

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menjadi komoditas utama pada budidaya perairan di sebagian besar belahan dunia karena mudah dibudidayakan, mampu beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan dan toleran terhadap padat penebaran yang tinggi (Pech *et al.* 2016). Produksi ikan nila dunia menempati urutan ketiga dengan total produksi mencapai 4 525.4 ribu ton atau 8.3% dari total produksi ikan air tawar di dunia (FAO 2020). Sebanyak 72% jumlah produksi ikan nila dunia dikembangkan di Asia Tenggara (Ye *et al.* 2011). Pasar yang masih sangat luas di luar negeri merupakan daya tarik bagi pembudidaya. Lahan budidaya yang tidak bertambah, maka dilakukan intensifikasi untuk menaikkan produksi. Metode padat penebaran tinggi pada usaha intensifikasi juga menyebabkan penurunan kualitas air dan meningkatkan stres pada ikan, sehingga mengakibatkan penyakit pada ikan (Sebastiao *et al.* 2015).

Salah satu penyakit yang menimbulkan kerugian cukup tinggi adalah penyakit streptococcosis yang antara lain disebabkan oleh infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* (Ye *et al.* 2011). Penyakit ini menjadi kendala utama dalam budidaya ikan nila (Pereira *et al.* 2010; Kayansamruaj *et al.* 2017; Shoemaker *et al.* 2017), yang dapat menimbulkan kematian hingga 90 % (Ye *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). *S. agalactiae* adalah bakteri Gram positif, nonspora, fakultatif anaerob, katalase negatif, homofermentatif dan memerlukan nutrisi yang kompleks (Hardi *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Pada ikan, bakteri ini dapat mengakibatkan radang otak, pendarahan dan luka pada tubuh bagian luar dengan cairan yang berlebihan, bintik merah di bagian operkulum, penumpukan cairan di bagian pektoral, sirip ekor serta mulut, mata menonjol, adanya gas dan cairan yang menumpuk di bagian perut, serta nanah muncul di sekitar operkulum (Cai *et al.* 2016).

Upaya yang telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit streptococcosis diantaranya dengan aplikasi antibiotik, vaksin, dan imunostimulan (Vaseeharan & Thaya 2011). Selanjutnya muncul kekhawatiran terhadap dampak negatif dari kemoterapi pada lingkungan dan kesehatan manusia diantaranya adalah munculnya strain bakteri resistan antibiotik, akumulasi dari residu pada jaringan tubuh ikan, serta penurunan kekebalan tubuh pada manusia, sehingga memunculkan peraturan dalam penggunaan antibiotik di berbagai negara (Reverter *et al.* 2014).

Salah satu alternatif pengendalian untuk mengatasi serangan penyakit tersebut adalah dengan penggunaan prebiotik (Ringo *et al.* 2010). Prebiotik adalah bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh inang, namun memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri menguntungkan di dalam usus sehingga menyehatkan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Bahan pangan yang tidak tercerna biasanya berupa karbohidrat meliputi monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida (Gibson *et al.* 2015) yang mempunyai sifat tidak terhidrolisis asam lambung, namun dapat terfermentasi di usus besar oleh bakteri probiotik. Beberapa hasil penelitian menunjukkan prebiotik mampu meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan

pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan (Merrifield *et al.* 2010).

Fermentasi karbohidrat adalah sumber energi utama bagi mikroflora usus, namun seiring dengan pergerakan bahan cerna di sepanjang usus, ketersediaan karbohidrat berkurang, sehingga protein dan asam amino akan menjadi sumber energi dominan bagi bakteri di dalam saluran cerna. Oleh karena itu, karbohidrat yang sulit dicerna sangat dibutuhkan untuk menjaga keseimbangan mikroflora di saluran cerna. Prebiotik yang telah difermentasi mampu menyeleksi bakteri yang menguntungkan bagi kesehatan inang dengan memodulasi keseimbangan mikroflora dalam usus (Gibson *et al.* 2010).

Produk akhir dari aktivitas fermentasi karbohidrat oleh mikroflora di dalam usus adalah asam lemak rantai pendek (SCFA) seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat (Ringo *et al.* 2014). Selanjutnya SCFA tersebut akan diserap oleh usus dan akan berperan dalam pemenuhan kebutuhan energi inang. Pada mamalia dan vertebrata, SCFA juga berperan dalam imunitas (Arques *et al.* 2015). Seperti penelitian yang dilakukan Maslowski *et al.* (2009) menemukan SCFA menstimulasi GPR43 yang sangat penting dalam mekanisme respons *inflammatory* pada tikus. SCFA pada ikan memberikan proteksi terhadap serangan penyakit seperti ditunjukkan pada hasil penelitian Suguna *et al.* (2014), bahwa polyhidroksibutirat mampu memberikan proteksi ikan nila terhadap infeksi bakteri patogen *Edwardsiella ictaluri gly09*.

Karbohidrat (sakarida) yang dapat menginduksi imunitas disebut imunosakarida, akan mengaktifasi sistem imun bawaan. Prebiotik mengaktifasi sistem imun bawaan dengan dua cara yaitu mengaktifasi sistem imun bawaan secara langsung dan meningkatkan bakteri probiotik dalam usus (Song *et al.* 2014). Karbohidrat berinteraksi dengan mikroba terkait dengan pola molekuler seperti asam teikoat, peptidoglikan, protein glikosilasi, atau kapsul polisakarida dari bakteri yang kemudian menginduksi sistem imun (Bron *et al.* 2012). Aktivitas imunomodulasi dari prebiotik dimediasi melalui interaksi langsung dengan reseptor, seperti β -glukan dan dectin-1 yang diekspresikan oleh makrofag. Aktivitas interaksi ligan ini memberikan sinyal molekul transduksi seperti NF-kB, yang menstimulasi sel imun (Bron *et al.* 2012).

Pemberian prebiotik mampu meningkatkan regulasi gen-gen terkait dengan imunitas dan resistansi penyakit (Ringo *et al.* 2010; Song *et al.* 2014). Seperti penelitian yang dilakukan oleh Yarahmadi *et al.* (2014) bahwa pemberian prebiotik mampu meningkatkan regulasi gen-gen yang terkait imunitas (lisozim dan TNF α), stimulasi respons imun dan meningkatkan resistansi penyakit pada ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) dalam melawan serangan *Aeromonas hydrophila*.

Beberapa jenis prebiotik yang banyak diteliti dan diaplikasikan pada berbagai jenis ikan diantaranya fruktooligosakarida (FOS), *short chain* fruktooligosakarida (scFOS), mannanoligosakarida (MOS), galaktooligosakarida (GOS), arabinoxyloligosakarida (AXOS), isomaltooligosakarida (IMO), dan inulin (Ringo & Song 2016). Berbagai prebiotik ini tersedia komersial sebagai prebiotik tunggal sehingga mikroflora yang dapat terstimulasi pertumbuhannya relatif terbatas, sehingga sangat diperlukan untuk menemukan satu bahan yang memiliki beberapa jenis prebiotik.

Madu adalah oligosakarida yang terdiri dari fruktosa dan glukosa, serta mempunyai banyak sekali komponen mikro (Viuda-Martos *et al.* 2008), yang beberapa fungsi diantaranya sebagai antibakteri, antioksidan, antitumor, antiradang, dan antiviral (Ramadan & Al- Ghamdi 2012). Madu mengandung oligosakarida dan komponen antibakterial yang secara sinergis mampu meningkatkan probiotik dalam melawan patogen (Mohan *et al.* 2017), dan dapat digunakan sebagai sumber prebiotik (Tian *et al.* 2010). Polen lebah madu yang ditambahkan pada pakan telah diteliti mampu meningkatkan laju pertumbuhan dan imunitas non spesifik, serta mengendalikan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila (El-Asely *et al.* 2014).

Berdasarkan uraian di atas, informasi mengenai karakter madu sebagai sumber prebiotik dan potensinya dalam meningkatkan komposisi bakteri saluran pencernaan, kinerja pertumbuhan, respons imun dan resistansi ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae* penting untuk dikaji lebih mendalam untuk mendukung keberhasilan bidang perikanan budidaya.

1.2 Rumusan Masalah

Ikan nila merupakan salah satu komoditas perikanan yang bernilai tinggi. Namun, budidaya ikan nila masih mengalami kendala akibat serangan penyakit bakterial yang disebabkan infeksi bakteri *S. agalactiae*. Akibat dari serangan penyakit ini adalah kematian hingga 90% yang menyebabkan penurunan produksi.

Alternatif pencegahan terhadap penyakit ikan tersebut diantaranya dapat dilakukan dengan aplikasi prebiotik. Madu banyak tersedia di Indonesia dan telah diteliti mengandung berbagai oligosakarida, serta mampu berperan sebagai antibakteri, antioksidan, antitumor, antiradang, dan antiviral tetapi pemanfaatannya masih terbatas pada manusia dan hewan terestrial. Pemanfaatan madu pada organisme akuatik khususnya terkait perannya sebagai prebiotik belum banyak dipelajari sehingga perlu dikaji lebih mendalam. Penelitian mengenai peran madu sebagai prebiotik pada organisme akuatik, dengan menggunakan prototipe ikan nila diharapkan mampu mengendalikan permasalahan penyakit streptococcosis serta dapat menjadi alternatif budidaya ikan yang ramah lingkungan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengevaluasi potensi madu sebagai prebiotik dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan, respons imun, dan resistansi ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*.

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan khusus sebagai berikut:

1. Mengkarakterisasi kriteria prebiotik pada madu meliputi kandungan oligosakarida dan analisis prebiotiknya, daya tahan terhadap hidrolisis asam lambung, dan aktivitas prebiotik.
2. Mengevaluasi pemberian prebiotik dari madu dengan dosis berbeda melalui pakan terhadap kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim pencernaan, mikrovili usus, asam lemak rantai pendek, dan keragaman mikrobiota saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*).
3. Mengevaluasi efektivitas prebiotik madu yang diberikan melalui pakan terhadap imunitas, proteksi dan keragaman mikrobiota saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) terhadap infeksi *S. agalactiae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapat dari penelitian potensi madu sebagai prebiotik dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan status kesehatan ikan nila (*O. niloticus*) adalah sebagai berikut:

1. Aplikasi prebiotik madu dapat menjadi strategi baru dalam peningkatan kinerja pertumbuhan dan status kesehatan hewan akuatik khususnya ikan nila terhadap serangan penyakit streptococcosis.
2. Informasi tentang keragaman bakteri saluran pencernaan dapat dijadikan dasar dalam menentukan prebiotik yang bermanfaat dalam meningkatkan status kesehatan ikan, serta dapat memfasilitasi penemuan probiotik baru.

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. Madu memenuhi kriteria prebiotik meliputi kandungan oligosakarida, kandungan prebiotik, daya tahan terhadap hidrolisis asam lambung, dan aktivitas prebiotik.
2. Madu mempengaruhi aktivitas enzim pencernaan, komposisi asam lemak rantai pendek (SCFA), morfologi usus dan kinerja pertumbuhan ikan nila, serta komposisi mikrobiota saluran pencernaan ikan nila.
3. Madu mempengaruhi tingkat ekspresi gen terkait imunitas, resistansi, dan jumlah *S. agalactiae* pada ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*.

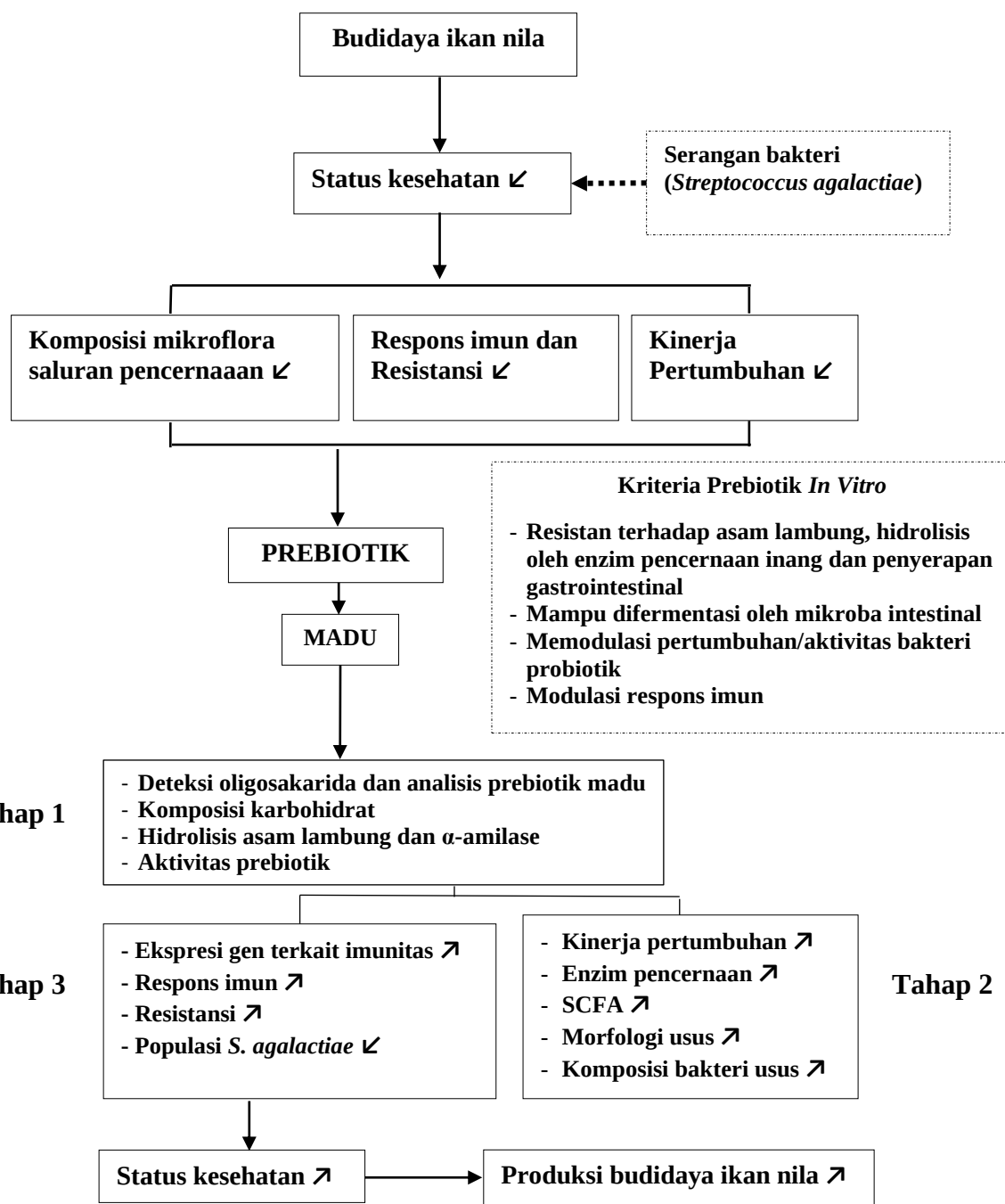
1.6 Kebaruan (Novelty)

Kebaruan yang didapat dari penelitian potensi madu sebagai prebiotik adalah sebagai berikut:

1. Madu klengkeng, madu randu, dan madu randu mengandung oligosakarida, tahan terhadap hidrolisis asam lambung, dan mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik sehingga memenuhi kriteria sebagai prebiotik.
2. Pemanfaatan madu sebagai prebiotik mampu meningkatkan keragaman mikrobiota saluran pencernaan dan kinerja pertumbuhan ikan nila.
3. Pemanfaatan madu sebagai prebiotik mampu meningkatkan imunitas dan proteksi ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*.
4. Informasi mengenai mikroflora saluran pencernaan ikan nila dapat memfasilitasi penemuan probiotik baru.

1.7 Kerangka Pemikiran Penelitian

Kerangka pemikiran penelitian potensi madu sebagai prebiotik untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan dan status kesehatan ikan nila disajikan dalam Gambar 1.



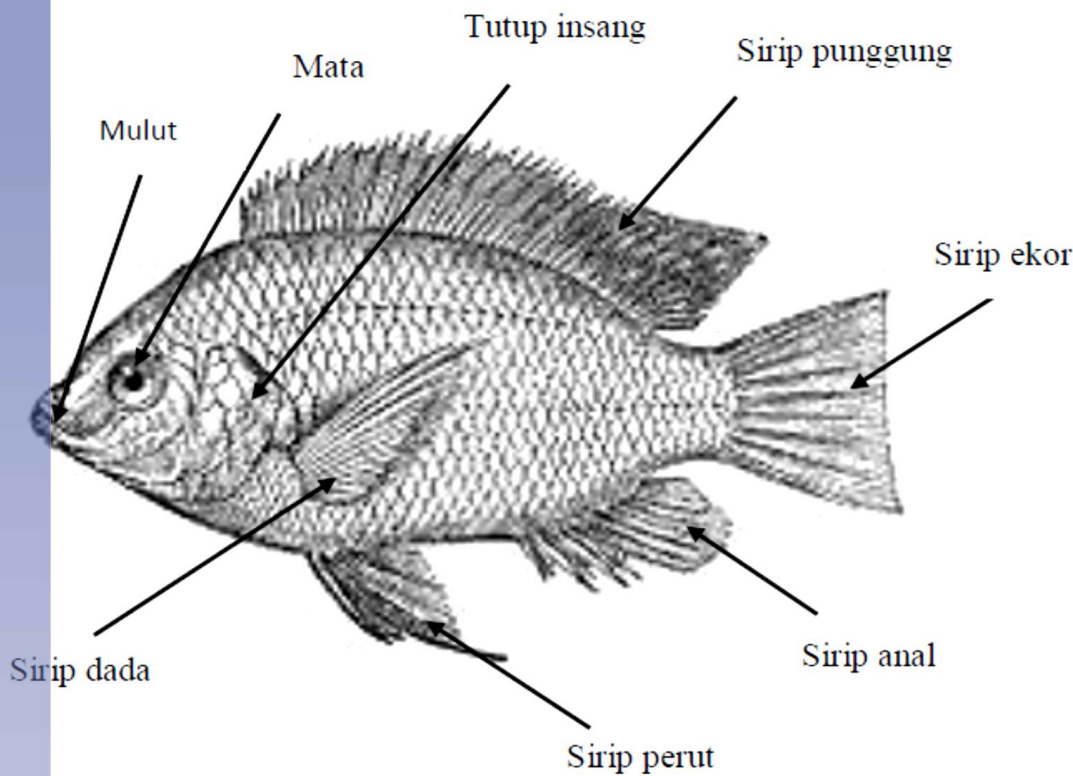
Gambar 1 Kerangka pemikiran penelitian potensi madu sebagai prebiotik untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan dan status kesehatan ikan nila

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nila (*O. niloticus*)

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah ikan komersial penting, yang memiliki karakteristik budidaya sangat baik karena dapat menggunakan pakan rendah protein dengan sangat baik, bereproduksi dengan mudah, dan mampu mentoleransi berbagai kondisi lingkungan dan stres.

Morfologi ikan nila menurut Saanin (1984), mempunyai bentuk tubuh bulat pipih, pada badan dan sirip ekor (*caudal fin*) ditemukan garis lurus. Pada sirip punggung ikan nila ditemukan garis lurus memanjang. Ikan nila dapat hidup di perairan tawar dengan menggunakan ekor untuk bergerak. Nila memiliki lima sirip, yaitu sirip punggung (*dorsal fin*), sirip dada (*pectoral fin*), sirip perut (*ventral fin*), sirip anus (*anal fin*), dan sirip ekor (*caudal fin*). Sirip punggungnya memanjang dari bagian atas tutup insang sampai bagian atas sirip ekor. Terdapat juga sepasang sirip dada dan sirip perut yang berukuran kecil serta sirip anus berbentuk agak panjang. Sementara itu, jumlah sirip ekornya hanya satu buah dengan bentuk bulat (Gambar 2).



Gambar 2 Morfologi ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

Nila jantan mempunyai bentuk tubuh membulat dan agak pendek dibandingkan dengan nila betina. Warna ikan nila jantan umumnya lebih cerah dibandingkan dengan betina. Pada bagian anus ikan nila jantan terdapat alat kelamin yang memanjang dan terlihat cerah. Alat kelamin ini semakin cerah ketika telah dewasa atau matang gonad dan siap membuahi telur. Sementara itu, warna sisik ikan nila betina sedikit kusam dan bentuk tubuh agak memanjang. Pada bagian

anus ikan nila betina terdapat dua tonjolan membulat. Satu merupakan saluran keluarnya telur dan yang satunya lagi saluran pembuangan kotoran. Ikan nila mencapai masa dewasa pada umur 4 sampai 5 bulan. Induk betina bertelur 1.000 sampai 2.000 butir. Setelah telur dibuahi oleh induk, telur akan dierami dimulut induk betina hingga menjadi larva.

Menurut Saanin (1984), ikan nila mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Osteichthyes
Ordo	: Percomorphi
Famili	: Cichlidae
Genus	: <i>Oreochromis</i>
Spesies	: <i>Oreochromis niloticus</i>

Ikan nila dilaporkan sebagai pemakan segala (*omnivora*), pemakan plankton, sampai pemakan aneka tumbuhan sehingga ikan ini diperkirakan dapat dimanfaatkan sebagai pengendali gulma air. Saat ini, ikan nila merupakan salah satu komoditas utama perikanan budidaya, produksinya menempati urutan ketiga dari total produksi ikan budidaya di dunia (FAO 2020). Intensifikasi budidaya ikan nila telah menyebabkan penurunan kualitas air yang dapat menyebabkan ikan stres dan menjadi awal dari serangan penyakit (Opiyoa *et al.* 2018).

2.2.1 Sistem Imun Ikan

Sistem kekebalan tubuh ikan tergolong paling sederhana dibandingkan kelompok vertebrata lainnya. Sistem pertahanan tubuh ikan akan terbentuk sempurna pada saat ikan telah dewasa. Sel spesifik dan jaringan dari sistem imun pada teleostei terletak pada organ timus, ginjal bagian depan, limpa dan kelenjar (Lin *et al.* 2005). Tanggap kebal alami terjadi apabila ada patogen masuk ke dalam inang, faktor humoral bawaan yang terdapat di serum dan mukus ikan akan melakukan perlawanan pasif dengan menghancurkan patogen. Apabila terjadi suatu serangan patogen atau benda asing pada ikan maka akan terjadi respons imun alami yang melibatkan sirkulasi dan perbaikan jaringan melalui respons fagosit granulosit (neutrofil, eosinofil sel granular) monosit, dan sel makrofag.

Sistem kekebalan tubuh ikan dijalankan dalam 2 tingkat: innate/natural/non spesifik dan adaptif/*acquired*/spesifik. Sistem kekebalan *innate* dibagi 2: non spesifik seluler (sel fagosit primitif) *toll-like receptors* (TLRs), makrofag, neutrofil, eosinofil dan non-spesifik sel sitotoksik. Ikan mempunyai kemampuan dalam sistem imun non-spesifik berupa barrier mekanik dan kimiawi yang terdiri dari permukaan kulit, sisik, dan mukus pada permukaan tubuh dan insang (Iwama & Nakanishi 1996). Sistem pertahanan ini berkaitan dengan disekresikannya mukus oleh sel mukus yang terdapat di jaringan epitel pada permukaan kulit, insang dan usus. Mukus mengandung substansi seperti imunoglobulin, lisozim, protein C-reaktif, dan lektin. Substansi tersebut sangat penting untuk pertahanan penyakit maupun lingkungan yang tidak menguntungkan. Sistem kekebalan *innate* non spesifik humoral (lectin, enzim/lisozim/lipolitik). Komponen humoral dari sistem imun bawaan menggunakan berbagai macam protein dan glikoprotein yang mampu

menghancurkan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Aoki *et al.* 2008).

Sistem kekebalan adaptif dibagi 2: seluler terdiri dari makrofag, *natural killer cells* (NK), *mast cells*, basofil, eosinofil dan neutrofil (Broere *et al.* 2011) dan humoral (imunoglobulin M/Ig M, komplemen, enzim). Komponen spesifik dalam sistem imun, terdiri dari humoral dan respons sel terhadap memori imunologi, walaupun memori imun pada ikan secara umum sangat kurang berkembang dibandingkan hewan tingkat tinggi lainnya. Tingkat induksi dan respons imun ikan sangat dipengaruhi oleh suhu perairan. Pada respons imun spesifik, makrofag bertindak melawan sel antigen, sedangkan B-limfosit terlibat dalam produksi antibodi. T-limfosit berperan dalam imunitas melalui diferensiasi dan proliferasi dari B-limfosit. Antibodi akan diproduksi terhadap patogen spesifik yang akan mengikat membran patogen dan merusak melalui aktivasi sistem komplemen dengan cara klasik (Li *et al.* 2006).

Mekanisme respons imun ikan ditentukan oleh aktivitas fagositik, aktivitas *respiratory burst*, lisozim, peroksidase dan aktivitas anti protease, aktivitas komplemen, dan sitokin (Akhter *et al.* 2015), yang termasuk dalam sitokin adalah kemokin, interferon, interleukin, limfokin, dan tumor nekrosis faktor. *Pattern Recognition Reseptor* (PRR), seperti reseptor β -glukan dan dectin-1 berinteraksi langsung dengan makrofag yang dimediasi dengan aktivitas imunomodulasi dari prebiotik sehingga mengeluarkan berbagai sitokin (Bown *et al.* 2002). Jenis interaksi reseptor ini mengaktifkan molekul transduksi sinyal, seperti NF-KB akan menstimulasi sel imun (Yadav & Schorey 2002). Sakarida akan berinteraksi seperti PRR dengan *Microbial Associated Molecular Patterns* (MAMPs) seperti asam teikoat, peptidoglikan, protein glikosilasi atau polisakarida kapsular dari bakteri, menyebabkan munculnya respons imun (Bron & Kleerebezem 2012).

2.2 Penyakit pada Ikan Nila

Bakteri *S. agalactiae* adalah salah satu patogen utama pada budidaya ikan nila. Penyakit akibat infeksi *S. agalactiae* disebut sebagai penyakit streptococcosis. Bakteri ini bisa menyebabkan kematian massal pada budidaya ikan nila di beberapa negara produsen ikan nila seperti Indonesia, Thailand, Malaysia dan China (Sheehan *et al.* 2009). Streptococcosis pada ikan nila menyerang mulai fase benih hingga fase dewasa (Yang & Li 2009; Jantrakajorn *et al.* 2014). Pada budidaya ikan nila intensif, infeksiusnya dapat menyebabkan tingkat kematian mencapai 90% (Ye *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012).

S. agalactiae tipe non-hemolitik lebih virulen dibandingkan dengan tipe β -hemolitik dilihat dari kematian, gejala klinis, perubahan tingkah laku, serta perubahan patologi anatomi baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Permukaan sel bakteri tipe β -hemolitik (non kapsul) lebih banyak tersusun atas protein yang lebih mudah dan cepat dikenali oleh sel fagosit. Sel bakteri tipe nonhemolitik (berkapsul) selain tersusun atas protein, juga tersusun atas karbohidrat yang lebih banyak, sehingga lebih sulit untuk difagosit. Sel bakteri tipe nonhemolitik lebih cepat tumbuh dan berkembangbiak serta menyebarkan virulensi di sel atau jaringan dibandingkan bakteri tipe β -hemolitik yang mudah dikenali dan mampu dilawan oleh sistem imun (Hardi *et al.* 2011).

Secara geografis *S. agalactiae* biotipe 2 yang memiliki nilai prevalensi paling tinggi dan menyebarkan patogen streptococcal. *S. agalactiae* biotipe 2 ditemukan

di Asia (Cina, Indonesia, Vietnam, dan Filipina) dan Amerika Latin (Ecuador, Honduras, Mexico dan Brazil). *S. agalactiae* biotipe 1 patogen dominan pada ikan tilapia ditemukan di daerah Thailand, Malaysia dan Singapura (Sheehan *et al.* 2009).

Gejala yang ditimbulkan akibat infeksi *S. agalactiae* antara lain *septicemia* dan radang otak (Mian *et al.* 2009), pembengkakan dan kekeruhan pada mata, mata memutih, perubahan pola renang, dan penjernihan tutup insang (Hardi *et al.* 2011). Penularan streptococcosis dapat terjadi melalui persinggungan dengan ikan sakit (Evans *et al.* 2006). Gejala yang ditimbulkan tergantung pada tingkat serangan, yaitu kronis atau akut. Pada tingkat kronis, gejala yang nampak yaitu adanya memar seperti luka di permukaan tubuh, bercak merah pada sirip, berenang lambat dan lebih sering berada di dasar akuarium, juga menyebabkan nafsu makan menurun. Gejala lain yang sering muncul adalah mata menonjol (*exophthalmia*) dan berenang memutar (*whirling*). Apabila serangan akut terjadi, maka akan terjadi kematian yang diduga karena adanya toksin, kehilangan cairan pada saluran pencernaan dan tidak berfungsinya sebagian organ. Perbedaan gejala yang muncul dikaitkan dengan organ target *S. agalactiae* yaitu mata, otak dan ginjal. Keberadaan bakteri pada organ mata dapat menyebabkan perubahan pada mata (*opacity*, *purulens*, *eksophthalmia* dan sebagainya). Keberadaan bakteri pada organ otak dapat menyebabkan ikan berenang abnormal (berenang miring bahkan *whirling*, sedangkan keberadaan bakteri pada ginjal ikan dapat menyebabkan perubahan warna tubuh menjadi lebih hitam (Hardi *et al.* 2011). Ikan yang terinfeksi akan mengalami penurunan nafsu makan. Menurut Hardi *et al.* (2011), bakteri yang menginfeksi otak ikan mengganggu kerja hipotalamus bagian lateral yang mengatur rasa lapar. Terganggunya sel-sel dalam hipotalamus yang berada dalam telencephalon (otak depan) akibat adanya *S. agalactiae* inilah yang menyebabkan ikan mulai mengalami penurunan nafsu makannya bahkan tidak mau makan pasca injeksi. Injeksi *S. agalactiae* dengan kepadatan 10^5 CFU mL⁻¹ pada ikan nila menyebabkan *exophthalmia*, *opacity*, berenang tidak menentu, *lethargy*, dan kulit berwarna gelap pada hari ke-2, ke-7, dan ke-14 setelah infeksi. Peradangan terjadi pada hari ke-3 dan ke-7 setelah infeksi.

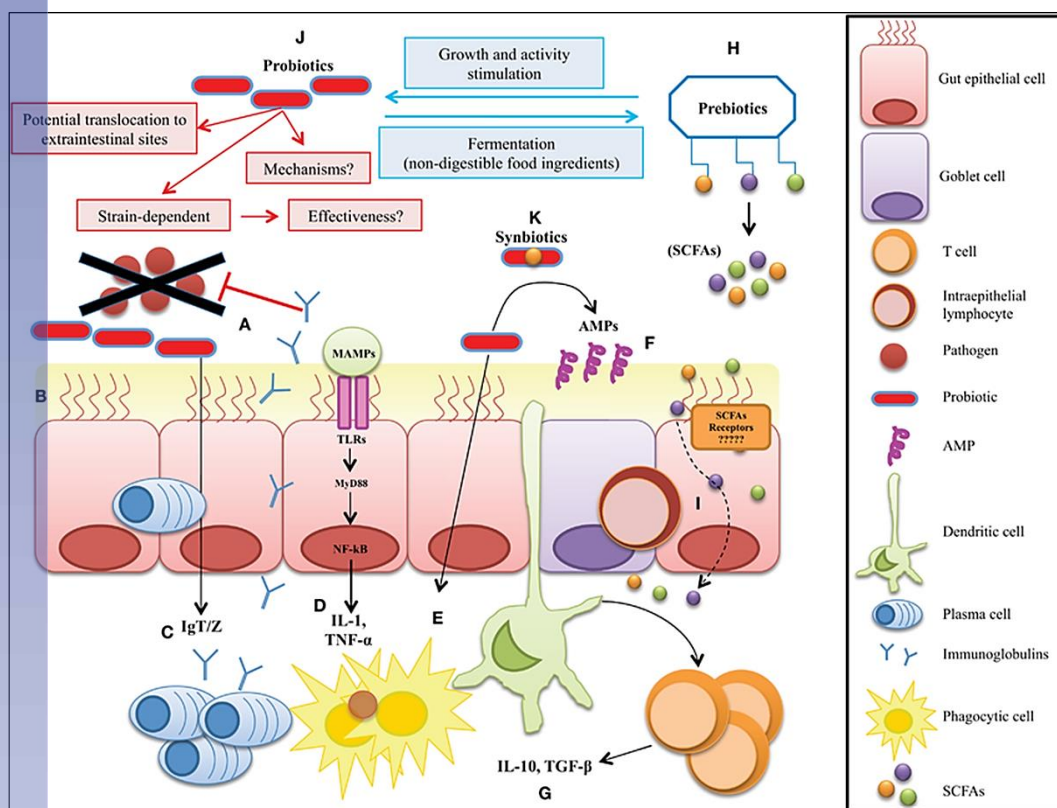
Injeksi *S. agalactiae* dengan kepadatan 105 CFU mL⁻¹ pada ikan nila menyebabkan *exophthalmia*, *opacity*, berenang tidak menentu, *lethargy*, dan kulit berwarna gelap setelah inokulasi pada hari ke-2, ke-7, dan ke-14. Peradangan terjadi pada hari ke-3 dan ke-7 setelah infeksi.

2.3 Prebiotik dalam Akuakultur

Prebiotik adalah bahan pangan yang tidak dapat dicerna inang, namun memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri di dalam usus sehingga menyehatkan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Beberapa persyaratan bahan yang dapat dijadikan sebagai prebiotik adalah: (a) tahan terhadap keasaman lambung, hidrolisis oleh enzim-enzim pencernaan pada saluran gastrointestinal, (b) dapat difermentasi oleh mikrobiota intestinal, serta (c) secara selektif merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri probiotik (Gibson *et al.* 2010).

Prebiotik biasanya dalam bentuk oligosakarida dan *dietary fiber*, misalnya inulin, galaktooligosakarida dan lain-lain. Oligosakarida yang tidak dapat dicerna itu merupakan sumber karbon bagi bakteri probiotik yang hidup di usus. Bakteri ini

dianggap menguntungkan karena metabolisme mereka sepenuhnya bersifat sakarolitik tanpa aktivitas proteolitik (Gibson *et al.* 2010). Oligosakarida tersebut akan difermentasi oleh bakteri probiotik dengan produk akhir seperti asam lemak rantai pendek (SCFA = *Short Chain Fatty Acid*) berupa asam laktat, butirat, propionat dan asetat. Dalam sel epitel usus, SCFA akan dikenali oleh reseptor yang, selanjutnya terjadi difusi melalui enterosit untuk meningkatkan fungsi penghalang mukosa kemudian mengaktifkan sinyal-sinyal yang menimbulkan respons imun yaitu berkurangnya sekresi mediator inflamasi (Gambar 3). SCFA mempunyai dampak fisiologi positif bagi tubuh inang. Selain SCFA, fermentasi prebiotik juga menghasilkan gas CO₂ dan H₂, anti inflamatori, menghambat patogen, dan mengontrol nafsu makan (Roberfroid *et al.* 2010; Flint *et al.* 2012). Indikator lain dari efektivitas prebiotik adalah kemampuannya menahan pertumbuhan dan aktivitas bakteri patogen (Gibson *et al.* 2010). Prebiotik juga memberikan manfaat kesehatan tambahan yaitu menstimulasi sistem imun, meningkatkan intoleransi laktosa, dan mereduksi risiko infeksi intestinal (Roberfroid *et al.* 2010). Prebiotik berpengaruh langsung terhadap komunitas mikroba di usus, yang dapat memberikan efek positif bagi pertumbuhan dan kesehatan inang, serta merupakan indikator khusus untuk menjelaskan potensi aplikasi prebiotik (Poolsawat *et al.* 2020).



Gambar 3 Prebiotik pada ikan (Arques *et al.* 2015)

Beberapa hasil penelitian menunjukkan prebiotik mampu meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan (Merrifield *et al.* 2010).

