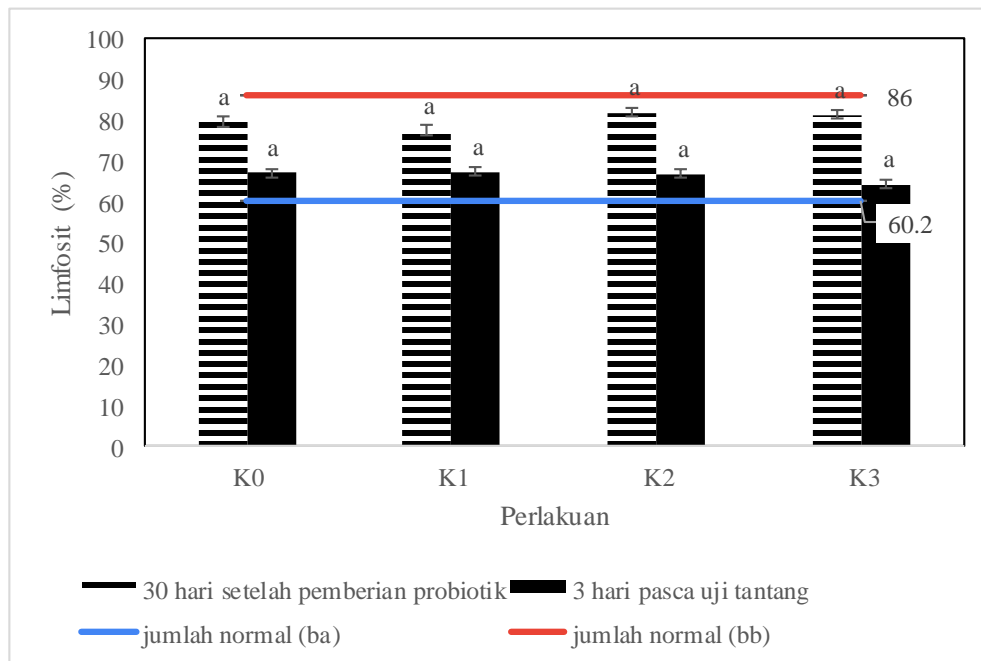
Basofil merupakan sel leukosit yang secara khusus dikaitkan dengan respon alergi atau hipersensitivitas. Basofil juga sulit ditemukan pada apusan darah menunjukkan bahwa basofil berfungsi sebagai pengatur imunitas (regulasi kekebalan alergi) bukan sebagai leukosit efektor (Chirumbolo et al., 2018).

4.4.4 Limfosit

Analisis limfosit pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan spesifik diferensial leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati, 2016). Analisis jumlah limfosit ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, yakni sebelum perlakuan, setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan limfosit didapatkan penurunan limfosit pada setiap perlakuan pasca uji tantang

patogen tetap berada di batas normal 60,2-86%, yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar 67%, K1 sebesar 67,2%, K2 sebesar 66,8%, dan K3 sebesar 64,2%.

Perbandingan data rata-rata limfosit dilakukan dengan membandingkan data jumlah limfosit masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan. Hasil data statistik menunjukkan bawah tidak ada signifikansi pada semua perlakuan. Data perhitungan statistik tertera pada **lampiran 12**. Data hasil analisis limfosit dapat dilihat pada gambar 4.8.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%

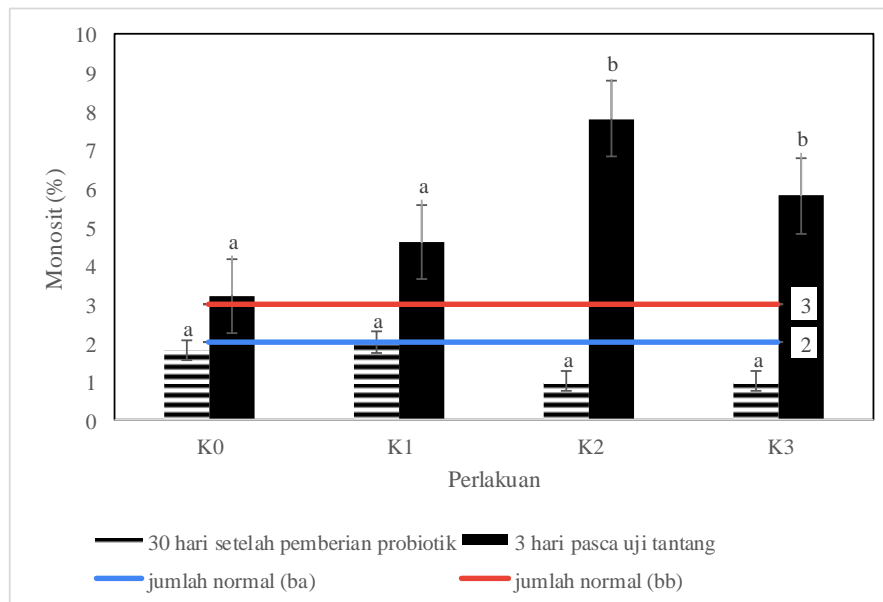
Gambar 4.8 Grafik Rata-rata Jumlah Limfosit

Apabila ditinjau dari kadar limfosit normal, pada tiap perlakuan K0, K1, K2 dan K3 setelah pemberian probiotik dan setelah uji tantang kadar limfosit masih dalam kadar normal sesuai dengan Fänge (1992) yakni 60,2 - 86%. Limfosit bertambah apabila keadaan organisme berada dalam kondisi stress. Limfosit memiliki fungsi yang beragam, yaitu sel T, B dan *natural killer* (NK). Sel limfosit T dan B merupakan efektor imunitas adaptif sedangkan *natural killer* merupakan limfosit *innate immunity* dan berfokus pada antivirus dan antikanker (LaRosa, 2008). Penurunan kadar limfosit pasca septikemia *E.ictaluri* menginduksi immunosupresi secara sistemik melalui apoptosis limfosit, yang menekan kekebalan sistemik selama tahap awal septikemia (Pirarat *et al.*, 2007).

4.4.5 Monosit

Analisis monosit pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan spesifik diferensial leukosit yang menjadi indikator kesehatan ikan (Nurhayati *et al.*, 2016). Analisis jumlah monosit ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca uji tantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan monosit didapatkan peningkatan monosit pada setiap perlakuan pasca uji tantang patogen berada diatas batas normal 3%, yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar 3,2%, K1 sebesar 4,6%, K2 sebesar 7,8%, dan K3 sebesar 5,8%.

Perbandingan data rata-rata monosit dilakukan dengan membandingkan data jumlah monosit masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan uji lanjutan Mann Whitney untuk membandingkan perlakuan K1, K2, dan K3 dengan K0 (kontrol). Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan signifikansi pada kadar monosit setelah ujiantang sebesar 0,004 ($p < 0,05$), kemudian pada uji Man Whitney menunjukkan bahwa antara perlakuan K0 dengan K2, K0 dengan K3 setelah ujiantang menunjukkan signifikansi berturut-turut sebesar 0,008 ($p < 0,05$) dan 0,016 ($p < 0,05$). Data perhitungan statistik tertera pada **lampiran 13**. Hasil pengamatan monosit dari tiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.9.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji Kruskal Wallis dan uji lanjutan mann-Whitney dengan tingkat kepercayaan 95%

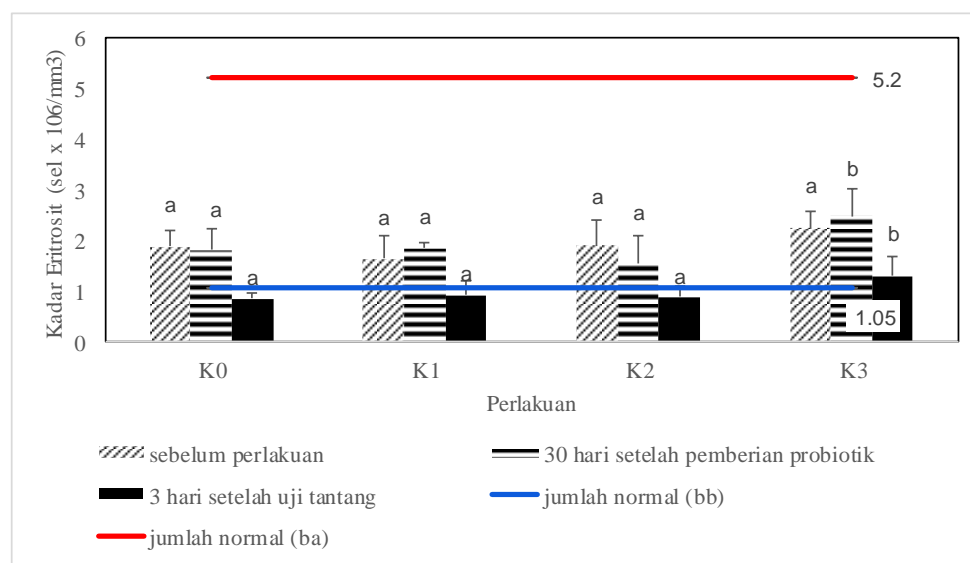
Gambar 0.9 Grafik Rata-rata Jumlah Monosit

Kenaikan monosit pasca ujiantang mengindikasikan peran monosit sebagai penghancur patogen dengan berdiferensiasi berkembang menjadi makrofag dan sel dendritik dalam keadaan peradangan atau infeksi (Yáñez et al., 2017). Monosit merespon infeksi secara cepat terhadap rangsangan mikroba dengan mengeluarkan sitokin dan antimikroba. Tidak signifikannya data hasil perlakuan terhadap kontrol menunjukkan bahwa ketika tubuh inang terpapar virulensi *E. ictaluri* menunjukkan bahwa monosit dan makrofag telah terinduksi ke lokasi infeksi (Serbina et al., 2008). Pada perlakuan K2 dan K3 menunjukkan signifikansi terhadap kontrol hal ini dikarenakan peningkatan monosit maksimum terjadi pada 72 hingga 96 jam setelah infeksi (North, 1970). Penghambatan *W.confusa* terhadap infeksi *E. ictaluri* belum dapat mengatasi infeksi sistemik secara optimal, diduga faktor virulensi *E. ictaluri* juga menjadi penyebab infeksi sistemik ini tetap terjadi yang ditandai meningkatnya jumlah leukosit sebagai pertahanan komponen seluler pada respon imun bawaan (*innate immunity*). Sesuai dengan penelitian Simon et al (2011) yang menjelaskan bahwa infeksi *E. ictaluri* mencapai jumlah maksimum pertumbuhannya dari 24 jam pasca infeksi sampai 108 jam pasca infeksi. Serta infeksi sistemik menyebar ke seluruh tubuh 24 jam pasca infeksi.

