

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan gabus *Channa striata* adalah komoditas ikan air tawar yang bernilai ekonomis karena permintaan yang tinggi. Hal ini disebabkan karena ikan gabus memiliki kandungan albumin yang bermanfaat untuk kesehatan manusia (Listyanto dan Andriyanto 2009; Chasanah *et al.* 2015). Albumin merupakan protein yang bermanfaat dalam penyembuhan luka pascaoperasi (Mustafa *et al.* 2012). Tingginya permintaan ikan gabus mendorong upaya peningkatan produksi dari sektor budidaya ikan gabus setiap tahunnya. Data statistik FAO (2018) melaporkan bahwa produksi ikan gabus mengalami peningkatan dari tahun 2010 hingga 2016, sebesar 377 ton, 481 ton, 511 ton, 518 ton. Meskipun demikian, beberapa kendala dalam kegiatan budidaya ikan gabus mulai terjadi, salah satunya disebabkan oleh faktor penyakit (Olga 2012).

Salah satu penyakit yang sering menginfeksi ikan gabus adalah *motile aeromonad septicaemia* (MAS), yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* (KKP BPBAT 2014). Penyakit MAS ditandai dengan pendarahan pada insang, kerusakan ginjal, dan dropsi. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian pada ikan gabus dari 23,30 % hingga 100 % (Olga 2012). Serangkaian upaya untuk mengatasi penyakit MAS telah dilakukan, diantaranya dengan meningkatkan imunitas ikan melalui pemberian imunostimulan, salah satunya adalah pemberian vitamin C (Dwinanti *et al.* 2019). Namun, vitamin C memiliki harga yang lebih mahal, sehingga dapat menambah biaya produksi.

Salah satu imunostimulan yang dapat meningkatkan imunitas adalah ragi. Penelitian tentang penggunaan ragi kue sebagai imunostimulan pada ikan telah banyak dilaporkan, di antaranya penambahan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan dapat meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pascainjeksi *Aeromonas hydrophila* dan menurunkan jumlah bakteri (Abdel-Tawab *et al.* 2008; Manoppo *et al.* 2015), penambahan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan pada ikan rohu dapat meningkatkan imunitas (Pal *et al.* 2007) dan penambahan ragi sebanyak 1,5 , 10 g kg⁻¹ pakan pada ikan kakap dapat meningkatkan respon imun (Ortuno *et al.* 2002). Penambahan ragi kue pada pakan dapat meningkatkan kelangsungan hidup ikan uji terhadap infeksi penyakit MAS, meningkatkan hemoglobin dan aktivitas fagositik. Penelitian tentang penggunaan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan sebagai imunostimulan pada ikan telah banyak dilakukan. Akan tetapi, informasi mengenai penggunaan ragi tempe, yang memiliki harga lebih murah, mudah didapatkan, dan mudah diaplikasikan sebagai imunostimulan pada ikan masih sangat terbatas.

Ragi tempe merupakan biakan *Rhizopus oligosporus* yang memiliki kandungan β -glukan sebesar 8 % (Purwijantiningsih *et al.* 2005). Kandungan β -glukan yang masuk ke dalam tubuh dapat menginduksi aktivitas fagositik dan aktivitas lisozim (Stier *et al.* 2014). Kandungan ini akan mengaktifkan gen lisozim sehingga pertahanan tubuh bawaan akan lebih kuat dalam menghadapi penyakit bakterial. Pemanfaatan ragi tempe dalam meningkatkan imunitas ikan belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian tentang penambahan ragi tempe dengan ragi kue sebagai pembanding pada pakan di ikan gabus untuk melihat efektifitas, efisiensi, dan kepraktisan penerapannya dalam meningkatkan sistem imun ikan gabus sehingga dapat menanggulangi

permasalahan penyakit akibat bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dan menganalisis efektivitas ragi komersial sebagai imunostimulan ikan gabus (*C. striata*).

1.2 Rumusan Masalah

Budidaya ikan gabus dihadapkan pada sejumlah kendala, salah satunya penyakit MAS yang disebabkan bakteri *A. hydrophila*. Bakteri ini dapat menyebabkan kematian hingga 100 %. Oleh karena itu perlu upaya dalam pengendalian penyakit MAS. Penggunaan imunostimulan merupakan salah satu alternatif dalam menanggulangi penyakit MAS. Peran imunostimulan yang ditambahkan ke dalam pakan dapat meningkatkan imunitas tubuh ikan. Salah satu imunostimulan yang sering digunakan adalah ragi. Ragi adalah imunostimulan yang mudah didapatkan, mudah diaplikasikan, dan murah. Ragi yang banyak dijual di pasaran adalah ragi kue dan ragi tempe. Ragi kue berasal dari biakan *Saccharomyces cerevisiae* yang memiliki kandungan glukukan. Glukan yang masuk ke dalam tubuh ikan akan diterima oleh reseptor tubuh, sehingga akan meningkatkan imunitas non spesifik ikan. Beberapa penelitian sudah melaporkan bahwa penambahan ragi kue dapat meningkatkan pertumbuhan, tingkat kelangsungan hidup, dan respons imun ikan terhadap serangan bakteri *A. hydrophila*. Oleh karena itu alternatif sumber ragi lain, seperti ragi tempe yang memiliki harga murah, mudah didapatkan, dan mudah diaplikasikan. Ragi tempe berasal dari biakan *Rhizopus oligosporus* yang memiliki kandungan glukukan. Namun, belum ada informasi tentang penambahan ragi tempe dalam pakan pada ikan gabus. Oleh karena itu, penggunaan ragi tempe sebagai alternatif ragi kue perlu diteliti untuk mengetahui efisiensi, efektivitas serta kepraktikan penerapannya dalam meningkatkan sistem imun ikan gabus dapat menanggulangi permasalahan penyakit akibat bakteri *A. hydrophila*.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi penambahan ragi komersial dalam pakan untuk meningkatkan imunitas ikan gabus terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif pemecahan masalah dalam meningkatkan sistem imun ikan gabus agar dapat menanggulangi permasalahan penyakit akibat bakteri *A. hydrophila* secara aman, ramah lingkungan, efektif, efisien, dan praktis.