2.4 Madu

Kandungan utama pada madu adalah fruktosa dan glukosa. Komponen lainnya yaitu oligosakarida, mineral, senyawa fenolik, enzim, dan air (Ruiz-Matute *et al.* 2010). Madu sudah digunakan sejak jaman dahulu sebagai bagian dari pengobatan tradisional, yang memiliki fungsi diantaranya sebagai antibakterial, antioksidan, antitumor, antiinflamatori, dan antiviral (Ramadan *et al.* 2012; Sakine *et al.* 2016). Madu memiliki aktivitas antibakterial alami karena faktor-faktor seperti kandungan gula yang tinggi, keasaman, dan hidrogen peroksida yang dibentuk oleh oksidasi glukosa selama pematangan madu. Aktivitas hidrogen peroksida adalah sesuatu yang sensitif pada panas dan cahaya, dengan denaturasi dari oksidasi glukosa. Aktivitas antimikroba bervariasi sesuai dengan sumber bunga pada nektar, sifatnya tidak berubah selama periode penyimpanan. (Kwakman & Zaat 2012).

Madu mengandung prebiotik oligosakarida yang potensial dan komponen antibakterial. Keduanya dapat bekerja secara sinergis meningkatkan efikasi probiotik terhadap patogen. Selain meningkatkan jumlah bakteri probiotik, madu juga menguntungkan karena meningkatkan peran probiotik dalam saluran gastrointestinal, meningkatkan level dari SCFA, serta meningkatkan resistansi terhadap patogen (Tian *et al.* 2010). Madu juga diakui sebagai prebiotik potensial, karena kandungan oligosakarida yang dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri baik, serta memiliki komponen antimikroba yang pada kondisi optimum dapat bekerja secara sinergi dengan probiotik melawan bakteri patogen dan mikroba usus lainnya (Saran *et al.* 2011).

2.5 Mikrobiota Usus

Mikrobiota usus adalah berbagai jenis mikrobiota, baik yang patogen maupun yang menguntungkan yang hidup di dalam usus (Flint *et al.* 2012). Mikrobiota usus belum diketahui secara luas komposisinya walaupun sudah diketahui perannya yang sangat besar dalam menopang aktivitas metabolisme yang berpengaruh terhadap kesehatan inang (Mohan *et al.* 2017). Mikrobiota usus juga berkontribusi pada nutrisi dan energi pada proses fermentasi anaerob (García-Elorriaga & Pineda 2013; Erejuwa *et al.* 2014; Marchesi *et al.* 2016). Dalam usus, beberapa mikroorganisme dapat menjadi patogen atau mengeluarkan metabolit yang antagonis apabila dibiarkan berkembang biak (Flint *et al.* 2012).

Strategi untuk meningkatkan kualitas dan keseimbangan mikrobiota pada spesies-spesies yang memiliki fungsi baik diantaranya dengan meningkatkan pertumbuhan probiotik, dengan cara memberikan prebiotik seperti fruktooligosakarida (FOS), inulin dan oligofruktosa yang akan meningkatkan pertumbuhan dari probiotik *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (Kellow *et al.* 2014; Rastall & Gibson 2015). Prebiotik akan mempengaruhi komposisi mikrobiota usus (Poolsawat *et al.* 2020).

Proteobacteria, *Firmicutes*, dan *Bacteroidetes* adalah filum bakteri usus yang paling banyak ditemukan pada ikan yang dianalisis hingga saat ini (Sullam *et al.* 2012). Keanekaragaman mikrobiota usus sangat menentukan hasil akhir fermentasi prebiotik berupa asam lemak rantai pendek seperti asam butirat, asam asetat dan asam propionat yang memiliki fungsi pertumbuhan dan kesehatan inang (Guerreiro *et al.* 2016).

III POTENSI MADU KLENGKENG, MADU RANDU, DAN MADU ORGANIK SEBAGAI PREBIOTIK

ABSTRAK

Salah satu upaya untuk meningkatkan performa pertumbuhan dan komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan adalah dengan pemberian prebiotik. Madu memiliki kandungan utama berupa oligosakarida, salah satu material yang dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi madu klengkeng, madu randu dan organik sebagai prebiotik. Kriteria prebiotik yang diuji meliputi kandungan oligosakarida dari madu dan ekstraknya menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), kandungan prebiotik, karbohidrat total dan gula pereduksi madu dan ekstraknya, hidrolisis asam lambung dan α -amilase dari ketiga ekstrak madu, serta aktivitas prebiotik ekstrak ketiga jenis madu. Hasil pengujian dengan KLT menunjukkan ekstrak madu klengkeng, madu randu, dan madu organik merupakan oligosakarida. Madu randu memiliki kadar FOS 14.76% dan kadar inulin 6.6%, lebih tinggi dibandingkan dua jenis madu lainnya. Hidrolisis asam lambung dan asam α -amilase selama 3 jam pengamatan mengalami peningkatan, baik dari ekstrak madu klengkeng, madu randu, madu organik. Madu klengkeng, madu randu dan madu organik memenuhi kriteria prebiotik. Ekstrak madu randu memiliki aktivitas prebiotik paling baik, dengan kadar FOS dan inulin tertinggi dibandingkan madu klengkeng dan madu randu.

Kata kunci: α -amilase, asam lambung, KLT, probiotik, oligosakarida

ABSTRACT

One of the efforts to improved growth performance and composition of microflora in the intestine, inhibit the growth of pathogens, and increase fish immunity is by giving prebiotics. Honey has the main content in the form of oligosaccharides, one of the materials that can be used as prebiotics. This study aimed to evaluate the potential of longan, kapok and organic honey as prebiotics. The prebiotic criteria tested included oligosaccharide content from honey and its extract by TLC (Thin Layer Chromatography), prebiotics content, total carbohydrates and reducing sugars of honey and their extracts, gastric acid hydrolysis and α -amylase from the extract of three honey, and prebiotics activity from extract of the three types of honey. Test results with TLC showed that the extract of longan honey, kapok honey and organic honey were oligosaccharides. Kapok honey has FOS levels of 14.76% and inulin levels of 6.6%, higher than the other two types of honey. Hydrolysis of gastric acid and α -amylase acid for 3 hours of observation has increased, both from the extract of longan honey, kapok honey, and organic honey. Longan honey, kapok honey and organic honey meet the prebiotic criteria. Kapok honey extract has the best prebiotic activity, with the highest levels of FOS and inulin compared to longan honey and organic honey.

Keywords: α -amilase, gastric acid, oligosaccharide, probiotic, TLC

3.1 Pendahuluan

Prebiotik didefinisikan sebagai bahan pangan yang difermentasi secara selektif oleh bakteri menguntungkan yang dapat menyebabkan perubahan komposisi maupun aktivitas mikrobiota usus dengan meningkatkan pelepasan metabolit yang memberi manfaat bagi inang dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri di dalam usus sehingga menyehatkan inang (Cerezuela *et al.* 2011), serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Ringo *et al.* 2010; Bindels *et al.* 2015; Flint *et al.* 2012). Prebiotik umumnya berupa karbohidrat yang tidak dapat dicerna dengan panjang rantai yang relatif pendek berdasarkan berat molekulnya (Ringo *et al.* 2010; Cummings *et al.* 2001), biasanya berupa polisakarida dan oligosakarida (Patel & Goyal 2012). Menurut tingkat polimerisasinya, prebiotik diklasifikasikan menjadi mono, oligo, atau polisakarida (Gibson *et al.* 2015), tetapi berdasarkan sifat fisiologis dan biokimiawinya, karbohidrat dapat diklasifikasikan sebagai dapat dicerna atau tidak dapat dicerna (Dhingra *et al.* 2012).

Oligosakarida yang tidak dapat dicerna merupakan sumber karbon bagi bakteri probiotik atau bakteri menguntungkan yang hidup di usus. Oligosakarida tersebut akan difermentasi oleh bakteri probiotik dengan produk akhir seperti asam lemak rantai pendek (SCFA = *Short Chain Fatty Acid*) berupa asam laktat, butirat, propionat dan asetat, yang merupakan sumber energi dan berperan penting pada proses fisiologi dan metabolisme di usus (Roy *et al.* 2006). Salah satu bakteri probiotik dari genus *Lactobacillus*, mampu memfermentasi oligosakarida yang tidak dapat dicerna, sehingga dianggap sebagai bakteri menguntungkan karena metabolisme sepenuhnya bersifat sakarolitik tanpa aktivitas proteolitik (Gibson & Roberfroid 1995; Gibson *et al.* 2010). Selain SCFA, dihasilkan juga gas CO₂ dan H₂, yang berperan sebagai antiinflamasi, penghambat patogen, menstimulasi sistem imun, meningkatkan intoleransi laktosa, mereduksi risiko infeksi intestinal dan pengontrol nafsu makan (Roberfroid *et al.* 2010; Flint *et al.* 2012).

Prebiotik yang telah diteliti dan diaplikasikan dalam akuakultur antara lain *fructooligosaccharides* (FOS), *short-chain fructooligosaccharides* (scFOS), *mannanooligosaccharides* (MOS), *galactooligosaccharides* (GOS), *xylooligosaccharides* (XOS), *trans-galactooligosaccharides* (TOS), *isomaltooligosaccharides* (IMO) dan inulin (Ringo *et al.* 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa prebiotik mampu meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan (Merrifield *et al.* 2010), serta berperan dalam pengaturan nafsu makan (Hobden *et al.* 2015).

Madu telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional yang berfungsi sebagai antibakterial, antioksidan, antitumor, antiinflamasi dan antiviral (Ramadan & Al-Ghamdi 2012; Sakine *et al.* 2016). Kandungan utama madu adalah fruktosa dan glukosa, oligosakarida, mineral, senyawa fenolik, enzim, dan air (Ruiz-Matute *et al.* 2010). Madu mampu meningkatkan peran probiotik dalam saluran gastrointestinal, meningkatkan level dari SCFA, serta meningkatkan resistansi terhadap patogen (Saran *et al.* 2011; Tian *et al.* 2010). Madu mempunyai kandungan *fructo-oligosaccharida* (FOS) dan *galacto-oligosaccharida* (GOS)

yang dapat meningkatkan kelangsungan hidup bakteri asam laktat (Landry *et al.* 2016). Hasil penelitian Fuandila *et al.* (2019) menunjukkan madu multiflora dapat meningkatkan kinerja pertumbuhan dan respons imun udang vaname terhadap infeksi *Vibrio parahaemolyticus*. Ada banyak jenis madu yang diproduksi dan dipasarkan di Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi kriteria prebiotik pada madu meliputi kandungan oligosakarida, daya tahan terhadap hidrolisis asam lambung, dan stimulasi pertumbuhan bakteri probiotik.

3.2 Bahan dan Metode

Madu yang digunakan adalah madu hasil budidaya dari lebah lokal (*Apis cerana*) yang berasal dari 3 jenis nektar bunga yang berbeda yaitu madu klengkeng, madu randu dan madu organik yang berasal dari nektar berbagai macam bunga. Ketiga jenis madu tersebut berasal dari Pusat Perlebahan Sukatani, Depok, Jawa Barat.

3.2.1 Analisis Kandungan Oligosakarida

Penelitian ini diawali dengan ekstraksi madu klengkeng, madu randu dan madu organik. Ekstrak kemudian diuji secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui kandungan karbohidrat dan prebiotiknya. Selain itu dilakukan pengujian kriteria prebiotik yaitu resistansi terhadap hidrolisis asam lambung dan α -amilase, serta aktivitas prebiotiknya. Dari karakterisasi 3 jenis madu tersebut kemudian dipilih satu jenis madu terbaik sebagai kandidat prebiotik pada tahapan penelitian selanjutnya.

3.2.2 Ekstraksi madu (Hernandez *et al.* 2009)

Sebanyak 500 mg madu ditambah dengan 3 g arang aktif (Metode Morales *et al.* 2006) kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL etanol 10% dan diaduk selama 30 menit. Campuran disaring dengan kertas saring Whatman No.1 pada keadaan vakum dan arang aktif dibilas dengan 25 mL etanol 10%. Desorpsi ekstrak dilakukan dengan menambahkan 100 mL etanol 50% v/v. Campuran diaduk selama 30 menit dan disaring lagi dengan kertas saring Whatman No.1. Filtrat dievaporasi pada keadaan vakum pada suhu 40 °C.

3.2.3 Deteksi Oligosakarida dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Efektivitas metode ekstrak madu diuji secara kualitatif dengan KLT. Sampel dilarutkan dalam etanol 5.0% dengan konsentrasi 5.0% b/v, standar karbohidrat dibuat pada konsentrasi 1.0 % b/v. Pelarut pengembang yang digunakan adalah piridin: butanol: air (4:6:3 v/v). Sampel dan standar gula masing-masing ditotolkan ke lempeng KLT yang telah diberi tanda batas sampel dan pelarut pengembang dibawah batas garis sampel. Setelah itu bejana ditutup rapat dan didiamkan sampai batas garis yang ditentukan. Lempeng diangkat lalu dikeringanginkan. Untuk mengembangkan warna dari spot, lempeng disemprot dengan larutan berisi 10% H₂SO₄ dalam etanol (97:3 v/v) (Smith 1969). Selanjutnya lempeng dipanaskan pada oven dengan suhu 90 °C selama lima menit hingga spot kehitaman dapat terlihat.

3.2.4 Analisis Kandungan Prebiotik pada Madu

Analisis kandungan prebiotik pada madu dilakukan dengan menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Analisis ini bertujuan untuk mengetahui jenis dan konsentrasi oligosakarida yang terkandung dalam prebiotik hasil ekstraksi. Kolom yang digunakan adalah *Sugar SP0810* (8.0 mmID x 300 mmL), ukuran partikel 5 µl dengan *refraktif indeks detector*: waters 2414 dan berlaju alir (*flow rate*) 2.0 ml menit⁻¹. Fase gerak yang digunakan adalah *asetonitril* dan air dengan perbandingan *asetonitril: aquabidest* (80:20). Volume sampel yang diinjeksikan adalah 20 µl dengan suhu kolom 40 °C. Standar gula yang digunakan adalah fruktooligosakarida (FOS), inulin, kestosa, dan nistosa. Setiap puncak yang terbentuk menunjukkan satu jenis komponen gula. Waktu retensi dari setiap komponen gula dibandingkan dengan waktu retensi dari standar gula. Waktu retensi yang hampir sama menunjukkan jenis komponen yang diperkirakan sama.

3.2.5 Pengukuran Komposisi Karbohidrat

Efektivitas metode ekstraksi diuji secara kuantitatif dengan metode kolorimetri. Gula pereduksi diukur dengan metode DNS (modifikasi Wichienchot *et al.* 2010). Sebanyak 0.2 mL sampel ditambah dengan 0.2 mL akuades dan 0.2 mL larutan DNS. Mulut tabung reaksi ditutup dengan kertas aluminium lalu tabung dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Tabung kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit, ditambah dengan 0.6 mL akuades dan divorteks. Absorbansi diukur pada λ 540 nm. Karbohidrat total diukur dengan metode fenol-sulfat (modifikasi Wichienchot *et al.* 2010). Sebanyak 0.2 mL sampel ditambahkan 0.2 mL fenol 5% v/v dan 1 mL H₂SO₄. Campuran kemudian divorteks dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Tabung kemudian ditambah dengan 1.6 mL akuades dan absorbansinya diukur pada λ 490 nm. Kurva standar glukosa dibuat pada konsentrasi 0-1 mg mL⁻¹.

3.2.6 Resistansi terhadap hidrolisis asam lambung (Wichienchot *et al.* 2010)

Ekstrak dilarutkan dalam air *reverse osmosis* (RO) dengan konsentrasi 1.0 mg mL⁻¹. Asam lambung buatan dibuat dengan *buffer* HCl dengan komposisi dalam gL⁻¹: NaCl (8), KCl (0.2), Na₂HPO₄·2H₂O (8.25), NaH₂PO₄ (14.35), CaCl₂·2H₂O (0.01), MgCl₂·6H₂O (0.18), akuades (1000 mL). Pengaturan pH 2 dilakukan dengan HCl 5 M. *Buffer* HCl ditambahkan ke larutan sampel dengan perbandingan 1:1 dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. Pada jam ke 0, 1, 2, dan 4 diambil 0.2 mL untuk pengujian kandungan gula pereduksi (dengan metode Dinitrosalisilat), sementara itu untuk pengukuran karbohidrat total (metode fenol-sulfat) diambil sebanyak 0.2 mL dan hanya diukur pada jam ke-0. Pengujian dilakukan dengan dua kali ulangan. Persentase hidrolisis dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Gpt} - \text{Gp0}}{(\text{total KH} - \text{Gp0})} \times 100$$

Keterangan

Gpt = konsentrasi gula pereduksi jam ke-t

Gp0 = konsentrasi gula pereduksi jam ke-0
KH = konsentrasi karbohidrat

Metode Dinitrosalisilat: sebanyak 0.2 mL sampel dicampur dengan Dinitrosalisilat sebanyak 0.2 mL dalam tabung reaksi kemudian diinkubasi pada air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu ruang kemudian ditambahkan 0.6 mL akuades. Absorbansi diukur pada 540 nm dengan spektrofotometer.

Metode Fenol-sulfat: Sebanyak 0.2 sampel ditambahkan 0.2 fenol 5% (b/v) dan 1 mL H₂SO₄ kemudian diinkubasi pada air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan 1.6 mL akuades. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 490 nm dengan spektrofotometer.

3.2.7 Resistansi terhadap hidrolisis α -amilase (Wichienchot *et al.* 2010)

Amilase diencerkan hingga konsentrasinya 3 U mL⁻¹ dilarutkan pada sodium phosphate buffer pH 8.5. Isolat oligosakarida disiapkan dengan membuat larutan 1.0%. Kemudian larutan enzim ditambahkan ke larutan sampel dengan perbandingan 1:1. Campuran diinkubasi selama 4 jam pada *waterbath* pada suhu 37 °C. Gula pereduksi diukur pada jam ke-0, 1, 2, dan 4 dengan metode Dinitrosalisilat, dan karbohidrat total diukur dengan metode fenol-sulfat.

3.2.8 Analisis Aktivitas Prebiotik

3.2.8.1 Stimulasi Prebiotik

Bakteri yang digunakan adalah bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum*. Sebelum digunakan, kultur *L. plantarum* ditumbuhkan pada media (*deMann Rogosa Sharpe Broth*) MRSB semalam pada suhu 37 °C secara anerob pada inkubator CO₂. Media uji sebanyak 10 mL ditambah dengan 1.0 mL larutan berisi 10 mg madu klengkeng untuk uji stimulasi madu klengkeng, demikian juga untuk madu madu randu, dan madu organik. Kultur bakteri *L. plantarum* diinokulasi sebanyak 50 μ L (kepadatan 10⁸ CFU mL⁻¹) ke dalam media uji stimulasi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Sebagai kontrol adalah *L. plantarum* yang ditumbuhkan pada media MRSB. *optical density* (OD) diukur pada panjang gelombang 600 nm pada jam ke-12 dan 24.

Kemampuan madu dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri *L. plantarum* dapat diketahui dengan membandingkan OD bakteri yang tumbuh pada media yang mengandung madu dan pada OD bakteri pada media tanpa penambahan madu (kontrol).

$$\text{Stimulasi prebiotik (\%)} = \frac{At}{B} \times 100$$

Keterangan:

At = Selisih OD bakteri pada media yang ditambah madu dengan OD pada kontrol pada jam ke- t

B = OD pada kontrol jam ke-t

3.2.8.2 Skor Aktivitas Prebiotik (modifikasi Huebner *et al.* 2008)

Bakteri yang digunakan adalah bakteri probiotik *L. plantarum* dan bakteri enterik *S. agalactiae*. Sebelum digunakan, kultur *L. plantarum* ditumbuhkan pada media (*deMann Rogosa Sharpe broth*) MRSB semalam pada suhu 37 °C secara anerob pada inkubator CO₂, demikian juga *S. agalactiae*. Kultur *S. agalactiae* diperlakukan sama dengan perbedaan media kultur (*Broth Hearth Infusion Broth*) BHIB. Media uji terdiri atas 10 mL MRSB untuk bakteri *L. plantarum* dan media Minimal 9 untuk bakteri *S. agalactiae*. Setiap media ditambah dengan 1.0 mL larutan berisi 10 mg sampel. Suspensi bakteri *L. plantarum* (kepadatan 10⁸ CFU mL⁻¹) diinokulasi sebanyak 50 µL ke dalam media uji stimulasi dan diinkubasi pada suhu 37 °C pada inkubator CO₂. Suspensi bakteri *S. agalactiae* (kepadatan 10⁸ CFU mL⁻¹) diinokulasi sebanyak 50 µL ke dalam media uji stimulasi dan diinkubasi pada suhu 37 °C. *Optical density* (OD) diukur pada panjang gelombang 600 nm pada jam ke-0, 12, dan 24. Blanko adalah media uji stimulasi tanpa inokulasi bakteri. Skor aktivitas prebiotik dinyatakan secara kuantitatif dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Skor aktivitas Prebiotik} = \left(\frac{P_{pt} - P_{p0}}{P_{gt} - P_{g0}} \right) - \left(\frac{E_{pt} - E_{p0}}{E_{gt} - E_{g0}} \right)$$

Keterangan:

- P_{pt} = OD probiotik pada prebiotik setelah t jam
- P_{p0} = OD probiotik pada prebiotik setelah 0 jam
- P_{gt} = OD probiotik pada kontrol setelah t jam
- P_{g0} = OD probiotik pada kontrol setelah 0 jam
- E_{pt} = OD enterik pada prebiotik setelah t jam
- E_{p0} = OD enterik pada prebiotik setelah 0 jam
- E_{gt} = OD enterik pada kontrol setelah t jam
- E_{g0} = OD enterik pada kontrol setelah 0 jam

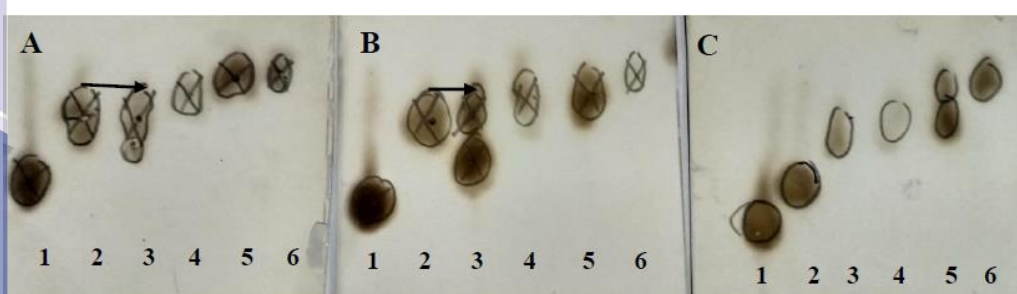
3.2.9 Analisis Data

Data kandungan ekstrak madu dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis statistik menggunakan *analisis of varians* (Anova), kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan pada taraf uji 5% dengan menggunakan program *statistical program software system* (SPSS) versi 25.

3.3 Hasil

3.3.1 Kromatografi madu dan ekstrak madu dengan KLT

Kromatogram madu klengkeng, madu randu, dan madu organik serta ekstraknya ditampilkan pada Gambar 4. *Retardation factor* (R_f) dari madu dan ekstrak madu disajikan pada Tabel 1.



Gambar 4 Kromatogram madu dan ekstrak madu klengkeng, randu, dan organik. (A1) Madu klengkeng, (A2) Ekstrak madu klengkeng, (A3) Standar rafinosa, (A4) Standar glukosa, (A5) Standar fruktosa, (A6) Standar maltosa; (B1) Madu randu, (B2) Ekstrak madu randu, (B3) Standar rafinosa, (B4) Standar glukosa, (B5) Standar fruktosa, (B6) Standar maltosa; (C1) Madu organik; (C2) Ekstrak madu organik, (C3) Standar rafinosa, (C4) Standar glukosa, (C5) Standar fruktosa, (C6) Standar maltosa

Tabel 1 *Retardation factor* madu dan ekstrak madu pada uji KLT (*Rf*)

Jenis Madu	Madu	Sampel		Standar		
		Ekstrak madu	Rafinosa	Glukosa	Fruktosa	Maltosa
Klengkeng	1.3	2.3*	2.3*	2.5	2.7	3
Randu	1.7	2*	2*	2.4	2.5	2.9
Organik	1	1.3	2.2	2.4	2.8	3.1

*= nilai *Rf* yang sama dengan standar

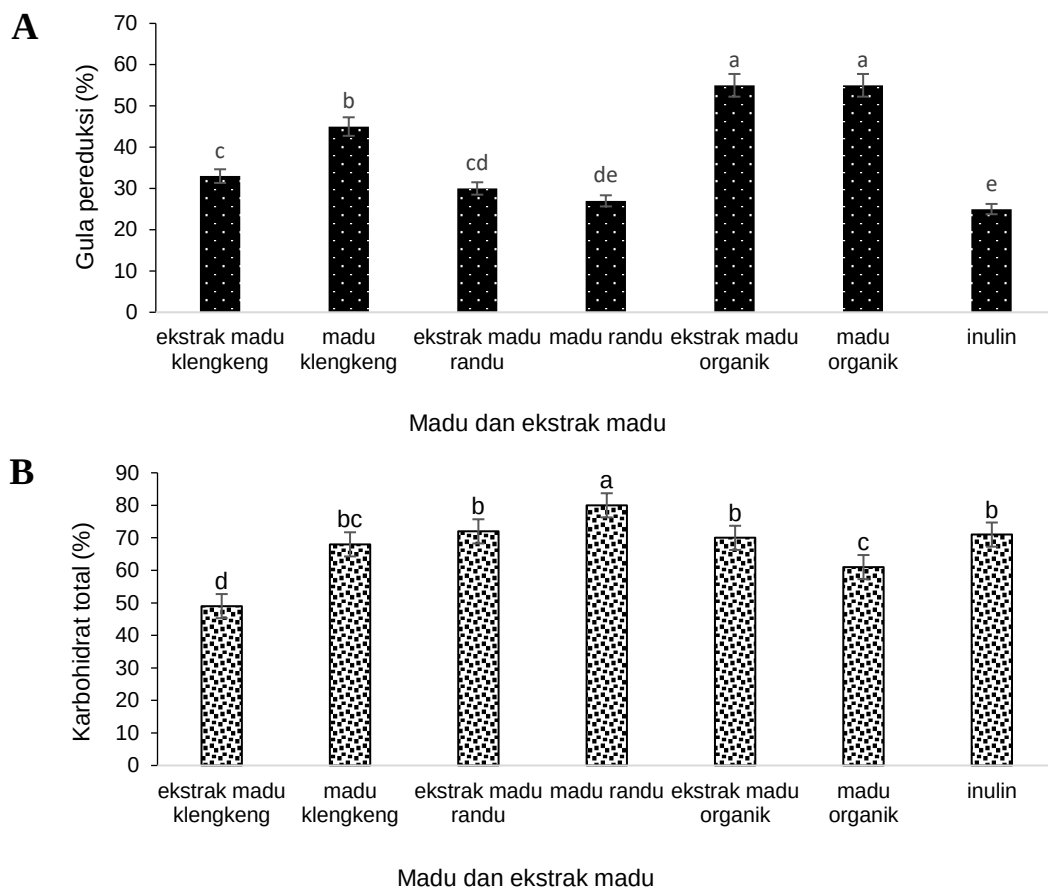
Kandungan prebiotik madu diamati menggunakan empat standar yaitu FOS, inulin, kestosa, dan nistosa. Kestosa dan nistosa digunakan sebagai standar oligosakarida karena kestosa dan nistosa, merupakan FOS rantai pendek (penyusun FOS). Madu randu memiliki kadar FOS 14.76 %, kadar inulin 6.6 % dengan kadar kestosa dan nistosa di bawah *Limit detection* (LoD), demikian juga madu klengkeng dan madu organik memiliki kadar FOS, inulin, kestosa, dan nistosa di bawah LoD. Kandungan prebiotik madu madu klengkeng, madu randu, dan madu organik disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Kandungan prebiotik madu klengkeng, madu randu, dan madu organik

Jenis prebiotik	Madu klengkeng (%)	Madu randu (%)	Madu organik (%)
FOS	<0.99	14.76	<0.99
Inulin	<0.56	6.60	<0.56
Kestosa	<0.37	<0.37	<0.37
Nistosa	<0.56	<0.56	<0.56

3.3.2 Karbohidrat total dan gula pereduksi dari madu dan ekstrak madu

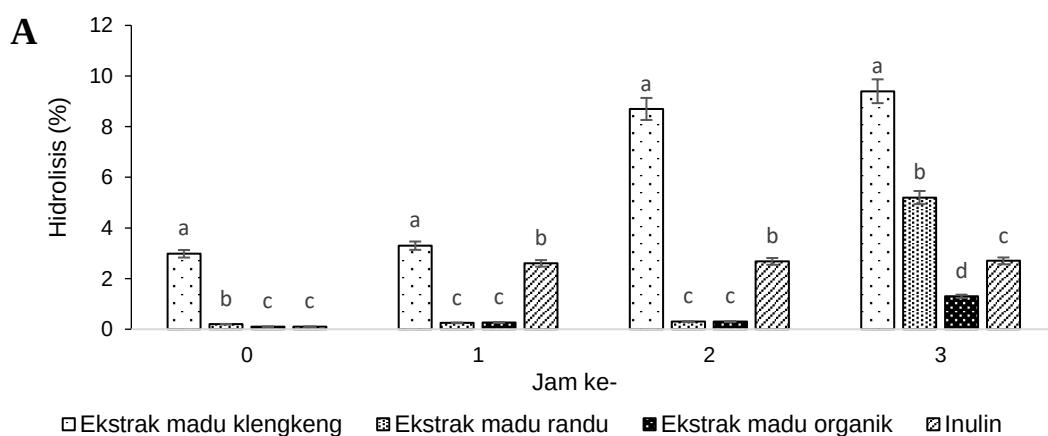
Kandungan karbohidrat total dan gula pereduksi madu ditentukan secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri, demikian juga dengan ekstrak dari ketiga jenis madu (Gambar 5). Karbohidrat total paling tinggi terdapat pada madu randu yaitu $80 \pm 0\%$, lebih tinggi dibandingkan madu klengkeng, madu organik, dan inulin. Sedangkan gula pereduksi dari ketiga madu dan ekstraknya berada dalam kisaran 27-55%, lebih tinggi dibandingkan inulin.

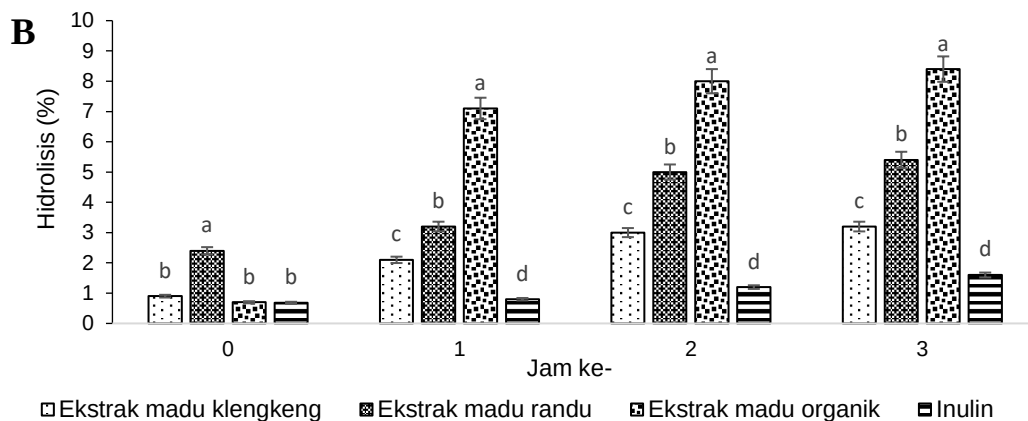


Gambar 5 Gula pereduksi (A) dan karbohidrat total (B) madu dan ekstrak madu klengkeng, madu randu, dan madu organik

3.3.3 Resistansi ekstrak madu terhadap asam lambung dan enzim α -amilase

Persentase hidrolisis asam lambung dan α -amilase mengalami peningkatan selama 3 jam pengamatan, baik ekstrak madu klengkeng, ekstrak madu randu, ekstrak madu organik, dan inulin (Gambar 6).





Gambar 6 Resistansi terhadap hidrolisis asam lambung (A) dan α -amilase (B) dari ekstrak madu klengkeng, madu randu, dan madu organik

3.3.4 Stimulasi Prebiotik dan Skor Aktivitas Prebiotik

Salah satu parameter dalam menentukan suatu material layak dijadikan kandidat prebiotik adalah stimulasi prebiotik dan skor aktivitas prebiotik. Stimulasi prebiotik dan skor aktivitas prebiotik pada jam ke-12 dan jam ke-24 ekstrak madu klengkeng, ekstrak madu randu, ekstrak madu organik, dan inulin disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Stimulasi prebiotik dan skor aktivitas prebiotik dari ekstrak madu klengkeng, ekstrak madu randu, dan ekstrak madu organik

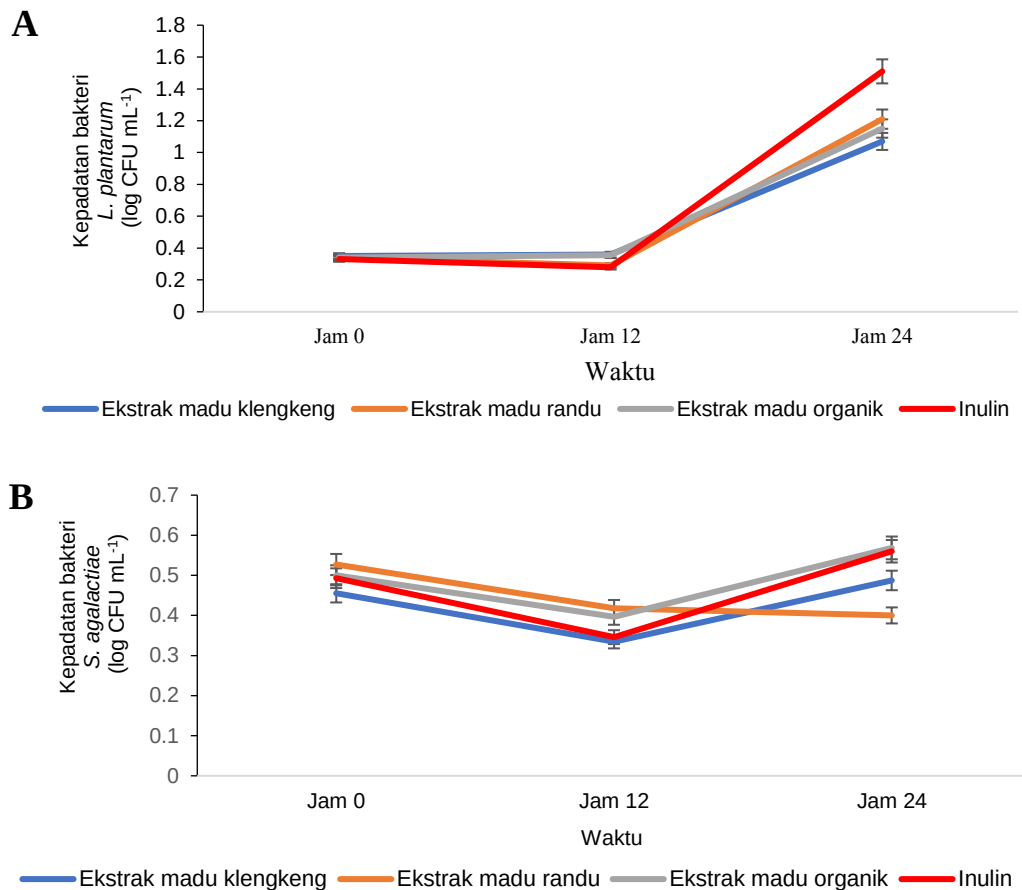
	Stimulasi prebiotik (%)		Skor aktivitas prebiotik	
	Jam-12	Jam-24	Jam-12	Jam-24
Ekstrak madu klengkeng	59.50±3.42	48.61±5.78	4.29±0.56	0.5±0.07
Ekstrak madu randu	80.21±6.11	68.05±4.12	3.82±0.78	0.71±0.03
Ekstrak madu organik	58.21±2.85	59.86±5.57	3.66±0.42	0.25±0.01
Inulin	60.00±1.98	40.00±7.12	5.16±0.12	0.24±0.03

Prebiotik madu mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri *L. plantarum*. Hal ini ditunjukkan dari jumlah *optical density* (OD) bakteri *L. plantarum* yang tumbuh pada media MRSB yang mengandung madu lebih banyak dibandingkan pada media MRSB tanpa penambahan madu (kontrol). OD *L. plantarum* dalam media MRSB pada jam ke-12 adalah 0.225 log CFU mL⁻¹, dan pada jam ke-24 sebesar 0.72 log CFU mL⁻¹. Stimulasi prebiotik ekstrak madu klengkeng pada jam ke-12 adalah 59.50±3.42% lalu turun hingga 48.61±5.78% pada jam ke-24, ekstrak madu randu pada jam ke-12 adalah 80.21±6.11% dan turun hingga 68.05±4.12% pada jam ke-24, ekstrak madu organik pada jam ke-12 adalah 58.21±2.85% lalu naik hingga 59.86±5.57% pada jam ke-24, dan inulin pada jam ke-12 adalah 60.00±1.98% lalu naik hingga 40.00±7.12% pada jam ke-24.