4.5 Analisis Eritrosit

Kondisi darah merupakan cerminan patofisiologi dari keseluruhan tubuh dan memberikan indikasi status kesehatan ikan. Secara lebih spesifik, eritrosit menentukan efisiensi

pengangkutan oksigen dari permukaan eritrosit ke jaringan, perubahan kuantitasnya mempengaruhi jalur metabolisme (Huijen *et al*, 2020). Analisis jumlah eritrosit ikan lele (*C. gariepinus*) dihitung pada 5 sampel pengulangan pada tiap periode pengambilan, yakni sebelum perlakuan, setelah 30 hari pemberian pakan tersuplementasi probiotik, dan 3 hari pasca ujiantang infeksi bakteri *E. ictaluri*. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan eritrosit didapatkan penurunan eritrosit pada setiap perlakuan pasca ujiantang patogen sangat tinggi jauh di bawah kadar normal sebesar $1,05 \times 10^6$ sel/mm³, yaitu masing masing perlakuan dengan rata-rata K0 sebesar $0,856 \times 10^6$ sel/mm³, K1 sebesar $0,922 \times 10^6$ sel/mm³, K2 sebesar $0,874 \times 10^6$ sel/mm³, dan pada perlakuan K3 termasuk kadar normal yaitu sebesar $1,294 \times 10^6$ sel/mm³. Perbandingan data rata-rata eritrosit dilakukan dengan membandingkan data jumlah eritrosit masing perlakuan, yaitu mengetahui signifikansi antar perlakuan dengan menggunakan uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan. Berdasarkan hasil didapatkan signifikansi pada perlakuan K3. Data perhitungan statistik tertera ada lampiran 7. Hasil perhitungan rata-rata jumlah eritrosit pada tiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.10.



Nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi pada uji ANOVA One-Way dan post hoc Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%

Gambar 4.10 Grafik Rata-rata Jumlah Eritrosit

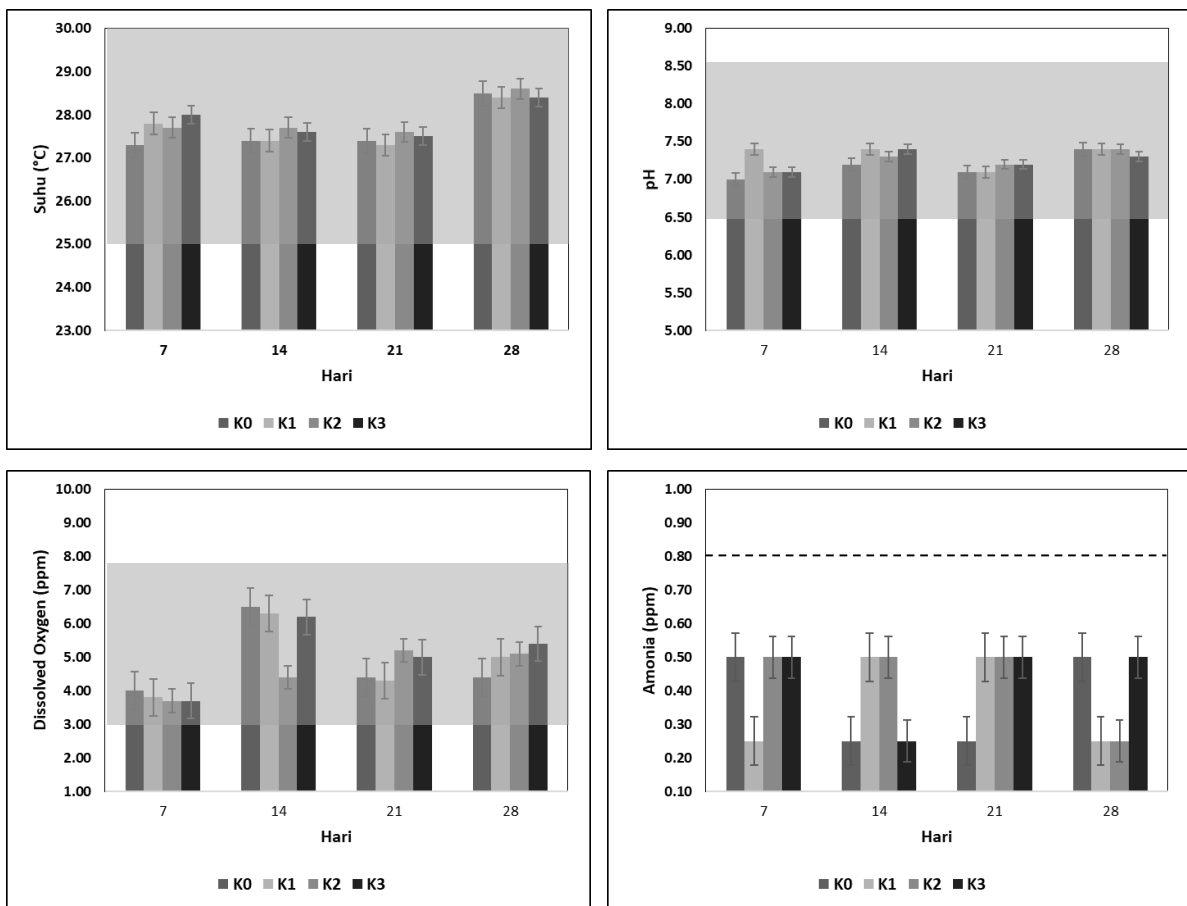
Pada tabel 4.2 menunjukkan total eritrosit mengalami penurunan jumlah eritrosit *C. gariepinus* pasca ujiantang diakibatkan oleh infeksi *E. ictaluri*. Target infeksi dari *E. ictaluri* adalah pembuluh darah, infeksi *E. ictaluri* menyebabkan septikemia timbul dengan cepat, septikemia adalah peristiwa penumpukan bakteri dipembuluh darah sehingga menyebabkan peradangan kemudian menyebabkan perdarahan (Booth *et al.*, 2006). Faktor virulensi *E. ictaluri* berupa β -hemolisin yang merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang bersifat toksik dengan melisis membran sel eritrosit sehingga menyebabkan perdarahan (Williams *et al.*, 2005). Kemampuan hemolisin dalam melisis eritrosit menyebabkan penurunan jumlah eritrosit dan menyebabkan peradangan serta perdarahan dipermukaan kulit serta organ dalam (Esmail *et al.*, 2015). Penurunan jumlah eritrosit menyebabkan penurunan kemampuan eritrosit mengangkut oksigen, sehingga menyebabkan hipoksia sel, dan penurunan metabolisme, hal ini sesuai dengan ciri gejala klinis seperti reaksi lambat, nafsu makan menurun bahkan berhenti makan (Huijie *et al*, 2020).

Rata-rata jumlah eritrosit pasca ujiantang berkisar antara $0,85 \times 10^6$ - $1,29 \times 10^6$ sel/mm³, sedangkan eritrosit tertinggi pasca ujiantang terdapat pada perlakuan K3, yaitu $1,29 \times 10^6$ sel/mm³. Peningkatan eritrosit ini diduga tubuh ikan kembali pada kondisi normal. Tubuh ikan mampu mempertahankan produksi sel darah merah untuk mengganti eritrosit yang mengalami

lisis akibat infeksi *E. ictaluri*. Selain itu, peningkatan eritrosit pasca uji tantangan pada perlakuan K3 dikarenakan adanya produksi eksopolisakarida dari *W. confusa* yang memiliki kemampuan antibakteri (Merrifield et al., 2014). Keberadaan *W. confusa* yang merupakan mikroflora normal pada pencernaan ikan memudahkan terkolonisasi pada usus dan menghambat pelekatan bakteri patogen *E. ictaluri* dalam usus (Nurhayati et al., 2022). Selain itu, *W. confusa* juga memproduksi bakteriosin yang berperan sebagai antibakteri patogen lain dengan mempengaruhi sintesis komponen dinding sel dan menghancurkan struktur dinding sel bakteri patogen (Garcia et al., 2019).

4.6 Analisis Parameter Kualitas Air

Analisis parameter kualitas air bertujuan untuk makaga kondisi optimal untuk pertumbuhan ikan dan memaksimalkan produktivitas. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan meliputi temperatur, pH, oksigen terlarut (DO), dan kadar amonia. Parameter kualitas air yang tidak optimum dapat menyebabkan stress dan gangguan metabolisme (BBPBAT, 2005)). Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Hasil analisis parameter lingkungan selama penelitian

Berdasarkan data hasil pengukuran parameter kualitas air pada Tabel 4.5 diketahui bahwa nilai suhu, pH, dan DO selama perlakuan sesuai dengan baku mutu parameter kualitas air menurut SNI No. 3 Tahun 2024 untuk produksi/pemeliharaan ikan lele yaitu suhu 25°C - 30°C, pH 6,5-8,5, DO >3 ppm. Pada analisis kadar amonia melebihi standar optimum sesuai SNI No. 3 Tahun 2014 tentang produksi ikan lele, namun masih di bawah ambang batas toleransi kadar amonia untuk ikan lele sebesar <0,8 ppm (BBPBAT, 2005).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

4.7 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Suplementasi bakteri probiotik *W. confusa* dengan perlakuan K3 konsentrasi sebesar 10^8 CFU/mL yang menunjukkan signifikansi pada jumlah rata-rata eritrosit *C. gariepinus* yang terinfeksi *E. ictaluri*, dilihat dari rata-rata total eritrosit mendekati normal sebesar $1,29 \times 10^6$ sel/mm³ dan kenaikan leukosit yang tidak jauh tinggi dari kadar leukosit normal yaitu, sebesar 309.090 sel/mm³
2. Suplementasi bakteri probiotik *W. confusa* dengan perlakuan K2 dan K3 konsentrasi sebesar 10^6 CFU/mL dan 10^8 CFU/mL yang menunjukkan signifikansi terhadap kontrol pada monosit pada *C. gariepinus* yang terinfeksi *E. ictaluri*.

4.8 Saran

Adapun saran dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukannya purifikasi dan karakterisasi eksopolisakarida dari *W. confusa* JCM 1093 untuk eksplorasi potensi antimikroba lebih lanjut.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait isolasi dan karakterisasi serta mekanisme penghambatan bakteriosin yang ada pada bakteri *W. confusa* JCM 1093 untuk mengetahui potensi penghambatannya terhadap pertumbuhan bakteri patogen khususnya *E. ictaluri*.
3. Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan analisis histopatologi untuk mengetahui dampak suplementasi *W. confusa* terhadap penghambatan *E. ictaluri* secara histologi mikroskopis.

DAFTAR PUSTAKA

- A'yunin, Q., Kartikaningsih, H., Andayani, S., Surantika, M., Fani, F., Soeprijanto, A., & Nasrullah, B. A. (2019). Efikasi Oxytetracycline terhadap Kesehatan Ikan Lele (*Clarias sp.*) yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 3(1),105- 110
- Abd El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. E., & Shalaby, A. M. E. (2009). *Micrococcus Luteus* And *Pseudomonas* Species as Probiotics For Promoting The Growth Performance And Health of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 27(2), 175–180. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.020
- Amin M, Adams M., Bolch CJS, Burke, CM. (2016), In Vitro Screening Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Gastrointestinal Tract Of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) As Probiotic Candidates. *Aquac. Int.* 23, 1–14.
- Anjana, Tiwari. S K (2022) Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 12, 1-11
- Aullybux, A.A., Puchooa, D., Bahorun, T. et al. (2019) Phylogenetics And Antibacterial Properties Of Exopolysaccharides From Marine Bacteria Isolated From Mauritius Seawater. *Ann Microbiol* 69, 957–972 <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01487-2>
- Badan Pusat Statistik (2023) <https://www.bps.go.id/>
- Badan Standarisasi Nasional (2014). SNI 6484.4:2014 Ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) Bagian 4 : Produksi benih
- Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT). (2005). *Budidaya Ikan Lele Sangkuriang*, Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Booth, N. J., Elkamel, A., & Thune, R. L. (2006). Intracellular Replication of *Edwardsiella ictaluri* in Channel Catfish Macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*. 18(2), 101–108. doi:10.1577/h05-025.1
- Brancatisano, F.L.; Maisetta, G.; Di Luca, M.; Esin, S.; Bottai, D.; Bizzarri, R.; Campa, M.; Batoni, G. (2014) Inhibitory Effect of the Human Liver-derived Antimicrobial Peptide hepcidin 20 on Biofilms of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)-positive and PIA-negative Strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Biofouling*. 30, 435–446
- Buchmann, Kurt. (2021) Neutrophils and Aquatic Pathogens. *Parasite Immunology*. 44(6), 1-11. doi:[10.1111/pim.12915](https://doi.org/10.1111/pim.12915)
- Chavasirikunton V, Vatanyoopaisarn S, Phalakornkule C (2006) Bacteriocin-like Activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* Isolated From Traditional Thai Fermented Sausages. *Journal of Culture Collections* 5,64-72
- Chen, H., Yuan, G., Su, J., & Liu, X. (2019). Hematological and Immune Genes Responses in Yellow Catfish (*Pelteobagrus Fulvidraco*) with Septicemia Induced by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2019.11.071

- Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A. (2018) The Role Of Basophils As Innate Immune Regulatory Cells In Allergy And Immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 3; 14(4),815-831. doi: 10.1080/21645515.2017.
- Ciptanto, S. (2010). Top 10 Ikan Air Tawar-Panduan Lengkap Pembesaran Secara Organik di Kolam Air, Kolam Terpal, Karamba, dan Jala Apung. Yogyakarta : Lily Publisher.
- De Krömer, M. T. R., Medina-De la Garza, C. E., & Brattig, N. W. (1995). Differences in Eosinophil and Neutrophil Chemotactic Responses in Sowda and Generalized form of *Onchocerciasis*. *Acta Tropica.* 60(1), 21–33. doi:10.1016/0001-706x(95)00099-z
- Dranoff, G. (2004). Cytokines In Cancer Pathogenesis And Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer,* 4(1), 11–22. doi:10.1038/nrc1252
- Dworkin, J. (2014). The Medium is The Message: Interspecies And Interkingdom Signaling By Peptidoglycan And Related Bacterial Glycans. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 137–154. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-112844
- Erickson, K. L., & Hubbard, N. E. (2000). Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *The Journal of Nutrition,* 130(2), 403S–409S. doi:10.1093/jn/130.2.403s
- Esmail, M. Y., Astrofsky, K. M., Lawrence, C., & Serluca, F. C. (2015). The Biology and Management of the Zebrafish. *Laboratory Animal Medicine,* 1015–1062. doi:10.1016/b978-0-12-409527-4.00020-1
- Fänge, R. (1992). 1 Fish Blood Cells. *The Cardiovascular System,* 1–54. doi:10.1016/s1546-5098(08)60008-4
- Fusco V, Quero GM, Cho G-S, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W dan Franz CMAP (2015) The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology And Biotechnological Potential. *Front. Microbiol.* 6:155. doi: 10.3389/fmicb.2015.00155.
- Gabriel, U.U., Ezeri, G.N.O. & Opabunmi, O.O. (2004) Influence Of Sex, Sources, Health Status And Acclimation On The Haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *African Journal of Biotechnology,* 3, 463–467
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H.C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N. (2019) The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* 10: 2993.
- Goh HF, Philip K (2015) Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *PLoS ONE* 10(10): e0140434. doi:10.1371/journal.pone.0140434
- Gullucee, M., Karadayi, M., Baris, O. (2013). Bacteriocins: Promising natural Antimicrobials. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education.* 2: 1016-1027
- Halim, C. N., & Zubaidah, E. (2013). Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri,* 1(1), 129–137. Retrieved from <https://jpa.ub.ac.id/index.php/jpa/article/view/12>

- Hamann, L., El-Samalouti, V., Ulmer, A. J., Flad, H. D. & Rietschel, E. T. (1998) Components Of Gut Bacteria As Immunomodulators. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 141–154.
- Hardan, AB., Mugrahani, WP., Rahmawati, IP., Megarani, DV. (2020) The Method of Total Erythrocyte and Leukocyte Counting in Raptors at Wildlife Rescue Centre (WRC) Jogja. *Venetary Biomedical and Clinical Journal.* Vol , No 2: 11-20.
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. (2013). Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients*, 5(6), 1869–1912. doi:10.3390/nu5061869
- Hastuti, Sri, dan Subandiyono (2011) Performa Hematologis Ikan Lele Dumbo “Sangkuriang” (*Clarias Gariepinus*, Burch) Yang Diberi Pakan Mengandung Kromium-Organik. *Jurnal Saintek Perikanan*, 7 (1). pp. 56-62.
- Hawke JP, Kent M, Rogge M, Baumgartner W, Wiles J, Shelley J, Savolainen LC, Wagner R, Murray K, Peterson TS. (2013), Edwardsiellosis Caused by *E. ictaluri* in Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*, *Journal of Aquatic Animal Health*, 25,3, 171-183, DOI: 10.1080/08997659.2013.782226.
- Hernández-Oaxaca D, López-Sánchez R, Lozano L, Wachter-Rodarte C, Segovia L and López Munguía A (2021) Diversity of *Weissella confusa* in *Pozol* and Its Carbohydrate Metabolism. *Front. Microbiol.* 12:629449. doi: 10.3389/fmicb.2021.629449
- Hoang, Anh Hoang., Pham M.T.D (2021) Phage Cocktails to Inactivate *Edwardsiella ictaluri*, an Infectious Agent in Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Chemical Engineering Transactions* 89:535-540.
- Huijie C, Gailing Y, Jianguo S, Xiaoling L. (2020) Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology Journal* 97: 531-539 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.071>.
- Jin, H., Jeong, Y., Yoo, SH. *et al.* (2019). Isolation And Characterization Of High Exopolysaccharide-Producing *Weissella confusa* VP30 From Young Children’s Feces. *Microb Cell Fact* 18:110. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1158-1>
- Klaenhammer, T.R. (1993) Genetic of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 12: 39-86.
- Kopp, E. B. & Medzhitov, R. (1999) The Toll-Receptor Family and Control Of Innate Immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 13–18.
- Kordon A.O, H. Abdelhamed, H. Ahmed, W. Baumgartner, A. Karsi, L.M. Pinchuk, (2019) Assessment Of The Live Attenuated And Wild-Type-Induced Immune Gene Expression and Langerhans-Like Cell Profiles In The Immune-Related Organs Of Catfish, *Front. Immunol.* 392.
- Koswara AD., (2009) Kajian Patogenesis Infeksi Buatan Bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada Ikan Lele *Clarias sp.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- LaRosa, David F., *et al* (2008). Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121(2): S364 - S369. doi:10.1016/j.jaci.2007.06.016
- Latif Anam , Shehzad Aamir , Niazi Sobia , Zahid Asna , Ashraf Waqas , Iqbal Muhammad Waheed , Rehman Abdur , Riaz Tahreem , Aadil Rana Muhammad , Khan Imran Mahmood , Özogul Fatih , Rocha João Miguel , Esatbeyoglu Tuba , Korma Sameh A. (2023) Probiotics: Mechanism Of Action, Health Benefits And Their Application In Food Industries. *Frontiers in Microbiology*. 14: 1216674 doi:10.3389/fmicb.2023.1216674
- Li, C., Zhang, Y., Wang, R., Lu, J., Nandi, S., Mohanty, S., Peatman, E. (2012). RNA-Seq Analysis Of Mucosal Immune Responses Reveals Signatures Of Intestinal Barrier Disruption and Pathogen Entry Following *Edwardsiella ictaluri* Infection In Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5), 816–827. doi:10.1016/j.fsi.2012.02.004
- Luo, Y.; Song, Y. (2021) Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 22:11401.
- Luskova, V. (1997). Annual Cycles and Normal Values Of Hematological Parameters In Fishes. *Acta Sc. Nat. Brno.*, 31(5): 70-78.
- Marsetio, (2017), Indonesian Sea Power and Regional Maritime Security Challenges, *J. Marit. Stud. Natl. Integr.*, vol. 1, no. 1, pp. 34–46, 2017.
- Martini, F. H., Nath, J. L., Bartholomew, E. F., Ober, W. C., Ober, C. E., Welch, K., & Hutchings, R. T. (2015). *Fundamental Anatomy and Physiology* (Tenth Edit). Pearson Education.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. (2005) An Immunomodulatory Molecule Of Symbiotic Bacteria Directs Maturation Of The Host Immune System. *Cell*. Jul 15;122(1):107-18. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007. PMID: 16009137.
- Merrifield, D. L., Balcázar, J. L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.-Z., Ringø, E. (2014). Indigenous Lactic Acid Bacteria in Fish and Crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 128–168. doi:10.1002/9781118897263.ch6
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira’s Basic Histology*, Mc Graw-Hill Education. Mc-Graw Hill Education.
- Moawad, U., Tawfik, M. & Awaad, A. (2017). Histomorphological, histochemical, and ultrastructural studies on the stomach of the adult African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(3), 155. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2016.08.002>.
- Morina, G., Zainuddin & Masyitha D. (2017) Histological Structure of Vesica Felea and Pancreas for The Local Cat Fish (*Clarias Bathracus*). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*. 2(1): 30-34.
- Murall, C.L.A.; Touzel, M.P.; Allen-Vercoe, E.; Alizon, S.; Froissart, R.; McCann, K. (2017) Chapter five—Invasions of host-associated microbiome networks. *In Advances*