Skor prebiotik ekstrak madu klengkeng pada jam ke-12 adalah 4.29±0.56 kemudian turun menjadi 0.5±0.07 pada jam ke-24, ekstrak madu randu pada jam ke-12 adalah 3.82±0.78 lalu turun hingga 0.71±0.03 pada jam ke-24, ekstrak madu organik pada jam ke-12 adalah 3.66±0.42 kemudian turun menjadi

0.25±0.01 pada jam ke-24, dan inulin pada jam ke-12 adalah 5.16±0.12 lalu turun hingga 0.24±0.03 pada jam ke-24.

Pertumbuhan bakteri probiotik (*L. plantarum*) dalam media MRSB dan bakteri enterik *S. agalactiae* dalam media Minimal M9 yang diberi prebiotik madu disajikan dalam Gambar 7.



Gambar 7 Kepadatan bakteri *L. plantarum* (CFU mL⁻¹) dalam media yang diperkaya ekstrak madu klengkeng, madu randu, dan madu organik (A) dan kepadatan bakteri *S. agalactiae* (CFU mL⁻¹) dalam media yang diperkaya ekstrak madu klengkeng, madu randu, dan madu organik (B)

3.4 Pembahasan

Pengamatan dilakukan terhadap warna madu dan ekstrak yang dihasilkan dari madu. Hasil pengamatan secara visual menunjukkan bahwa warna madu klengkeng, madu randu, dan madu organik hampir sama yaitu kecoklatan. Warna ekstrak madu klengkeng dan madu randu berwarna kehitaman, sedang madu organik lebih cerah. Madu umumnya tidak berwarna hingga kehitaman, krem, kuning, oranye, dan coklat (Bogdavov *et al.* 1997). Warna madu juga dipengaruhi kandungan mineral. Madu yang lebih pucat mengandung 0.04% mineral, sementara madu yang lebih gelap mengandung mineral sebanyak 0.2% (Anklam 1998). Asam fenolik dan turunannya mempunyai peran yang sangat penting dalam warna madu (Landry *et al.* 2016).

Sumber bunga sangat berkorelasi dengan penanda fisikokimia (warna, aroma, dan tekstur) seperti senyawa aroma volatil, fenolik dan asam amino, oligosakarida dan lain-lain (Mohan *et al.* 2017). Warna madu ditentukan oleh banyak faktor diantaranya adalah kondisi tanaman, usia tanaman penghasil nektar, pemanenan madu, dan penyimpanan madu (Landry *et al.* 2016).

Karbohidrat adalah sumber potensial untuk karbon, oksigen, dan energi untuk metabolisme, sehingga biasanya berfungsi sebagai sumber nutrisi utama untuk mikroorganisme (Peters 2006). Karbohidrat yang bisa dimanfaatkan berupa monosakarida (glukosa, galaktosa, fruktosa, xilosa), disakarida (sukrosa, maltosa, laktosa), oligosakarida (kestosa, rafinosa, maltotriosa), dan polisakarida (pati, dekstrin, selulosa, inulin, xilan), biasanya berasal dari industri atau pertanian, umumnya digunakan sebagai bahan baku kompleks (Saxena *et al.* 2009). Kandungan karbohidrat harus dimonitor untuk mengoptimalkan kualitas dan kuantitas dari metabolit yang diproduksi. Selama proses fermentasi, perubahan komposisi karbohidrat, akan merubah sifat kimianya, maka kadar gula berfungsi sebagai indikator utama dalam menentukan produktivitas proses fermentasi (Woodley *et al.* 2013).

KLT merupakan salah satu teknik pemisahan sederhana baik secara kualitatif maupun kuantitatif, analisis yang mampu secara simultan untuk beberapa substansi karbohidrat dengan waktu yang singkat (Poole 2014). Rafinosa adalah standar yang digunakan untuk oligosakarida. Glukosa dan fruktosa digunakan sebagai standar monosakarida sedangkan maltosa digunakan untuk standar disakarida. Adanya ekor pada spot kromatogram mengindikasikan adanya beragam karbohidrat dalam jumlah yang rendah.

Kromatogram madu klengkeng menghasilkan R_f 1.3 sehingga tidak sesuai dengan R_f standar oligosakarida (rafinosa) dan 3 standar yang dipakai. Ekstrak madu klengkeng memiliki nilai R_f 2.3, sama dengan R_f standar rafinosa yaitu 2.3 (Gambar 2). Hal tersebut mengandung arti bahwa ekstrak madu klengkeng termasuk oligosakarida. Kromatogram madu randu menghasilkan R_f 1.7 sehingga tidak sesuai dengan R_f standar oligosakarida (rafinosa) maupun 3 standar yang dipakai. Ekstrak madu randu memiliki nilai R_f 2.0, sesuai dengan R_f standar rafinosa yaitu 2.0. Hal tersebut mengandung arti bahwa ekstrak madu klengkeng termasuk oligosakarida. Kromatogram madu organik menghasilkan R_f 1.0 sehingga tidak sesuai dengan R_f standar oligosakarida (rafinosa) dan 3 standar yang dipakai. Ekstrak madu organik memiliki nilai R_f 1.3 tidak sesuai dengan keempat standar yang dipakai. Walaupun tidak memiliki nilai R_f yang sama dengan standar oligosakarida yang dipakai (rafinosa), namun ekstrak madu organik sudah bukan madu murni lagi, karena sudah mengalami proses hidrolisis, dibuktikan dengan nilai R_f yang sudah berbeda dengan madu organik. Spot hidrolisis madu organik kemungkinan juga termasuk oligosakarida, apabila digunakan standar oligosakarida yang lain (selain rafinosa).

Karbohidrat yang bisa digunakan sebagai prebiotik diantaranya fruktan-fructooligosaccharides (FOS) dan inulin (Gibson *et al.* 2005). Fruktooligosakarida (FOS) adalah oligosakarida rantai pendek D-glukosa dan D-fruktosa, sering disebut *neosugar* yang terdiri atas 3-5 unit monosakarida. Penyusunnya adalah campuran 1-kestosa (GF2), nistosa (GF3), dan 1F-fruktofuransil nistosa (GF4), juga disebut sebagai FOS tipe GF_n. Bentuk lain dari FOS yang tersedia disebut sebagai tipe FF_n FOS (Goh *et al.* 2006). Tingkat kemanisan FOS kira-kira sepertiga sukrosa dan bebas kalori (Yun 1996). FOS resistan dalam saluran pencernaan bagian atas dapat

menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik. Inulin merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Fruktan mewakili kategori senyawa yang terdiri dari sebagian besar ikatan glikosidik. Inulin merupakan polimer unit fruktosa. Fruktan dapat memiliki setidaknya satu keterkaitan fruktosilglukosa ditandai dengan ditemukannya glukosa dan merupakan tautan awal di rantai polimer. Inulin berfungsi sebagai prebiotik karena menjadi komponen pangan substrat mikrobiota yang menguntungkan di dalam usus. Setelah dikonsumsi, senyawa prebiotik mencapai usus besar dalam keadaan struktur yang tidak berubah, selanjutnya prebiotik difermentasi menjadi asam lemak rantai pendek dan dari beberapa mikrobiota spesifik akan dihasilkan asam lemak rantai pendek, yang berguna bagi kesehatan inang. Madu randu memiliki kadar FOS 14.76 %, kadar inulin 6.6 % serta kadar kestosa dan nistosa di bawah LoD, demikian juga madu klengkeng dan madu organik, kadar FOS, inulin, kestosa, dan nistosa di bawah standar LoD. Semakin tinggi kadar FOS dan inulin, maka akan semakin banyak prebiotik yang bisa digunakan bakteri probiotik, yang tentu saja akan memberikan manfaat lebih besar.

Karbohidrat total merupakan molekul yang lebih kompleks daripada gula pereduksi. Gula mewakili komponen utama dari madu. Gula pereduksi (*invert sugar*), terutama fruktosa dan glukosa, adalah komponen utama pada madu. Perbedaan nilai gula pereduksi karena madu yang belum matang telah dipanen sehingga proses inversi oleh enzim invertase tidak sempurna. Perbedaan konsentrasi gula pereduksi karena sukrosa tidak ditransformasi dengan sempurna menjadi glukosa dan fruktosa (Kucuk *et al.* 2007). Penyebab lain yang bisa terjadi adalah karena adanya pencampuran dengan zat-zat lain (sukrosa atau air) sehingga gula reduksi menjadi lebih rendah.

Pencernaan makanan dipengaruhi tiga faktor utama yaitu: (a) makanan yang dicerna dan sejauh mana makanan tersebut rentan terhadap enzim pencernaan, (b) aktivitas enzim pencernaan, (c) lama waktu makanan terpapar enzim pencernaan (Ray *et al.* 2012). Pencernaan digambarkan sebagai proses dimana makanan di saluran pencernaan dibagi menjadi senyawa yang lebih mudah diserap, dengan bantuan enzim pencernaan. Asam lambung adalah salah satu enzim pencernaan yang ada di usus. Kihara & Sakata (2002), mendapatkan hasil bahwa bakteri usus pada ikan mampu melakukan metabolisme oligosakarida yang berasal dari kedelai dan kacang polong dengan menghasilkan *short chain fatty acid* (SCFA), karbon dioksida dan metana. Ketiga ekstrak madu yang diuji (madu klengkeng, randu, dan organik) memiliki resistansi terhadap hidrolisis asam lambung dan α -amilase (Gambar 6). Resistansi oligosakarida ini sesuai dengan Sanz *et al.* (2005) yang menyebutkan bahwa oligosakarida madu memiliki resistansi terhadap asam lambung dan enzim pencernaan lain secara *in vitro*.

Lactobacillus plantarum merupakan salah satu bakteri Gram positif dan termasuk bakteri probiotik potensial yang disolasi dari saluran pencernaan ikan (Kazun *et al.* 2018). Karena kemampuannya untuk hidup dalam saluran pencernaan inilah, maka *L. plantarum* digunakan sebagai pendukung pemberian vaksin kepada inang (Bahey-El-Din *et al.* 2012). *L. plantarum* juga mampu memproduksi substansi antimikroba, seperti plantaricin, yang aktif melawan patogen dan memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhannya sehingga digunakan sebagai alternatif terapi antibiotik dalam akuakultur (Cebeci & Gurakan 2003). *Streptococcus agalactiae* adalah bakteri enterik yang dipakai karena bakteri ini mempunyai prevalensi antara 40-70% pada benih dan ikan ukuran konsumsi (Pech *et al.* 2016).

Salah satu parameter dalam menentukan suatu material layak dijadikan kandidat prebiotik adalah aktivitas prebiotiknya. Ekstrak madu randu memiliki stimulasi probiotik terbaik dibandingkan dua jenis madu yang lain karena mampu meningkatkan populasi *L. plantarum* sebesar $80.21 \pm 6.11\%$ pada jam ke-12 dan $68.05 \pm 4.12\%$ pada jam ke-24 (Tabel 3). Hal tersebut karena madu randu memiliki kandungan FOS dan inulin (Tabel 2). Ekstrak madu randu memiliki skor prebiotik baik dibandingkan dengan ekstrak dua jenis madu yang lain, karena mempunyai skor prebiotik 3.82 ± 0.78 pada jam ke-12, dan mampu mempertahankan sampai jam ke-24 sebanyak 0.71 ± 0.03 . Selama 24 jam masih terdapat glukosa yang bisa dimanfaatkan sebagai sumber karbon.

L. plantarum ditumbuhkan dalam media MRSB, sementara *S. agalactiae* ditumbuhkan pada media Minimal M9. Kedua media mengandung glukosa 2% sebagai sumber karbon. Jika salah satu dari kedua spesies bakteri mampu memanfaatkan prebiotik oligosakarida madu sebagai sumber karbonnya maka pertumbuhannya akan lebih baik dibandingkan kultur bakteri lainnya. Hal ini ditunjukkan melalui selisih nilai OD antara jam ke-24 dan jam ke-0 yang lebih tinggi. Ketiga jenis madu menunjukkan kemampuan dalam menstimulasi pertumbuhan secara selektif yaitu dapat digunakan oleh bakteri probiotik (*L. plantarum*), tetapi sedikit digunakan oleh bakteri enterik (*S. agalactiae*) karena oligosakarida meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik dan menekan bakteri patogen (Sharma *et al.* 2017). Madu mengandung oligosakarida sehingga akan bermanfaat bagi pertumbuhan bakteri asam laktat pada usus dan bersifat antagonis pada bakteri patogen dengan membatasi proliferasinya (Patel & Goyal 2012). Indikator dari efektivitas prebiotik adalah kemampuannya menahan pertumbuhan dan aktivitas bakteri patogen (Gibson *et al.* 2010). Prebiotik oligosakarida akan difermentasi oleh bakteri probiotik, sehingga penggunaan pakan yang diperkaya dengan prebiotik akan menyebabkan peningkatan kinerjanya di usus besar (Kaplan & Hutkins 2000).

4. Simpulan

Madu klengkeng, madu randu dan madu organik memiliki kandungan oligosakarida. Kandungan karbohidrat total dan gula pereduksi madu lebih tinggi daripada ekstrak madu, tahan terhadap hidrolisis asam lambung dan α -amilase, dan memiliki aktivitas prebiotik sehingga memenuhi kriteria sebagai prebiotik. Ekstrak madu randu memiliki aktivitas prebiotik lebih baik, dengan kadar FOS dan inulin tertinggi dibandingkan dengan madu klengkeng dan madu organik.

IV EVALUASI PEMBERIAN PREBIOTIK MADU RANDU TERHADAP KERAGAMAN MIKROBIOTA PADA SALURAN PENCERNAAN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) DAN KINERJA PERTUMBUHANNYA

Abstrak

Salah satu metode untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan, meningkatkan komposisi mikrobiota usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan adalah dengan pemberian prebiotik. Madu randu memiliki kandungan utama berupa oligosakarida FOS 14.76% dan inulin 6.60%, salah satu material yang bisa dimanfaatkan sebagai prebiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi pemberian prebiotik dari madu randu dengan dosis berbeda melalui pakan terhadap kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim pencernaan, mikrovili usus, asam lemak rantai pendek, dan keragaman mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Penelitian menggunakan empat perlakuan yaitu kontrol (pakan tanpa penambahan madu) dan pakan dengan penambahan madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1%. Ikan nila dengan ukuran 20 ± 1.72 g dipelihara dengan pakan perlakuan selama 30 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian prebiotik madu randu melalui pakan mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan memberikan rasio konversi pakan lebih rendah, meningkatkan aktivitas enzim pencernaan (amilase, protease, dan lipase), meningkatkan panjang, rasio perimeter dan kerapatan mikrovili usus, meningkatkan asam lemak rantai pendek, memicu munculnya Genus *Bacillus* dan *Clostridium-sensu-stricto* dan meningkatkan keragaman mikrobiota yang berpotensi sebagai probiotik yaitu *Cetobacterium*, dengan dosis terbaik pemberian madu randu 1%.

Kata kunci: Asam lemak rantai pendek, enzim pencernaan, mikrobiota mikrovili, oligosakarida

Abstract

One method to increase growth performance, improve intestinal microbiota composition, inhibit pathogen growth, and induce fish immunity is by prebiotics administration. Honey has oligosaccharides FOS 14.76% and inulin 6.60% as the main content that can be utilized as a prebiotic. This study evaluated the administration of dietary prebiotic from kapok honey at different doses on growth performance, digestive enzyme activities, intestinal microvilli, short-chain fatty acid contents, and microbiota diversity in the digestive tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

This study used four diet treatments, namely, control (without honey administration) and kapok honey administration at 0.25%, 0.5%, and 1% doses. Nile tilapia weighing 20 ± 1.72 g were reared with the diet treatments for 30 days. The results showed that honey prebiotic administration could increase growth performance, give a lower feed conversion ratio, induce digestive enzyme activities, increase microvilli length, perimeter ratio and density of intestinal microvilli,

increase short-chain fatty acid contents, triggering the emergence of the genus *Bacillus* and *Clostridium-sensu-stricto* and increasing the diversity of microbiota that have the potential as probiotics, namely *Cetobacterium*, with the best dose of 1% kapok honey.

Keywords: Digestive enzyme, microbiota, intestinal microvilli, oligosaccharides, short- chain fatty acids

4.1 Pendahuluan

Produksi ikan nila dunia menempati urutan ketiga dengan total produksi mencapai 4 525.4 ribu ton atau 8.3% dari total produksi ikan budidaya di dunia (FAO 2020). Selain menjadi komoditas utama pada budidaya perairan di sebagian besar belahan dunia karena mudah dibudidayakan, ikan nila mampu beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan, toleran terhadap padat penebaran yang tinggi (Pech *et al.* 2016), pertumbuhan yang cepat, mudah menerima pakan alami dan suplemen makanan, serta resistan terhadap penyakit (Pech *et al.* 2017). Sebanyak 72% jumlah produksi ikan nila dunia dikembangkan di Asia Tenggara (Ye *et al.* 2011). Nila menjadi komoditas penting di Indonesia karena total produksi global mencapai 6.510.700 ton pada tahun 2017, dimana kontribusi ekspor Indonesia sebesar 18.43% (Fitzsimmons 2018). Salah satu upaya meningkatkan produksi nila adalah dengan intensifikasi. Aplikasi padat penebaran tinggi, penurunan kualitas air dan stres pada ikan adalah faktor yang umumnya mengakibatkan penyakit pada ikan (Sebastiao *et al.* 2015). Salah satunya adalah penyakit *Streptococcosis* yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* yang diketahui sebagai penyebab utama kematian pada budidaya ikan nila di dunia (Kanika *et al.* 2017). Bakteri ini menyebabkan kegagalan panen sehingga menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar di industri akuakultur nila di beberapa negara termasuk Brasil (Tavares *et al.* 2016), Indonesia (Lusiastuti *et al.* 2014; Pradeep *et al.* 2016; Malaysia (Amal *et al.* 2015), Thailand (Kayansamruaj *et al.* 2014) dan Cina (Chen *et al.* 2012).

Salah satu alternatif pengendalian untuk mengatasi serangan penyakit adalah dengan penggunaan prebiotik (Ringo *et al.* 2010). Prebiotik adalah bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh inang, namun memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan meningkatkan aktivitas microbiota menguntungkan di dalam usus sehingga meningkatkan kesehatan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Bahan pangan yang tidak tercerna biasanya berupa oligosakarida seperti fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), serta inulin (Sanz *et al.* 2005), yang mempunyai sifat tidak dapat dihidrolisis oleh asam lambung, namun dapat difermentasi oleh probiotik di usus. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian prebiotik mampu meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, pencernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi microbiota dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan (Gibson *et al.* 2010; Merrifield *et al.* 2010; Roberfroid *et al.* 2010).

Mikrobiota usus merupakan berbagai jenis microbiota, baik yang merugikan maupun yang menguntungkan yang hidup di dalam usus (Flint *et al.* 2012). Mikrobiota usus belum diketahui secara luas komposisinya walaupun sudah diketahui perannya yang sangat besar dalam menopang aktivitas metabolisme yang berpengaruh terhadap kesehatan inang (Mohan *et al.* 2017), juga berkontribusi pada

nutrisi dan energi pada proses fermentasi anaerob (García-Elorriaga & Pineda 2013; Erejuwa *et al.* 2014; Marchesi *et al.* 2016). Keragaman dan perubahan mikrobiota usus hewan akuatik belum banyak diketahui (Xia *et al.* 2014). Terbatasnya kemampuan untuk mengkultur dan mengisolasi sebagian besar mikrobiota dari sampel menyebabkan koloni mikrobiota yang ditemukan tidak bisa diidentifikasi, sehingga pola representasi populasi mikrobiota tidak diketahui (Tyagi & Singh 2017). Seperti halnya vertebrata lain, mikrobiota usus juga diharapkan berpengaruh dalam kesehatan dan fisiologi ikan (Ghanbari *et al.* 2015).

Strategi untuk meningkatkan kualitas dan keseimbangan mikrobiota pada spesies yang memiliki fungsi baik diantaranya dengan meningkatkan pertumbuhan probiotik, dengan cara memberikan prebiotik seperti fruktooligosakarida (FOS), inulin dan oligofruktosa (Kellow *et al.* 2014; Rastall & Gibson 2015). Seperti penelitian yang dilakukan oleh El-Asely *et al.* (2014), yang menggunakan polen lebah madu sebagai prebiotik pada pakan mampu meningkatkan laju pertumbuhan dan imunitas non spesifik ikan, serta mampu mengendalikan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila. Fuandila *et al.* (2019) telah melakukan penelitian menggunakan madu multiflora dan mendapatkan hasil adanya peningkatan kinerja pertumbuhan dan respons imun udang vaname terhadap infeksi *Vibrio parahaemolyticus*.

Sejauh ini belum ada penelitian terkait penggunaan madu pada ikan nila terutama pengaruhnya terhadap keragaman mikrobiota dan mikrovili usus ikan. Dengan demikian, tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi pemberian prebiotik dari madu yang diberikan melalui pakan terhadap kinerja pertumbuhan, aktivitas enzim pencernaan, mikrovili usus, asam lemak rantai pendek dan komposisi mikrobiota saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

4.2 Bahan Dan Metode

4.2.1 Pemeliharaan dan percobaan pakan uji pada ikan nila

Penelitian ini menggunakan madu randu, merupakan madu terbaik dari beberapa jenis madu yang diteliti sebelumnya, karena memiliki kandungan oligosakarida berupa FOS dan inulin, resisten terhadap hidrolisis asam lambung dan α -amilase, dan mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik. Madu randu diperoleh dari Pusat Perlebahan Sukatani, Depok, Jawa Barat. Penelitian menggunakan empat perlakuan yaitu kontrol (tanpa penambahan madu) dan pakan dengan penambahan madu dosis 0.25% (2.5 g Kg^{-1} pakan), 0.5% (5 g Kg^{-1} pakan), dan 1% (10 g Kg^{-1} pakan). Setiap perlakuan diulang empat kali. Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pakan yang mengandung madu dibuat dengan cara mencampurkan madu dan putih telur (sebagai perekat) sebanyak 2.0% pada pakan sesuai perlakuan, dengan cara dispray. Sebelum diberikan ke ikan, pakan dikeringudarkan terlebih dahulu selama 10-15 menit.

Ikan nila yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan nila ukuran $10 \pm 0.24 \text{ cm}$ dan berat $20.9 \pm 1.72 \text{ g}$ yang berasal dari Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, Jawa Barat. Sebelum diberi perlakuan dengan pakan uji, ikan diaklimatisasi selama satu minggu pada bak fiber volume 500 L. Selanjutnya 320 ekor ikan dipelihara selama 30 hari dalam wadah pemeliharaan berupa akuarium ukuran $100 \times 60 \times 60 \text{ cm}^3$ (volume 60 L) sebanyak 16 buah

dengan padat tebar 20 ekor per akuarium. Pemberian pakan dilakukan secara satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 18.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kualitas air dijaga mengacu pada SNI 6141.2: 2009, kisaran suhu 28 - 30 °C, DO 4-6 mg L⁻¹, pH 6.5-7.5 dan TAN 0.1- 0.5 mg L⁻¹.

4.2.2 Pengukuran kinerja pertumbuhan

Parameter kinerja pertumbuhan yang diukur meliputi kelangsungan hidup, laju pertumbuhan spesifik, dan rasio konversi pakan. Semua ikan nila dari setiap perlakuan ditimbang setiap 10 hari untuk mengetahui bobot tubuh ikan. Evaluasi kinerja pertumbuhan berdasarkan rumus kelangsungan hidup (%) = $100 \times \text{jumlah akhir ikan} / \text{jumlah awal ikan}$. Laju pertumbuhan spesifik (%) = $100 \times (\ln \text{ bobot akhir} - \ln \text{ bobot awal}) / \text{hari pemeliharaan}$. Rasio konversi pakan = $\text{pakan yang dikonsumsi} / \text{pertambahan berat badan}$ (Zokaeifar *et al.* 2012).

4.2.3 Pengukuran aktivitas enzim pencernaan

Pengukuran enzim pencernaan dilakukan pada hari ke 30 masa pemeliharaan. Analisis aktivitas enzim pencernaan ikan nila meliputi enzim protease, lipase, dan amilase. Sampel adalah usus ikan sebanyak 10 ekor/perlakuan dari ulangan yang berbeda. Usus dipotong dan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dihomogenkan dalam 10 mL PBS (*phosphate buffer saline*) yaitu 8 g NaCl, 1.5 g Na₂PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1000 mL akuades. Usus dihomogenkan dan disentrifuse selama 20 menit pada kecepatan 15000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis aktivitas enzim pencernaan. Uji aktivitas amilase menggunakan metode Bergmeyer dan Grasi (1983), uji aktivitas lipase menggunakan metode Borlongan (1990), dan uji aktivitas protease menggunakan metode Bergmeyer & Grasi (1983).

4.2.4 Mikrovili usus ikan nila

Pengukuran mikrovili usus dilakukan pada hari ke 30 masa pemeliharaan. Sampel adalah usus ikan 3 ekor ikan/ulangan preparasi untuk pengamatan mikrovili usus ikan nila mengacu pada Goldstein *et al.* (2003), meliputi pembersihan, prefiksasi, fiksasi, dehidrasi, pengeringan, pemasangan spesimen pada *stub*, pelapisan dengan Au menggunakan *ion coater*. Pemotongan dan pengamatan sampel dilakukan seperti penelitian Munaeni *et al.* (2020) yaitu secara vertikal dan horizontal. Pengamatan dilakukan dengan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) tipe JEOL JSM IT 200 10kV. Empat gambar pada perbesaran x 4000 dari masing-masing perlakuan dengan pemotongan vertikal dianalisis dengan *software ImageJ*. Parameter yang diamati meliputi panjang mikrovili (PMv) dan lebar mikrovili (LMv) dalam μm , sedangkan rasio perimeter (RP) dan kerapatan mikrovili (KMv) dalam *arbitrary units* (AU) berdasarkan rumus yang digunakan oleh Dimitroglou *et al.* (2011): Rasio perimeter (AU) = $\text{perimeter internal} / \text{perimeter eksternal} - \text{arbitrary units}$. Kerapatan mikrovili (AU) = $\text{kerapatan mikrovili bagian foreground} / \text{area mikrovili bagian background} - \text{arbitrary units}$.

4.2.5 Analisis asam lemak rantai pendek (SCFA)

Pengukuran asam lemak rantai pendek dilakukan pada hari ke 30 masa pemeliharaan. Analisis kuantitatif dari konsentrasi asam lemak rantai pendek bagian usus dari koleksi sampel ikan segar dilakukan dengan menggunakan HPLC (*high performance liquid chromatography*). Lima ekor ikan dari setiap perlakuan diambil isi ususnya, kemudian digabungkan dalam satu *tube*. Selanjutnya disentrifugasi dan disaring dengan ukuran 0.2 μm . Sebanyak 20 μL supernatan yang dihasilkan diambil dan diinjeksikan secara langsung pada BioRad HPX87H kolom analisis asam organik dan dipisahkan secara isokratis 0-005 mol l^{-1} H_2SO_4 dengan laju aliran 0.5 mL^{-1} . Puncak dianalisis menggunakan detektor ultraviolet dengan panjang gelombang variabel dan dikuantifikasi dengan integrator Hewlett Packard 3392A.

4.2.6 Komposisi mikrobiota usus

Pengukuran komposisi mikrobiota dilakukan pada hari ke 30 masa pemeliharaan. Sampel usus ikan nila tiga ekor/ulangan, diuji dengan NGS (*next generation sequencing*). Permukaan tubuh ikan nila dicuci dan didesinfeksi menggunakan etanol 70%, dibilas akuades steril sebanyak tiga kali, kemudian rongga perut dibuka secara aseptik. Usus ikan nila ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam wadah steril selanjutnya disimpan pada suhu -80 °C sampai diproses lebih lanjut. Selanjutnya sampel dibawa ke laboratorium NovogeneAIT untuk diuji komposisi dan keragaman bakteri pada usus. Tahapan dari uji ini adalah ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, purifikasi, *preparasi library*, dan *quality control*.

Metode sekuensing dilakukan dengan ekstraksi genom DNA dari sampel menggunakan metode CTAB/SDS. Konsentrasi DNA dan kemurniannya diamati dengan gel agarose 1%. DNA diencerkan menjadi 1 ng / μL menggunakan air steril. Amplifikasi dilakukan pada wilayah 16S rRNA/18SrRNA/ITS menggunakan primer spesifik dengan *barcode*. Semua reaksi PCR dilakukan dengan *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (Biolab New England)*. Kuantifikasi dan kualifikasi PCR produk dilakukan dengan mencampur volume yang sama dari 1X *loading buffer* (mengandung *SYB green*) dengan produk PCR dan elektroforesis pada gel agarose 2%. Sampel dengan pita utama pada ukuran antara 400-450 bp dipilih untuk analisis lebih lanjut. Pencampuran dan pemurnian produk PCR dilakukan dengan rasio kesetimbangan (hasil, spesifitas dan ketepatan). Selanjutnya produk campuran PCR dimurnikan dengan *Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Jerman)*. *Preparasi library* dan sekuensing menggunakan *TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA)*, kemudian diukur menggunakan *Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific)* dan *Agilent Bioanalyzer 2100 system*. Selanjutnya, *library* disekuensing menggunakan *platform Illumina HiSeq2500* dengan ukuran 250 bp.

4.2.7 Analisis data

Bobot biomassa awal, bobot biomassa akhir, pertambahan bobot, konsumsi pakan, kelangsungan hidup, laju pertumbuhan spesifik, rasio konversi pakan, mikrovili usus, asam lemak rantai pendek, dan aktivitas enzim

pencernaan dianalisis dengan Anova (*Analysis of Variance*). Apabila ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 95%. Morfologi usus dianalisis secara deskriptif. Uji proteomik dengan NGS, file *fastqfile* diolah menggunakan program bioinformatika QIIME (Caporaso *et al.* 2010).

1.3 Hasil

4.3.1 Kinerja pertumbuhan dan kelangsungan hidup

Data kinerja pertumbuhan ikan nila yang meliputi bobot biomassa awal, bobot biomassa akhir, penambahan bobot, jumlah konsumsi pakan, laju pertumbuhan spesifik, rasio konversi pakan, dan kelangsungan hidup disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 Kinerja pertumbuhan ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan

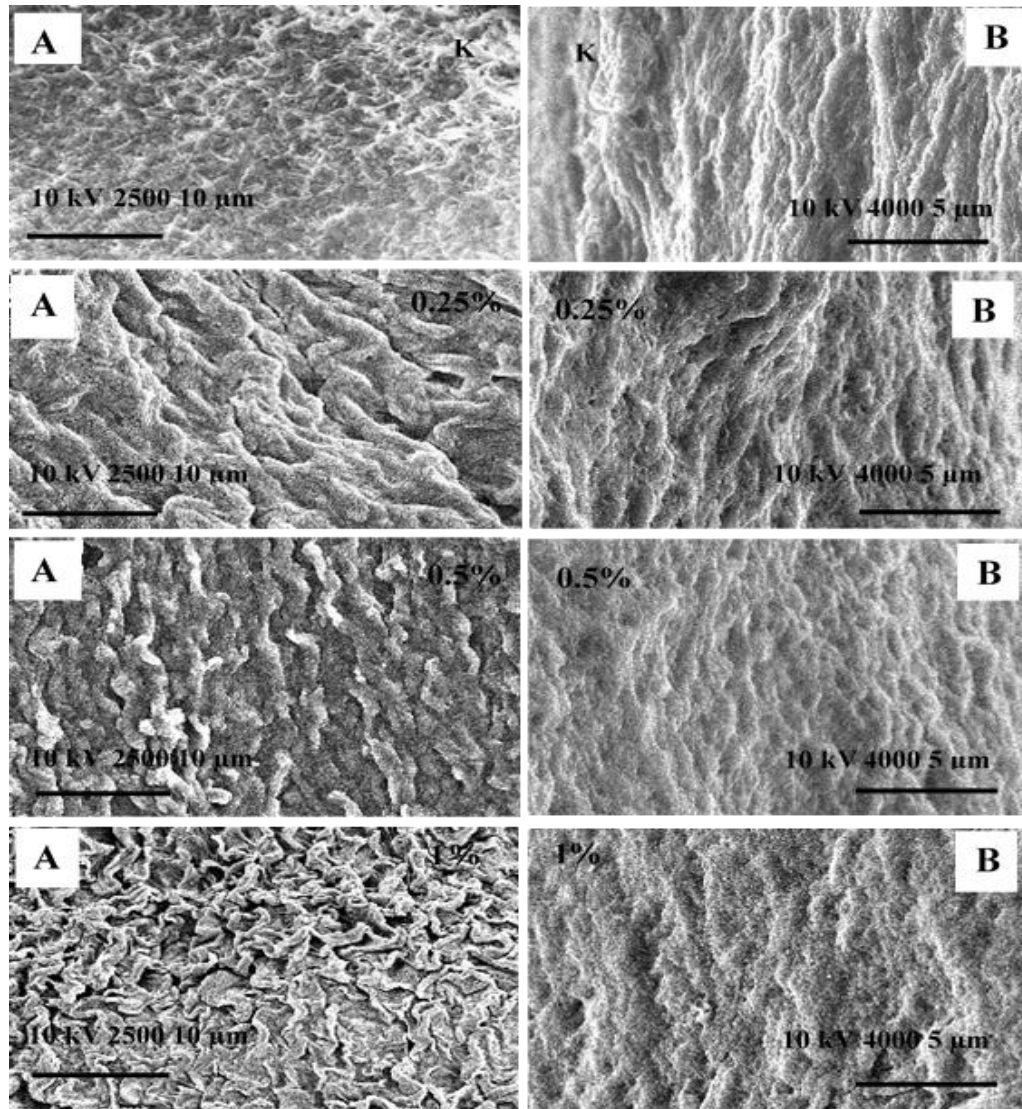
Parameter	Kontrol	Perlakuan		
		0.25%	0.50%	1.00%
W0 (g)	21.20±1.25a	20.60±0.16a	20.40±0.09a	20.60±0.05a
Wt (g)	31.28±1.18c	36±3.60bc	37.33±2.50b	46.66±3.08a
ΔW (g)	10.08±0.59c	15.4±3.69b	16.93±2.69b	26.06±2.44a
KP (g)	466.77±4.45b	492.78±4.03a	500.45±5.72a	500.43±2.83a
LPS (%/hari)	7.69±0.20c	9.05±0.07bc	9.38±0.52ab	10.87±0.30a
RKP	1.2±0.02a	1.057±0.01b	1.027±0.00bc	1.006±0.07c
KH (%)	98%±0.02a	98%±0.02a	96%±0.00a	98%±0.02a

Angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan). W0: Bobot biomassa awal, Wt: Bobot biomassa akhir (W30), ΔW: Pertambahan bobot, KP: Konsumsi pakan, LPS: Laju Pertumbuhan Spesifik, RKP: Rasio Konversi Pakan, KH: Kelangsungan hidup; kontrol (tanpa pemberian prebiotik), prebiotik madu dosis 0.25, 0.5 dan 1%

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa bobot biomassa awal antar perlakuan tidak berbeda nyata ($P>0.05$). Bobot biomassa akhir penelitian yaitu pada hari ke-30 menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$) antar perlakuan, dengan biomassa tertinggi pada perlakuan penambahan prebiotik 1% dan terendah pada perlakuan kontrol. Pertambahan bobot ikan nila menunjukkan beda nyata ($P<0.05$) antar perlakuan, dengan pertambahan bobot tertinggi pada perlakuan penambahan prebiotik 1% dan terendah pada perlakuan kontrol. Konsumsi pakan, laju pertumbuhan spesifik, dan rasio konversi pakan dari semua perlakuan berbeda nyata ($P<0.05$). Kelangsungan hidup untuk semua perlakuan tidak berbeda nyata ($P>0.05$).

4.3.1 Mikrovili usus ikan nila

Pengaruh pemberian prebiotik madu melalui pakan pada mikrovili usus ikan nila menggunakan *Scanning Electron Microscopy* disajikan dalam Gambar 8. Hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan mikrovili usus ikan nila pada perlakuan kontrol dibandingkan dengan perlakuan yang diberi penambahan madu pada pakan. Mikrovili usus ikan nila pada perlakuan pakan dengan penambahan madu lebih panjang dan rapat dibandingkan dengan perlakuan kontrol.



Gambar 8 Mikrovili usus ikan nila yang diberi prebiotik melalui pakan setelah 30 hari pemeliharaan dengan pengamatan SEM. Pemotongan sampel secara horizontal (A) dan vertikal (B). K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%) dan 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

Hasil pengamatan panjang mikrovili (PMv), rasio perimeter (PR), dan kerapatan mikrovili (KMv) dari ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan dengan SEM disajikan pada Tabel 5. Terdapat perbedaan mikrovili usus ikan nila pada perlakuan kontrol dibandingkan dengan perlakuan pemberian prebiotik. Panjang mikrovili, perimeter dan kerapatan mikrovili pada semua perlakuan berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap kontrol.

Tabel 5 Panjang mikrovili (PMv), rasio perimeter (PR) dan kerapatan mikrovili (KMv) usus ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan

Parameter	Kontrol	Perlakuan		
		0.25%	0.50%	1.00%
PMv (μm)	7.00 $\pm$ 0.83b	7.11 $\pm$ 0.78a	7.2 $\pm$ 0.22a	7.55 $\pm$ 0.34a
RP (AU)	2.23 $\pm$ 0.16b	3.32 $\pm$ 0.15a	3.54 $\pm$ 0.38a	3.11 $\pm$ 0.11a
KMv (AU)	2.74 $\pm$ 0.19c	5.24 $\pm$ 0.13b	5.49 $\pm$ 0.01a	5.70 $\pm$ 0.10a

Angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan). Panjang mikrovili (PMv), rasio perimeter (PR), dan kerapatan mikrovili (KMv)

4.3.2 Aktivitas enzim pencernaan

Hasil pengukuran aktivitas enzim amilase, protease, dan lipase pada ikan nila setelah 30 hari pemberian prebiotik madu disajikan pada Tabel 6. Hasil pengukuran aktivitas enzim amilase dan protease menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0.05$) antara perlakuan prebiotik madu dengan kontrol. Nilai tertinggi terdapat pada perlakuan dengan penambahan madu dosis 1% pada pakan dan terendah terdapat pada kontrol. Pengukuran enzim lipase menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) antar perlakuan penambahan madu, namun berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol. Nilai tertinggi terdapat pada perlakuan dengan penambahan madu dosis 1% dan terendah adalah kontrol.

Tabel 6 Aktivitas enzim amilase, protease dan lipase pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan

Enzim (Ug^{-1})	Kontrol	Perlakuan		
		0.25%	0.50%	1.00%
Amilase	47.5 $\pm$ 4.75c	63.3 $\pm$ 4.14bc	85.97 $\pm$ 6.81b	239.4 $\pm$ 3.11a
Protease	11.64 $\pm$ 0.00b	17.72 $\pm$ 8.81ab	16.01 $\pm$ 4.95b	24.24 $\pm$ 1.29a
Lipase	12.28 $\pm$ 3.95b	14.245 $\pm$ 4.24a	14.39 $\pm$ 4.98a	15.494 $\pm$ 1.47a

Angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan). K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

4.3.3 Asam lemak rantai pendek (SCFA)

Hasil pengujian asam lemak rantai pendek (asam asetat, propionat, iso butirrat, N butirrat, iso valerat, N valerat) setelah 30 hari pemberian prebiotik madu disajikan dalam Tabel 7. Pemberian prebiotik madu mampu meningkatkan asam lemak rantai pendek. Asam asetat, propionat, iso butirrat, N-butirat, iso valerat dan N valerat berbeda nyata antar perlakuan ($P < 0.05$).

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

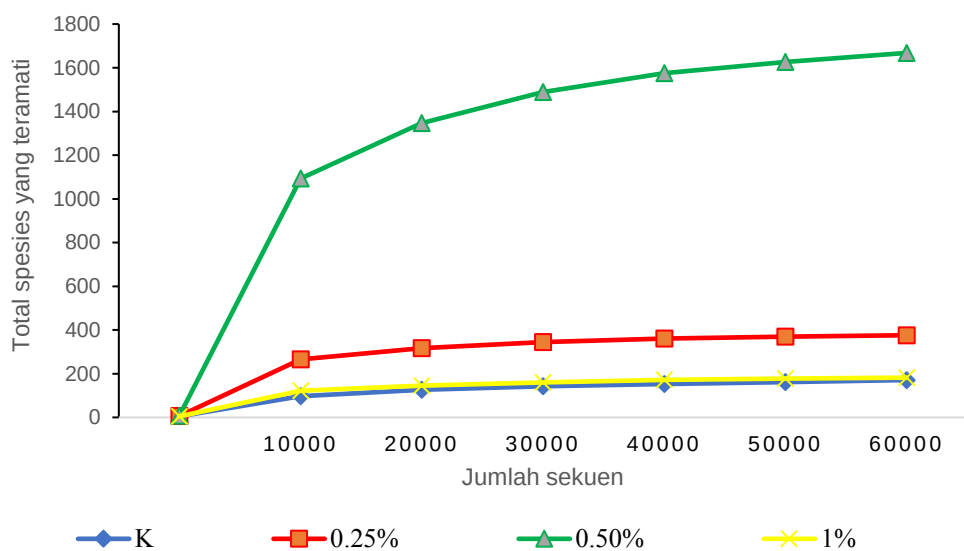
Tabel 7 Kandungan asam lemak rantai pendek (asam asetat, propionat, iso butirrat, N butirrat, iso valerat, N valerat) pada usus ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan

Jenis asam (Mmol)	K	Perlakuan		
		0.25%	0.50%	1.00%
Asetat	10.97±0.75b	16.31±0.92a	12.36±1.38b	12.09±0.23b
Propionat	2.76±0.21d	6.16±0.20b	4.21±0.21c	7.36±0.37a
Iso butirrat	0.97±0.09c	3.23±0.22b	1.2±0.04c	5.56±0.65a
N butirrat	2.58±0.02d	5.37±0.16a	3.05±0.07c	3.91±0.20a
Iso valerat	1.72±0.06d	3.25±0.04b	2.45±0.10c	3.74±0.19a
N valerat	1.21±0.13bc	1.53±0.31ab	1.30±0.05c	1.74±0.05a

Angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan). K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%) dan 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

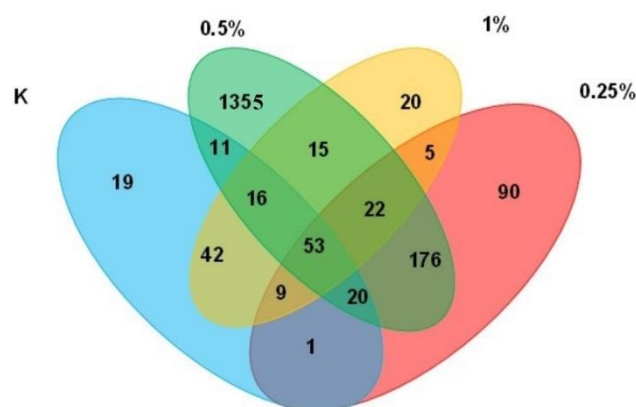
4.3.4 Komposisi mikrobiota usus

Kelimpahan mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1% melalui pakan dan perlakuan pakan tanpa prebiotik sebagai kontrol disajikan dalam Gambar 9. Empat sampel yang dianalisis menghasilkan 2567 sekuen DNA yang selanjutnya teridentifikasi adanya *Operational Taxonomy Unit* (OTU) sebanyak 1854. Total OTU yang terbanyak adalah perlakuan madu 0.5% sebesar 1618 spesies, disusul perlakuan madu 0.25% sebanyak 376, perlakuan madu 1% sebanyak 182, dan kontrol sebanyak 171 OTU.



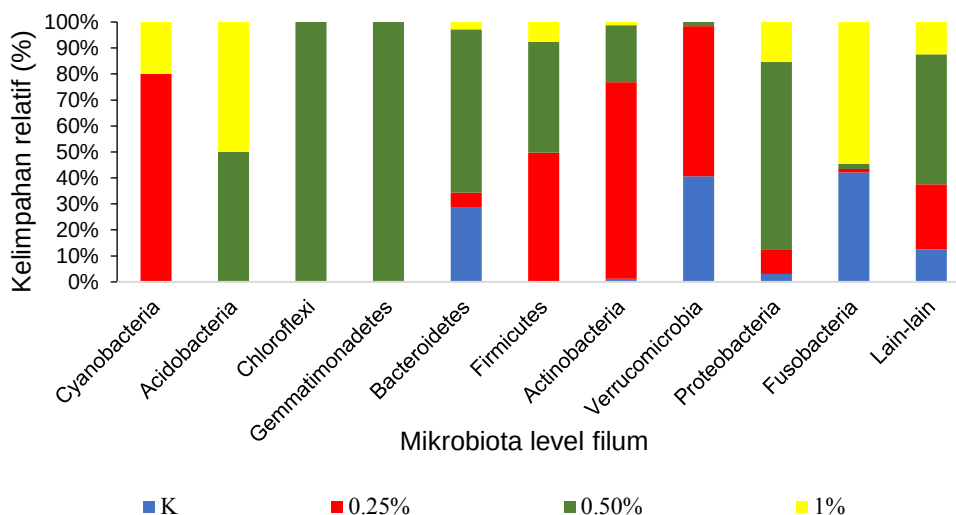
Gambar 9 Kurva kelimpahan mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis yang berbeda. K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

Diagram Venn mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1% melalui pakan dan tanpa prebiotik madu sebagai kontrol disajikan pada Gambar 10. OTU unik dari semua perlakuan (kontrol, perlakuan madu 0.25%, 0.5% dan 1%) berjumlah 1484. OTU unik perlakuan kontrol = 19, perlakuan madu 0.25% = 90, perlakuan madu 0.5% = 1355, dan perlakuan madu 1% = 20.



Gambar 10 Diagram Venn mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda. K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

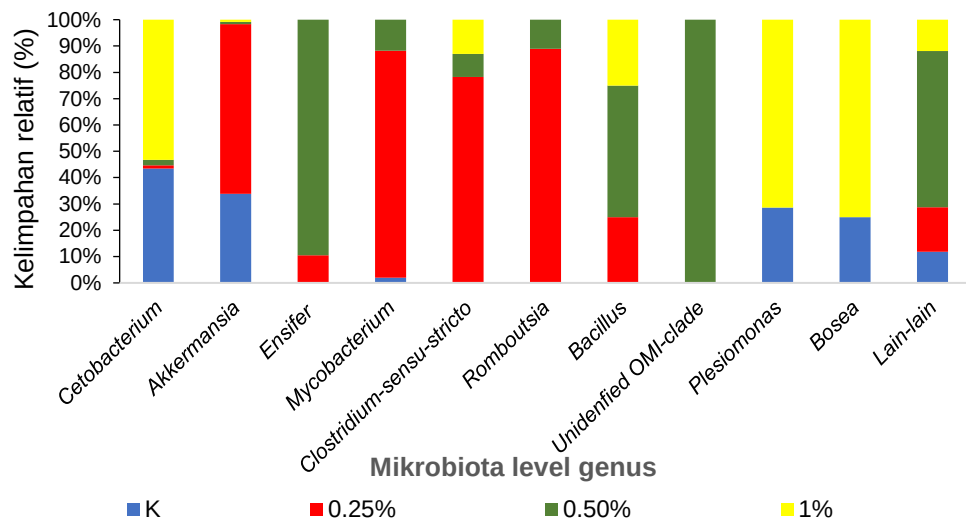
Kelimpahan mikrobiota level filum pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1% melalui pakan dan tanpa prebiotik madu sebagai kontrol disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11 Kelimpahan mikrobiota level filum pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda. K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

Analisis dengan NGS mendapatkan data bahwa mikrobiota pada usus ikan nila tersusun atas 10 filum (*Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Verrumicrobia*, *Proteobacteria*, dan *Fusobacteria*). Dari 10 filum tersebut, hanya lima filum yang ada pada setiap perlakuan (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrumicrobia*, *Proteobacteria*, dan *Fusobacteria*). Persentase filum dominan dari keempat perlakuan adalah *Fusobacteria* ($\geq 38\%$), *Proteobacteria* ($>16.25\%$), *Verrumicrobia* ($>16\%$), *Actinobacteria* ($>10.25\%$), dan *Bacteroidetes* ($>4.375\%$). Lima filum yang lain (*Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, dan *Gemmatimonadetes*) menunjukkan variasi kelimpahan level filum yang hanya ada pada perlakuan penambahan prebiotik madu. *Cyanobacteria* ditemukan pada perlakuan pakan dengan penambahan madu 0.25% dan 1%, *Acidobacteria* hanya ditemukan pada perlakuan pakan dengan penambahan madu 0.5% dan 1%. *Gemmatimonadetes* dan *Chloroflexi* hanya ada pada perlakuan penambahan madu 0.5%, dan *Firmicutes* ditemukan pada semua perlakuan pakan dengan penambahan madu.

Kelimpahan mikrobiota level genus pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1% melalui pakan dan tanpa prebiotik madu sebagai kontrol disajikan pada Gambar 12. Terdapat dua genus yang ditemukan pada semua perlakuan (*Cetobacterium* dan *Akkermansia*). Persentase genus *Cetobacterium* adalah 38% sedangkan *Akkermansia* sebanyak 14.75% dari jumlah OTU yang teridentifikasi. Terdapat dua genus yang hanya ditemukan pada ketiga perlakuan madu dalam pakan yaitu *Clostridium-sensu-stricto* dan *Bacillus*.



Gambar 12 Kelimpahan genus pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda. K (kontrol), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik 1%)

4.4 Pembahasan

Prebiotik adalah bahan makanan yang mengandung karbohidrat yang dapat difermentasi oleh probiotik sehingga menguntungkan kesehatan inang dengan cara memodulasi keseimbangan mikrobiota usus (Roberfoid *et al.* 2010), biasanya berupa FOS, inulin dan beberapa oligosakarida lainnya (Ringo *et al.* 2010). Madu pada dasarnya adalah larutan gula jenuh, terutama fruktosa dan glukosa, disakarida (sukrosa dan maltosa), serta oligosakarida (Viuda-Martos *et al.* 2008). Beberapa oligosakarida yang terkandung dalam madu yakni 1-kestosa, nistosa dan inulobiosa (Jan *et al.* 2010). Madu digunakan dalam penelitian ini karena mengandung prebiotik FOS, GOS dan inulin (Fuandila *et al.* 2019) yang telah banyak diteliti untuk akuakultur dan terbukti meningkatkan kinerja pertumbuhan dan resistansi penyakit.

Beberapa penelitian tentang suplementasi MOS terbukti mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan pada ikan (Dimitroglou *et al.* 2010a; Refstie *et al.* 2010; Sang & Fotedar 2010; Torrecillas *et al.* 2011). Suplemasi FOS sebanyak 2% mampu menaikkan kinerja pertumbuhan ikan nila (El-Gawad *et al.* 2016), sedangkan penelitian Grisdale-Helland *et al.* (2008) menemukan bahwa suplementasi 1% oligosakarida secara signifikan meningkatkan tingkat pencernaan ikan salmon atlantik (*Salmo salar*). Prebiotik akan memberikan lingkungan yang optimal untuk pertumbuhan mikrobiota usus menguntungkan (Poot-Lopez *et al.* 2014).

Nilai RKP yang diperoleh pada perlakuan prebiotik madu signifikan ($P < 0.05$) lebih rendah dibandingkan kontrol (Tabel 4). Hal tersebut disebabkan oleh adanya peran bakteri menguntungkan yang dapat memanfaatkan prebiotik yang terkandung di dalam madu. Menurut Ai *et al.* (2011), bakteri saluran pencernaan berperan dalam dekomposisi nutrien, memberikan bahan aktif secara fisiologis seperti enzim, asam amino dan vitamin pada makroorganisme, sehingga memfasilitasi pemanfaatan pakan dan pencernaan yang lebih baik. Menurunnya nilai RKP disebabkan oleh adanya peningkatan pemanfaatan pakan dalam usus, adanya aktivitas enzim yang dilakukan oleh bakteri probiotik, serta peningkatan aktivitas *gastrointestinal tract* (Aquiano *et al.* 2013), dibuktikan dengan peningkatan aktivitas enzim pencernaan (amilase dan lipase) pada perlakuan pemberian madu yang berbeda nyata dengan perlakuan kontrol ($P < 0.05$) (Tabel 6).

Mikrobiota usus akan memproduksi enzim untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, dan lipase, serta dengan menyediakan faktor pertumbuhan yang diperlukan inang. Enzim amilase dapat menghidrolisis amilum dan membantu pencernaan pada organisme. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim diperoleh data bahwa aktivitas enzim amilase semakin meningkat dengan meningkatnya dosis madu (Tabel 6), aktivitas amilase tertinggi pada penambahan prebiotik madu 1% ($239.4 \pm 3.11 \text{ U g}^{-1} \text{ protein}$). Hal tersebut disebabkan semakin tinggi jumlah madu yang ditambahkan pada pakan, maka semakin besar pula jumlah oligosakarida yang bisa dimanfaatkan oleh mikrobiota usus penghasil enzim eksogen pada ikan nila. Enzim protease mampu menghidrolisis protein menjadi peptida, bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptida menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk metabolisme. Aktivitas protease tertinggi pada prebiotik madu 1% ($24.24 \pm 1.29 \text{ U g}^{-1} \text{ protein}$). Lipase merupakan kelompok enzim yang berfungsi menghidrolisis lemak, monogliserida, digliserida, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Falony *et al.* 2006). Aktivitas lipase pada madu 0.25%, 0.5% dan 1% lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Mikrobiota usus dan enzim yang dihasilkan sangat berkaitan, karena jumlah mikroba usus berbanding lurus dengan enzim yang dihasilkan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Sankari *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa mikrobiota usus dan enzim yang dihasilkan meningkatkan rasio konversi pakan dan kinerja pertumbuhan. Enzim eksogen yang dihasilkan oleh mikrobiota di saluran pencernaan akan membantu enzim endogen inang untuk menghidrolisis nutrisi pada pakan (Hamsah *et al.* 2017), sehingga pakan dapat dimanfaatkan secara maksimal untuk pertumbuhan. Hal tersebut juga terbukti pada penelitian ini bahwa perlakuan penambahan prebiotik madu mampu meningkatkan bobot akhir, pertambahan bobot, dan laju pertumbuhan spesifik ikan nila (Tabel 4). Terdapat korelasi antara peningkatan aktivitas enzim pencernaan dan total bakteri di usus yang mampu meningkatkan pemanfaatan pakan untuk pertumbuhan ikan (Soleimani *et al.* 2012) dan udang (Munaeni *et al.* 2020). Pemberian pakan dengan penambahan madu mampu meningkatkan bobot ikan (Tabel 4), dengan bobot tertinggi pada penambahan madu 1%. Hal ini sesuai dengan penelitian El-Latif *et al.* (2015), bahwa terdapat korelasi antara peningkatan aktivitas enzim pencernaan dan mikrovili karena penambahan prebiotik.

Mikrovili berperan dalam penahanan dan pemanfaatan nutrisi dalam usus. Pemberian madu pada pakan secara signifikan menaikkan panjang mikrovili usus, dengan mikrovili terpanjang pada perlakuan pakan dengan penambahan madu 1%. Semakin tinggi dosis madu, maka mikrovilinya semakin panjang (Tabel 5). Hal tersebut disebabkan semakin tinggi dosis madu yang ditambahkan pada pakan, maka semakin tinggi enzim yang dihasilkan mikrobiota yang akan meningkatkan enzim inang dalam memacu kinerja pertumbuhan inang. Peningkatan jumlah dan panjang mikrovili menyebabkan perluasan area penyerapan di usus yang bermanfaat dalam penyerapan nutrisi sehingga meningkatkan kinerja pertumbuhan inang (Dimitroglou *et al.* 2011; Dimitroglou *et al.* 2010a; Dimitroglou *et al.* 2010b). Rasio perimeter perlakuan pemberian madu pada pakan lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kontrol. Rasio yang tinggi menunjukkan perimeter usus yang tinggi dengan struktur vili yang lebih panjang dan lebih kompleks. Perubahan bentuk morfologi usus yang lebih baik merupakan salah satu faktor dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan indikator dari pemanfaatan pakan yang efektif. Pemberian prebiotik madu pada ikan nila mampu meningkatkan kerapatan mikrovili dan mampu memproduksi lebih banyak struktur mikrovili (Tabel 4), dengan kerapatan tertinggi pada penambahan madu 1%. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Dimitroglou *et al.* (2010) yang telah menambahkan MOS pada pakan ikan nila.

Fermentasi prebiotik yang terjadi di usus menghasilkan SCFA (*short chain fatty acid*), H₂, CO₂, dan CH₄ yang dihasilkan dari glikolisis bakteri anaerob (Metzler-Zebeli *et al.* 2010). Produk akhir dari fermentasi karbohidrat adalah asetat, propionat, butirat, isobutirat, dan isovalerat (Macfarlane & Macfarlane 2003). Hasil uji kandungan asam propionat dan butirat pada perlakuan pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% pada ikan nila (Tabel 7) menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan penelitian yang dilakukan Leenhouders *et al.* (2007) yang menambahkan biji-bijian sereal pada pakan dan Amirkolaie *et al.* (2006) yang menambahkan pati pada pakan ikan nila. SCFA memiliki pengaruh penting dalam mengubah komposisi dan kolonisasi mikrobiota usus, dan sangat berpengaruh terhadap berbagai kondisi kesehatan seperti efek fagositik, antiinflamasi dan antimikroba pada ikan dan mamalia (Liu *et al.* 2014; Allameh *et al.* 2017), serta

memberikan energi dalam pembentukan morfologi usus yaitu meningkatkan panjang mikrovili dan meningkatkan jumlah sel epitel (Dimitroglou *et al.* 2010b).

Perlakuan pemberian prebiotik madu pada pakan memberikan OTU yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 10). Hal tersebut disebabkan kandungan oligosakarida dari madu dapat dimanfaatkan oleh mikrobiota usus. Tingginya OTU unik pada perlakuan penambahan madu 0.5% (1335), diduga karena OTU unik tersebut mampu tumbuh dengan baik pada lingkungan tersebut, sehingga terjadi kesetimbangan antar spesies yang bersama-sama dapat memanfaatkan nutrisi dari oligosakarida madu sehingga semua komponen mikrobiota dapat tumbuh dengan optimal. Namun tingginya OTU unik pada perlakuan penambahan madu dosis 0.5% tidak memberikan kinerja pertumbuhan yang lebih baik karena tidak semua OTU unik yang teridentifikasi merupakan mikrobiota yang menguntungkan yang bermanfaat terhadap kinerja pertumbuhan ikan nila.

Mikrobiota usus memiliki peran penting dalam pencernaan zat makanan kompleks serta dalam mempertahankan status kesehatan inang. Komposisi taksonomi mikrobiota usus ikan akan berubah dengan cepat dalam merespons perubahan kebiasaan makan dan kondisi kesehatan inang (Li *et al.* 2014; Xia *et al.* 2014). Jenis mikrobiota dari filum *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, dan *Fusobacteria* ditemukan pada semua perlakuan pada penelitian ini. *Fusobacteria* adalah komponen utama mikrobiota, diikuti oleh filum *Proteobacteria* pada saluran pencernaan ikan (Larsen *et al.* 2014; van Kessel *et al.* 2011; Di Maiuta *et al.* 2013). Semua perlakuan, baik kontrol maupun perlakuan pakan dengan penambahan madu teridentifikasi adanya kedua filum tersebut. *Actinobacteria* merupakan filum utama yang teridentifikasi pada ikan nila (Gambar 11). Beberapa spesiesnya memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti antibiotik, antitumor, anti parasit, dan enzim (Manivasagan *et al.* 2013). *Actinobacteria* yang bermanfaat diantaranya *Streptomyces* sp. Kemampuannya dalam memproduksi senyawa antagonis dan antimikroba yang potensial dapat dimanfaatkan sebagai probiotik dalam akuakultur (Tan *et al.* 2016).

Semua perlakuan penambahan madu pada pakan teridentifikasi adanya filum *Firmicutes* (Gambar 9). Menurut Ringo *et al.* (2018), sebagian besar *Firmicutes* merupakan kandidat bakteri probiotik pada saluran pencernaan. Kehadiran bakteri probiotik tersebut karena kemampuannya untuk memanfaatkan oligosakarida dari madu yang ditambahkan pada pakan. Beberapa genus dari famili *Firmicutes* seperti *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Streptococcus* sering digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur (Tyagi & Singh 2017). Satu persen dari keseluruhan OTU yang teridentifikasi adalah genus *Bacillus*, diantaranya adalah *B. funiculus*, *B. coagulans*, *B. aerophilus*, *B. aryabhattai*, *B. agaradherens*, dan *B. cellulanlycun*. *Bacillus* merupakan genus bakteri yang telah sering digunakan sebagai probiotik (Mingmongkolchai & Panbangred 2018).

Genus *Clostridium sensu stricto* mempunyai kemampuan untuk memanfaatkan berbagai polisakarida, seperti selulosa, xilan dan hemiselulosa, yang merupakan bagian utama dari serat tumbuhan secara sakarolitik, fermentasi serat, dan juga proteolitik (Li *et al.* 2015). Genus *Clostridium sensu stricto* yang teridentifikasi pada semua perlakuan penambahan madu sebanyak 2.87%. *Clostridium* adalah bakteri komensal dan kemoorganotropik yang mampu memfermentasi berbagai nutrisi, seperti karbohidrat, protein, asam organik, dan bahan organik lainnya, untuk menghasilkan asam asetat, asam propionat, asam

butirat, dan beberapa pelarut, seperti aseton dan butanol yang akan menghasilkan asam lemak rantai pendek (SCFA) dari fermentasi karbohidrat (Guo *et al.* 2020).

Penambahan prebiotik madu pada pakan mampu meningkatkan jumlah bakteri probiotik dan merubah komposisi mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila (Gambar 13), yang berkorelasi dengan kinerja pertumbuhan (Tabel 4) dan berkaitan dengan morfologi usus ikan nila (Tabel 5). Jumlah *Cetobacterium* pada pemberian pakan dengan penambahan madu dosis 1% mengalami kenaikan. Hal tersebut disebabkan karena dosis madu 1% merupakan dosis madu terbesar sehingga dosis 1% madu mengandung oligosakarida yang terbanyak, yang tentu saja berpengaruh terhadap populasi probiotik. Pada perlakuan pemberian pakan dengan penambahan madu 1%, *Cetobacterium* dapat tumbuh dengan baik dibandingkan dengan genus yang lain karena mampu memanfaatkan oligosakarida madu dengan baik. Menurut Musatto & Manchilha (2007), bakteri probiotik mampu menfermentasi oligosakarida yang terkandung pada madu sebagai substrat untuk pertumbuhan dan menghambat bakteri patogen. Penggunaan prebiotik merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan pertumbuhan mikrobiota yang menguntungkan pada mukosa saluran pencernaan, memperbesar peluang menempelnya bakteri menguntungkan dari kelompok bakteri asam laktat, seperti *bifidobacteria* dalam saluran pencernaan ikan (Wu *et al.* 2014).

Mycobacterium adalah salah satu bakteri patogen pada ikan. Spesies dari genus *Mycobacterium* yang paling banyak menyerang ikan adalah *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* dan *Mycobacterium chelonae* (Kusar *et al.* 2016). Pada perlakuan pakan dengan penambahan madu 1% tidak ditemukan adanya genus *Mycobacterium* seperti pada kontrol dan dosis madu 0.25% dan 0.5%. Hal tersebut disebabkan karena oligosakarida menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yaitu secara tidak langsung mencegah perlekatan dan kolonisasi bakteri patogen pada usus (Song *et al.* 2014; Rodriguez-Estrada *et al.* 2013).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian prebiotik madu randu dengan dosis 1% pada pakan nila mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan memberikan rasio konversi pakan lebih rendah, meningkatkan aktivitas enzim pencernaan (amilase, protease, dan lipase), meningkatkan panjang, rasio perimeter dan kerapatan mikrovili usus, meningkatkan asam lemak rantai pendek, memicu munculnya Genus *Bacillus* dan *Clostridium-sensu-stricto*, meningkatkan keragaman mikrobiota yang berpotensi sebagai probiotik yaitu *Cetobacterium*, serta mereduksi genus *Mycobacterium*.

4.5 Simpulan

Pemberian prebiotik madu randu melalui pakan pada ikan nila mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan, memberikan rasio konversi pakan lebih rendah, meningkatkan aktivitas enzim pencernaan, meningkatkan panjang, rasio perimeter, dan kerapatan mikrovili usus, meningkatkan asam lemak rantai pendek, memicu munculnya Genus *Bacillus* dan *Clostridium-sensu-stricto* dan meningkatkan keragaman mikrobiota yang berpotensi sebagai probiotik yaitu *Cetobacterium*, dengan dosis terbaik pada pemberian madu 1%.

V EFEKTIVITAS PREBIOTIK MADU RANDU UNTUK MENINGKATKAN KERAGAMAN MIKROBIOTA SALURAN PENCERNAAN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*), IMUNITAS, DAN PROTEKSI TERHADAP INFEKSI *Streptococcus agalactiae*

ABSTRAK

Salah satu metode untuk meningkatkan imunitas ikan adalah dengan pemberian prebiotik. Madu memiliki kandungan utama berupa oligosakarida yang bisa dimanfaatkan sebagai prebiotik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa prebiotik dapat memicu sistem imun ikan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi efektivitas prebiotik madu randu yang diberikan melalui pakan untuk meningkatkan keragaman mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*), imunitas, dan proteksi terhadap infeksi *Streptococcus agalactiae*. Penelitian menggunakan empat perlakuan yaitu kontrol (pakan tanpa penambahan madu) dan pakan dengan penambahan madu dosis 0.25%, 0.5%, dan 1%. Ikan nila dengan ukuran 20 ± 1.72 g dipelihara dengan pakan perlakuan selama 30 hari. Selanjutnya ikan nila diuji tantang dengan bakteri *S. agalactiae* pada kepadatan sel 10^5 CFU mL⁻¹ sebanyak 0.1 mL / ekor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian prebiotik madu melalui pakan mampu meningkatkan *respiratory burst*, lisozim, ekspresi gen IL8 dan TNF α , serta menekan jumlah *S. agalactiae* di organ target, dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan nila ketika diinfeksi *S. agalactiae*. Hasil pengamatan organ hati dan limpa ikan nila setelah uji tantang menunjukkan pada perlakuan kontrol positif mengalami kerusakan yang lebih parah dibanding pada perlakuan pemberian prebiotik madu. Perlakuan prebiotik madu dosis 1% yang diuji tantang *S. agalactiae* menghasilkan OTU lebih banyak dengan OTU dominan adalah genus *Cetobacterium*.

Kata kunci: Gen imun, lisozim, kelangsungan hidup, organ target, *respiratory burst*

ABSTRACT

One method to increase fish immunity is by giving prebiotics. Honey has the main content in the form of oligosaccharides which can be used as prebiotics. Several studies have reported that prebiotics can trigger the immune system of fish. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the prebiotic kapok honey dietary through feed on immunity, protection and microbiota diversity in the digestive tract of tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae* infection. The study used four treatments, namely control (feed without adding honey) and feed with the addition of honey with doses of 0.25%, 0.5%, and 1%. Tilapia weighing 20 ± 1.72 g were reared with treated feed for 30 days. Furthermore, tilapia were challenged with *S. agalactiae* bacteria at cell density of 10^5 CFU mL⁻¹ was 0.1 mL / fish. The results showed that the prebiotic honey through feed was able to increase respiration burst, lysozyme, IL8 and TNF α gene expression, and

suppress the amount of *S. agalactiae* in target organs, and increase the survival of tilapia when infected with *S. agalactiae*. The results of observation of the liver and spleen of tilapia after the challenge test showed that the positive control treatment had more severe damage than the prebiotic honey treatment. The prebiotic treatment of 1% dose of honey tested against *S. agalactiae* produced more OTU with the dominant OTU of the genus *Cetobacterium*.

Keywords: Immune genes, lysozyme, respiratory burst, survival, target organs

5.1 Pendahuluan

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu komoditas utama pada perikanan budidaya di sebagian besar belahan dunia karena mudah dibudidayakan dan mampu beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan serta toleran terhadap padat penebaran yang tinggi (Pech *et al.* 2016). Produksi ikan nila dunia menempati urutan ketiga dengan total produksi mencapai 4 525.4 ribu ton atau 8.3% dari total produksi ikan budidaya di dunia (FAO 2020). Peningkatan produksi didukung oleh intensifikasi produksi dan perluasan area budidaya. Akan tetapi penerapan sistem budidaya intensif dengan padat tebar yang tinggi menyebabkan penurunan kualitas air dan meningkatkan stres pada ikan, sehingga mengakibatkan ikan mudah terserang penyakit (Kennedy *et al.* 2016).

Salah satu penyakit pada budidaya ikan nila yang dapat menimbulkan kerugian cukup tinggi adalah penyakit streptococcosis yang antara lain disebabkan oleh infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* (Ye *et al.* 2011). Penyakit ini menjadi kendala utama dalam budidaya ikan nila (Kayansamruaj *et al.* 2017; Shoemaker *et al.* 2017), bisa menimbulkan kematian hingga 90 % (Ye *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). *S. agalactiae* adalah bakteri Gram positif, nonspora, fakultatif anaerob, katalase negatif, homofermentatif dan memerlukan nutrisi yang kompleks (Chen *et al.* 2012). Pada ikan, bakteri ini dapat mengakibatkan radang otak, dengan gejala lain yaitu pendarahan dan luka pada tubuh bagian luar dengan cairan yang berlebihan, bintik merah di bagian operkulum, penumpukan cairan di bagian pectoral, sirip ekor serta mulut, mata menonjol, adanya gas dan cairan yang menumpuk di bagian perut, serta nanah muncul di sekitar operkulum (Osman *et al.* 2017).

Salah satu alternatif pengendalian untuk mengatasi serangan penyakit tersebut adalah dengan penggunaan prebiotik (Ringo *et al.* 2010). Prebiotik adalah bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh inang, namun memberikan efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri menguntungkan di dalam usus sehingga menyehatkan inang (Cerezuela *et al.* 2011). Bahan pangan yang tidak tercerna biasanya berupa oligosakarida seperti fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), serta inulin (Sanz *et al.* 2005), yang mempunyai sifat tidak dapat dihidrolisis oleh asam lambung, namun dapat difermentasi oleh probiotik di usus. Beberapa hasil penelitian menunjukkan prebiotik mampu meningkatkan pertumbuhan, kelangsungan hidup, kecernaan pakan, efisiensi pakan, komposisi mikroflora dalam usus, menghambat pertumbuhan patogen, dan meningkatkan imunitas ikan (Merrifield *et al.* 2010). Pemberian prebiotik mampu meningkatkan regulasi gen-gen terkait dengan imunitas dan resistansi penyakit (Ringo *et al.* 2010; Song *et al.* 2014). Prebiotik berpengaruh langsung terhadap efisiensi komunitas mikroba di usus, yang dapat

memberikan efek positif bagi pertumbuhan dan kesehatan inang, serta merupakan indikator khusus untuk menjelaskan potensi aplikasi prebiotik.