in *Ecological Research*; Bohan, D.A., Dumbrell, A.J., Massol, F., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; Volume 57, p. 80.

- Nam H, Ha M, Bae O, Lee Y (2002) Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the Adherence And Growth Of *Helicobacter Pylori*. *Appl Environ Microbiol* 68: 4642-4645
- Nasrudin. (2010). *Jurus Sukses Berternak Lele Sangkuriang*. Jakarta. PT AgroMedia Pustaka
- North RJ. (1970) The Relative Importance Of Blood Monocytes And Fixed Macrophages To The Expression Of Cell-Mediated Immunity To Infection. *J Exp Med*.132(3):521-34. doi: 10.1084/jem.132.3.521. PMID: 5002519; PMCID: PMC2138809.
- Nurhayati, A. P. D., Prasetyo, E. N., Setiawan, E., Ashuri, N. M., Saadah, N. N., Muzaki, F. K., Syahid, M., & Arifiyanto, A. (2016). Growth Performance of *Clarias gariepinus* Toward Fish Processing Waste Pellet And Probiotics Feeding. *Bioflux*, 9(2), 1–10.
- Nurhayati, A.P.D., Zulaika E., Amin, M., Setiawan, E., & Wijaya, Z. (2022). Isolation and screening of lactic acid bacteria producing anti-edwardsiella from the gastrointestinal tract of wild-caught catfish (*Clarias gariepinus*) for probiotic candidates. *Research Square*. doi:10.21203/rs.3.rs-2081380/v1.
- Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., La Salvia, M., & Hall, G. (2001). *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia: a Case Report. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1604–1607. doi:10.1128/jcm.39.4.1604-1607.2001
- Ondari, E., Calvino-Sanles, E., First, N. J., & Gestal, M. C. (2021). Eosinophils and Bacteria, the Beginning of a Story. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(15), 8004. <https://doi.org/10.3390/ijms22158004>
- Overhage, J.; Campisano, A.; Bains, M.; Torfs, E.C.; Rehm, B.H.; Hancock, R.E. (2008). Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 76, 4176–4182
- P. Corti, J. Xue, J. Tejero, N. Wajih, M. Sun, D.B. Stolz, Kim S. TsangV, M.T. Gladwin, (2016) Globin X Is A Six-Coordinate Globin That Reduces Nitrite To Nitric Oxide In Fish Red Blood Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (30) 8538–8543
- Park, S.B., Aoki, T. & Jung, T.S. (2012). Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet Res* 43:67. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-67>.
- Pirarat N, Maita M, Endo M, Katagiri T. (2007) Lymphoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 22:608–616.
- Plumb JA, Sheifinger CC, Shryock TR, Goldsby T (1995) Susceptibility of Six Bacterial Patogens of Channel Catfish to Six Antibiotics. *Journal of Aquatic Animal Health* 7 :211-217.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., (2004). Hematologia de peixes brasileiros, in: RanzaniPaiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M. (Eds), *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo, Ed. Varela, pp. 89–120.

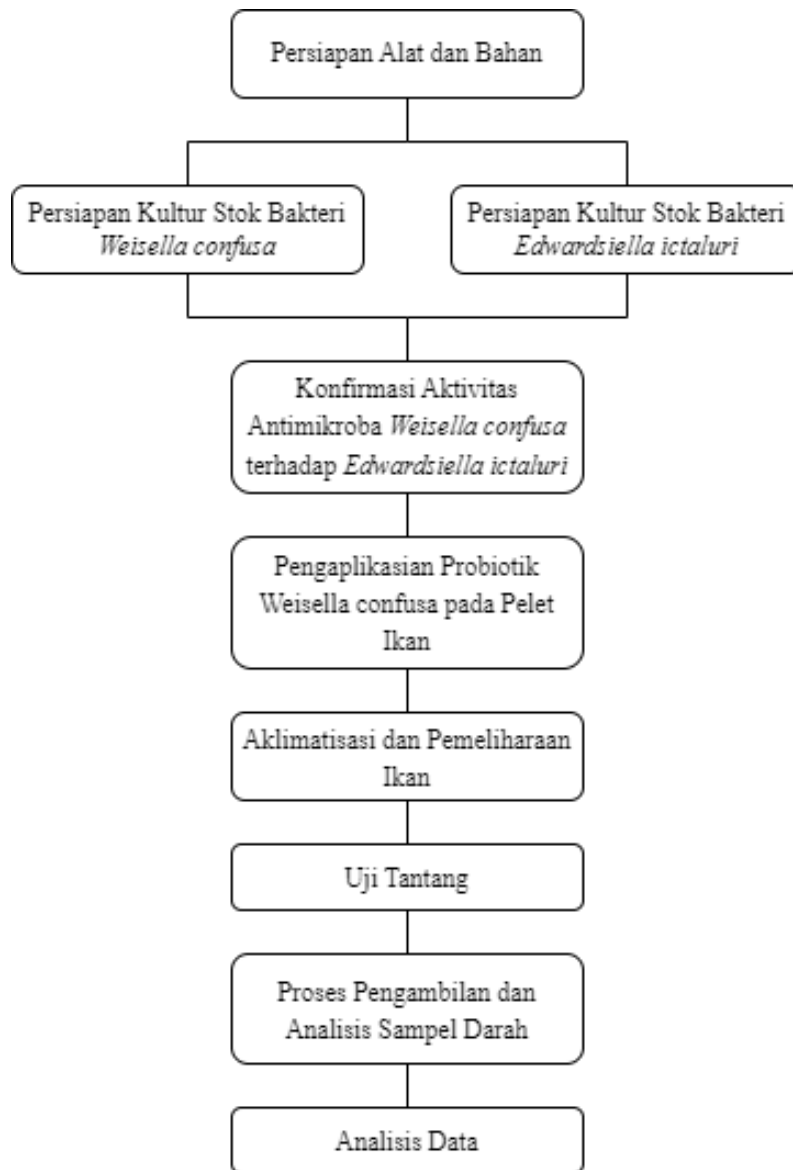
- Rehulka, J. (2000). Influence of Astaxanthin on Growth Rate, Condition and Some Blood Indices of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Aquaculture*, 190: 27-47.
- Rehulka, J. (2002). Aeromonas Causes Severe Skin Lesions In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry. *Acta Vet Brno*, 71: 351-360.
- Rehulka, J., Minarik, B. Rehulková, E., (2004). Red Blood Cell Indices of Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum) In Aquaculture. *Aquacult. Res.* 35, 529–546.
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The Eosinophil. *Annual review of immunology*, 24, 147–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>
- Royet, J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011). Peptidoglycan Recognition Proteins: Modulators Of The Microbiome And Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 837–851. doi: 10.1038/nri3089
- Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; (2021) The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 18, 649–667.
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunology*, 84(1): 237–249.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046.Structure>.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 421–452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
- Shah N, Patel A, Ambalam P, Holst O, Ljungh A, Prajapati J (2016) Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture. *Annals of microbiology*. 66:1137-1143
- Shukla, S., & Goyal, A. (2011). 16S rRNA-Based Identification of a Glucan-Hyperproducing *Weissella confusa*. *Enzyme Research*, 1–10. doi:10.4061/2011/250842
- Simon Menanteau-Ledouble, Attila Karsi, Mark L. Lawrence (2011) Importance of skin abrasion as a primary site of adhesion for *Edwardsiella ictaluri* and impact on invasion and systematic infection in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Veterinary Microbiology*, 148:2–4 (425-430) <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.022>.
- Sink, Todd. (2004). The Function Of The Stress Hormone Cortisol In Disease Susceptibility Of Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*. DOI: 10.13140/RG.2.1.1378.1520.
- Soeharsono. (2010). Probiotik: Basis Ilmiah, Aplikasi, dan Aspek Praktis. Bandung: Widya Padjajaran
- Suanyuk, N., Rogge, M., Thune, R., Watthanaphiromsakul, M., Champhat, N., & Wiangkum, W. (2013). Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus*(Günther) × *Clarias gariepinus*(Burchell), associated with *Edwardsiella*

ictaluri infection in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 385–395. doi:10.1111/jfd.12127