Asam lemak rantai pendek seperti asam butirat, asam asetat dan asam propionat yang dihasilkan dari fermentasi prebiotik oleh mikrobiota usus mempunyai fungsi khusus untuk pertumbuhan dan kesehatan inang, dan berbagai produk akhir pemanfaatan prebiotik sangat bergantung pada keanekaragaman mikrobiota usus (Guerreiro *et al.* 2016; Teitelbaum 2009). Pemberian sodium butirat pada *Ctenopharyngodon idella* selama 60 hari terbukti mampu menginduksi penurunan regulasi dari sitokin proinflamasi TNF α , IFN γ , IL1b, IL6, IL8, IL15, IL17D, IL 12p35 dan IL 12p40, ada peningkatan regulasi sitokin antiinflamasi IL10, IL11, TGFb1, TGFb2, IL4 / 13A dan IL4 / 13B (Tian *et al.* 2017). Selain itu, matriks butirat mikroenkapsulasi (MSB) secara signifikan berkorelasi dengan ekspresi HSP70 usus, sitokin proinflamasi (termasuk IL1b dan TNF α) dan sitokin antiradang (TGFb) dalam setiap segmen usus, kecuali untuk HSP70 di usus bagian distal dan IL1b di bagian depan ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Liu *et al.* 2014). Prebiotik memberikan stimulasi kekebalan dan resistansi terhadap penyakit (Zang *et al.* 2014; Ai *et al.* 2011; El-Latif *et al.* 2015). Mannanooligosakarida (MOS) yang dikombinasikan dengan β -glucan meningkatkan performa pertumbuhan, imunitas, dan resistansi penyakit pada timun laut (Gu *et al.* 2011).

Prebiotik yang dapat menginduksi imunitas disebut imunosakarida, akan mengaktifasi sistem imun bawaan. Prebiotik akan mengaktifasi sistem imun bawaan dengan dua cara yaitu mengaktifasi sistem imun bawaan inang secara langsung dan tidak langsung yaitu dengan meningkatkan bakteri probiotik dalam usus (Song *et al.* 2014). Aktivasi secara langsung yaitu karbohidrat berinteraksi langsung dengan reseptor yang dimiliki inang yang kemudian menginduksi sistem imun inang. Aktivitas imunomodulasi dari prebiotik dimediasi reseptor seperti β -glucan dan dectin-1. Aktivitas interaksi ligan ini memberikan sinyal molekul transduksi seperti NF-kB, yang menstimulasi sel imun (Bron *et al.* 2012). Beberapa jenis prebiotik yang banyak diteliti dan diaplikasikan pada berbagai jenis ikan diantaranya fruktooligosakarida (FOS), *short chain* fruktooligosakarida (scFOS), mannanooligosakarida (MOS), galaktooligosakarida (GOS), arabinoxyloligosakarida (AXOS), isomaltooligosakarida (IMO), dan inulin (Ringo & Song 2016). Berbagai prebiotik ini tersedia komersial sebagai prebiotik tunggal sehingga mikroflora yang dapat terstimulasi pertumbuhannya relatif terbatas, sehingga sangat diperlukan untuk menemukan satu bahan yang memiliki beberapa jenis prebiotik.

Madu adalah salah satu sumber prebiotik (Tian *et al.* 2010). Kandungan utamanya adalah oligosakarida yang terdiri dari fruktooligosakarida dan glukooligosakarida, serta mempunyai banyak sekali komponen mikro (Viuda-Martos *et al.* 2008). Madu memiliki beberapa fungsi diantaranya sebagai antibakteri, antioksidan, antitumor, antiradang, dan antiviral (Ramadan & Al-Ghamdi 2012). Oligosakarida madu dan komponen antibakterial secara sinergis mampu meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas probiotik dalam melawan patogen (Mohan *et al.* 2017). Polen lebah madu yang ditambahkan pada pakan telah diteliti mampu meningkatkan laju pertumbuhan dan imunitas non spesifik, serta mengendalikan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila (El-Asely *et al.* 2014).

Sejauh ini belum ada penelitian terkait penggunaan madu pada ikan nila terutama pengaruhnya terhadap imunitas proteksi dan keragaman mikrobiota

saluran pencernaan ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*. Dengan demikian, tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi efektivitas pemberian prebiotik madu melalui pakan terhadap imunitas, proteksi dan keragaman mikrobiota saluran pencernaan ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*.

5.2 Bahan Dan Metode

5.2.1 Pemeliharaan dan Percobaan Pakan Uji pada Ikan Nila

Penelitian ini menggunakan madu randu, yaitu madu terbaik berdasarkan uji aktivitas prebiotik yang sudah dilakukan dari beberapa jenis madu yang diteliti sebelumnya. Madu randu diperoleh dari Pusat Perlebahan Sukatani Depok, Jawa Barat. Penelitian menggunakan empat perlakuan yaitu kontrol (tanpa penambahan madu) dan pakan dengan penambahan madu dosis 0.25% (2.5 g Kg⁻¹ pakan), 0.5% (5 g Kg⁻¹ pakan), dan 1% (10 g Kg⁻¹ pakan). Setiap perlakuan diulang empat kali. Setelah ikan nila dipelihara selama 30 hari (hari ke-30), ikan diuji tantang dengan suspensi *S. agalactiae* secara intramuskular sebanyak 0.1 mL ekor⁻¹ pada konsentrasi 10⁵ CFU mL⁻¹ yang merupakan dosis LD₅₀ (Taukhid 2009), sedangkan ikan nila pada kontrol negatif diinjeksi dengan *phosphate buffer saline* (PBS).

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pakan yang mengandung madu dibuat dengan cara mencampurkan madu dan putih telur (sebagai perekat) sebanyak 2.0 % pada pakan sesuai perlakuan, dengan cara *dispray*. Sebelum diberikan ke ikan, pakan dikeringudarkan terlebih dahulu selama 10-15 menit.

Ikan nila yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan nila ukuran 10±0.24 cm dan berat 20.9±1.72 g yang berasal dari Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Depok, Jawa Barat. Sebelum diberi perlakuan dengan pakan uji, ikan diaklimatisasi selama satu minggu pada bak fiber volume 500 L. Selanjutnya 320 ekor ikan dipelihara selama 30 hari dalam wadah pemeliharaan berupa akuarium ukuran 100 x 60 x 60 cm³ (volume 60 L) sebanyak 16 buah dengan padat tebar 20 ekor per akuarium. Pemberian pakan dilakukan secara satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 18.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kondisi kualitas air selama pemeliharaan berada pada kisaran suhu 28 - 30 °C, DO 4 - 6 mg L⁻¹, pH 6.5 - 7.5, TAN 0.1 - 0.5 mg L⁻¹ sesuai dengan SNI 6141.2:2009.

5.2.2 Imunitas Ikan Nila Terhadap Infeksi *S. agalactiae*

Parameter imunitas yang diukur meliputi *respiratory burst* dan lisozim. Respons imun diukur pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-10, hari ke-20, hari ke-30 (sebelum uji tantang), hari ke-32 (setelah uji tantang), hari ke-35 (5 hari setelah uji tantang), dan hari ke-37 (7 hari setelah uji tantang).

5.2.3 Respiratory Burst

Pengukuran *respiratory burst* berdasarkan reduksi NBT (nitrobluetetrazolium) sebagai ukuran superoxide anion (O₂⁻) (Anderson & Siwicki 1995). Sebanyak 50 µL darah diinkubasi selama satu jam pada suhu 37

°C. Selanjutnya darah dibuang dan dibilas menggunakan PBS pH 7.4. Kemudian ditambahkan 100 µL NBT 0,2% dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Larutan NBT dibuang dan ditambahkan 100 µL metanol absolut selama 10 menit. Selanjutnya metanol dibuang dan dibilas dengan metanol 30% yang dilarutkan dalam PBS pH 7.4. Selanjutnya 60 µL KOH (1M) dan 70 DMSO (dimethylsulfoxide) ditambahkan pada sampel. Aktivitas *respiratory burst* diukur dengan mengukur *optical density* (OD) menggunakan ELISA reader tipe *Multiscan Go Thermo Scientific* pada panjang gelombang 540 nm.

5.2.4 Aktivitas Lisozim (Ellis 1990)

Plasma (10 µL) ditambahkan suspensi cair bakteri *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) sebanyak 190 µL (0,02 gr *M. lysodeikticus* ditambah 0,6 gr Na₂H₂PO₄ dalam 100 mL akuades steril pada suhu 25 °C). Pembacaan dilakukan dengan ELISA reader tipe *Multiscan Go Thermo Scientific* (λ 530) setelah 30 detik dan 4.5 menit. Konsentrasi lisozim dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi lisozim (UI/ml/menit)} = [(\text{OD}_{30s} - \text{OD}_{4.5m}) \times 1000] \times (1 / t \times s)$$

Keterangan:

- 1000 = Konversi hasil absorbansi (OD) menjadi unit internasional (UI)
- t = waktu (menit)
- s = jumlah plasma (mL)
- OD_{30s} = Pembacaan optikal densitas detik ke-30
- OD_{4.5m} = Pembacaan optikal densitas menit ke-4.5

5.2.5 Ekspresi Gen Imun Terkait Imunitas

Uji ekspresi gen terkait imunitas dilakukan pada hari ke-10, hari ke-30, hari ke-32 (setelah uji tantang), hari ke-35 (5 hari setelah uji tantang). Ikan nila dari tiap perlakuan dipuasakan selama 18 jam sebelum sampel diambil. Sampel yang digunakan adalah ginjal ikan nila. Total RNA diisolasi masing-masing dari 3 ekor ikan per ulangan, menggunakan reagen *TRIzol (easy RED™, iNtRON Biotechnology, Korea)*, sesuai dengan protokol. Integritas dan kualitas RNA diverifikasi menggunakan *NanoDrop ND1000 (Thermo scientific, USA)*. Untuk reverse transkripsi PCR, 1 µg dari total RNA digunakan untuk sintesis komplemen DNA (cDNA). Selanjutnya cDNA dianalisis ekspresi gennya menggunakan mesin real time PCR. Ekspresi gen yang diukur adalah IL8 dan TNFα menggunakan *Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)*. Susunan primer *forward* dan *reverse* untuk ekspresi gen yang diukur disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8 Susunan primer *forward* dan *reverse* gen-gen terkait dengan imunitas

Gen	Primer	Referensi
IL8 f	GCACTGCCGCTGCATTAAG	Ming <i>et al.</i> 2013
IL8 r	GCAGTGGGAGTTGGGAAGAA	
TNFα f	GGTTAGTTGAGAAGAAATCACCTGCA	Praven <i>et al.</i> 2006
TNFα r	GTCGTCGCTATTCCTGCAGATCA	
β-actin f	CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG	Pang <i>et al.</i> 2013
β-actin r	TGTGTGGTGTGTGGTTGTTTTG	

Selanjutnya, *quantitative real-time* PCR (qRT-PCR) dikerjakan dengan *SensiFast™ SYBR Lo-Rox kit* (Bioline, United Kingdom) dan *Stratagene MX3000P real-time PCR system*. Campuran reaksi terdiri atas 10 ml dari *SensiFast™ SYBR Lo-Rox*, 0.5 μM setiap primer dan 2 mL dari cDNA. Siklus qRT-PCR adalah 95 °C selama 10 menit, diikuti 40 siklus pada 95 °C selama 15 detik, *annealing* dilakukan selama 1 menit pada suhu 60 °C untuk IL8, sedang untuk TNFα pada suhu 57 °C.

Sinyal fluorescen diukur pada *annealing/extension step*. Analisis kurva disosiasi dimulai pada suhu 65 °C dan berakhir pada suhu 95 °C, dengan tambahan kenaikan dari 0.5 °C setiap 5 detik untuk memvalidasi spesifik amplikon PCR. Untuk seluruh gen yang diuji, analisis kurva disosiasi hanya ditunjukkan pada satu puncak yang ada yang berhubungan dengan temperatur pencairan yang mengindikasikan bahwa PCR diamplifikasi secara spesifik. Reaksi dilakukan rangkap dua atau rangkap tiga. Sejumlah transkrip gen target dinormalkan ke transkrip β-actin. Siklus ambang batas (Ct) berdasar pada kuantifikasi relatif dari seluruh gen dianalisa dengan formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen 2001).

$$\Delta\Delta C_t = C_t(\text{target}) - C_t(\beta\text{-aktin}) \text{ perlakuan} - (C_t(\text{target}) - C_t(\beta\text{-aktin kontrol})).$$

5.2.6 Jumlah *S. agalactiae* di Organ Target

Jumlah *S. agalactiae* di organ target dilakukan setelah uji tantang (hari ke-32). Untuk mengetahui jumlah *S. agalactiae* pada organ target dilakukan dengan menggunakan metode cawan sebar (Madigan *et al.* 2011). Sampel adalah organ target berupa limpa, hati, ginjal, otak, dan usus ikan dari setiap perlakuan. 0.1 gr sampel ditimbang, digerus, dan dimasukkan dalam 10 mL PBS diencerkan secara bertingkat, kemudian ditanam 0.1 μL pada media agar *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA). Inkubasi dilakukan selama 24-48 jam kemudian dihitung banyaknya koloni yang tumbuh.

$$\text{Total bakteri} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengencer}} \times \frac{1}{\text{sampel (mL)}}$$

5.2.7 Histopatologi Hati Dan Limpa

Histopatologi hati dan limpa dilakukan setelah uji tantang (hari ke-32). Jaringan hati dan limpa diambil, kemudian difiksasi dengan larutan *Davidson* selama 24-72 jam (Gomes *et al.* 2015). Selanjutnya dipotong dengan ukuran 1x1

cm dengan ketebalan 3-5 mm, dilanjutkan dengan tahap *dehydration*, *clearing*, *embedding*, *blocking paraffin*, *sectioning*, dan *staining*. Pewarnaan menggunakan *haematoxylin* dan *eosin* (H&E). Selanjutnya diamati dengan mikroskop pada perbesaran 40x.

5.2.8 Resistansi Ikan Nila terhadap *S. agalactiae*

Resistansi ikan nila diukur berdasarkan kelangsungan hidup setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. Kelangsungan hidup dihitung pada akhir uji tantang (Dehaghani *et al.* 2015).

5.2.9 Komposisi Mikrobiota Saluran Pencernaan Pasca Uji Tantang

Komposisi mikrobiota usus pasca uji tantang dilakukan setelah uji tantang (hari ke-32). Sampel usus ikan nila sebanyak tiga ekor per ulangan pada kontrol positif dan perlakuan pemberian prebiotik madu dosis 1% (perlakuan pemberian prebiotik madu dosis tertinggi diuji dengan *next generation sequencing* (NGS). Permukaan tubuh ikan nila dicuci dan didesinfeksi menggunakan etanol 70% kemudian dibilas akuades steril sebanyak tiga kali, kemudian rongga perut dibuka secara aseptik. Usus ikan nila ditimbang sebanyak 5 g usus dan dimasukkan ke dalam wadah steril selanjutnya disimpan pada suhu -80 °C sampai diproses lebih lanjut. Selanjutnya sampel dibawa ke laboratorium NovogeneAIT untuk diuji komposisi dan keragaman bakteri pada usus. Tahapan dari uji ini adalah ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, purifikasi, preparasi *library*, dan *quality control*.

Metode sekuensing dilakukan dengan ekstraksi genom DNA dari sampel menggunakan metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide/Sodium Dodecyl Sulfat* (CTAB/SDS). Konsentrasi DNA dan kemurniannya diamati dengan gel agarose 1%. DNA diencerkan menjadi 1ng μL^{-1} menggunakan air steril. Amplifikasi dilakukan pada wilayah 16S rRNA/18SrRNA/ITS menggunakan primer spesifik dengan *barcode*. Semua reaksi PCR dilakukan dengan Phusion® *High-Fidelity PCR Master Mix* (Biolab New England). Kuantifikasi dan kualifikasi PCR produk dilakukan dengan mencampur volume yang sama dari 1X *loading buffer* (mengandung *SYBr green*) dengan produk PCR dan elektroforesis pada gel agarose 2%. Sampel dengan strip utama yang cerah antara 400-450 bp dipilih untuk percobaan lebih lanjut. Pencampuran dan pemurnian produk PCR dilakukan dengan rasio kesetimbangan. Selanjutnya produk campuran PCR dimurnikan dengan Qiagen *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Jerman). Preparasi *library* dan sekuensing menggunakan TruSeq® *DNA PCR-Free Sample Preparation Kit* (Illumina, USA), kemudian diukur menggunakan Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Thermo Scientific) dan Agilent *Bioanalyzer 2100 system*. Selanjutnya, *library* disequencing menggunakan platform Illumina HiSeq2500 dengan ukuran 250 bp.

5.2.10 Analisis Data

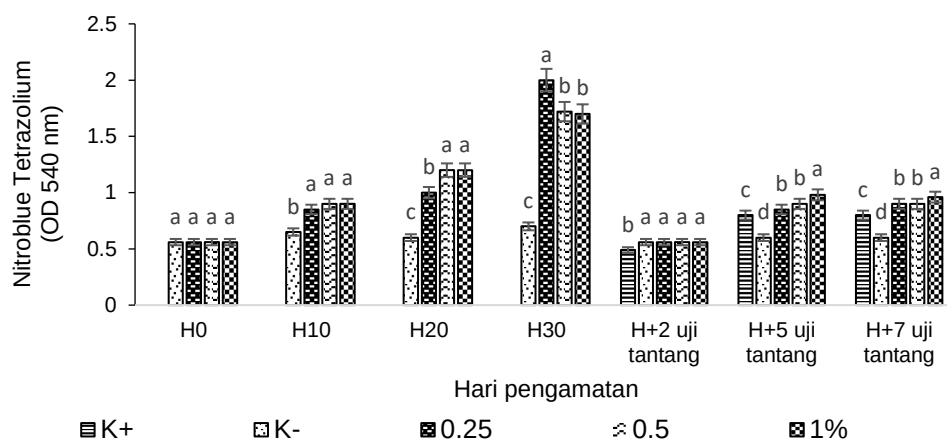
Data imunitas ikan nila, resistansi ikan nila terhadap *S. agalactiae*, dan jumlah *S. agalactiae* pada organ target dianalisis dengan Anova (*Analysis of Variance*). Apabila ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 95%. Parameter histopatologi dianalisis secara

deskriptif. Uji proteomik dengan NGS pada *file fastqfile* diolah menggunakan program bioinformatika QIIME (Caporaso *et al.* 2010).

5.3 Hasil

5.3.1 Respiratory Burst

Selama masa pemeliharaan, nilai *respiratory burst* semua perlakuan madu mengalami peningkatan (Gambar 13). Nilai *respiratory burst* tertinggi setelah perlakuan madu (hari ke-30) adalah pada perlakuan madu dosis 0.25% (2 ± 0.05), berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan madu dosis 1% (1.7 ± 0.02) dan 0.5% (1.7 ± 0.03), serta perlakuan kontrol (0.7 ± 0.013). Aktivitas *respiratory burst* pada hari ke-2 setelah uji tantang menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan setelah perlakuan pemberian madu. Nilai *respiratory burst* hari ke-2 setelah uji tantang tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) antara pemberian prebiotik madu 0.25% sebesar 0.55 ± 0.01 , 0.5% sebesar 0.56 ± 0.01 , 1% sebesar 0.56 ± 0.01 , dan kontrol negatif sebesar 0.51 ± 0.08 , namun berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan kontrol positif (0.49 ± 0.01). Selanjutnya pada hari ke-5 dan ke-7 setelah uji tantang, nilai *respiratory burst* mengalami peningkatan pada semua perlakuan dengan nilai tertinggi pada perlakuan pemberian madu 1%.

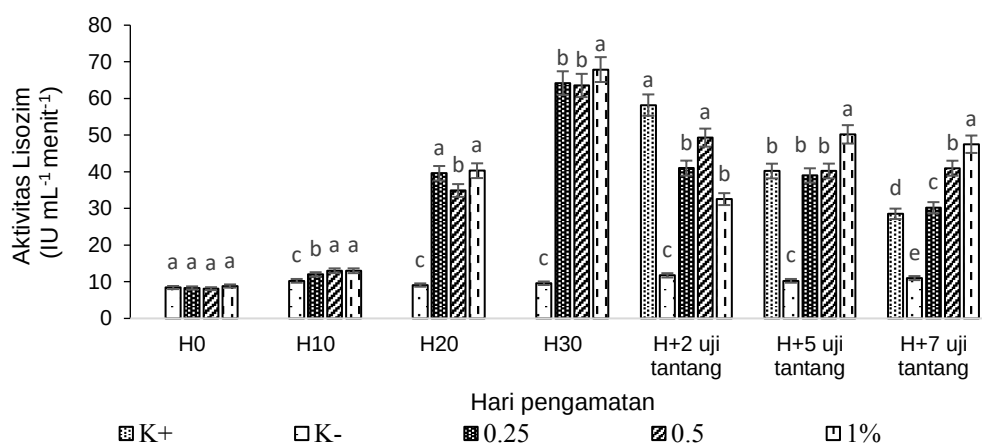


Gambar 13 Nilai aktivitas *respiratory burst* ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis yang berbeda sebelum dan sesudah uji tantang. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1%). Huruf yang berbeda pada periode pengamatan yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$)

5.3.2 Aktivitas Lisozim

Aktivitas lisozim ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda disajikan pada Gambar 14. Aktivitas lisozim ikan nila pada perlakuan pemberian madu signifikan ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan perlakuan kontrol hingga hari ke-30, dengan nilai tertinggi pada pemberian madu dosis 1% sebesar 67.89 ± 2.13 IU mL⁻¹ menit⁻¹. Aktivitas lisozim ikan nila hari ke-2 setelah uji tantang pada perlakuan kontrol positif sebesar 58.2 ± 2.13 IU mL⁻¹ menit⁻¹ dan

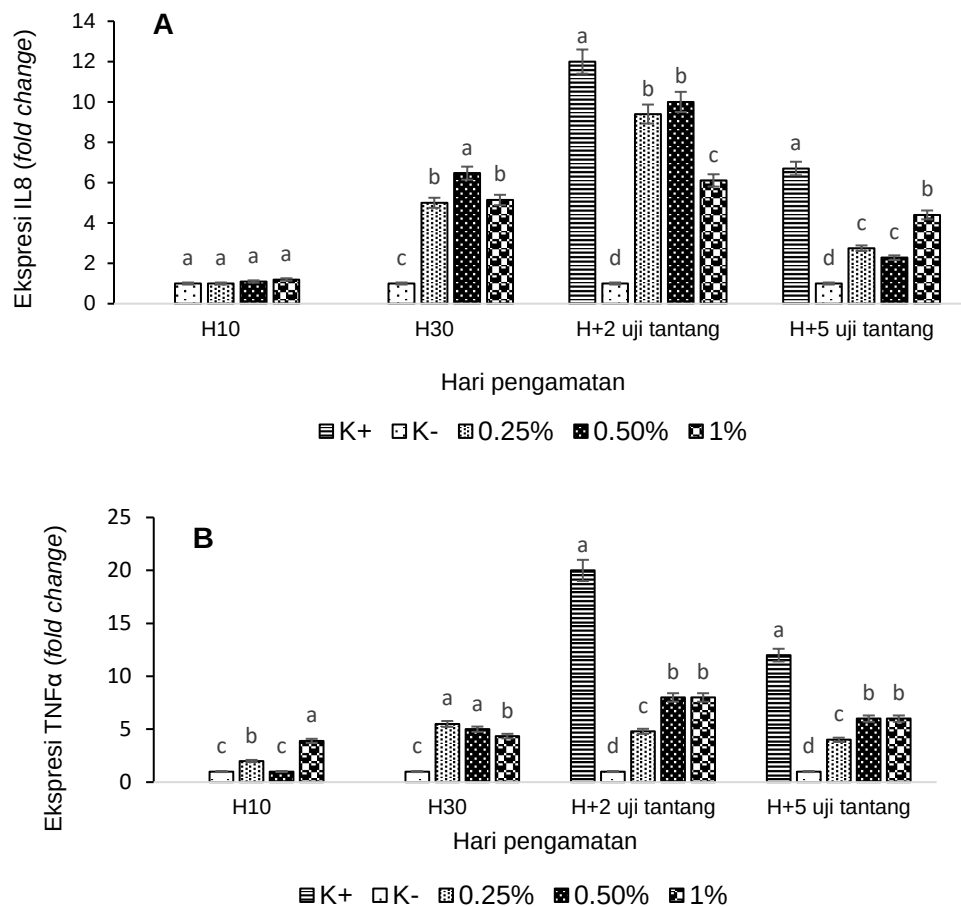
perlakuan pemberian madu 0.5% (49.32 ± 4.23 IU mL⁻¹ menit⁻¹) berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan pemberian madu 0.25% (41.31 ± 2.86 IU mL⁻¹ menit⁻¹) dan 1% (32.55 ± 5.14 IU mL⁻¹ menit⁻¹). Aktivitas lisozim ikan nila hari ke-5 setelah uji tantang pada perlakuan madu 1% berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pemberian madu 0.25% dan 0.5%. Aktivitas lisozim ikan nila hari ke-7 setelah uji tantang pada perlakuan madu 1% berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pemberian madu 0.25% dan 0.5% serta kontrol positif dan kontrol negatif.



Gambar 14 Nilai aktivitas lisozim ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis yang berbeda sebelum dan sesudah uji tantang. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1%). Huruf yang berbeda pada periode pengamatan yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$)

5.3.3 Ekspresi Gen Imun Terkait Imunitas

Ekspresi gen IL8 dan TNF α pada ikan nila yang diberi prebiotik madu melalui pakan selama 30 hari disajikan pada Gambar 15. Gen IL8 terekspresi pada hari ke-30 (sebelum uji tantang), hari ke-2 setelah uji tantang, dan hari ke-5 setelah uji tantang. Pada hari ke-30, ekspresi gen IL8 pada perlakuan pemberian madu dosis 0.5% memberikan nilai tertinggi (6.47 ± 0.08 fold change), berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan pemberian madu dosis 0.25% (5 ± 0.02 fold change) dan perlakuan pemberian madu dosis 1% (5.14 ± 0.30 fold change). Pada hari ke-2 setelah uji tantang, ekspresi gen IL8 perlakuan kontrol positif tertinggi (12 ± 0.25 fold change), berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan pemberian madu dosis 0.25% (9.4 ± 1.21 fold change) dan dosis 0.5% (10 ± 0.45 fold change). Pada hari ke-5 setelah uji tantang, ekspresi gen IL8 perlakuan kontrol positif tertinggi (6.7 ± 0.56 fold change), berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan semua perlakuan pemberian madu. Perlakuan pemberian madu 1% (4.4 ± 0.15 fold change) berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pemberian madu 0.5% (2.28 ± 0.28 fold change) dan 0.25% (2.75 ± 0.07 fold change).



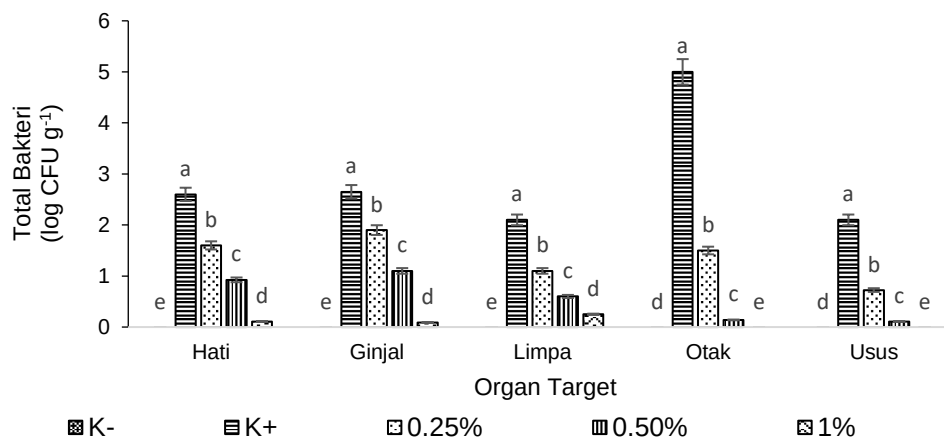
Gambar 15 Ekspresi gen terkait respons imun IL8 (A) dan TNF α (B) ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis yang berbeda sebelum dan sesudah uji tantang. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1%). Huruf yang berbeda pada periode pengamatan yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$)

Gen TNF α terekspresi pada semua periode pengamatan baik sebelum dan sesudah uji tantang. Pada hari ke-30, ekspresi gen TNF α perlakuan pemberian madu dosis 0.25% sebesar 5.5 ± 0.43 fold change dan 0.5% sebesar 5.0 ± 0.21 fold change, tidak berbeda nyata ($P > 0.05$), namun berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan dosis 1% (4.35 ± 0.34 fold change) dan kontrol (1.0 ± 0.12 fold change). Pada hari ke-2 setelah uji tantang, ekspresi gen TNF α tertinggi pada perlakuan kontrol positif (20 ± 2.28 fold change), berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan pemberian madu dosis 0.5% (8.0 ± 1.34 fold change) dan 1% (8.0 ± 0.67 fold change). Perlakuan madu dosis 0.5% dan 1% berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan madu dosis 0.25% (4.8 ± 0.84 fold change). Pada hari ke-5 setelah uji tantang, ekspresi gen TNF α tertinggi pada perlakuan kontrol positif (12 ± 1.31

fold change), berbeda nyata ($P < 0.05$) dibandingkan dengan perlakuan pemberian madu dosis 0.5% (6.0 ± 1.31 *fold change*) dan 1% (6.2 ± 1.31 *fold change*). Perlakuan pemberian madu dosis 0.5% dan 1% berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pemberian madu dosis 0.25% (4.0 ± 0.56 *fold change*), serta kontrol negatif (1.2 ± 0.78 *fold change*).

5.3.4 Total *S. agalactiae* di Organ Target

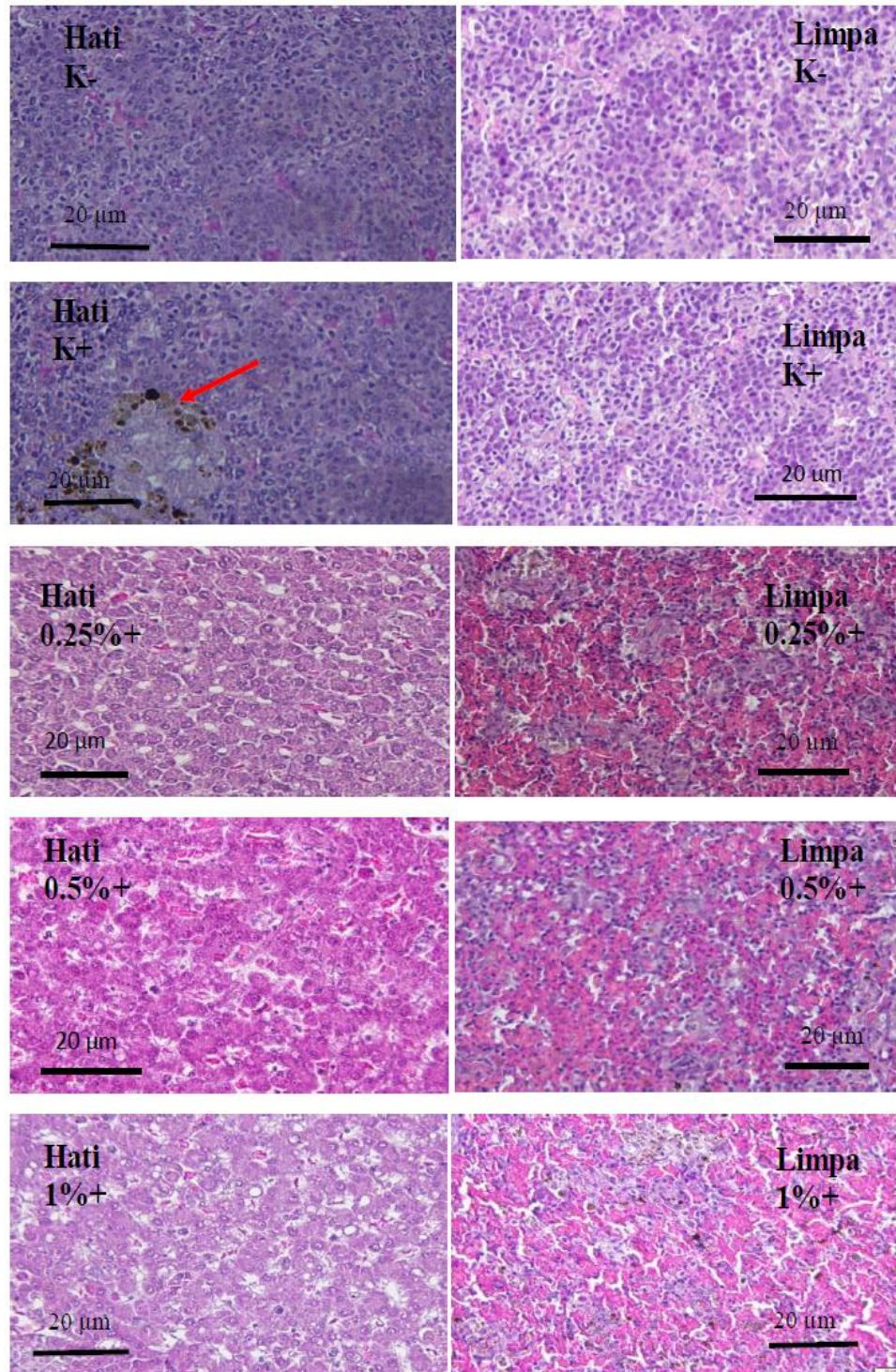
Hasil penghitungan *S. agalactiae* di organ target ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda (0.25%, 0.5%, dan 1%) setelah diuji tantang dengan bakteri *S. agalactiae* disajikan pada Gambar 16. Tidak ditemukan adanya *S. agalactiae* pada perlakuan kontrol negatif. Jumlah *S. agalactiae* pada perlakuan kontrol positif pada semua organ (hati, ginjal, limpa, otak, dan usus) signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan semua perlakuan pemberian prebiotik madu ($P < 0.05$). Jumlah *S. agalactiae* pada perlakuan kontrol positif di otak lebih tinggi dibandingkan dengan organ lain yaitu sebesar 5.0 ± 8.2 log CFU g^{-1} ($P < 0.05$), serta berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.



Gambar 16 Total bakteri *S. agalactiae* di organ ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda melalui pakan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1%). Huruf yang berbeda pada organ yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$)

5.3.5 Histopatologi Hati dan Limpa

Hasil pengamatan histologi hati dan limpa disajikan pada Gambar 17. Secara umum hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada semua perlakuan madu memiliki *Melanomacrophage centers* (MMCs) yang lebih besar dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif dan kontrol negatif, namun tidak terdapat haemosiderin pada semua perlakuan madu. Hasil pengamatan hati dan limpa ikan nila hari ke-2 setelah diinfeksi dengan *S. agalactiae* menunjukkan adanya kerusakan pada perlakuan kontrol positif organ hati. Terdapat perubahan warna MMCs pada hati, yaitu adanya warna hitam (haemosiderin).