- Tunde, A.O., Oluwagbemiga, O.S., Babatunde, A., Oluseyi, O.O., (2016). The Growth Performance Of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Fed Commercially Prepared Imported Fish Feeds. *Int. J. Agric. Econ.* 1, 57–61.
- Turnbull, J.F. (2012) Stress and resistance to infectious diseases in fish. In *Infectious Disease in Aquaculture*; Woodhead Publishing: Amsterdam, The Netherlands; pp. 111–125.
- Van Vuren, J.H.J. (1986). The effects of toxicants on the haematology of *Labeo umbratus* (Teleostei; cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83C: 155-159.
- Wang, R., Xiao, T., Zeng, L., Liu, X., Zhou, Y., & Ma, J. (2016). Generation and use of *Edwardsiella ictaluri* ghosts as a vaccine against enteric septicemia of catfish (ESC). *Aquaculture*, 456, 9–15. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.01
- Warseno, Y., (2018). Budidaya Lele Super Intensif di Lahan Sempit. *Jurnal Riset Daerah*. 17(2): 3065– 3088.
- Widiastuti, I. A. E. (2020). Respon Imun Pada Olahraga. *Jurnal Kedokteran*, 9(2), 165–173.
- Williams, M. L., & Lawrence, M. L. (2005). Identification and Characterization Of A Two-Component Hemolysin From *Edwardsiella ictaluri*. *Veterinary Microbiology*. 108(3-4): 281–289. doi:10.1016/j.vetmic.2005.04.017
- Windriani, U., (2017) Buku Saku Budidaya Ikan Lele Sistem Bioflok. Jakarta: Direktorat Produksi dan usaha Budidaya.
- Witeska, M., Lugowska, K., Kondera, E. (2016). Reference values of hematological parameters for juvenile *Cyprinus carpio*. *Bull. Eur.Ass. Fish Pathol.* 36, 169-180.
- Yáñez A, Coetzee SG, Olsson A, Muench DE, Berman BP, Hazelett DJ, Salomonis N, Grimes HL, Goodridge HS. (2017) Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*. 47(5):890-902.
- Zhang, Q.Y.; Yan, Z.B.; Meng, Y.M.; Hong, X.Y.; Shao, G.; Ma, J.J.; Cheng, X.R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.Y. (2021) Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil. Med. Res.* 8:48.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Perhitungan Sel Darah Merah

Perlakuan	Periode	Pengulangan	Jumlah Eritrosit	Rata-rata Jumlah eritrosit
K0	Sebelum Perlakuan	1	1390000	1870000
		2	2240000	
		3	2100000	
		4	1750000	
		5	1870000	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	2460000	1810000
		2	1600000	
		3	1950000	
		4	1580000	
		5	1460000	
	Setelah Uji Tantang	1	890000	856000
		2	850000	
		3	890000	
		4	970000	
		5	680000	
K1	Sebelum Perlakuan	1	1050000	1640000
		2	1250000	
		3	1930000	
		4	2120000	
		5	1850000	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	1910000	1848000
		2	1650000	
		3	1970000	
		4	1870000	
		5	1840000	
	Setelah Uji Tantang	1	1220000	922000
		2	880000	
		3	950000	
		4	470000	
		5	1090000	
K2	Sebelum Perlakuan	1	2620000	1900000
		2	1470000	
		3	1790000	
		4	2180000	
		5	1440000	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	1800000	1530000
		2	890000	
		3	1080000	
		4	2250000	
		5	1630000	

	Setelah Uji Tantang	1	1160000	874000
		2	980000	
		3	850000	
		4	580000	
		5	800000	
K3	Sebelum Perlakuan	1	2430000	2240000
		2	2700000	
		3	2230000	
		4	1890000	
		5	1950000	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	2620000	2480000
		2	3270000	
		3	2330000	
		4	1790000	
		5	2390000	
	Setelah Uji Tantang	1	1810000	1294000
		2	1570000	
		3	1140000	
		4	1000000	
		5	950000	

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Sel Darah Putih

Perlakuan	Periode	Pengulangan	Jumlah Leukosit	Rata-rata Leukosit
K0	Sebelum Perlakuan	1	97600	98610
		2	98550	
		3	97450	
		4	100050	
		5	99400	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	96300	97320
		2	97200	
		3	97550	
		4	98050	
		5	97500	
	Setelah Uji Tantang	1	344500	351130
		2	343650	
		3	356250	
		4	352900	
		5	358350	
K1	Sebelum Perlakuan	1	97250	97510
		2	99300	
		3	97400	
		4	96800	
		5	96800	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	97150	96490
		2	96600	
		3	96600	
		4	94250	
		5	97850	
	Setelah Uji Tantang	1	342450	327720
		2	314350	
		3	335600	
		4	326050	
		5	320150	
K2	Sebelum Perlakuan	1	100450	100130
		2	101500	
		3	97050	
		4	99550	
		5	102100	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	94250	96070
		2	93250	
		3	99150	
		4	95050	

		5	98650	
	Setelah Uji Tantang	1	328450	313440
		2	316800	
		3	316250	
		4	322000	
		5	283700	
K3	Sebelum Perlakuan	1	95700	97250
		2	99950	
		3	95800	
		4	98950	
		5	95850	
	Setelah Pemberian Probiotik	1	96800	96480
		2	94950	
		3	97950	
		4	96700	
		5	96000	
	Setelah Uji Tantang	1	283300	309090
		2	336700	
		3	302900	
		4	306800	
		5	315750	

Lampiran 4. Hasil Perhitungan Rata-rata Diferensial Leukosit

a. Awal Perlakuan

Perlakuan		Diferensial Leukosit					TOTAL
		Neutrofil	Monosit	Limfosit	Eusinofil	Basofil	
(K0) Kontrol	1	10	3	83	3	1	100
	2	13	0	82	4	1	100
	3	11	3	82	3	1	100
	4	9	2	82	4	3	100
	5	9	4	84	2	1	100
Rata-rata		10.4	2.4	82.6	3.2	1.4	
K1	1	11	4	82	3	0	100
	2	8	5	80	6	1	100
	3	6	2	89	3	0	100
	4	9	4	84	2	1	100
	5	14	3	79	4	0	100
Rata-rata		9.6	3.6	82.8	3.6	0.4	
K2	1	7	0	90	3	0	100
	2	7	3	85	4	1	100
	3	6	4	87	2	1	100
	4	3	4	92	1	0	100
	5	6	3	87	3	1	100
Rata-rata		5.8	2.8	88.2	2.6	0.6	
K3	1	7	0	89	3	1	100
	2	7	0	89	4	0	100
	3	3	3	91	2	1	100
	4	6	2	87	4	1	100
	5	5	5	86	3	1	100
Rata-rata		5.6	2	88.4	3.2	0.8	

b. Setelah Pemberian Probiotik

Perlakuan		Diferensial Leukosit					Total
		Neutrofil	Monosit	Limfosit	Eusinofil	Basofil	
K0 (Kontrol)	1	13	3	80	3	0	100
	2	15	2	79	2	0	100
	3	14	0	83	0	0	100
	4	13	3	79	0	1	100
	5	15	1	76	2	1	100
Rata-rata		14	1.8	79.4	1.4	0.4	
K1	1	15	0	84	0	0	100
	2	14	3	80	1	0	100
	3	20	1	72	3	1	100
	4	15	2	79	0	0	100
	5	16	4	71	2	2	100
Rata-rata		16	2	77.2	1.2	0.6	
K2	1	14	0	81	3	1	100
	2	13	1	82	2	0	100

	3	13	3	78	3	0	100
	4	12	0	84	0	0	100
	5	9	1	84	0	1	100
Rata-rata		12.2	1	81.8	1.6	0.4	
K3	1	11	0	86	1	1	100
	2	15	3	78	2	0	100
	3	9	0	84	3	1	100
	4	12	2	79	2	1	100
	5	13	0	79	2	1	100
Rata-rata		12	1	81.2	2	0.8	

c. Pasca Uji Tantang

Perlakuan		Diferensial Leukosit					
		Neutrofil	Monosit	Limfosit	Eusinofil	Basofil	Total
K0 (Kontrol)	1	20	2	70	6	1	100
	2	18	3	70	5	2	100
	3	19	5	65	7	1	100
	4	17	3	68	6	2	100
	5	21	3	62	7	2	100
Rata-rata		19	3.2	67	6.2	1.6	
K1	1	21	4	66	5	3	100
	2	18	6	67	4	3	100
	3	19	5	67	6	0	100
	4	20	5	62	7	2	100
	5	11	3	74	5	2	100
Rata-rata		17.8	4.6	67.2	5.4	2	
K2	1	14	7	70	6	2	100
	2	11	8	71	5	3	100
	3	10	9	70	7	1	100
	4	22	6	64	2	2	100
	5	19	9	59	6	2	100
Rata-rata		15.2	7.8	66.8	5.2	2	
K3	1	22	5	65	6	1	100
	2	23	7	61	5	2	100
	3	21	6	61	7	2	100
	4	19	4	64	6	3	100
	5	11	7	70	5	2	100
Rata-rata		19.2	5.8	64.2	5.8	2	

Lampiran 5. Skema Pembuatan Suspensi Bakteri *W. confusa*

Pengenceran suspensi bakteri dari kepadatan 10^9 CFU/mL (Hernandez, 2021) menjadi 10^8 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, dan 10^4 CFU/mL dengan volume masing masing sebesar 10 mL dibuat dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 10^9 &= 10 \cdot 10^8 \\V_1 \cdot 10^9 &= 10^9 \\V_1 &= 1 \text{ mL}\end{aligned}$$

Untuk pembuatan suspensi bakteri kepadatan 10^8 dapat dibuat dengan cara menambahkan 1 mL suspensi bakteri kepadatan 10^9 kedalam larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 9 mL.