Gambar 17 Histopatologi hati dan ginjal ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda melalui pakan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25% diuji tantang), 0.5%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5% diuji tantang), 1%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% diuji tantang) Haemosiderin = 

@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity

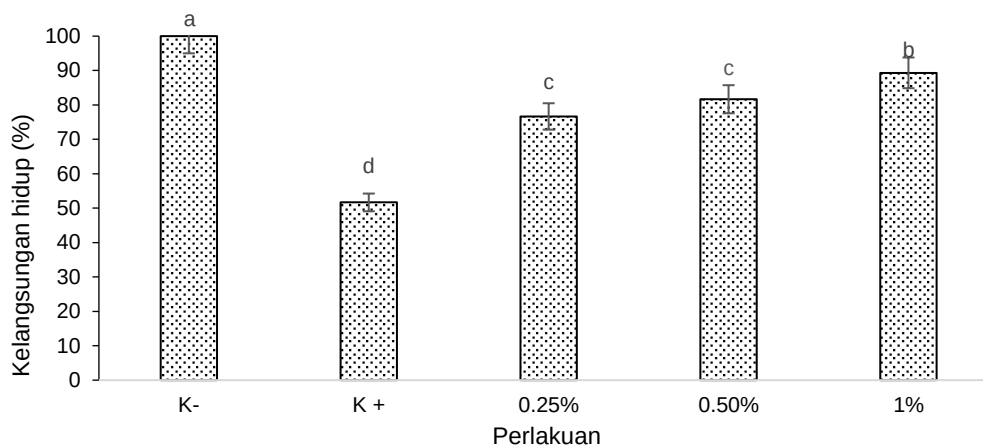
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



5.3.6 Resistansi Ikan Nila terhadap Infeksi *S. agalactiae*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelangsungan hidup ikan nila setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* pada perlakuan pemberian madu berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol positif (Gambar 18). Kelangsungan hidup pada perlakuan madu dosis 1% sebesar $89.33 \pm 1.15.0\%$, berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan dosis 0.5% sebesar $81.66 \pm 5.7\%$ dan dosis 0.25% sebesar $75.66 \pm 5.77\%$. Kelangsungan hidup terendah dihasilkan oleh perlakuan kontrol positif yakni sebesar $51.66 \pm 5.77\%$.



Gambar 18 Tingkat kelangsungan hidup ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis berbeda melalui pakan setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), 0.25% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.25%), 0.5% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 0.5%), 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1%)

5.3.7 Komposisi Mikroba Saluran Pencernaan Pasca Uji Tantang

Kelimpahan mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 1% melalui pakan dan perlakuan pakan tanpa prebiotik sebagai kontrol setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* disajikan dalam Tabel 9.

Tabel 9 Kelimpahan mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis 1% dan kontrol setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K+ (kontrol diuji tantang), 1%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% diuji tantang)

Jumlah sekuen	Jumlah mikrobiota yang teramati	
	(K+)	(1%+)
10	2	5
20000	47	132
40000	55	146
60000	58	153
80000	60	156
100000	62	158
120000	62	159

Dua sampel yang dianalisis menghasilkan 1253 sekuen DNA yang selanjutnya teridentifikasi adanya 81 OTU (*Operational Taxonomy Unit*). Total OTU pada perlakuan kontrol positif sebanyak 58, dan pada perlakuan madu 1% sebanyak 60, dengan OTU unik-pada masing-masing perlakuan adalah 21 dan 23. OTU unik dan OTU bersama perlakuan kontrol positif dan perlakuan madu 1% setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* disajikan pada Tabel 10.

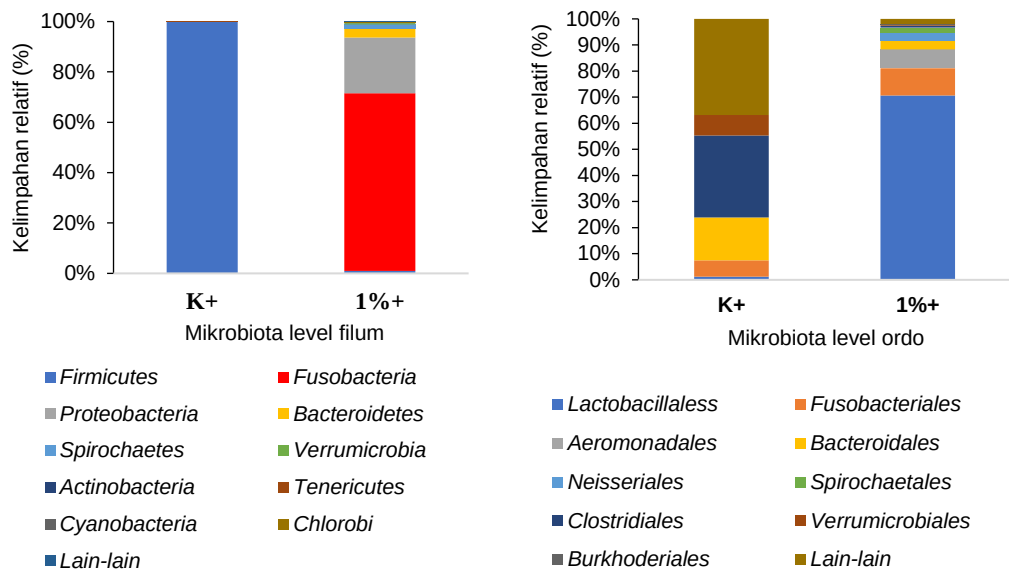
Tabel 10 Mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 1% dan kontrol setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K+ (kontrol diuji tantang) dan 1%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% diuji tantang)

Mikrobiota	Jumlah
K+	21 (26%)
1%+	23 (28%)
OTU bersama	37 (45%)

Mikrobiota pada usus ikan nila setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* tersusun atas 10 filum (*Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Verrumicrobia*, *Actinobacteria*, *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, dan *Chlorobi* (Gambar 19). Dari 10 filum tersebut, hanya enam filum yang ada pada kedua perlakuan (*Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrumicrobia*, dan *Actinobacteria*). Persentase filum dominan dari kedua perlakuan adalah (*Firmicutes*>50%, *Fusobacteria*>35%, *Proteobacteria*>11%, *Bacteroidetes*>1.72%, *Verrumicrobia*>0.26%, dan *Actinobacteria*>0.13%). Filum *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, dan *Chlorobi* hanya ditemukan pada perlakuan penambahan madu dosis 1%, sedang *Tenericutes* hanya ditemukan pada perlakuan kontrol positif.

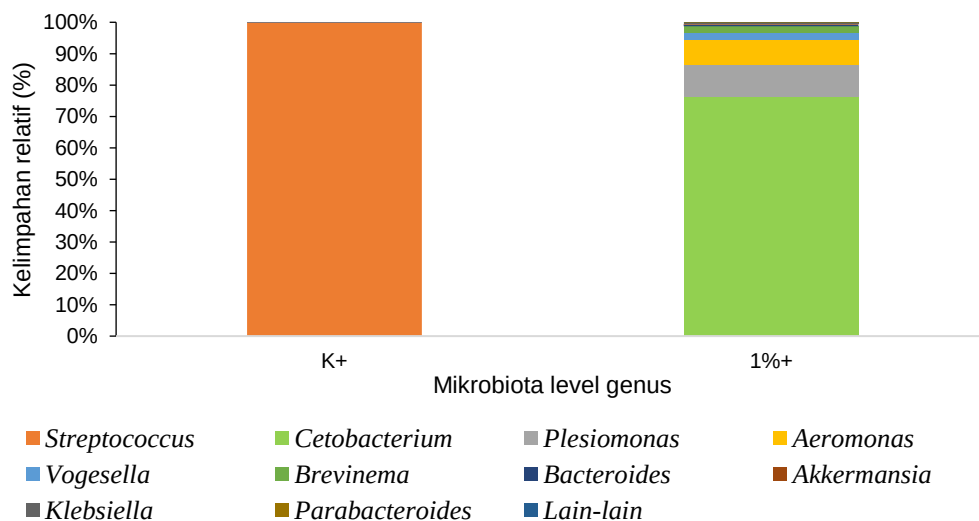
Terdapat enam ordo yang ditemukan pada perlakuan kontrol positif dan perlakuan pemberian madu dosis 1% yang diuji tantang dengan *S. agalactiae* yaitu (*Lactobacillales*, *Fusobacteriales*, *Bacteroidales*, *Clostridiales*, dan *Verrumicrobiales*). Perlakuan pemberian madu dosis 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak variasi ordo dibandingkan perlakuan kontrol positif yaitu dengan adanya ordo *Aeromonadales*, *Neisseriales*, *Spirochaetales*, dan *Burkholderiales*.





Gambar 19 Kelimpahan mikrobiota level filum dan ordo pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 1% dan kontrol setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K+ (kontrol diuji tantang) dan 1%+ (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% diuji tantang)

Genus *Streptococcus* mendominasi perlakuan kontrol positif setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* yaitu sebesar 98%. Sedangkan pada perlakuan pemberian madu dosis 1% memberikan lebih banyak variasi genus dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif yaitu dengan adanya genus *Cetobacterium*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Vogesella*, *Brevinema*, *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Klebsiella*, dan *Parabacteroides*. Kelimpahan mikrobiota level genus pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dosis 1% melalui pakan dan kontrol positif setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* disajikan pada Gambar 20.



Gambar 20 Kelimpahan mikrobiota level genus pada saluran pencernaan ikan nila yang diberi prebiotik madu dengan dosis 1% setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*. K+ (kontrol diuji tantang) dan 1% (pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% diuji tantang)

5.4 Pembahasan

Respiratory burst adalah pelepasan secara cepat *reactive oxygen species* (ROS) seperti hidrogen peroksida, anion superoksida, dan radikal hidroksil yang bertanggung jawab dalam membunuh atau meminimalisir partikel asing. ROS diproduksi oleh sel fagosit bertanggung jawab untuk membunuh atau menghancurkan material yang ditelan, termasuk mikroba. ROS digunakan untuk mengetahui kemampuan inang untuk bertahan melawan patogen (Abbas *et al.* 2012).

Proses *respiratory burst* dimulai ketika patogen yang masuk ke dalam tubuh ikan akan difagositosis oleh sel-sel fagosit. Patogen yang menginfeksi dikenali oleh reseptor pada sel fagosit dan membentuk fagosom (vakuola pencernaan). Fagosom akan bersatu dengan lisosom dan membentuk fagolisosom. Patogen dalam proses tersebut, akan dihancurkan dan partikelnya akan dihilangkan oleh beberapa enzim degradatif ke dalam fagosom serta menghasilkan ROI (*reactive oxygen intermediates*). Penambahan prebiotik madu terbukti mampu meningkatkan aktivitas *respiratory burst* pada ikan nila setelah masa pemeliharaan 30 hari dengan hasil terbaik diperoleh pada perlakuan madu dosis 0.25% sebesar (2 ± 0.05), disusul dosis madu 1% (1.7 ± 0.02) dan 0.5% (1.7 ± 0.03) (Gambar 13). Prebiotik atau imunosakarida yang ada di dalam saluran pencernaan akan mengaktifkan sistem imun bawaan secara langsung dengan *pattern recognition receptors* (PRRs) melalui *microbial associated molecular patterns* (MAMPs) yang memicu imunitas inang (Song *et al.* 2014). Hasil pengamatan aktivitas *respiratory burst* pada hari ke-32 (2 hari setelah masa ujiantang) menunjukkan telah terjadi penurunan aktivitas bila dibandingkan dengan sebelum ujiantang (Gambar 13). *Respiratory burst* perlakuan madu mengalami penurunan. Aktivitas fagositosis telah berhasil memusnahkan bakteri patogen *S. agalactiae*, sehingga tidak terbentuk ROS. Pada hari ke-35 (5 hari setelah ujiantang), nilai *respiratory burst* pada semua perlakuan madu berangsur naik, demikian juga dengan kontrol positif. Pada hari ke-37 (7 hari sesudah ujiantang), nilai *respiratory burst* cenderung stabil. Hal ini diduga ikan mengalami perbaikan jaringan, inflamasi serta peningkatan sistem imun spesifik (Iwama 1996).

Lisozim adalah sistem pertahanan pertama pada ikan yang penting dalam melawan serangan mikroba. Lisozim adalah enzim yang diproduksi oleh makrofag aktif (Goethe & Phi-van 1998), yang mampu mendegradasi peptidoglikan dinding sel bakteri dengan menghidrolisis β -(1, 4) hubungan glikosidik di N-asetilmuramik dan N-asetilglukosamin dan berperan sebagai opsonin untuk memacu proses fagositosis sel fagosit. Enzim lisozim mampu melisiskan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif (Magnadottir 2006). Pada ikan, lisozim mempunyai aktivitas yang lebih luas daripada mamalia (Demers & Bayne 1997), biasanya digunakan sebagai indikator kekebalan non spesifik. Lisozim ditemukan di lendir, serum, dan berbagai jaringan ikan air tawar dan laut (Fagan *et al.* 2003).

Prebiotik mampu menstimulasi sistem imun inang. Karbohidrat (sakarida) yang dapat menginduksi imunitas disebut imunosakarida, akan mengaktifasi sistem imun bawaan. Kemampuan *immunomodulatory* prebiotik dipengaruhi oleh jenis atau bentuk prebiotik yang diberikan. Prebiotik mengaktifasi sistem imun bawaan dengan dua cara yaitu mengaktifasi sistem imun bawaan secara langsung dan meningkatkan bakteri probiotik dalam usus (Song *et al.* 2014). Pada penelitian ini penambahan prebiotik madu selama 30 hari masa pemeliharaan mampu meningkatkan aktivitas lisozim dibandingkan dengan kontrol (Gambar 14).

Peningkatan aktivitas lisozim pada perlakuan prebiotik madu menunjukkan bahwa telah terjadi interaksi antara oligosakarida madu dengan sel imun ikan nila. Prebiotik berinteraksi dengan sel imun seperti sel fagosit mononuklear (monosit, makrofag) dan leukosit polimorfonuklear (neutrofil), sel *natural killer* (NK) untuk memacu respons imun non spesifik seperti lisozim, *respiratory burst*, dan komplemen. Selain itu, karbohidrat oligosakarida dari madu dapat berinteraksi langsung dengan mikrobiota usus terkait dengan pola molekuler seperti asam lemak, peptidoglikan, protein glikosilasi, hal ini sesuai dengan penelitian Bron *et al.* (2012) bahwa kapsul polisakarida dari bakteri yang kemudian menginduksi sistem imun inang. Aktivitas imunomodulasi dari prebiotik dimediasi melalui interaksi langsung dengan reseptor, seperti β -glukan dan dectin-1 yang diekspresikan oleh makrofag. Aktivitas interaksi ligan ini memberikan sinyal molekuler transduksi seperti NF- κ B, yang menstimulasi sel imun inang (Bron *et al.* 2012). Penurunan aktivitas lisozim secara bertahap terjadi setelah dilakukan ujiantang dengan *S. agalactiae* (Gambar 14). Pada hari ke-32 (2 hari setelah ujiantang), perlakuan madu mengalami penurunan lisozim, sedangkan perlakuan kontrol positif mengalami peningkatan. Selanjutnya pada hari ke-35 (5 hari sesudah ujiantang), lisozim kontrol positif menurun, sedang perlakuan madu perlakuan 1% meningkat. Pada hari ke-37 (7 hari sesudah ujiantang), nilai lisozim perlakuan madu cenderung stabil, penurunan lisozim perlakuan kontrol positif masih terjadi, hal ini diduga ikan telah melakukan pemulihan pasca infeksi dan kembali ke kondisi seimbang.

Peranan gen-gen terkait imunitas penting dalam mengendalikan serangan penyakit infeksi. Sitokin adalah modulator kekebalan dan termasuk interleukin 1 β , (IL1 β), interleukin 8 (IL8), tumor faktor nekrosis alfa (TNF α), CXCL2- dan CC-chemokine, interferon (IFN) dan resistensi myxovirus (Mx) (Xu *et al.* 2013). Gen-gen tersebut berperan dalam kemotaksis, aktivasi komplemen, menghancurkan patogen, dan opsonisasi dalam proses fagositosis (Salaun *et al.* 2007). Oligosakarida selain memodulasi sitokin dengan cara merangsang pertumbuhan bakteri probiotik penghasil SCFA di usus besar (Abu-Elala *et al.* 2018), juga mampu memicu imunitas inang (Song *et al.* 2014). Pemberian prebiotik madu mampu meningkatkan ekspresi gen IL8. Gen IL8 terekspresi pada hari ke-30 (sebelum ujiantang), hari ke-32 (2 hari setelah ujiantang), dan hari ke-35 (5 hari sesudah ujiantang). Pemberian prebiotik madu menghasilkan ekspresi gen IL8 yang lebih tinggi daripada kontrol, karena oligosakarida mampu memicu sistem imun ikan nila. Hasil ini sesuai dengan penelitian Lee *et al.* (2011), yang memberikan LPS pada ikan *Paralichthys olivaceous* signifikan meningkatkan transkrip IL8. Setelah diujiantang dengan *S. agalactiae*, terjadi peningkatan ekspresi gen IL8. Hasil penelitian Sun *et al.* (2011) menyatakan bahwa pemberian injeksi atau setelah ikan terinfeksi bakteri patogen akan meningkatkan ekspresi gen IL8. Gen IL8 memainkan peran penting dalam respon imun ikan, yakni dalam peradangan akut dengan mengaktivasi dan memediasi neutrofil dan sel lain serta dalam memulai ledakan oksidatif pada neutrofil dan mendorong penyembuhan luka dengan mendorong angiogenesis (Mukaida *et al.* 1998). Efek biologis gen IL8 pada neutrofil diantaranya meningkatkan kadar kalsium sitosol, *respiratory burst*, perubahan bentuk neutrofil dan kemotaksis (Laing *et al.* 2002).

Tumor necrosis factor alpha (TNF α) merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam berbagai respons inang, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, nekrosis, apoptosis, dan induksi sitokin lainnya. TNF α dapat menginduksi kelangsungan hidup yang dimediasi NF-kB atau apoptosis (Rahman & McFadden 2006). TNF α memiliki respons antimikroba yang kuat, termasuk menginduksi apoptosis, membunuh sel yang terinfeksi, dan mengatur naik turunnya respons imun inang. Sesuai dengan penelitian Chen *et al.* (2018) yang memberikan oligosakarida dari konjac pada ikan *Schizothorax prenanti*, ekspresi gen TNF α pada semua perlakuan madu mengalami kenaikan. Hal tersebut diduga karena oligosakarida dikenali sebagai molekul yang mempunyai resiko oleh reseptor TLR (*Toll-like receptors*) pada sel imun inang, yang selanjutnya akan mengaktifkan respons imun. Pada hari ke-32 (2 hari sesudah ujiantang), ekspresi gen TNF α pada semua perlakuan madu dan kontrol positif berangsur-angsur naik, sebagai respons infeksi *S. agalactiae* yang memicu sistem imun. TNF α adalah mediator inflamasi sebagai respons infeksi suatu penyakit (Holland *et al.* 2002). Induksi TNF- α berperan penting dalam memicu respon imun bawaan melawan invasi bakteri melalui pola pengenalan mikroorganisme, kehadiran patogen, dan stimulasi respons inflamasi (Pietretti & Wiegertjes 2014). Setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*, semua perlakuan pemberian madu mengalami kenaikan ekspresi gen IL8 karena adanya induksi bakteri patogen *S. agalactiae*. Selain itu, uji tantang juga meningkatkan *respiratory burst* (Laing *et al.* 2002). Selanjutnya ekspresi TNF α mengalami penurunan pada hari ke-35 karena sistem imun sudah mengenali patogen, memberi sinyal pada sitokin, mengaktifkan transkrip TNF α , dan memberi respons imun, dan akhirnya berhasil mengalahkan patogen tanpa terjadinya peradangan dan kerusakan jaringan (Elbahnaswya & Elshopakey 2020). Ekspresi TNF α berhubungan dengan jumlah dan komposisi bakteri. Pada perlakuan pemberian madu dosis 1%, setelah diuji tantang terjadi dominasi bakteri probiotik genus *Cetobacterium* (Gambar 20), pada saat itu ekspresi TNF α lebih tinggi dibandingkan dengan dosis madu yang lebih rendah dan kontrol (Gambar 15B). Diduga dominasi bakteri tersebut berpengaruh menaikkan ekspresi gen TNF α karena peran gen TNF α sebagai imunomodulator baik *innate* maupun *adaptive*, proliferasi sel, dan proses apoptosis.

Jumlah *S. agalactiae* di semua organ (hati, ginjal, limpa, otak, dan usus) pada perlakuan kontrol positif signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan semua perlakuan pemberian prebiotik madu ($P < 0.05$) (Gambar 16). Tingginya *S. agalactiae* pada perlakuan kontrol positif diduga karena rendahnya proteksi dalam menghadapi serangan bakteri *S. agalactiae* setelah uji tantang. Jumlah *S. agalactiae* di usus pada perlakuan madu lebih rendah dibandingkan kontrol positif, dengan nilai terendah pada pemberian madu dosis 1%, di mana tidak ditemukan adanya *S. agalactiae*. Karbohidrat pada madu dosis 1% diduga dapat terfermentasi dengan baik oleh mikrobiota usus karena oligosakarida madu menyediakan substrat untuk pertumbuhan dan proliferasi bakteri anaerob yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* di usus, dan komposisi mikrobiota usus berubah.

Jumlah *S. agalactiae* di otak pada perlakuan kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif pada organ lain, hal ini sesuai dengan penelitian Abuseliana *et al.* (2011) bahwa salah satu organ target dari *S. agalactiae* adalah otak. Keberadaan bakteri pada organ otak dapat menyebabkan

ikan berenang tidak menentu (*spiraling, spinning*) (Laith *et al.* 2017). Keberadaan bakteri pada ginjal ikan dapat menyebabkan perubahan warna tubuh menjadi lebih hitam (Hardi 2011). Ikan yang terinfeksi *S. agalactiae* juga mengalami penurunan nafsu makan. Bakteri *S. agalactiae* mampu menembus *blood-brain barrier* dan kemudian menyerang sistem saraf pusat pada otak (Bowater *et al.* 2012). Bakteri yang menginfeksi otak ikan mengganggu kerja *hipotalamus* bagian lateral yang mengatur rasa lapar. Terganggunya sel-sel dalam hipotalamus yang berada dalam *telencephalon* (otak depan) akibat adanya *S. agalactiae* inilah yang menyebabkan ikan mulai mengalami penurunan nafsu makannya bahkan tidak mau makan.

Ginjal, hati, dan limpa pada beberapa teleostei diduga merupakan kumpulan makrofag yang disebut pusat melanomakrofag (MMCs) (Camila *et al.* 2017). MMCs adalah agregat fagosit berpigmen pada hati dan limpa (Steinel & Bolnick 2017). MMCs adalah elemen penting dari sistem kekebalan ikan, termasuk fagositosis dan pemrosesan antigen serta penghancuran, detoksifikasi dan daur ulang bahan endogen dan eksogen (Agius & Robert 2003). Menurut Lyons *et al.* (2004), ukuran dan jumlah MMCs akan meningkat ketika terjadi stres, infeksi patogen, serta parasit. MMCs dapat dibedakan secara histologis di dalam jaringan dengan pigmen seperti melanin, haemosiderin, dan lipofuskin (Diaz-Satizabal & Magor 2015; Gomes *et al.* 2015). Haemosiderin adalah pigmen besi dalam bentuk besi (Fe) yang merupakan hasil dari pemecahan eritrosit. Hemosiderin sering ditemukan di hati ikan (Wolke 1992; Velkova & Kostoski 2005; Leknes 2015), hal ini sering terjadi karena haemosiderin merupakan produk degradasi hemoglobin yang telah disaring oleh sistem limfoid-makrofag (Khan *et al.* 1994). Selain itu hati memainkan peran kunci dalam metabolisme yang akan mencerminkan kondisi ikan seperti adanya lesi dan perubahan histopatologis.

Perubahan MMCs di hati ikan nila yang terinfeksi *S. agalactiae* diduga terkait dengan imunitas ikan. Munculnya haemosiderin di organ hati kontrol positif (Gambar 17) diduga terjadi karena adanya serangan bakteri *S. agalactiae*. Haemosiderin diduga berasal dari plak infeksi *S. agalactiae* kronis, sehingga timbul warna biru dan melanin berwarna coklat sangat gelap pada jaringan. Menurut Suwannasang *et al.* (2014), perubahan histopatologis yang diamati pada hati menunjukkan adanya degenerasi hepatosit dan kongesti pada sinusoid karena ketidakmampuan hati untuk mendetoksifikasi benda asing yang mengakibatkan disfungsi hati dan akhirnya kematian. Hasil pengamatan organ hati dan limpa ikan nila pada hari ke-32 (2 hari setelah ujiantang) menunjukkan pada perlakuan kontrol positif mengalami kerusakan yang lebih parah dibanding pada perlakuan pemberian prebiotik madu. Perlakuan pemberian prebiotik madu tidak muncul haemosiderin diduga karena adanya oligosakarida yang dimanfaatkan dengan baik oleh inang, sehingga menimbulkan imunitas terhadap serangan *S. agalactiae*. Oligosakarida madu berperan sebagai imunomodulator, yaitu senyawa atau zat yang meningkatkan respons sistem kekebalan, yang diduga menghasilkan resistansi organisme terhadap keberadaan patogen (Vallejos-Vidal *et al.* 2016).

Kelangsungan hidup ikan nila yang diberi prebiotik madu setelah diujiantang dengan *S. agalactiae* signifikan lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan kontrol positif (Gambar 18). Sedangkan pada perlakuan madu, kelangsungan hidup tertinggi pada dosis 1% berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan dosis 0.25% dan 0.5%. Rendahnya angka kematian pada perlakuan prebiotik madu setelah ujiantang menunjukkan bahwa penambahan madu dalam pakan dapat

menekan pertumbuhan patogen dengan cara meningkatkan respons imun. Hal ini sesuai dengan penelitian Mussatto & Mancilha (2007), bahwa fermentasi prebiotik di usus oleh bakteri anaerob dapat menyebabkan terjadinya perubahan komponen mikrobiota, hal ini karena oligosakarida madu menyediakan substrat untuk pertumbuhan dan proliferasi bakteri anaerob yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di usus. Pemberian prebiotik merupakan salah satu upaya untuk memaksimalkan pertumbuhan mikrobiota menguntungkan pada saluran pencernaan yang berfungsi untuk menghilangkan organisme patogen secara efisien (Song *et al.* 2014). Selain itu, produk akhir dari aktivitas fermentasi karbohidrat oleh mikrobiota di dalam usus adalah asam lemak rantai pendek (*Short Chain Fatty Acid*) seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat (Ringo *et al.* 2014). Selanjutnya SCFA tersebut akan diserap oleh usus dan akan berperan dalam pemenuhan kebutuhan energi inang. Pada mamalia dan vertebrata, SCFA juga berperan dalam imunitas (Arques *et al.* 2015). Seperti penelitian yang dilakukan Maslowski *et al.* (2009), SCFA menstimulasi GPR43 yang sangat penting dalam mekanisme respons *inflammatory* pada tikus. SCFA pada ikan memberikan proteksi terhadap serangan penyakit seperti ditunjukkan pada hasil penelitian Suguna *et al.* (2014), bahwa poly-hidroksibutirat mampu memberikan proteksi ikan nila terhadap infeksi bakteri patogen *Edwardsiella ictaluri gly09*. Tingginya mortalitas pada perlakuan kontrol positif juga disebabkan oleh rendahnya imunitas ikan nila dalam melawan infeksi bakteri *S. agalactiae*. Hal tersebut terlihat dari rendahnya nilai parameter imunitas yang dihasilkan pada perlakuan kontrol positif. Tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi pada perlakuan prebiotik madu didukung oleh tingginya kadar lisozim dan *respiratory burst* pada akhir masa pemeliharaan. Imunitas yang meningkat memberikan pertahanan yang lebih baik pada ikan nila ketika terjadi serangan patogen *S. agalactiae*.

Setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*, jumlah OTU pada perlakuan madu 1% lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif (Tabel 10). Hal ini sejalan dengan hasil pengujian *respiratory burst*, lisozim, dan kelangsungan hidup ikan nila yang diberi prebiotik madu signifikan lebih tinggi dibandingkan kontrol positif. Diduga oligosakarida madu dapat dimanfaatkan secara optimal oleh mikrobiota usus sehingga mikrobiota menguntungkan dapat tumbuh dengan optimal. Hal ini sesuai dengan hasil beberapa penelitian, dengan meningkatnya pertumbuhan mikrobiota menguntungkan pada mukosa saluran pencernaan, akan memperbesar peluang menempelnya bakteri menguntungkan dari kelompok bakteri asam laktat, seperti *bifidobacteria* dalam saluran pencernaan ikan, yang secara tidak langsung mencegah perlekatan dan kolonisasi bakteri patogen (Wu *et al.* 2014; Song *et al.* 2014; Rodriguez Estrada *et al.* 2013).

Setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae*, pada perlakuan madu dosis 1% jumlah filum lebih banyak dibandingkan kontrol positif (Gambar 19), karena oligosakarida madu dapat digunakan dengan baik oleh bakteri pada saluran pencernaan ikan nila, sehingga meningkatkan komposisi mikrobiota usus. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa filum yang mendominasi mikrobiota pada saluran pencernaan ikan adalah *Fusobacteria* dan *Proteobacteria* (Larsen *et al.* 2014; van Kessel *et al.* 2011; Di Maiuta *et al.* 2013).

Perlakuan penambahan madu dosis 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak variasi ordo dibandingkan perlakuan kontrol positif (Gambar 19), yaitu dengan adanya ordo *Aeromonadales*, *Neisseriales*, *Spirochaetales*, dan *Burkholderiales*. Genus *Streptococcus* mendominasi perlakuan kontrol positif hingga mencapai 98%. Hal tersebut sesuai dengan hasil pengamatan kelangsungan hidup dan jumlah *S. agalactiae* di organ target dimana pada perlakuan kontrol positif lebih tinggi dibandingkan perlakuan madu yang diuji tantang dengan *S. agalactiae*. Perlakuan kontrol positif tidak memiliki proteksi terhadap infeksi *S. agalactiae*.

Bacillus dan *Lactobacillus* sering digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur (Ringo *et al.* 2018). Pada penelitian ini, perlakuan penambahan madu dosis 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak variasi genus dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif yaitu dengan adanya *Cetobacterium*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Vogesella*, *Brevinema*, *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Klebsiella*, dan *Parabacteroides* (Gambar 20), yang didominasi genus *Cetobacterium* (70%). Genus *Cetobacterium* diantaranya adalah strain *Cetobacterium somerae* banyak ditemukan pada ikan air tawar, mempunyai kemampuan menghasilkan vitamin B12 yang tinggi (Sugita *et al.* 1991). Vitamin B12 bermanfaat dalam pembentukan protein, sel darah, dan jaringan. Selain itu, *Cetobacterium somerae* juga mampu menghambat pertumbuhan strain bakteri lainnya (Sugita *et al.* 1996). Keberadaan dan kelimpahannya yang tinggi pada ikan air tawar memiliki potensi dalam pengembangan probiotik dan prebiotik di masa datang (Larsen *et al.* 2014). Genus *Bacteroides* adalah salah satu bakteri probiotik ikan air tawar (Tuan *et al.* 2013; Lazado *et al.* 2015). Genus *Akkermansia* diantaranya *Akkermansia muciniphila* yang disebut probiotik masa depan. Fermentasi *A. muciniphila* menghasilkan sulfat bebas dan memproduksi asetat dan propionat dalam usus. Roeselers *et al.* (2011), mengisolasi *A. muciniphila* pada saluran pencernaan ikan zebrafish. *A. muciniphila* tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan gula non-musim (seperti fruktosa dan glukosa) karena lebih mudah untuk diangkut dan pembuat energi yang efisien, daripada GalNAc dan GlcNAc (Ottman *et al.* 2017).

5.5 Simpulan

Pemberian prebiotik madu melalui pakan mampu meningkatkan *respiratory burst*, lisozim, ekspresi gen IL8 dan TNF α , serta menekan jumlah *S. agalactiae* di organ target, dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan nila ketika diinfeksi bakteri *S. agalactiae*. Organ hati dan limpa ikan nila pada perlakuan kontrol positif mengalami kerusakan yang lebih parah dibanding pada perlakuan pemberian prebiotik madu. Perlakuan prebiotik madu dosis 1% menghasilkan OTU lebih banyak dengan OTU dominan adalah genus *Cetobacterium*.

VI PEMBAHASAN UMUM

Ikan nila merupakan salah satu komoditas budidaya utama Indonesia yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi baik di dalam negeri maupun luar negeri. Peluang pasar yang masih sangat luas di luar negeri, menjadi daya tarik untuk meningkatkan produksi melalui kegiatan budidaya ikan secara intensif. Kegiatan budidaya ikan nila yang dilakukan secara intensif sering tidak memberikan hasil sesuai harapan karena adanya serangan penyakit dan kinerja pertumbuhan yang tidak maksimal.

Perlu diambil tindakan untuk meminimalkan kegagalan produksi karena permasalahan kinerja pertumbuhan yang rendah dan serangan bakteri patogen pada budidaya ikan. Berbagai upaya pengendalian dapat dilakukan, salah satunya dengan menggunakan prebiotik. Prebiotik adalah bahan makanan yang tidak dapat dicerna yang merangsang pertumbuhan atau aktivitas bakteri komensal yang bermanfaat meningkatkan kesehatan inang (Guerreiro *et al.* 2016), meningkatkan kinerja pertumbuhan dan aktivitas mikroba saluran pencernaan, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, serta meningkatkan resistansi terhadap stres dan patogen (Das *et al.* 2017).

Beberapa penelitian bidang akuakultur terdahulu menggunakan material *single prebiotics* sebagai bahan prebiotik seperti FOS, GOS, dan inulin. Sehingga diperlukan material yang merupakan *multi prebiotics* yang diharapkan mampu memberikan hasil yang lebih baik. Madu adalah material yang termasuk *multiprebiotics*. Bahan aktif yang terkandung pada madu adalah FOS (Yadav & Shukla 2017), XOS (Mano *et al.* 2018), GOS dan inulin (Sanz *et al.* 2005) selain beberapa kandungan lain seperti mineral, vitamin, asam amino, asam organik, flavonoid dan senyawa fenolik lainnya serta zat aromatik. Komposisinya sangat bervariasi, tergantung pada tumbuhan dan asal geografisnya (Santos-Buelga & Gonzalez-Paramas 2017).

Penelitian awal dilakukan pada tiga jenis madu yaitu madu klengkeng, madu randu dan madu organik untuk mengetahui kriteria prebiotik dari ketiga jenis madu. Pengujian oligosakarida madu dan ekstrak madu dengan KLT menggunakan standar rafinosa mendapatkan hasil bahwa ekstrak madu klengkeng dan ekstrak madu randu merupakan oligosakarida, ditandai dengan *R_f* yang sama tinggi dengan standar rafinosa. Diduga ekstrak madu organik juga merupakan oligosakarida apabila digunakan standar oligosakarida yang lain. Stakiosa dan rafinosa adalah standar yang bisa digunakan untuk menguji bioaktif oligosakarida (Agbenorhevi *et al.* 2007). Karbohidrat total tertinggi dimiliki madu randu. Gula pereduksi dari ketiga madu berada dalam kisaran 27-55%, lebih tinggi dibandingkan inulin. Hal tersebut disebabkan karena dalam madu terdapat berbagai macam komponen oligosakarida yaitu FOS, GOS, dan inulin (Sanz *et al.* 2005). Oligosakarida madu resistan terhadap asam lambung dan α -amilase. Persentase hidrolisis asam lambung terbesar adalah pada madu organik yaitu 8.4% pada jam ke-3 sedangkan madu randu dan madu klengkeng sebesar 5.4% dan 3.2%. Persentase hidrolisis α -amilase terbesar adalah madu klengkeng yaitu 9.4% pada jam ke-3, sedangkan madu randu dan madu organik sebesar 5.2% dan 3%. Prebiotik mensyaratkan toleran terhadap asam lambung dan α -amilase dalam saluran pencernaan sehingga bisa dimanfaatkan oleh mikrobiota menguntungkan (Banerjee *et al.* 2017).

Oligosakarida madu memiliki aktivitas prebiotik terhadap pertumbuhan bakteri probiotik *L. plantarum*. Pada jam ke-12, ekstrak madu klengkeng, ekstrak madu randu, ekstrak madu organik, dan inulin mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik *L. plantarum*. Ekstrak madu randu memiliki aktivitas prebiotik paling baik dibandingkan dengan dua jenis madu yang lain, karena mampu menstimulasi *L. plantarum* $80.21 \pm 6.11\%$ pada jam ke-12, dan $68.05 \pm 4.12\%$ pada jam ke-24, selain itu madu randu memiliki skor prebiotik 3.82 pada jam ke-12, dan mampu mempertahankan kemampuannya sampai jam ke-24 sebanyak 0.71. Hal tersebut karena adanya kandungan FOS sebesar 14.76% dan inulin 6.6%. Selama 24 jam masih terdapat glukosa yang bisa dimanfaatkan sebagai sumber karbon. Bakteri probiotik melakukan metabolisme dengan memanfaatkan oligosakarida dan menghasilkan SCFA (Rurangwa *et al.* 2008). Dari ketiga madu yang diteliti, madu randu merupakan madu terbaik sebagai prebiotik karena memiliki aktivitas prebiotik tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri probiotik. Selanjutnya madu randu diuji lebih lanjut pengaruhnya dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan komposisi bakteri pada saluran pencernaan dengan ikan nila sebagai model.