Sedangkan untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan kepadatan 10^6 dapat dibuat berdasarkan rumus perhitungan berikut :

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 10^8 &= 10 \cdot 10^6 \\V_1 \cdot 10^8 &= 10^7 \\V_1 &= 10^{-1} \text{ mL} \\V_1 &= 100 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Sehingga, dengan menambahkan 100 μL suspensi bakteri kepadatan 10^8 kedalam larutan NaCl 0,9% mL sebanyak 9,9 mL maka akan didapatkan suspense bakteri dengan kepadatan 10^6 .

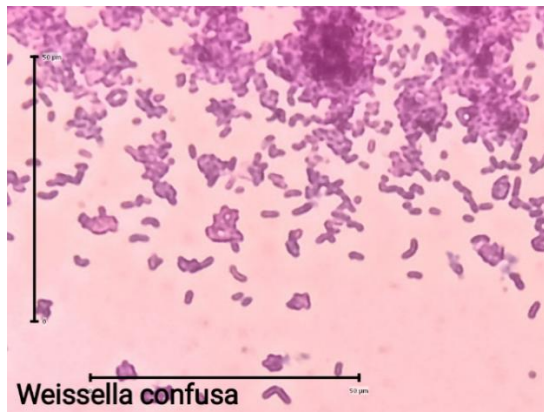
Sedangkan untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan kepadatan 10^4 dapat dibuat berdasarkan rumus perhitungan berikut :

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 10^6 &= 10 \cdot 10^4 \\V_1 \cdot 10^6 &= 10^5 \\V_1 &= 10^{-1} \text{ mL} \\V_1 &= 100 \mu\text{L}\end{aligned}$$

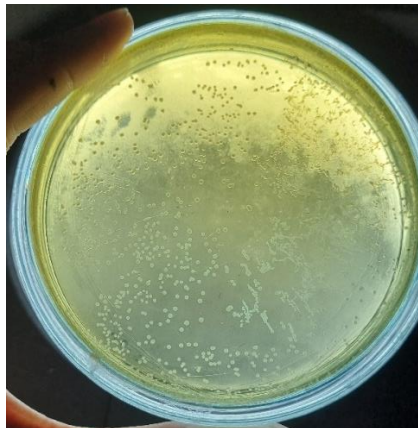
Sehingga, dengan menambahkan 100 μL suspensi bakteri kepadatan 10^6 kedalam larutan NaCl 0,9% mL sebanyak 9,9 mL maka akan didapatkan suspense bakteri dengan kepadatan 10^4 .

Lampiran 6. Hasil Uji Pendahuluan

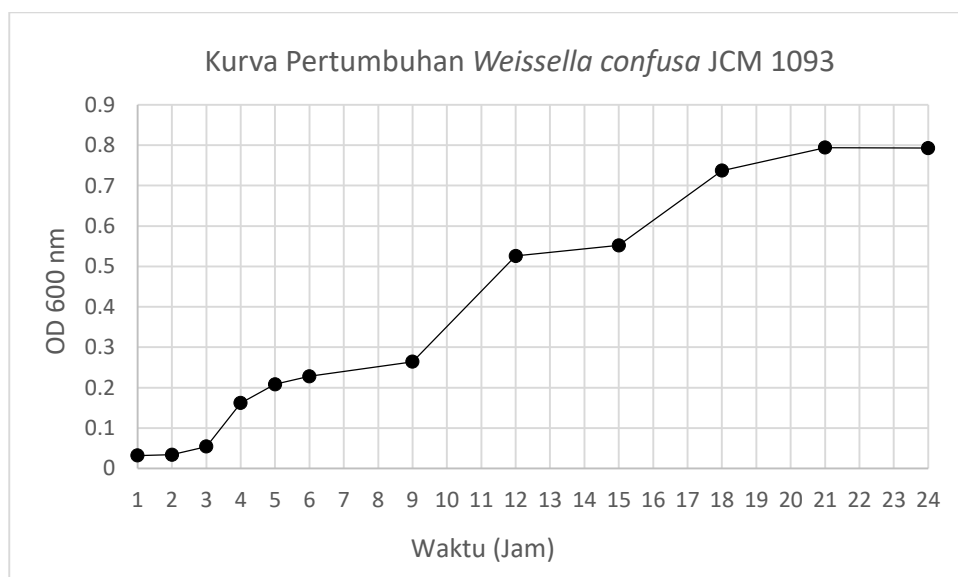
- a. Pewarnaan gram bakteri *W. confusa*



- b. Morfologi koloni *W. confusa* pada media MRSA

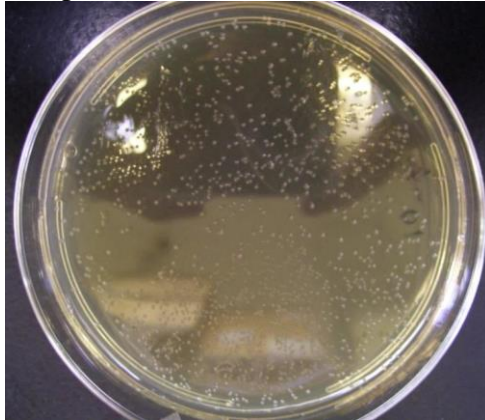


- c. Kurva pertumbuhan *W. confusa*

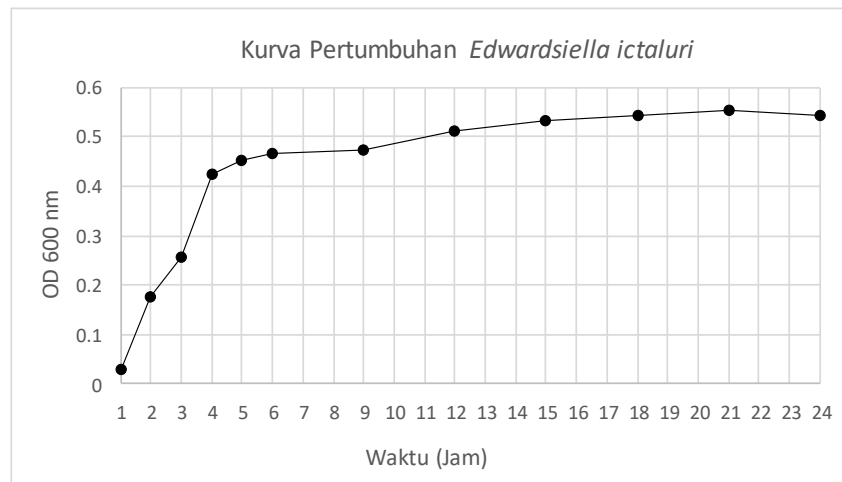


Fase Log/Adaptasi : jam ke- 1-6
Fase Log/Eksponensial : jam ke- 9-12
Fase Stasioner : jam ke- 18-20
Fase Kematian : setelah 24 jam

d. Morfologi koloni *E. ictaluri* pada media TSA



e. Kurva pertumbuhan *E. ictaluri*



Fase Lag/Adaptasi : jam ke-1-2

Fase Log/Ekspensial : jam ke- 4

Fase Stasioner : jam ke- 12-20

Fase Kematian : setelah 24 jam

Lampiran 7. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Sel Darah Merah

Tests of Normality

	Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RBC_Probiotik	K0	.297	5	.171	.859	5	.225
	K1	.274	5	.200*	.901	5	.417
	K2	.193	5	.200*	.957	5	.788
	K3	.197	5	.200*	.965	5	.843
RBC_Ujitantang	K0	.278	5	.200*	.884	5	.330
	K1	.241	5	.200*	.931	5	.604
	K2	.166	5	.200*	.992	5	.985
	K3	.258	5	.200*	.881	5	.313

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan hasil uji normalitas data hasil perhitungan darah merah menunjukkan persebaran data normal (signifikansi >0,05) sehingga dapat dilanjutkan ke uji ANOVA One-Way dan post hoc duncan.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RBC_Probiotik	Between Groups	2.415	3	.805	4.176	.023
	Within Groups	3.084	16	.193		
	Total	5.499	19			
RBC_Ujitantang	Between Groups	.642	3	.214	3.039	.059
	Within Groups	1.127	16	.070		
	Total	1.769	19			

RBC_Probiotik

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K2	5	1.5300	
K0	5	1.8100	
K1	5	1.8480	
K3	5		2.4800
Sig.		.294	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

RBC_Ujitantang

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K0	5	.8560	
K2	5	.8740	
K1	5	.9220	
K3	5		1.2940
Sig.		.715	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 8. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Sel Darah Putih

Tests of Normality

	Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
WBC_Probiotik	K0	.226	5	.200*	.930	5	.599
	K1	.332	5	.074	.870	5	.268
	K2	.249	5	.200*	.873	5	.279
	K3	.186	5	.200*	.980	5	.932
WBC_Ujitantang	K0	.238	5	.200*	.876	5	.292
	K1	.158	5	.200*	.969	5	.871
	K2	.364	5	.029	.806	5	.091
	K3	.175	5	.200*	.983	5	.950

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan hasil uji normalitas data hasil perhitungan darah putih menunjukkan persebaran data normal (signifikansi >0,05) sehingga dapat dilanjutkan ke uji ANOVA One-Way dan post hoc duncan.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WBC_Probiotik	Between Groups	4127000.000	3	1375666.667	.520	.675
	Within Groups	42331000.000	16	2645687.500		
	Total	46458000.000	19			
WBC_Ujitantang	Between Groups	5382304500.000	3	1794101500.000	8.401	.001
	Within Groups	3416880000.000	16	213555000.000		
	Total	8799184500.000	19			