Energi metabolisme adalah parameter biologis utama dan terpenting yang terlibat dalam semua proses fisiologis makhluk hidup. Kebutuhan energinya berasal dari oksidasi senyawa organik (karbohidrat, lipid dan protein) yang dihasilkan dari pencernaan makanan. Pencernaan adalah proses dasar dalam metabolisme ikan dalam menggunakan nutrisi yang tersedia untuk mengatasi masalah biologis (Solovyev & Gisbert 2016). Peran utama saluran pencernaan adalah memecah bahan makanan menjadi molekul yang lebih kecil yang selanjutnya akan diserap di epitel saluran pencernaan (Merrifield *et al.* 2011) dengan bantuan enzim

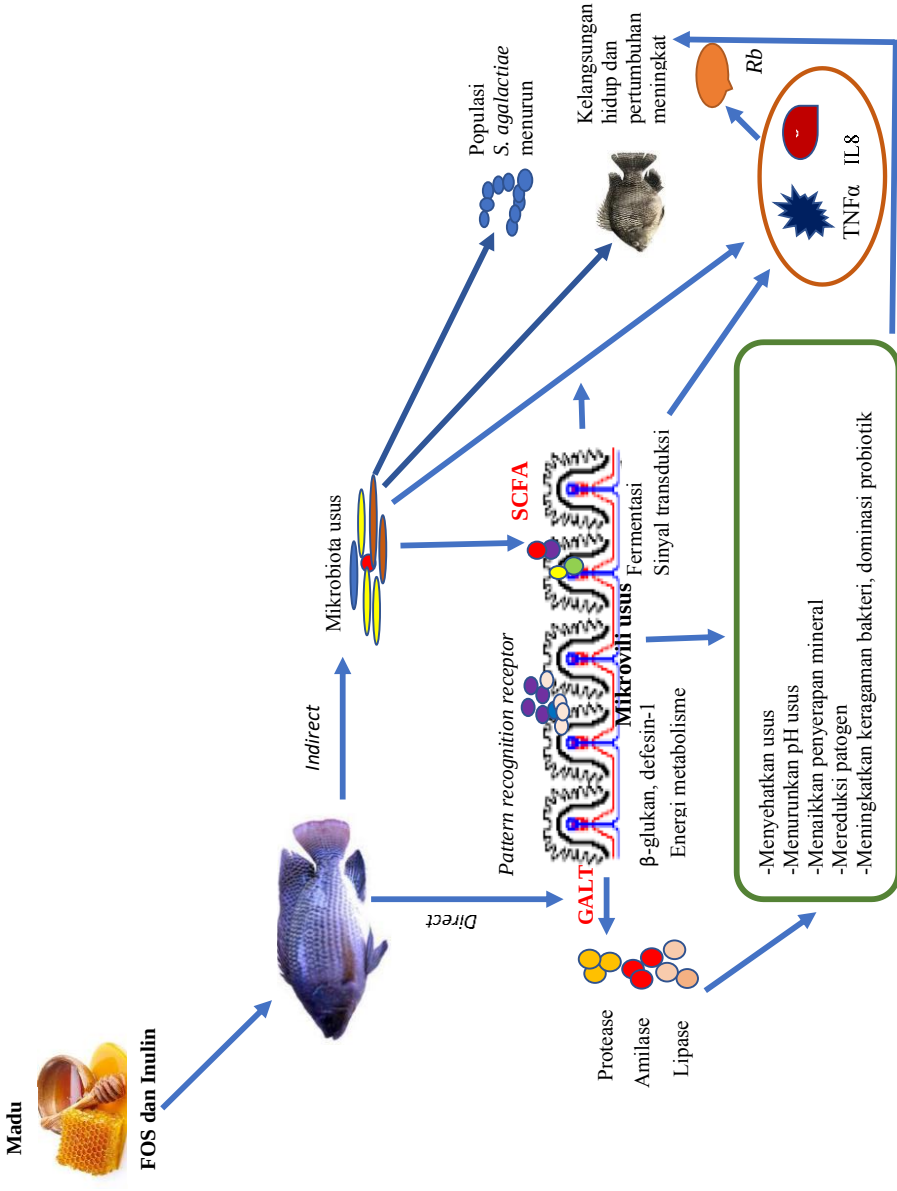
Nilai rasio konversi pakan yang diperoleh pada perlakuan prebiotik madu signifikan ($P < 0.05$) lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal tersebut disebabkan adanya peran bakteri menguntungkan yang dapat memanfaatkan prebiotik yang terkandung di dalam madu. Bakteri saluran pencernaan berperan dalam dekomposisi nutrisi, memberikan bahan aktif secara fisiologis seperti enzim, asam amino dan vitamin pada makroorganisme, sehingga memfasilitasi pemanfaatan pakan dan pencernaan yang lebih baik (Doeschate *et al.* 2008; Zokaeifar *et al.* 2012; Sugita *et al.* 1991; Vine *et al.* 2006). Prebiotik oligosakarida akan difermentasi oleh bakteri probiotik sehingga penggunaan pakan yang diperkaya dengan prebiotik akan meningkatkan kinerjanya di usus besar (Kaplan & Hutkins 2000).

Menurunnya nilai RKP disebabkan oleh adanya peningkatan pemanfaatan pakan dalam usus, adanya aktivitas enzim yang dilakukan oleh bakteri probiotik, serta peningkatan aktivitas *gastrointestinal tract* (Aquiano *et al.* 2013), dibuktikan dengan peningkatan aktivitas enzim pencernaan (amilase dan lipase) pada perlakuan pemberian madu yang lebih tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan kontrol ($P < 0.05$).

Mikrobiota usus akan memproduksi enzim untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, dan lipase, serta dengan menyediakan faktor pertumbuhan yang diperlukan inang (Zokaeifar *et al.* 2012). Enzim pencernaan sebagai landasan utama dari keseluruhan proses pencernaan, sangat berkaitan dengan jumlah, jenis dan karakteristik fungsionalnya (Pujante *et al.* 2017). Ketika pati, polisakarida, dan karbohidrat kompleks melalui saluran pencernaan, selanjutnya dipecah oleh amilase tambahan yang berada di saluran gastrointestinal (Oswald 2018). Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim diperoleh data bahwa aktivitas enzim amilase semakin meningkat dengan meningkatnya dosis madu, aktivitas amilase

tertinggi terdapat pada penambahan prebiotik madu 1% ($239.4 \pm 3.11 \text{ U g}^{-1} \text{ protein}$). Hal tersebut disebabkan semakin tinggi jumlah madu yang ditambahkan pada pakan, maka semakin besar pula jumlah oligosakarida yang bisa dimanfaatkan oleh mikrobiota usus penghasil enzim eksogen pada ikan nila. Protease pada ikan memiliki sifat molekuler yang beragam, bergantung pada spesies, organ, serta faktor lingkungan (Sriket 2014). Enzim protease berada pada jaringan otot organ pencernaan (Singh & Benjakul 2018). Aktivitas protease tertinggi terdapat pada perlakuan prebiotik madu 1% ($24.24 \pm 1.29 \text{ U g}^{-1} \text{ protein}$). Aktivitas lipase pada perlakuan prebiotik madu 0.25%, 0.5% dan 1% lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Mikrobiota usus dan enzim yang dihasilkan sangat berkaitan, karena jumlah mikroba usus berbanding lurus dengan enzim yang dihasilkan. Degradasi nutrisi di saluran pencernaan ikan sangat bergantung pada enzim yang tersedia (Hani *et al.* 2018). Penelitian Sankari *et al.* (2016), mikrobiota usus dan enzim yang dihasilkan meningkatkan rasio konversi pakan dan kinerja pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan penelitian Hamsah *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa enzim eksogen yang dihasilkan oleh mikrobiota di saluran pencernaan akan membantu enzim endogen inang untuk menghidrolisis nutrisi pada pakan, sehingga pakan dapat dimanfaatkan secara maksimal untuk pertumbuhan. Seperti pada penelitian ini bahwa perlakuan penambahan prebiotik madu mampu meningkatkan bobot akhir, pertambahan bobot, dan laju pertumbuhan spesifik ikan nila. Terdapat korelasi antara peningkatan aktivitas enzim pencernaan dan total bakteri di usus yang mampu meningkatkan pemanfaatan pakan untuk pertumbuhan ikan (Soleimani *et al.* 2012) dan udang (Munaeni *et al.* 2020). Pemberian pakan dengan penambahan madu mampu meningkatkan bobot ikan, dengan bobot tertinggi pada penambahan madu 1%. Hal ini sesuai dengan penelitian Abd El-Latif *et al.* (2015), bahwa terdapat korelasi antara peningkatan aktivitas enzim pencernaan dan mikrovili karena penambahan prebiotik.

Mikrovili berperan dalam penahanan dan pemanfaatan nutrisi dalam usus. Pemberian madu pada pakan secara signifikan menaikkan panjang mikrovili usus. Hal ini sesuai dengan penelitian Sado *et al.* (2015) yang menambahkan prebiotik MOS pada ikan nila, Zou *et al.* (2010) pada red drum (*Sciaenops ocellatus*), Salze *et al.* (2008) pada ikan kobia, dan Yilmaz *et al.* (2007) pada ikan rainbow trout. Semakin tinggi dosis madu, maka mikrovilinya semakin panjang, dengan mikrovili terpanjang pada perlakuan pakan dengan penambahan madu 1%. Hal tersebut disebabkan semakin tinggi dosis madu yang ditambahkan pada pakan, maka semakin tinggi enzim eksogen yang dihasilkan mikrobiota yang akan meningkatkan enzim endogen inang dalam memacu kinerja pertumbuhan inang. Peningkatan jumlah dan panjang mikrovili menyebabkan perluasan area penyerapan di usus yang bermanfaat dalam penyerapan nutrisi sehingga meningkatkan area penyerapan pada usus. Rasio perimeter perlakuan pemberian madu pada pakan lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kontrol. Rasio yang tinggi menunjukkan perimeter usus yang tinggi dengan struktur vili yang lebih panjang dan lebih kompleks. Perubahan bentuk morfologi usus yang lebih baik merupakan salah satu faktor dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan indikator dari pemanfaatan pakan yang efektif. Mekanisme kinerja pertumbuhan ikan nila yang diberi prebiotik madu disajikan pada Gambar 21.



Gambar 21 Mekanisme kinerja pertumbuhan dan respons imun pada ikan yang diberi prebiotik madu dengan modifikasi dari Arques *et al.* (2015)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Metabolisme mikrobiota anaerob terlibat dalam fermentasi karbohidrat yaitu mengubah makanan yang tidak dapat dicerna menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA) (Piazzon *et al.* 2017; Metzler-Zebeli *et al.* 2010). Pada proses fermentasi karbohidrat yang dilakukan oleh bakteri probiotik dihasilkan asetat, propionat, butirat, isobutirat, dan sejumlah kecil isovalerat yaitu sekitar 2-9% dari total produksi SCFA (Hao *et al.* 2017). SCFA memainkan peran penting dalam memelihara homeostasis usus dan berfungsi sebagai penghubung dengan inang, sistem kekebalan dan mikrobiota komensal pada usus (Trachsel *et al.* 2016). Sebagai pertukaran, inang akan menyediakan habitat yang aman dan pasokan energi yang konstan ke mikrobiota. Dalam budidaya, SCFA telah digunakan sebagai promotor pertumbuhan (Gao *et al.* 2011; Robles *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014; Silva *et al.* 2016). Hasil uji kandungan asam propionat dan butirat pada perlakuan pakan dengan penambahan prebiotik madu 1% pada ikan nila (Tabel 6) menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan madu lain karena madu 1% memiliki kandungan oligosakarida yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan madu yang lain sehingga SCFA yang dihasilkan lebih besar.

Perlakuan pemberian prebiotik madu pada pakan memberikan OTU yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 11). Hal tersebut disebabkan kandungan oligosakarida dari madu dapat dimanfaatkan oleh mikrobiota usus. Tingginya OTU unik pada perlakuan penambahan madu 0.5% (1335), diduga karena OTU unik tersebut mampu tumbuh dengan baik pada lingkungan tersebut, sehingga terjadi kesetimbangan antar spesies yang bersama-sama dapat memanfaatkan nutrisi dari oligosakarida madu sehingga semua komponen mikrobiota dapat tumbuh dengan optimal. Pada perlakuan madu dosis 0.25% dan 1% terjadi kematian bakteri. Basson & Grobler (2008) menyatakan bahwa berbagai bakteri rentan terhadap madu. Madu menunjukkan spektrum aktivitas antibakteri yang luas terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, termasuk bakteri-bakteri yang resisten antibiotik (MRSA). Selain itu, ditemukan sifat antimikroba madu *in vitro* yaitu H₂O₂, *methylglyoxal* (MGO) dan antimikroba peptida, bee defensin-1, yang merupakan mekanisme berbeda yang diduga terlibat dalam aktivitas bakterisidal madu (Kwakman *et al.* 2010). Tingginya OTU unik pada perlakuan penambahan madu dosis 0.5% tidak memberikan kinerja pertumbuhan yang lebih baik karena tidak semua OTU unik yang teridentifikasi merupakan mikrobiota yang menguntungkan yang bermanfaat terhadap kinerja pertumbuhan ikan nila.

Mikrobiota usus memiliki peran penting dalam pencernaan zat makanan kompleks serta dalam mempertahankan status kesehatan inang. Jenis mikrobiota dari filum *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, dan *Fusobacteria* ditemukan pada semua perlakuan pada penelitian ini. *Fusobacteria* dan *proteobacteria* umum ditemukan pada saluran pencernaan ikan (Larsen *et al.* 2014). Semua perlakuan pada penelitian ini, baik kontrol maupun perlakuan pakan dengan penambahan madu teridentifikasi adanya kedua filum tersebut. *Actinobacteria* merupakan filum utama yang teridentifikasi pada ikan nila (Gambar 12). Beberapa spesiesnya *Actinobacteria* memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti antibiotik, antitumor, anti parasit, dan enzim (Ser *et al.* 2015), diantaranya *Streptomyces* sp. Kemampuannya dalam memproduksi senyawa antagonis dan antimikroba yang potensial dapat dimanfaatkan sebagai probiotik dalam akuakultur.

Semua perlakuan penambahan madu pada pakan teridentifikasi adanya filum *Firmicutes* (Gambar 12). Beberapa genus dari famili *Firmicutes* seperti *Bacillus* dan *Lactobacillus* sering digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur (Wang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2019). Bakteri probiotik ini diduga mampu memanfaatkan oligosakarida dari madu yang ditambahkan pada pakan. Genus *Clostridium sensu stricto* yang teridentifikasi pada semua perlakuan penambahan madu sebanyak 2.87%. *Clostridium* adalah bakteri komensal dan kemoorganotropik yang mampu memfermentasi berbagai nutrien, seperti karbohidrat, protein, asam organik, dan bahan organik lainnya, untuk menghasilkan asam asetat, asam propionat, asam butirat, dan beberapa pelarut, seperti aseton dan butanol yang akan menghasilkan asam lemak rantai pendek (SCFA) dari fermentasi karbohidrat (Guo *et al.* 2020), sehingga dalam akuakultur sering digunakan sebagai probiotik. Genus *Cetobacterium* juga merupakan salah satu probiotik yang digunakan pada akuakultur. Pada perlakuan 1% madu mempunyai jumlah *Cetobacterium* lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan perlakuan pemberian madu dosis lain.

Penambahan prebiotik madu pada pakan mampu meningkatkan jumlah bakteri probiotik dan merubah komposisi mikrobiota pada saluran pencernaan ikan nila, yang berkorelasi dengan kinerja pertumbuhan dan morfologi usus ikan nila. Indikator dari efektivitas prebiotik adalah kemampuannya menahan pertumbuhan dan aktivitas bakteri patogen (Gibson *et al.* 2010). Menurut Musatto & Manchilha, (2007), bakteri probiotik mampu menfermentasi oligosakarida yang terkandung pada madu sebagai substrat untuk pertumbuhan dan menghambat bakteri patogen. Penggunaan prebiotik merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan pertumbuhan mikrobiota yang menguntungkan pada mukosa saluran pencernaan, memperbesar peluang menempelnya bakteri menguntungkan dari kelompok bakteri asam laktat, seperti bifidobacteria dalam saluran pencernaan ikan (Wu *et al.* 2014), yang secara tidak langsung mencegah perlekatan dan kolonisasi bakteri patogen (Song *et al.* 2014).

Setelah 30 hari pemeliharaan, ikan nila diuji tantang dengan bakteri *S. agalactiae* untuk diuji imunitasnya. Penambahan prebiotik madu mampu meningkatkan aktivitas *respiratory burst* pada ikan nila setelah masa pemeliharaan 30 hari dengan hasil terbaik diperoleh pada perlakuan madu dosis 0.25% sebesar 0.25% (2 ± 0.05), disusul dosis madu 1% (1.7 ± 0.02) dan 0.5% (1.7 ± 0.03). Hasil pengamatan aktivitas *respiratory burst* setelah masa uji tantang menunjukkan telah terjadi penurunan aktivitas bila dibandingkan dengan sebelum uji tantang. Nilai aktivitas *respiratory burst* tertinggi terdapat pada semua perlakuan madu ($P < 0.05$) dibandingkan kontrol positif. Secara umum, nilai *respiratory burst* pada hari ke-32 (2 hari setelah uji tantang) perlakuan madu menurun, hal ini disebabkan *S. agalactiae* yang masuk tidak menimbulkan stres, sehingga tidak muncul stress biologis karena infeksi patogen yang menyebabkan kenaikan nilai ROS. Fagositosis telah berhasil memusnahkan bakteri *S. agalactiae*. Selanjutnya ikan akan mengalami perbaikan jaringan, inflamasi serta peningkatan sistem imun spesifik. Hari ke-35 (5 hari setelah uji tantang) dan hari ke-37 (7 hari sesudah uji tantang), terjadi kenaikan *respiratory burst* pada perlakuan madu. Hal tersebut diduga terjadi produksi ROS walaupun sedikit, sehingga menyebabkan kenaikan *respiratory burst* walaupun perlahan.

Pada penelitian ini penambahan prebiotik madu selama 30 hari masa pemeliharaan mampu meningkatkan aktivitas lisozim dibandingkan dengan kontrol. Penurunan aktivitas lisozim terjadi setelah dilakukan uji tantang dengan *S. agalactiae*. Pada perlakuan kontrol positif, uji tantang dengan *S. agalactiae* meningkatkan nilai lisozim. Hal tersebut diduga karena sebelumnya tidak ada material yang memicu aktivitas lisozim. Sehingga pada saat ada rangsangan dari *S. agalactiae*, terjadi peningkatan nilai lisozim. Pada perlakuan madu, uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae* tidak menimbulkan lonjakan aktivitas lisozim. Hal tersebut diduga karena sebelumnya lisozim ikan nila sudah teraktivasi dengan pemberian madu. Sehingga uji tantang hanya memberikan penurunan pada hari ke-32 (2 hari sesudah uji tantang), dan cenderung stabil pada hari selanjutnya. Hal ini diduga ikan telah melakukan pemulihan pasca infeksi dan kembali ke kondisi seimbang.

Oligosakarida mampu merangsang pertumbuhan bakteri probiotik penghasil SCFA di usus (Abu-Elala *et al.* 2018). Selain itu, SCFA sebagai hasil dari fermentasi oligosakarida dapat digunakan sebagai promotor pertumbuhan dan stimulator imun (Liu *et al.* 2014; Estensoro *et al.* 2016; Hoseinifar *et al.* 2016, 2017; Safari *et al.* 2016; Silva *et al.* 2016; Tian *et al.* 2017). Sitokin adalah modulator kekebalan dan termasuk interleukin 1 β , (IL1 β), interleukin 8 (IL8), tumor faktor nekrosis alfa (TNF α), CXC2- dan CC-kemokin, interferon (IFN) dan resistensi myxovirus (Mx) (Xu *et al.* 2013). Gen-gen tersebut berperan dalam kemotaksis, aktivasi komplemen, menghancurkan patogen, dan opsonisasi dalam proses fagositosis (Salaun *et al.* 2007). Selama masa pemeliharaan, ekspresi gen IL8 mengalami kenaikan, diduga karena oligosakarida madu dikenali oleh reseptor TLR (*Toll-like receptors*) pada sel imun inang, sehingga muncul respons imun. Setelah diuji tantang ekspresi gen IL8 makin meningkat. Hal tersebut diduga karena bakteri patogen memicu naiknya gen IL8, dan kemudian berangsur turun pada hari ke-35 (5 hari sesudah uji tantang). Ekspresi gen IL8 pada hari ke-32 (2 hari sesudah uji tantang) menunjukkan pada dosis madu 0.5% lebih tinggi dibandingkan dosis madu 1%. Hal tersebut berkaitan dengan jumlah OTU pada akhir perlakuan madu (hari ke-30). Jumlah OTU pada perlakuan pemberian madu dosis 0.5% sangat tinggi yaitu sebesar 1335. Jumlah OTU yang sangat tinggi inilah yang menyebabkan ekspresi gen IL8 perlakuan madu dosis 0.5% terekspresi lebih tinggi dibandingkan perlakuan madu dosis 1%. Oligosakarida selain memodulasi sitokin dengan cara merangsang pertumbuhan bakteri probiotik penghasil SCFA di usus besar (Abu-Elala *et al.* 2018), juga mampu memicu imunitas inang secara langsung (Song *et al.* 2014). Peranan gen-gen terkait imunitas penting dalam mengendalikan serangan penyakit infeksi. IL8 memainkan peran penting dalam respon imun ikan, juga dalam peradangan akut dengan mengaktifasi dan memediasi neutrofil dan sel lain serta dalam memulai ledakan oksidatif pada neutrofil dan mendorong penyembuhan luka dengan mendorong angiogenesis (Mukaida *et al.* 1998). IL8 berperan meningkatkan kadar kalsium sitosol, *respiratory burst*, perubahan bentuk neutrofil dan kemotaksis (Laing *et al.* 2002).

Tumor necrosis factor alpha (TNF α) merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam berbagai respons inang, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, nekrosis, apoptosis, dan induksi sitokin lainnya. TNF α dapat menginduksi kelangsungan hidup yang dimediasi NF-kB atau apoptosis (Rahman & McFadden 2006). TNF α memiliki respons antimikroba yang kuat,

termasuk menginduksi apoptosis, membunuh sel yang terinfeksi, menghambat patogen, dan mengatur naik turunnya respons imun inang. Selama masa pemeliharaan, ekspresi TNF α pada semua perlakuan madu mengalami kenaikan. Hal tersebut karena oligosakarida madu dikenali oleh reseptor TLR (*Toll-like receptors*) pada sel imun inang, selanjutnya akan mengaktifkan respons imun. TNF α adalah mediator inflamasi sebagai respons infeksi suatu penyakit (Holland *et al.* 2002). Induksi TNF- α berperan penting dalam memicu respon imun bawaan melawan invasi bakteri melalui pola pengenalan mikroorganisme, kehadiran patogen, dan stimulasi respons inflamasi (Pietretti & Wiegertjes 2014). Sesudah ujiantang, terjadi penurunan ekspresi TNF α karena sistem imun sudah mengenali patogen, memberi sinyal pada sitokin, mengaktifkan transkrip TNF α , memberi respons imun, dan akhirnya berhasil mengalahkan patogen tanpa terjadinya peradangan dan kerusakan jaringan. Terdapat hubungan antara mikrobiota pada saluran pencernaan dengan ekspresi TNF α , yaitu saat perlakuan pemberian madu dosis 1% terjadi dominasi bakteri probiotik genus *Cetobacterium* (Gambar 20), ekspresi TNF α lebih tinggi dibandingkan dengan dosis madu yang lebih rendah dan kontrol (Gambar 15B), karena bakteri probiotik yang berlimpah akan memberikan sinyal transduksi yang lebih banyak sehingga ekspresi gen TNF α tetap tinggi. Mekanisme aktivasi sistem imun ikan nila yang diberi prebiotik madu disajikan pada Gambar 21. Ekspresi TNF α berhubungan dengan *respiratory burst* (Gambar 13), hal tersebut karena saat ada antigen bakteri *S. agalactiae* akan terjadi produksi ROS walaupun sedikit, sehingga menyebabkan kenaikan *respiratory burst* walaupun perlahan.

S. agalactiae pada perlakuan kontrol positif pada organ hati, ginjal, limpa, otak, dan usus signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan semua perlakuan pemberian prebiotik madu pada semua dosis. Tingginya *S. agalactiae* pada perlakuan kontrol positif diduga disebabkan karena tidak adanya proteksi dalam menghadapi serangan bakteri *S. agalactiae* pada uji tantang. *S. agalactiae* di usus pada perlakuan madu lebih sedikit dibandingkan kontrol positif. Pada pemberian madu dosis 1% tidak terdapat adanya *S. agalactiae*. Pada perlakuan pemberian madu, jumlah *S. agalactiae* menurun seiring dengan kenaikan dosis madu yang diberikan. Hal tersebut diduga karena serangan *S. agalactiae* dapat dikendalikan dengan terekspresinya gen IL8 dan TNF α yang juga berhubungan dengan produksi ROS yang akan menaikkan *respiratory burst* (Gambar 13). Madu 1% dapat terfermentasi dengan baik di usus oleh bakteri probiotik sehingga terjadi perubahan komponen mikrobiota, karena oligosakarida madu menyediakan substrat untuk pertumbuhan dan proliferasi bakteri probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* di usus. Jumlah *S. agalactiae* di otak pada perlakuan kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif pada organ lain, karena salah satu organ target dari *S. agalactiae* adalah otak (Abuseliana *et al.* 2011). Jaringan otak menunjukkan penebalan *meningeal* dan infiltrasi sel inflamasi yang mengindikasikan terjadinya *meningitis*, disertai dengan temuan adanya perdarahan (Suwannasang *et al.* 2014). *S. agalactiae* diduga mampu melewati *blood-brain barrier* dan mendapatkan akses ke sistem saraf pusat, sehingga menyebar ke seluruh sistem organ organisme yang memulai sepsis bakterial. Madu menghambat bakteri patogen melalui beberapa mekanisme, diantaranya menyebabkan perubahan struktur dan morfologi, kerusakan membran bakteri, perubahan siklus bakteri dan pertumbuhan sel, gangguan metabolisme,

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

gangguan mekanisme pompa efflux, perubahan sinyal quorum sensing bakteri, dan penghambatan biofilm (Combarros-Fuertes *et al.* 2020).

Pusat melanomakrofag (MMCs) merupakan sel fagositik berpigmen (melanin) yang bertindak sebagai respons cepat terhadap adanya infeksi dan kadar sitokin, seperti interleukin-1 (IL-1), IL-6, dan interferon-gamma (IFN- γ) juga dianggap sebagai penanda respon imun pada ikan (Agius & Robert 2003). Haemosiderin di organ hati kontrol positif, diduga terjadi karena adanya serangan bakteri *S. agalactiae*. Haemosiderin di MMCs diduga berasal dari plak infeksi *S. agalactiae* kronis, sehingga timbul warna biru dan melanin berwarna coklat sangat gelap pada jaringan. Perubahan warna pada hati menunjukkan adanya degenerasi hepatosit dan kongesti pada sinusoid karena ketidakmampuan hati untuk mendetoksifikasi benda asing dan mengakibatkan disfungsi hati dan akhirnya terjadi kematian (Suwannasang *et al.* 2014). Perlakuan madu tidak menimbulkan hemosiderin diduga karena oligosakarida yang dimanfaatkan dengan baik oleh inang, sehingga menimbulkan imunitas terhadap serangan *S. agalactiae*. Oligosakarida madu berperan sebagai imunomodulator, yaitu senyawa atau zat yang meningkatkan respons sistem kekebalan, yang diduga menghasilkan resistansi organisme terhadap keberadaan patogen (Vallejos-Vidal *et al.* 2016).

Kelangsungan hidup ikan nila yang diberi prebiotik madu setelah diuji tantang dengan *S. agalactiae* lebih tinggi dibandingkan perlakuan kontrol positif. Sedangkan pada perlakuan madu, kelangsungan hidup tertinggi pada dosis 1% berbeda nyata dengan dosis 0.25% dan 0.5%. Rendahnya angka kematian pada perlakuan prebiotik madu setelah uji tantang menunjukkan bahwa penambahan madu dalam pakan dapat menekan pertumbuhan patogen dengan cara meningkatkan respons imun. Tingginya mortalitas pada perlakuan kontrol positif juga disebabkan oleh rendahnya imunitas ikan nila dalam melawan infeksi bakteri *S. agalactiae*, terlihat dari rendahnya nilai parameter imunitas yang dihasilkan pada perlakuan kontrol positif. Tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi pada perlakuan prebiotik madu didukung oleh tingginya kadar lisozim dan *respiratory burst* pada akhir masa pemeliharaan. Imunitas yang meningkat memberikan pertahanan yang lebih baik pada ikan nila ketika terjadi serangan patogen *S. agalactiae*.

Perlakuan madu 1% yang diuji tantang menunjukkan OTU yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif. Hal ini sesuai dengan hasil pengujian *respiratory burst*, lisozim, dan kelangsungan hidup ikan nila yang diberi prebiotik madu signifikan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Diduga oligosakarida madu dapat dimanfaatkan secara optimal oleh mikrobiota usus sehingga terjadi kesetimbangan antar spesies sehingga semua komponen mikrobiota menguntungkan dapat tumbuh dengan optimal.

Mikrobiota usus memiliki peran penting dalam pencernaan zat makanan kompleks serta dalam mempertahankan status kesehatan inang. Perlakuan madu 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak filum, karena oligosakarida madu dapat digunakan dengan baik oleh bakteri pada saluran pencernaan ikan nila, sehingga meningkatkan jumlah dan variasi mikrobiota usus.

Perlakuan penambahan madu dosis 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak variasi ordo dibandingkan perlakuan kontrol positif. Genus *Streptococcus* mendominasi perlakuan kontrol positif hingga mencapai 98%. Perlakuan penambahan madu dosis 1% yang diuji tantang memberikan lebih banyak variasi

genus dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif. Genus *Cetobacterium*, diantaranya *Cetobacterium somerae* banyak ditemukan pada ikan air tawar, mampu menghasilkan vitamin B12 yang tinggi (Tsuchiya *et al.* 2008), juga mampu menghambat pertumbuhan strain bakteri lain (Sugita *et al.* 1996). Kelimpahannya yang tinggi pada ikan air tawar memiliki potensi dalam pengembangan probiotik dan prebiotik di masa datang (Larsen *et al.* 2014). Genus *bacteroides* adalah salah satu bakteri probiotik ikan air tawar (Lakhsmi *et al.* 2015). Genus *Akermansia* diantaranya *Akermansia muciniphila* disebut probiotik masa depan. Fermentasi *A. muciniphila* menghasilkan sulfat bebas dan memproduksi asetat dan propionat dalam usus yang bermanfaat bagi inang.

Pada bidang akuakultur, madu sebagai prebiotik memiliki nilai lebih apabila dibandingkan dengan jenis prebiotik lainnya. Dari sisi penggunaannya, madu sebagai prebiotik dapat dimanfaatkan secara langsung oleh pembudidaya tanpa memerlukan ekstraksi terlebih dahulu. Ikan mampu memanfaatkan semua prebiotik yang terkandung dalam madu. Sebagai pembanding adalah penelitian prebiotik ubi jalar (Djauhari *et al.* 2017), yang membutuhkan biaya besar untuk melakukan ekstraksi agar dapat memanfaatkan kandungan satu jenis prebiotik dari ubi jalar tersebut. Hal tersebut tentunya secara ekonomi akan menyulitkan pembudidaya. Selain itu, harga prebiotik komersial yang ada di pasaran jauh lebih mahal dibandingkan harga madu.

Pemberian prebiotik madu memberikan kinerja pertumbuhan yang tinggi dibandingkan dengan prebiotik tunggal, seperti penelitian Poolsawat *et al.* 2020 yang memberikan prebiotik FOS pada ikan nila. Madu mengandung FOS dan inulin (hasil penelitian tahap 1), memberikan pertambahan bobot ikan, laju pertumbuhan yang spesifik dan aktivitas enzim amilase lebih tinggi. Demikian juga dengan jumlah mikrobiota usus. Pemberian prebiotik madu memberikan OTU yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian satu jenis prebiotik. Selain itu, pada penambahan prebiotik madu terdapat genus *Clostridium-sensu-stricto* dan *Bacillus* yang bisanya dimanfaatkan sebagai prebiotik pada akuakultur. Imunitas ikan nila yang diberi prebiotik madu lebih tinggi dibandingkan dengan prebiotik tunggal, seperti penelitian El-Gawad *et al.* 2016, yang memberikan FOS pada ikan nila. Nilai lisozim pemberian FOS dosis 1% berkisar 40 IU mL⁻¹menit⁻¹. Sedangkan pada pemberian madu 1% sebesar 67.89 IU mL⁻¹menit⁻¹. Hal tersebut karena madu mengandung FOS dan inulin (hasil penelitian tahap 1), sehingga dengan menggunakan madu dapat sekaligus menggunakan dua macam prebiotik yang berbeda, yang tentu saja memberikan manfaat yang jauh lebih besar. Demikian juga pada penelitian Hoseinifar *et al.* 2017, yang memberikan prebiotik inulin pada ikan mas, ekspresi gen TNF α lebih rendah dibandingkan dengan nilai ekspresi gen TNF α pemberian prebiotik madu.

Berdasarkan uraian di atas maka didapatkan gambaran bahwa penggunaan prebiotik madu randu mempunyai manfaat yang besar bagi budidaya perikanan dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan proteksi serangan penyakit. Hal tersebut karena madu randu selain mengandung oligosakarida berupa FOS dan inulin sebesar 21.36% (hasil penelitian tahap 1), mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan keragaman mikrobiota usus. Selain itu madu meningkatkan respons imun, ekspresi gen terkait dengan imunitas, mengurangi populasi *S. agalactiae*, meningkatkan kelangsungan hidup, dan memberikan variasi mikrobiota yang tinggi pada ikan nila setelah diuji tantang dengan hasil terbaik penggunaan madu dosis 1%.

Penelitian madu sebagai prebiotik ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji efektivitas dan efisiensi dari penggunaan madu, diantaranya: evaluasi skala lapangan serta uji multilokasi agar dapat mengevaluasi keuntungan ekonomi yang didapat dari pemberian prebiotik madu serta mengevaluasi penggunaan prebiotik madu pada komoditi perikanan lain dengan patogen yang berbeda.

VII SIMPULAN DAN SARAN UMUM

7.1 Simpulan

Pemberian madu sebagai prebiotik mampu meningkatkan keragaman mikrobiota usus, kinerja pertumbuhan, respons imun, dan resistansi ikan nila terhadap infeksi *S. agalactiae*, dengan hasil terbaik pada pemberian madu randu dengan dosis 1%.