WBC_Probiotik

Duncan ^a		Subset for alpha = 0.05	
Group	N	1	
K2	5	98070.0000	
K3	5	98480.0000	
K1	5	98490.0000	
K0	5	97320.0000	
Sig.		.280	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

WBC_Ujitantang

Duncan ^a		Subset for alpha = 0.05		
Group	N	1	2	
K3	5	309090.0000		
K2	5	313440.0000		
K1	5	327720.0000		
K0	5		351130.0000	
Sig.		.073	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 9. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Neutrofil

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Group	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil_Probiotik	K0	.241	5	.200*	.821	5	.119
	K1	.300	5	.161	.813	5	.103
	K2	.261	5	.200*	.859	5	.223
	K3	.127	5	.200*	.999	5	1.000
Limfosit_Probiotik	K0	.237	5	.200*	.950	5	.740
	K1	.227	5	.200*	.910	5	.468
	K2	.212	5	.200*	.895	5	.384
	K3	.331	5	.076	.838	5	.159
Monosit_Probiotik	K0	.221	5	.200*	.902	5	.421
	K1	.136	5	.200*	.987	5	.967
	K2	.300	5	.161	.833	5	.146
	K3	.360	5	.033	.767	5	.042
Eusinofil_Probiotik	K0	.273	5	.200*	.852	5	.201
	K1	.221	5	.200*	.902	5	.421
	K2	.254	5	.200*	.803	5	.086
	K3	.300	5	.161	.883	5	.325
Basofil_Probiotik	K0	.367	5	.026	.684	5	.006
	K1	.349	5	.046	.771	5	.046
	K2	.367	5	.026	.684	5	.006
	K3	.473	5	.001	.552	5	.000
Neutrofil_Ujitantang	K0	.136	5	.200*	.987	5	.967
	K1	.320	5	.104	.809	5	.096
	K2	.192	5	.200*	.919	5	.523
	K3	.283	5	.200*	.816	5	.108
Monosit_Ujitantang	K0	.372	5	.022	.828	5	.135
	K1	.237	5	.200*	.961	5	.814
	K2	.221	5	.200*	.902	5	.421
	K3	.221	5	.200*	.902	5	.421
Limfosit_Ujitantang	K0	.214	5	.200*	.887	5	.341
	K1	.318	5	.108	.903	5	.425
	K2	.332	5	.075	.832	5	.143
	K3	.214	5	.200*	.881	5	.313
Eusinofil_Ujitantang	K0	.231	5	.200*	.881	5	.314
	K1	.237	5	.200*	.961	5	.814
	K2	.261	5	.200*	.859	5	.223
	K3	.231	5	.200*	.881	5	.314

Basofil_Ujitantang	K0	.367	5	.026	.684	5	.006
	K1	.300	5	.161	.833	5	.146
	K2	.300	5	.161	.883	5	.325
	K3	.300	5	.161	.883	5	.325

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan hasil uji normalitas data hasil perhitungan diferensial leukosit pada data neutrofil, limfosit, dan eosinofil menunjukkan persebaran data normal (signifikansi >0,05) sehingga dapat dilanjutkan ke uji ANOVA One-Way dan post hoc duncan. Selanjutnya untuk data monosit dan basofil karena didapatkan data yang tidak normal akan dilanjutkan analisis nonparametrik Kruskal Wallis.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Neutrofil_Probiotik	Between Groups	52.150	3	17.383	4.575	.017
	Within Groups	60.800	16	3.800		
	Total	112.950	19			
Neutrofil_Ujitantang	Between Groups	50.800	3	16.933	.995	.421
	Within Groups	272.400	16	17.025		
	Total	323.200	19			

Neutrofil_Probiotik

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K3	5	12.0000	
K2	5	12.2000	
K0	5	14.0000	14.0000
K1	5		16.0000
Sig.		.143	.124

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Neutrofil_Ujitantang

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
K2	5	15.2000
K1	5	17.8000
K0	5	19.0000
K3	5	19.2000
Sig.		.177

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

□

Lampiran 10. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Eusinofil

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Eusinofil_Probiotik	Between Groups	1.750	3	.583	.370	.775
	Within Groups	25.200	16	1.575		
	Total	26.950	19			
Eusinofil_Ujitantang	Between Groups	2.950	3	.983	.615	.615
	Within Groups	25.600	16	1.600		
	Total	28.550	19			

Eusinofil_Probiotik

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
K1	5	1.2000	
K0	5	1.4000	
K2	5	1.6000	
K3	5	2.0000	
Sig.			.368

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

□

Eusinofil_Ujitantang

Duncan^a

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
K2	5	5.2000	
K1	5	5.4000	
K3	5	5.8000	
K0	5	6.2000	
Sig.			.267

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 11. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Basofil

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Group	N	Mean Rank
Basofil_Probiotik	K0	5	9.30
	K1	5	10.30
	K2	5	9.30
	K3	5	13.10
	Total	20	
Basofil_Ujitantang	K0	5	8.00
	K1	5	12.00
	K2	5	11.00
	K3	5	11.00
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}		
	Basofil_Probiotik	Basofil_Ujitantang
Kruskal-Wallis H	1.760	1.569
df	3	3
Asymp. Sig.	.624	.666

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Group

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Basofil_Probiotik	K0	5	5.30	26.50
	K1	5	5.70	28.50
	Total	10		
Basofil_Ujitantang	K0	5	4.60	23.00
	K1	5	6.40	32.00
	Total	10		

Test Statistics ^a		
	Basofil_Probiotik	Basofil_Ujitantang
Mann-Whitney U	11.500	8.000
Wilcoxon W	26.500	23.000
Z	-.239	-1.010
Asymp. Sig. (2-tailed)	.811	.313
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^b	.421 ^b

a. Grouping Variable: Group

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Basofil_Probiotik	K0	5	5.50	27.50
	K2	5	5.50	27.50
	Total	10		
Basofil_Ujitantang	K0	5	4.70	23.50
	K2	5	6.30	31.50
	Total	10		

Test Statistics^a		
	Basofil_Probiotik	Basofil_Ujitantang
Mann-Whitney U	12.500	8.500
Wilcoxon W	27.500	23.500
Z	.000	-.956
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.339
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b	.421 ^b

a. Grouping Variable: Group

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Basofil_Probiotik	K0	5	4.50	22.50
	K3	5	6.50	32.50
	Total	10		
Basofil_Ujitantang	K0	5	4.70	23.50
	K3	5	6.30	31.50
	Total	10		

Test Statistics^a		
	Basofil_Probiotik	Basofil_Ujitantang
Mann-Whitney U	7.500	8.500
Wilcoxon W	22.500	23.500
Z	-1.225	-.956
Asymp. Sig. (2-tailed)	.221	.339
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b	.421 ^b

a. Grouping Variable: Group

b. Not corrected for ties.

Lampiran 12. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Limfosit

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Limfosit_Probiotik	Between Groups	64.200	3	21.400	1.531	.245
	Within Groups	223.600	16	13.975		
	Total	287.800	19			
Limfosit_Ujitantang	Between Groups	29.800	3	9.933	.559	.650
	Within Groups	284.400	16	17.775		
	Total	314.200	19			

Limfosit_Probiotik

Duncan ^a		Subset for alpha = 0.05
Group	N	1
K1	5	77.2000
K0	5	79.4000
K3	5	81.2000
K2	5	81.8000
Sig.		.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Limfosit_Ujitantang

Duncan ^a		Subset for alpha = 0.05
Group	N	1
K3	5	64.2000
K2	5	66.8000
K0	5	67.0000
K1	5	67.2000
Sig.		.316

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 13. Hasil Perhitungan Analisis Statistik Monosit

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Group	N	Mean Rank
Monosit_Probiotik	K0	5	12.10
	K1	5	12.70
	K2	5	8.80
	K3	5	8.40
	Total	20	
Monosit_Ujitan tang	K0	5	4.20
	K1	5	8.40
	K2	5	17.20
	K3	5	12.20
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}		
	Monosit_Probiotik	Monosit_Ujitan tang
Kruskal-Wallis H	2.252	13.429
df	3	3
Asymp. Sig.	.522	.004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Group

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Monosit_Probiotik	K0	5	5.30	26.50
	K1	5	5.70	28.50
	Total	10		
Monosit_Ujitan tang	K0	5	3.90	19.50
	K1	5	7.10	35.50
	Total	10		

Test Statistics ^a		
	Monosit_Probiotik	Monosit_Ujitan tang
Mann-Whitney U	11.500	4.500
Wilcoxon W	26.500	19.500
Z	-.213	-1.747
Asymp. Sig. (2-tailed)	.831	.081
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^b	.095 ^b

a. Grouping Variable: Group

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Monosit_Probiotik	K0	5	6.40	32.00
	K2	5	4.60	23.00
	Total	10		
Monosit_Ujitantang	K0	5	3.00	15.00
	K2	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Monosit_Probiotik	Monosit_Ujitantang
Mann-Whitney U	8.000	.000
Wilcoxon W	23.000	15.000
Z	-.976	-2.652
Asymp. Sig. (2-tailed)	.329	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b	.008 ^b

a. Grouping Variable: Group

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Monosit_Probiotik	K0	5	6.40	32.00
	K3	5	4.60	23.00
	Total	10		
Monosit_Ujitantang	K0	5	3.30	16.50
	K3	5	7.70	38.50
	Total	10		

Test Statistics^a

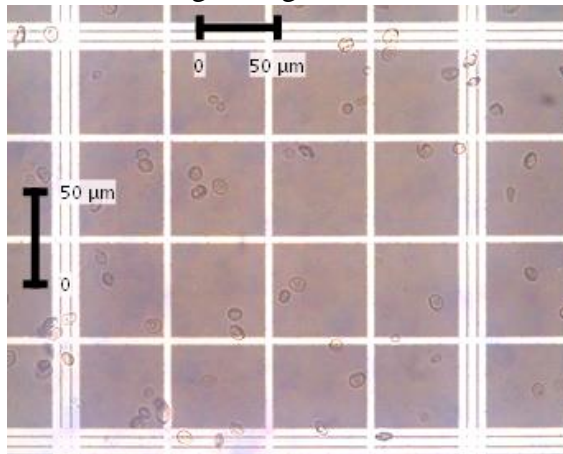
	Monosit_Probiotik	Monosit_Ujitantang
Mann-Whitney U	8.000	1.500
Wilcoxon W	23.000	16.500
Z	-.986	-2.341
Asymp. Sig. (2-tailed)	.324	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b	.016 ^b

a. Grouping Variable: Group

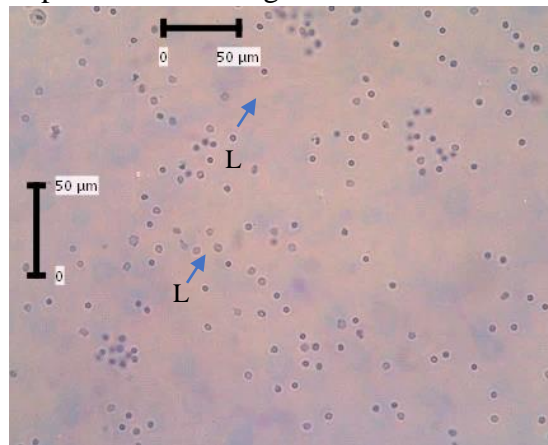
b. Not corrected for ties.

Lampiran 14. Dokumentasi Pengamatan Sel Darah

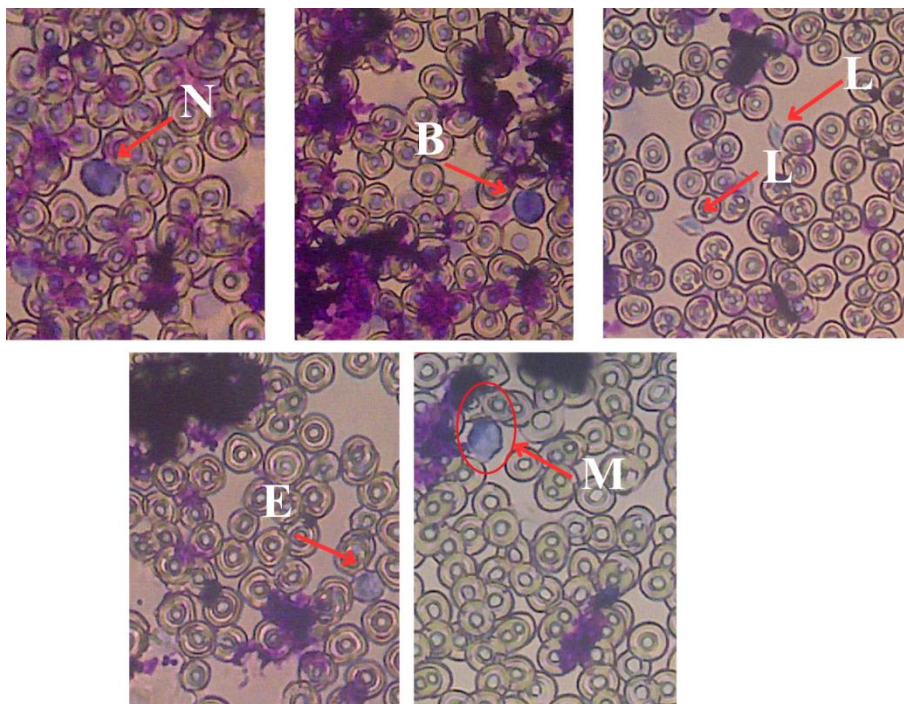
a. Pengamatan sel eritrosit dalam ruang hitung R



b. Pengamatan sel leukosit pada kamar hitung W



c. Pengamatan diferensial leukosit



Keterangan: N: Neutrofil; B: Basofil; L: Small limfosit; E: Eusinofil; M: Monosit.

Lampiran 15. Parameter Lingkungan

a. Hasil pengamatan parameter lingkungan suhu

Perlakuan	Suhu (°C)					Rata-rata
	Hari pengamatan ke-				Rata-rata	
	7	14	21	28		
K0	27,7	27,4	27,4	28,5	27,75 ± 0,51	
K1	27,8	27,4	27,3	28,4	27,72 ± 0,49	
K2	27,7	27,7	27,6	28,6	27,90 ± 0,46	
K3	28,0	27,6	27,5	28,4	27,87 ± 0,41	

b. Hasil pengamatan parameter lingkungan pH

Perlakuan	pH					Rata-rata
	Hari pengamatan ke-				Rata-rata	
	7	14	21	28		
K0	7,0	7,2	7,1	7,4	7,17 ± 0,17	
K1	7,4	7,4	7,1	7,4	7,32 ± 0,15	
K2	7,1	7,3	7,2	7,4	7,25 ± 0,12	
K3	7,1	7,4	7,2	7,3	7,25 ± 0,12	

c. Hasil pengamatan parameter lingkungan DO (*Dissolved Oxygen*)

Perlakuan	DO (ppm)					Rata-rata
	Hari pengamatan ke-				Rata-rata	
	7	14	21	28		
K0	4,0	6,5	4,4	4,4	4,82 ± 1,13	
K1	3,8	6,3	4,3	5	4,85 ± 1,08	
K2	3,7	4,4	5,2	5,1	4,60 ± 0,69	
K3	3,7	6,2	5,0	5,4	5,07 ± 1,04	

d. Hasil pengamatan parameter lingkungan amonia

Perlakuan	Amonia (ppm)					Rata-rata
	Hari pengamatan ke-				Rata-rata	
	7	14	21	28		
K0	0,50	0,25	0,25	0,50	0,37 ± 0,14	
K1	0,25	0,50	0,50	0,25	0,37 ± 0,14	
K2	0,50	0,50	0,50	0,25	0,44 ± 0,12	
K3	0,50	0,25	0,50	0,50	0,43 ± 0,12	

Lampiran 16. Data Kelulusan Hidup (Survival Rate) Pasca Uji Tantang

Perlakuan	Pengamatan			Survival rate
	Hari 1	Hari 2	Hari3	
K0	10	9	8	80%
K0	10	10	10	100%
K1	10	10	10	100%
K1	10	10	10	100%
K2	10	10	10	100%
K2	10	10	10	100%
K3	10	10	10	100%
K3	10	10	10	100%

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir yang berjudul **“Pengaruh Suplementasi Pakan Dengan Kandidat Probiotik *Weissella confusa* Terhadap Respon Hematologi pada *Clarias gariepinus* yang Diinfeksi Patogen *Edwardsiella ictaluri*”**. Penyusunan laporan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan ketulusan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada :

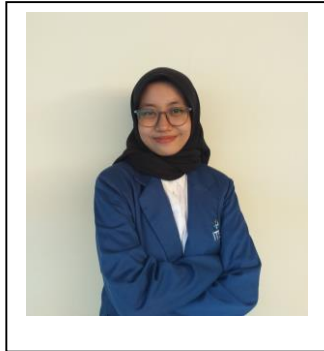
1. Ibu Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing 1 dan Bapak Muhamad Amin, S.Pi.,M.Sc.,Ph.D. selaku dosen pembimbing 2 atas segala bimbingan serta ilmu yang diberikan selama penelitian. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan bapak dan ibu dengan balasan terbaik.
2. Ibu Prof. Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji 1 dan Ibu Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si selaku dosen penguji 2 atas segala saran dan masukan yang membangun untuk penulis.
3. Kedua orangtua tercinta Ibu Daryani S.Kep.Ns., M.Kep dan Bapak Teguh Wiyono, S.ST.,M.Kes atas segala doa, cinta, kepercayaan dan dukungannya. Semoga Allah SWT membalas kebaikan Umi dan Abi dengan balasan terbaik.
4. Kepada saudara penulis Kak Icha, Hafizh dan Khayla atas dukungan dan bantuannya.
5. Kepada teman-teman Biologi ITS angkatan 2020, khususnya rekan-rekan Laboratorium Biosains dan Teknologi Hewan atas bantuan dan dukungannya.
6. Kepada Bapak Affendi Adi Hermawan, A.Md selaku laboran Laboratorium Biosains dan Teknologi Hewan atas dukungan dan bantuannya.
7. Kepada sahabat penulis Alfa, Alifia, Hana, Cindy, Nilam K, dan Nissa atas segala dukungan dan bantuannya.
8. Kepada tim riset weissella Syakirah Shafwah dan Ro'iqotul Millah atas bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa meskipun dalam penyusunannya telah diusahakan semaksimal mungkin, penulisan tugas akhir ini masih memiliki banyak kekurangan sehingga besar harapan penulis untuk dapat menerima kritik maupun saran agar kedepannya dapat menjadi lebih baik lagi.

Surabaya, Juli 2024

Penulis

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Klaten, 22 April 2002, merupakan anak kedua dari 4 bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu di TK IT Mutiara Hati, SD IT Hidayah Klaten, SMP IT Ibnu Abbas dan SMA IT Ibnu Abbas. Setelah lulus dari SMA IT Ibnu Abbas tahun 2020, Penulis mengikuti seleksi mandiri dan diterima di departemen Biologi FSAD - ITS pada tahun 2020 dan terdaftar dengan NRP 5005201085.

Di departemen Biologi Penulis sempat aktif di beberapa kegiatan Kemahasiswaan diantaranya Himpunan Mahasiswa Biologi ITS (HIMABITS), Badan Eksekutif Mahasiswa ITS (BEM ITS), Pekan Kreativitas Mahasiswa (PKM) dan aktif sebagai Asisten Praktikum Sistematika Hewan, Fisiologi Hewan, Oseanografi, dan Teknik Analisis Mikroba.