7.2 Saran

Dengan beragamnya jenis madu di pasaran, perlu dilakukan pemilihan jenis-jenis madu yang memiliki kandungan prebiotik tinggi sehingga mampu memberikan manfaat yang optimal bagi ikan. Perlu dilakukan evaluasi aplikasi madu pada skala lapangan dan uji multilokasi disertai dengan analisis ekonomi pada komoditas budidaya lain dengan patogen yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and molecular immunology. 7th ed. PA, USA: Saunders Elsevier Philadelphia.
- Ab El-latif AM, Abd El-Gawad EAA, Emam MAA. 2015. Effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on feed utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Egyptian Journal of Aquaculture*. 5:1-16. [https://doi: 10.21608/eja.2019.46730](https://doi.org/10.21608/eja.2019.46730).
- Abu-Elala N, Younis NA, Abu Bakar HO, Ragaa NM, Borges LL, Bonato MA. 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 44:331-341.
- Abuseliana AF, Daud HHM, Abdul Aziz S, Khairani Bejo S, Al Said M. 2011. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.) *JAVA*. 7:914-919.
- Agbenorhevi JK, Oduro I, Ellis WO, Abodakpi VD, Eleblu SE. 2007. Effect of soaking, autoclaving and repeated boiling on oligosaccharides in cowpea. *Nigerian Food Journal*. 25:88-94.
- Agius C, Roberts RJ. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Disease*. 26:499-561.
- Ai Q, Xu H, Mai K, Xu W, Wang J. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*. 317:155-161.
- Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M. 2015. A review: Probiotics and prebiotics associated with aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. 45: 733-741. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>.
- Allameh SK, Yusoff FM, Ringo E, Daud HM, Saad CR, Ideris A. 2015. Effects of dietary mono-and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp (*Puntius gonionotus* Bleeker 1850). *Aquaculture Nutrition*. 367-373. <https://doi.org/10.1111/anu.12265>.
- Amal MNA, Saad MX, Zahrah AS, Zulkafli AR. 2015. Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*. 46:313-323. <https://doi.org/10.1111/are.12180>.
- Amirkolaie AK, Verreth JA, Schrama JW. 2006. Effect of gelatinization degree and inclusion level of dietary starch on the characteristics of digesta and faeces in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 260:194-205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.039>.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. (Eds.). Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health Section. Manila: Asian Fisheries Society. p. 185-202.
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem*. 63:549-562.
- Anguiano M, Pohlenz C, Buentello A, Gatlin DM. 2013. The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops*

ocellatus) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *British Journal of Nutrition*. 109:623-629. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114512001754>.

- Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H, Hirono I. 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In *Fisheries for Global Welfare and Environment, Memorial Book of the 5th World Fisheries Congress* (pp. 263-276). Terrapub: Tokyo, Japan.
- Arques AM, Schryver P, Bossier P, Gorkiewicz G, Mulero V, Gatlin DM, Villegas JG. 2015. Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Frontier Immunology*. 6:1-14.
- Bahey-El-Din M. 2012. *Lactococcus lactis* based vaccines from laboratory bench to human use: An overview. *Vaccine*. 30: 685-690.
- Banerjee D, Chowdhury R, Bhattacharya P. 2017. *In-vitro* evaluation of targeted release of probiotic *Lactobacillus casei* (2651 1951 RPK) from symbiotic microcapsules in the gastrointestinal (GI) system. Experiment and modelling. *LWT-Food Sci Technol*. Doi 10.1016/j.lwt.2017.05.011.
- Basson NJ, Grobler SR. 2008. Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected microorganisms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 41: 1-4. doi:10.1186/1472-6882-8-41.
- Bergmeyer HU, Grassi M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Volume 2. Berlin (DE): Verlag Chemie.
- Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 12:303–10.
- Bogdanov S, Martin, P, Lüllmann C. Apidologie. 1997. 29: 513-524. [13] International Honey Commission Harmonised methods of the International Honey Commission. <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009>. 2009; Accessed 23-04-2016.
- Borlongan TG. 1990. Studies on the lipase of milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture*. 89: 315-325. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90135-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90135-A).
- Bowater RO, Forbes-Faulkner J, Anderson IG, Condon K, Robinson B. 2012. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in Northern Queensland, Australia. *Journal of Fish Disease*. 35: 173-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01332.x>.
- Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. 2011. T-cell subsets and T cell-mediated immunity. In *Principles of immunopharmacology*. ISBN: 978-3-03460135-1. DOI:10.1007/978-3-0346-0136-8_2.
- Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. 2012. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*. 10:66-78.
- Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez Pomares L. 2002. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med*. 196 407e412.
- Cai X, Wang B, Peng Y, Li Y, Lu Y, Huang Y, Jiana J, Wu Z. 2016. Construction of a *Streptococcus agalactiae phoB* mutant and evaluation of its potential as

an attenuated modified live vaccine in golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 63:405-416.

Camila FS, Silva RF, Amara MGC, Domingos FFT, Ribeiro RIMA, Thome RG, Santos HB. 2017. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyology*. 151: e160041. DOI 10.1590/1982-0224-20160041.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenkov T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

Cebeci A, Gurakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol*. 20:511-518.

Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MA. 2011. Current knowledge in synbiotic use of fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 1:1-8.

Chen M, Wu Y, Yan Q, Zhao J, Feng L, He M, Zhenzhen LV. 2018. Effects of dietary konjac oligosaccharide supplementation on serum immune parameters and intestinal immunity of *Schizothorax prenanti*. *Fisheries Science*. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1252-z>.

Chen M, Li LP, Wang R, Liang WW, Huang Y, Li J, Lei AY, Huang WY, Gan X. 2012. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary Microbiology*. 159:526-530.

Combarros-Fuertes P, Fresno JM, Estevinho MM, Sousa-Pimenta M, Tornadijo ME, Estevinho LM. 2020. Review: Honey: Another Alternative in the Fight against Antibiotic-Resistant Bacteria?. *Antibiotics*. 9: 774. doi:10.3390/antibiotics9110774.

Cummings JH, Macfarlane, GT, Englyst HN. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73:415-420.

Das S, Mondal K, Haque S. 2017. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2:422-429.

Dehaghani, PG, Baboli MJ, Moghadam AM, Ziaei-Nejad S, Pourfarhadi M. 2015. Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Czech Journal of Animal Science*. 60:224-232.

Demers NE, Bayne CJ. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 21: 363-373.

Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. 2012. Dietary fibre in foods: a review. *J Food Sci Technol*. 49:255-66.

Di Maiuta N, Schwarzentruher P, Schenker M, Schoelkopf, J. 2013. Microbial population dynamics in the faeces of wood-eating loricariid catfishes. *Letter of Applied Microbiology*. 56:401-407. <https://doi.org/10.1111/lam.12061>.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Diaz-Satizabal L, Magor BG. 2015. Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius auratus*, L.). *Dev Comp Immunol*. 48: 221-8.
- Dimitroglou A, Reynolds P, Ravnoy B, Johnsen F, Sweetman JW. 2011. The Effect of Mannan Oligosaccharide Supplementation on Atlantic Salmon Smolts (*Salmo salar* L.) Fed Diets with High Levels of Plant Proteins. *Journal of Aquaculture Research and Development*. S1:011. doi:10.4172/21559546.S1-011.
- Dimitroglou A, Merrifield P, Spring J, Sweetman R, Moate, Davies SJ. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 300: 182–188. [https://doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.01.015](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.015).
- Dimitroglou A, Davis SJ, Sweetman J, Divanach P, Chatzifotis S. 2010. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: Effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquaculture Research*. 41: 245-251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02513.x>.
- Djahuri R, Widanarni, Sukenda, Suprayudi MA, Zairin Jr M. 2017. Growth Performance and Health Status of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Supplemented with Prebiotic from Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Extract. *Pakistan Journal of Nutrition*. 16: 155-163. DOI: 10.3923/pjn.2017.155.163.
- Doeschate KI, Coyne VE. 2008. Improved growth rate in farmed Halotiismidae through probiotic treatment, *Aquaculture*. 284 174e179.
- El-Asely A, Abbas AA, Austin B. 2014. Honey bee pollen improves growth, immunity & protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with aeromonas hydrophila. *Fish & Shellfish Immunology*. 40:500-504.
- Elbahnaswya S, Elshopakey G. 2020. Differential gene expression and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged intraperitoneally with *Photobacterium damsela* and *Aeromonas hydrophila* demonstrating immunosuppression. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735364>.
- El-Gawad A, Ashraf M, Abd El-latif, Shourbela RM. 2016. Enhancement of Antioxidant Activity, Non-specific Immunity and Growth Performance of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* by Dietary Fructooligosaccharide. *Journal Aquaculture Research & Development*. 7:1-7. [https://doi: 10.4172/2155-9546.1000427](https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000427).
- Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 827-39. DOI: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6.
- Ellis AE. 1990. *Lysozyme Assays*. Techniques in fish immunology. Pp101-103.
- Erejuwa O, Sulaiman SA, Wahab MS. 2014. Modulation of gut microbiota in the management of metabolic disorders: the prospects and challenges. *International Journal of Molecular Science*. 15:4158-4188.
- Estensoro I, Ballester-Lozano G, Benedito-Palos L, Grammes F, Martos-Sitcha JA, Mydland LT. 2016. Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a

marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLoS ONE* 11: e0166564.

[FAO] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

Fagan MS, O'Byrne-Ring N, Ryan R, Cotter D, Whelan K, Mac Evilly U. 2003. A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification. *Aquaculture*. 222: 287-300.

Malony G, Armas JC, Mendoza JCD, Hernández JLM. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology & Biotechnology*. 44: 235-240.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9:577-589.

Fitzsimmons K. 2018. Global developments and market trends in tilapia. In: Asian Aquaculture Conference 2018, Bangkok. Thailand. [https://DOI:10.13140/RG.2.2.16948.09603](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16948.09603).

Fuandila NN, Widanarni, Yuhana M. 2019. Growth performance and immune response of prebiotic honey fed pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Journal of Applied Aquaculture*. DOI: 10.1080/10454438.2019.1615593.

García-Elorriaga G, Pineda G. 2013. Nutrition and intestinal microflora. *Journal of Nutrition Therapy*. 2:112-121.

García-Elorriaga G, Pineda G. 2013. Nutrition and intestinal microflora. *Journal of Nutrition Therapy*. 2:112-121.

Gao Y, Storebakken T, Shearer KD, Penn M, Øverland M. 2011. Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. *Aquaculture*. 311:233-240.

Ghanbari M, Kneifel W, Domig KJ. 2015. A new view of the fish gut microbiome: advances from next generation sequencing. *Aquaculture*. 448: 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

Gibson PR, Varney J, Malakar S, Muir JG. 2015. Food components and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 148:1158-1174.

Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Feradon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *The Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 7:1-19. [https://doi: 10.1616/1476-2137.15880](https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880).

Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. 2005. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17:259-275. DOI: 10.1079/NRR200479.

Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125:1401-1412.

Grisdale-Helland B, Helland S, Gatlin DM. 2008. The effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic Salmon

(*Salmo salar*). *Aquaculture*. 283:163-167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>.

- Goethe R, Phi-van L. 1998. Posttranscriptional lipopolysaccharide regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11 cells. *Journal of Immunology*. 160:4970e8.
- Goh YJ, Zhang C, Benson AK, Schlegel V, Lee JH, Hutkins RW. 2006. Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:7518-7530. DOI: 10.1128/AEM.00877-06.
- Goldstein J, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael J. 2003. *Scanning Electron Microscopy and x-Ray Microanalysis*. 3rd ed. United States of America: Springer.
- Gomes JMM, Ribeiro HJ, Procópio MS, Alvarenga BM, Castro ACS, Dutra WO, Silva JBB, Corrêa Junior JD. 2015. What the erythrocytic nuclear alteration frequencies could tell us about genotoxicity and macrophage iron storage?. *PLoS One*. 11: e0143029.
- Gu MH, Ma K, Mai W, Zhang N, Bai, Wang X. 2011. Effectsofdietary β -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 31:303-309.
- Guerreiro I, Couto A, Machado M, Castro C, Pousao Ferreira P, Oliva-Teles A. 2016. Probiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Fish Shellfish Immunol*. 50:168-174.
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P. 2020. A review: Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 11:24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>.
- Hamsah, Widanarni, Alimuddin, Yuhana M, Junior MZ. 2017. The nutritional value of *Artemia* sp. enriched with probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and the prebiotic mannan-oligosaccharide. *AACL Bioflux*, 10:8-17.
- Hani YMI, Adrien M, Cyril T, Elodie K, Olivier P, Bado-Niles A, Beaudouin R, Porcher JM, Alain Geffard A, Dedourge-Geffard O. 2018. Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Characterization and pathogenicity of β and non haemolytic *Streptococcus agalactiae* in cultured Nila tilapia. *Journal of Veterinary*. 12:152-164.
- Hernandez O, Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML. 2009. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *International Dairy Journal*. 19:531-536.
- Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ. 2002. Recombinant interleukin-1 β activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Endocrinology*. 175:261.267. DOI: 10.1677/joe.0.1750261.
- Hoseinifar SH, Safari R, Dadar M. 2017. Dietary sodium propionate affects mucosal immune parameters, growth and appetite related genes expression:

Insights from zebrafish model. General and Comparative. *Endocrinology* 243:78-83.

Hoseinifar SH, Ahmadi A, Khalili M, Raeisi M, Van Doan H, Caipang CM. 2017. The study of antioxidant enzymes and immune-related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different prebiotics. *Aquaculture Research*. 1-8. DOI: 10.1111/are.13359.

Hobden MR, Guerin-Deremaux L, Rowland I, Gibson GR, Kennedy OB. 2015. Potential anti-obesogenic properties of non-digestible carbohydrates: specific focus on resistant dextrin. *Proc Nutr Soc*. 7:258-67.

Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, Hutkins RW. 2008. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*. 18:287-293.

Iwama G. 1996. *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto. 68-95, 185-222p.

Iwama G, Nakanishi T. 1996. *The Fish Immune System. Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press. USA. 380 hlm.

Jan MS, Mohd NMS, Norrakiah AS. 2010. Fructooligosaccharides in honey and effects of honey on growth of *Bifidobacterium longum* BB 536. *International Food Research Journal*. 17:557-561.

Jantrakajorn S, Maisak H, Wongtavatchai J. 2014. Comprehensive investigation of streptococcosis outbreaks in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and red tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. *Journal World Aquatic Society*. 45:392-402.

Kannika K, Pisuttharachai D, Srisapoom P, Wongtavatchai J, Kondo H, Hirono I, Unaja KS, Areechon N. 2017. Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal Applied Microbiology*. 6:1497-1507. [https://doi: 10.1111/jam.13447](https://doi.org/10.1111/jam.13447).

Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2682-2684.

Kayansamruaj P, Dong HT, Pirarat N, Nilubol D, Rodkhum C. 2017. Efficacy of α -enolase-based DNA vaccine against pathogenic *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Short Communication. *Aquaculture*. 468:102-106.

Kazun B, Kazun K, Ylińska J, Siwicki AK. 2018. *In vitro* study of *Lactobacillus plantarum* properties as a potential probiotic strain and an alternative method to antibiotic treatment of fish. *Fisheries & Aquatic Life*. 26:47-55.

Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM. 2014. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomized controlled trials. *British Journal of Nutrition*. 111:1147-1161.

Kennedy DA, Kurath G, Brito IL, Purcell MK, Andrew F, Read AF, Winton JR, Wargo AA. 2016. Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evolutionary Applications*. 9: 344-454. doi:10.1111/eva.12342.

Khan RA, Barker DE, Hooper R, Lee EM, Ryan K, Nag K. 1994. Histopathology in Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 26. 95-102.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Kihara M, Sakata T. 2002. Production of short-chain fatty acids and gas from various oligosaccharides by gut microbes of carp (*Cyprinus carpio* L) in micro scale batch culture. *Comp. Biochem. Physiol.* 132: 333-340.
- Kucuk M, Kolaylı S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from anatolia. *Food Chemistry*. 100:526-534.
- Kusar D, Zajc U, Jenci V, Ocepek M, Higgins J, Zolnir-Dov M, Pate M. 2016. Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases*. doi:10.1111/jfd.12558.
- Kwakman PHS, Zaat SAJ. 2012. Antibacterial component of honey. *IUBMB Life*. 64:48-55.
- Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T. 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Development & Comparative Immunology*. 26:433-44. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00092-1).
- Laith AA, Ambak MA, Hassan M, Sheriff SMd, Nadirah M. 2017. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary World*. 10: 101-111. doi: 10.14202/vetworld.2017.101-111.
- Lakshmi B, Viswanath B, Sai Gopal DVR. 2013. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *Journal of Pathology*. Article ID 424123. p. 1–13.
- Landry BKU, Jayabalan R, Sahoo M. 2016. Honey, prebiotics, and probiotics: review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 7:2428-2438.
- Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR. 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 1396-1404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>.
- Lazado CC, Caipang CM, Estante EG. 2015. Prospects of host associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol*. 45:212.
- Lee EY, Park HH, Kim Y, Chung JK, Choi TJ. 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Gene*. 274:237-243. DOI: 10.1016/s0378-1119(01)00600-x.
- Leenhouwers JJ, Ortega RC, Verreth JA, Schrama JW. 2007. Digesta characteristics in relation to nutrient digestibility and mineral absorption in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed cereal grains of increasing viscosity. *Aquaculture*. 273:556-565. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.044>.
- Leknes IL. An improved method to demonstrate macrophages in teleosts. 2015. *Tissue Cell*. 3:254-56.
- Li T, Long M, Gatesoupe FJ, Zhang Q, Li A, Gong X. 2015. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microbiolog & Ecology*. 69:25-36. DOI 10.1007/s00248-014-0480-8. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0480-8>.
- Li J, Ni J, Li J, Wang C, Li X, Wu S, Zhang T, Yu Y, Yan Q. 2014. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different

feeding habits. *Journal Applied of Microbiology*. 117:1750-1760. [https://doi: 10.1111/jam.12663](https://doi.org/10.1111/jam.12663).

- Li A, Yang W, Hu J. 2006. Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophilla* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus* L.). *Aquaculture Research*. 37: 813-820. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2006.01497.x.
- Lin HT, Lin HY, Yang HL. 2005. Histology and histochemical enzyme-staining patterns of major immune organs in *Epinephelus malabaricus*. *Journal of Fish Biology*. 66: 729-40. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00635.x>.
- Liu W, Yang Y, Zhang J, Gatlin DM, Ringø E, Zhou Z. 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition* 112:15-29.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lusiastuti AM, Textor M, Seeger H, Akineden O, Zschöck M. 2014. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence tipe 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. *Aquaculture Research*. 45:1260-1263. [https://doi: 10.1111/are.12069](https://doi.org/10.1111/are.12069).
- Lyons BP, Stentiford GD, Green M, Bignell J. 2004. "DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 55:177-186. 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.016.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2011. *Brock biology of microorganism*. 13th ed.
- Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*. 20: 137-51.
- Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiology Research*. 168:311-332.[https://doi 10.1016/j.micres. 2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.002).
- Marchesi J, Fava F, Adam DH, Hermes GDA. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 65:330-339.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 461:1282-1296.
- Mano MCR, da Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM. 2017. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102:17-37.
- Macfarlane S, Macfarlane GT. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceeding Nutrition Society*. 62:67-72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>.
- Merrifield DL, Olsen RE, Myklebust R, Ringø E, El-Shemy H. 2011. Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. Soybean and nutrition. 2011. <http://www.intechopen.com/books/>

soybean-and-nutrition/dietary-effect-of-soybean-glycine-max-products-on-gut-histology-and-microbiota-of-fish.

- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøgwald J, Castex M, Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 302:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>.
- Metzler-Zebeli BU, Hooda S, Pieper R, Zijlstra RT, van Kessel AG, Mosenthin R. 2010. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:3692-3701. <https://doi.org/10.1128/AEM.00257-10>.
- Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HCP. 2009. Aspect of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Journal of Veterinary Microbiology*. 136:180-183.
- Ming C, Rui W, Liping L, Huang T, Weiye H, Jian L, Chao L, Aiying L, Honglin L, Wanwen L. 2013. Sequence and evolution differences of *Oreochromis niloticus* CXC contribute to the diversification of cellular immune responses in tilapias with treatment of *Streptococcus iniae*. *Journal of Animal Veterinary Advances*. 12:303-311.
- Mingmongkolchai S, Panbangred W. 2018. A review: *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*. 124:1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.13690>.
- Mohan A, Quek SY, Maddox NG, Gao Y, Shu Q. 2017. Effect of honey in improving the gut microbial balance. A review: *Food Quality Safety*. 1:107-115. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx015>.
- Morales V, Sanz ML, Olano A, Corzo N. 2006. Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. *Chromatographia*. 64: 233-238.
- Mukaida N, Harada A, Matsushima K. 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 9:9-23. DOI: 10.1016/S1359-6101(97)00022-1.
- Munaeni W, Widanarni, Yuhana M, Setiawati M, Wahyudi AT. 2020. Impact of dietary supplementation with *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. on intestinal microbiota diversity and growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 528: 735466. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735466>.
- Mussatto SI, Mancilha IM. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review: Carbohydrate Polymers. 68, 587- 597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>.
- Opiyo MA, Esther Marijanib, Patricia Muendoc, Rezin Odeded, William Leschene, Harrison Charo-Karisa. 2018. A review of aquaculture production and health management practices of farmed fish in Kenya. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6:141-148.
- Osman KM, Khalid S. Al-Maary, Aymen S. Mubarak, Turki M. Dawoud, Ihab MI. Moussa, Mai DS. Ibrahim, Ashgan M. Hessain, Ahmed Orabil, Nehal M, Fawzy. 2017. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Veterinary Research*. 13:357. DOI 10.1186/s12917-017-1289-8.

- Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietila TE, Kainulainen V, Klievink J, Belzer C. 2017. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS ONE*, 12: e0173004. doi.org/10.1371/journal.pone.0173004.
- Oswald C. 2018. Digestive Enzyme: Amylase, Protease, and Lipase. *Integrative Therapeutics*.
- Pang JJ, Gao FY, Lu MX, Ye X, Zhu HP, Ke XL. 2013. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns. *Fish & Shellfish Immunology*. 34:486-496.
- Patel S, Goyal A. 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *Biotech*. 2:115-125.
- Pech ZGH, Chavez CMR, Reynoso FL. 2017. Pathogenic Bacteria in *Oreochromis niloticus* Var. Stirling Tilapia Culture. *Fish Aqua*. 8:1-7. https://doi: 10.4172/2150-3508.1000197.
- Pech HZG, Sánchez LC, Chávez MR, Reynoso FL, Collado CJ, Rosado P. 2016. Current state of bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 7:428-438.
- Pereira UP, Mian GF, Oliveira ICM, Figueiredo HCP. 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human, and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Journal of Veterinary & Microbiology*. 140:186-192.
- Peters D. 2006. Carbohydrates for fermentation. *Journal Biotechnology*, 1: 806-814.
- Pietretti D, Wiegertjes GF, 2014. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Development and Comparative Immunology*. 43: 205-222. https://doi.org/ 10.1016/j.dci.2013.08.010.
- Poolsawat L, Li X, Yang H, Yang P, Chowdhury MAK, Yusuf A, Leng X. 2020. The potentials of fructooligosaccharide on growth, feed utilization, immune and antioxidant parameters, microbial community and disease resistance of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Research*. 00:1-13. DOI: 10.1111/are.14786.
- Poot-Lopez GR, Hernandez JM, Gasca-Leyva E. 2014. Analysis of ration size in Nile tilapia production: Economics and environmental implications. *Aquaculture*. 420:98-205. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.005.
- Pradeep PJ, Suebsing R, Sirthammajak S, Kampeera J, Jitrakorn S, Saksmerprom V, Jeffs A. 2016. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture Reports*. 3: 58-66. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.12.002.
- Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L. 2006. Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 43:279-291.
- Piazzon MC, Caldach-Giner JA, Fouz B, Estensoro I, Simo-Mirabet P, Puyalto M. 2017. Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*. 5:164.
- Poole C. 2014. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Elsevier

- Pujante IM, Díaz-López M, Mancera JM, Moyano FJ. 2017. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*. 482:367-76.
- Rahman MM, McFadden G. 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathogens*. 2: 1-12. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020004.
- Ramadan MF, Al-Ghamdi A. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly. *Journal of Functional Foods*. 4:39-52.
- Ray AK, Ghosh K, Ringo E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*. 18:465-492.
- Rastall RA, Gibson GR. 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion Biotechnology*. 32:42-46.
- Refstie SG, Baevefjord RR, Seim, Elvebo O. 2010. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*. 305:109-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.005>.
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. 433:50-61.
- Ringo E, Hoseinifar SH, Ghosh K, Doan HV, Beck BR, Song SK. 2018. A review: Lactic Acid Bacteria in Finfish-An update. *Frontiers in Microbiology*. 9:1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>.
- Ringø E, Song SK. 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquacult. Nutr*. 22:4-24. 10.1111/anu.12349.
- Ringo E, Zhou Z, He S, Olsen RE. 2014. Effect of stress on intestinal microbiota of Arctic charr (Atlantic salmon, Rainbow trout and Atlantic cod. *African Journal of Microbiology*. 8:609-618.
- Ringo E, Olsen RE, Gifstand TO, Dalmo RA, Amlund H, Hemre GI, Bakke AM. 2010. Prebiotics in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*. 16:117-136.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyle L, McCartney AL, Rastal R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104:3-51.
- Robles R, Lozano A, Sevilla A, Marquez L, Nuez-Ortín W, Moyano F. 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 39: 1567-1580.
- Rodriguez-Estrada U, Satoh S, Haga Y, Fushimi H, Sweetman J. 2013. Effect of inactivated *Enterococcus faecalis* and mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity and disease protection in rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*. 75: 416-428. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.799620>.
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF. 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal*. 5:1595-1608. doi:10.1038/ismej.2011.3.

- Roy CC, Kien CL, Bouthillier L, Levy E. 2006. Short-chain fatty acids: ready for prime time. *Nutrition Clinical Practise*. 21:351-66.
- Ruiz-Matute AI, Brokl M, Soria AC, Sanz ML, Matinez-Castro. 2010. Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemical*. 120:637-642.
- Rurangwa JL, Laranja R, Van Houdt, Delaedt Y, Geraylou Z, Van de Wiele T, Van Loo J, Van Craeyveld V, Courtin CM, Delcour JA, Ollevier F. 2008. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 932-940. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04034.x.
- Saanin, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan, Jakarta : Bina Cipta.
- Safari R, Hoseinifar SH, Kavandi M. 2016. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. *Fish Physiology and Biochemistry*. 42: 1733-1739.
- Sado RY, Fernanda Raulino-Domanski F, de Freitas PF, Baioco-Sales F. 2015. Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Lat. Am. J. Aquat. Res*. 43: 944-952.
- Salaun B, Romero P, Lebecque S. 2007. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Europe Journal Immunology*. 37:3311-3318. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737744>.
- Salze G, Mclean E, Schwarz MH, Craig SR. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhance salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*. 274:148-152. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.008.
- Sang HM, Fotedar M. 2010. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performance soft hetropical spiny lobster juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius1798). *Fish & Shellfish Immunology*. 28:483-489. <https://doi: 10.1016/j.fsi.2009.12.011>.
- Santos-Buelga C, Gonzales-Paramas AM. 2017. Chemical Composition of Honey. Bee Product-Chemical and Biological Properties. Pp 43-82.
- Sharma S, Sreeja V, Prajapati JB. 2016. Development of synbiotic lassi containing honey: studies on probiotic viability, product characteristics and shelf life. *Indian Journal of Dairy Science*. 69:148-153.
- Sakine B, Rahimi S, Miran SNK. 2016. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. *Veterinary Research Forum*. 7:13-20.
- Sankari H, Philip B, Philip R, Singh ISB. 2016. Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Etroplus suratensis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Aquaculture Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/anu.12452>.
- Sanz ML, Polemis N, Morales V. 2005. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *J Agric Food Chem*. 53: 2914-2921.
- Saran S, Singh K, Bisht MS, Teotia UVS, Dobriyal AK. 2011. Comparison of prebiotics for the functional attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 6:173-178.

- Saxena RC, Adhikari DK, Goyal HB. 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Ren Sust Energy Rev.* 13:167-178.
- Sebastiao FA, Furlan LR, Hashimoto DT, Pilarski F. 2015. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16s rRNA gene sequencing. *Advance in Microbiology.* 5: 409-424. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.56042>.
- Ser HL, Palanisamy UD, Yin WF, Malek SNA, Chan KG, Goh BH. 2015. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Front. Microbiol.* 6:854 doi: 10.3389/fmicb.2015.00854.
- Sheehan B, Labrie L, Lee Y, Lim W, Wong F, Chan J. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific.* 5:26-29.
- Shoemaker CA, Lozana CA, LaFrentz B, Garcia JC, Soto E, Xu D, Beck BH, Rye M. 2017 Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated. *Aquaculture.* 468:193-198.
- Silva BC, Vieira FDN, Mourino JLP, Bolivar N, Seiffert WQ. 2016. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 47: 612-623.
- Singh A, Benjakul S. 2018. Proteolysis and its Control Using Protease Inhibitors in Fish and Fish Product: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Vol 17. doi: 10.1111/1541-4337.12337.
- Smith I. 1969. *Chromatographic and Electrophoretic.* Volume 1 3rd edition. Medical book Ltd.
- Soleimani N, Hoseinifar SH, Merrifield DL, Barati M, Abadi ZH. 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology.* 32:316-321. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.023>.
- Solovyev M, Gisbert E. 2016. Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem.* 42:1383-94. doi: 10.1007/s10695-016-0226-2.
- Sriket C. 2014. Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal.* 21:433-445.
- Sugita H, Shibuya K, Shimooka H, Deguchi Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture.* 145:195-203.
- Sugita HC, Miyajima H, Deguchi. 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture.* 92:267-276.
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight R. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol Ecol.* 21:3363-78. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.
- Song SK, Beck BR, Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, Ringo E. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish immunology.* 40:40-48.



- Steinel NC, Bolnick DI. 2017. Melanomacrophage Centers as a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology*. 8:827. doi: 10.3389/fimmu.2017.00827.
- Suguna P, Binuramesh C, Abirami P, Saranya V, Poornima K, Rajeswari V. 2014. Immunostimulation by poly-beta hydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) from *Bacillus thuringiensis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 36:90-97.
- Sun JS, Zhao L, Sun L. 2011. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property. *Fish & Shellfish Immunology*. 30: 1362-1367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.023>.
- Suwannasang A, Dangwetngam M, Issaro A, Phromkunthong W, Suanyuk N. 2014. Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Songklanakarin. *J. Sci. Technol*. 36: 499-506.
- Tan LH, Chan KG, Lee LH, Goh BH. 2016. Review: *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontier Microbiology*. 7:79. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00079>.
- Taukhid. 2009. Efektivitas pemberian vaksin *Streptococcus* spp. pada benih ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui teknik perendaman untuk pencegahan penyakit Streptococcosis. *Laporan Penelitian Hibah Penelitian Bagi Peneliti dan Perekayasa Departemen Kelautan dan Perikanan*. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Pusat Riset Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan. 33p.
- Tavares GC, Costa FAA, Santos RRS, Barony GM, Leal CAG, Figueiredo HCP. 2016. Nonlethal sampling methods for diagnosis of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. 454:237-242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.028>.
- Teitelbaum JE. 2009. Prebiotics and lipid metabolism. In Cho SS, & Finocchiaro T (Eds.), *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: Health benefits and food applications* (pp. 209–220). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Tian L, Zhou X-Q, Jiang W-D, Liu Y, Wu P, Jiang J. 2017. Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF- κ B and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology* 66:548-563.
- Tian H, Maddox IS, Ferguson LR, Shu Q. 2010. Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. *BioMetals*, 23:593-596.
- Tuan TN, Duc PM, Hatai K. 2013. Overview of the use of probiotics in aquaculture. *Int J Res Fish Aquacult*. 33:8997.
- Torrecillas SA, Makol MJ, Caballero D, Montero R, Gin'és J, Sweetman, Izquierdo M. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*. 17: 223-233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00730.x>.
- Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H. 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol*. 46:43-48. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x

- Tyagi A, Singh B. 2017. Microbial diversity in Rohu fish gut and inland saline aquaculture sediment and variations associated with next generation sequencing of 16S rRNA gene. *Journal of Fish & Life Science*. 22:1-8.
- Vallejos-Vidal E, Reyes-López F, Teles M, MacKenzie S. 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish Shellfish Immunol*. 56:34-69.
- van Kessel MA, Dutilh BE, Neveling K, Kwint MP, Veltman MP, Flik G, Jetten MS, Klaren PH. 2011. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, 1- 41. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>.
- Vaseeharan B, Thaya R. 2011. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquatic International*. 22:1079-1091.
- Velkova-Jordanoska L, Kostoski G. 2005. Histopathological analysis of liver in fish (*Barbus meridionalis petenyi* Heckel) in reservoir. *Trebeništa. Nat Croat*. 14:147-53.
- Vine NG, W.D. Leukes WD, Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture, *FEMS Microbiol. Rev*. 30:404e427.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández L, Pérez-Álvarez JA. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*. 73:117-124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>.
- Wang YC, Hu SY, Chiu CS, Liu CH. 2019. Multiple strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish & Shellfish Immunology*. 84:1050-1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.017>.
- Wang YB, Xu ZR, Xia MS. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp (*Penaesus vannamei*). *Fishery Science*. 71:1036-1041.
- Wichienchot S, Jatupornpipat M, Rastall RA. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemical*. 120:850-857.
- Wolke RE. Piscine macrophage aggregates. 1992. A review. *Annual Reviews of Fish Diseases*. 2:91-108.
- Woodley JM, Breuer M, Mink D. 2013. A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production. *Chem Eng Res Des*. 91:2029-2036.
- Wu ZX, Yu YM, Chen X, Liu H, Yuan JF, Shi Y, Chen XX. 2014. Effect of prebiotic konjac mannan-oligosaccharides on growth performance, intestinal microflora, and digestive enzyme activities in yellow catfish. *Pelteobagrus Fulvidraco. Fish Physiology and Biochemistry*. 40:763-771. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9883-6>.
- Xia JH, Lin G, Fu GH, Wan ZY, Lee M, Wang L, Liu XJ, Yue EH. 2014. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*. 15:266. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-266>.
- Xu H, Shao XL, Zhang Z, Zou YM, Wu XY, Yang LQ. 2013. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 93:39-44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.038>.

- Yadav R, Shukla P. 2017. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1108957>.
- Yadav M, Schorey JS. 2002. The b-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 3168e3175.
- Yang W, Li A. 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*. 294:14-17.
- Yarahmadi P, Miandare HK, Farahmand H, Mirvaghefi A, Hoseinifar SY. 2014. Dietary fermentable fiber upregulated immune related genes expression, increased innate immune response and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 41:326-331.
- Ye X, Li J, Lu MX, Deng GC, Jiang XY, Tian YY, Quan YC, Jian Q. 2011. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*. 77:623-632.
- Yilmaz E, Genc MA, Genc E. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israel Journal or Aquaculture*. 59:182-188.
- Zhang H, Tang H, Zang Y, Tang X, Wang Y. 2018. Microorganism's adaptation of Crucian carp may closely relate to its living environments. *MicrobiologyOpen*. 2019;8:e650. 1 of 9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.650>
- Zhang CN, Li XF, Jiang GZ, Zhang DD, Tian HY. 2014. Effects of dietary fructooligosaccharide levels and feeding modes on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish & Shellfish Immunol*. 41: 560-569.
- Zokaeifar H, Balcazar JR, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Fish. Shellfish Immunol*. 33:683e689.
- Zhou QC, Alejandro Buentello J, Delbert M, Gatlin. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 309:253-257.

RIWAYAT HIDUP



@Hak cipta milik IPB University

Penulis dilahirkan di Purworejo, 19 Januari 1980, merupakan anak ketiga dari Bapak Parmono dan Ibu Wagini Astuti. Penulis menyelesaikan pendidikan Sarjana di Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian dan Diploma Ekonomi, Fakultas Ekonomi Universitas Gadjah Mada tahun 2003, Program Magister Sains Biologi, Universitas Indonesia tahun 2013. Penulis menikah dengan Nursan Priadi dan dikaruniai dua orang anak, Adya Darma Mahardika Priadi dan Arziki Darma Attarahman Priadi.

Pada tahun 2016, penulis meneruskan pendidikan doktor pada Program Studi Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Penulis bekerja sebagai peneliti di Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia sejak 2005 hingga sekarang.

Untuk memenuhi persyaratan program doktor, hasil penelitian telah dipublikasi di dua jurnal yaitu jurnal nasional terakreditasi (SINTA 2: Jurnal Riset Akuakultur volume 13, no 3 (2020) dengan judul “Potensi prebiotik madu klengkeng, madu randu, dan madu organik terhadap kinerja pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*)” dan jurnal internasional bereputasi (SCOPUS Q2: Aquaculture Research, volume 52, issue 3, hal 1215-1226 dengan judul “The effect of dietary honey prebiotic on microbiota diversity in the digestive tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its growth performance”.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.