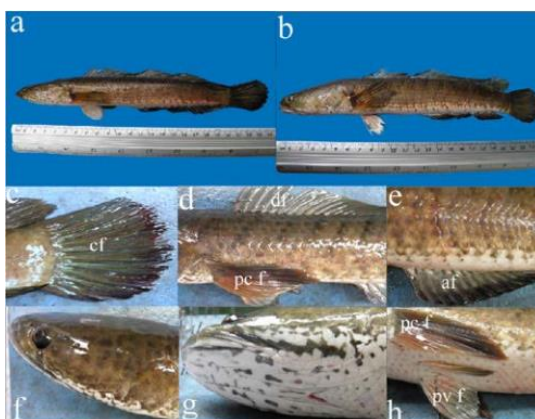
II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Gabus (*Channa striata*)

Ikan gabus merupakan komoditas ikan air tawar asli Indonesia yang penyebarannya meliputi Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, dan Papua. Ikan gabus mempunyai nama yang berbeda pada lokasi asal, contohnya di Jawa ikan gabus bernama kuthuk, haruan menurut daerah Malaysia, Banjarmasin,

Banjarnegara, rajong daerah sunda, dan lain-lain (Listyanto dan Andriyanto 2009). Secara taksonomi ikan gabus termasuk dalam kingdom Animalia, filum Chordata, kelas Actinopterygii, ordo Perciformes, famili Channidae, genus *Channa* dan spesies *C. striata*.

Warna tubuh bagian atas ikan gabus adalah coklat hingga kehitaman. Perut ikan gabus berwarna coklat muda hingga keputihan. Kepala ikan gabus berbentuk pipih (Listyanto dan Andriyanto 2009). Tubuh ikan gabus berbentuk silinder, seperti ular (Gambar 1). Perbedaan antara ikan gabus jantan dan betina adalah terlihat dari ukuran tubuh (jantan lebih kecil dari pada betina). Ikan gabus memiliki sirip punggung, sirip dubur, dan sirip dada sebanyak 37-46, 23-29 dan 15-16. Ikan gabus memiliki gigi taring sebanyak 4-7. Sisik ikan gabus adalah *cycloid* (Requieron *et al.* 2012).



Gambar 1 Morfologi ikan gabus (*Channa striata*) (Requieron *et al.* 2012).

Ikan gabus dapat hidup pada daerah rawa, sawah, genangan, daerah aliran arus tenang yang membawa emulsi lumpur, dan perairan payau (KKP BPBAT 2014). Ketinggian air untuk memelihara ikan gabus adalah 40 cm. Suhu optimal ikan gabus adalah 28-32 °C.

Ikan gabus bersifat karnivora, piscivores (pemakan hewan kecil disekitarnya), dan kanibal antar sesama (War *et al.* 2011). Ikan gabus memiliki siklus hidup dari telur, larva, benih, dewasa, dan induk. Telur ikan gabus berukuran 1,20-1,40 mm, kemudian telur berkembang secara embrionik dari dua sel, 16 sel, morula, blastula, gastrula, neurula, myotome. Proses embrionik terjadi selama 24 jam. Ikan gabus yang sudah menetas kemudian akan menjadi larva. Ukuran larva awal adalah 3,5 mm. *Post larva* berukuran adalah 40,8 mm. Proses dari larva hingga *post larva* selama 20 hari (Marimuthu dan Haniffa 2007). Larva ikan gabus merupakan fase kritis karena adanya perubahan pemberian pakan dari endogenus ke eksogenus, sehingga ikan gabus memerlukan pakan yang sesuai dengan kebutuhannya. Apabila pemberian pakan kurang sesuai maka akan terjadi kanibalisme dan kematian (War *et al.* 2011).

Fase benih adalah fase ikan gabus memulai makan. Ikan gabus mulai diberi pakan pelet dengan kandungan protein kasar >40 % (Yulisman *et al.* 2012). Pemberian pakan dengan kadar protein kasar 40 % akan memberikan kelangsungan hidup 80 %, pertumbuhan bobot hingga 2,89 g, efisiensi pakan 86,65 % dengan FCR 1,15 (Supandi *et al.* 2015).

2.2 Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* adalah bakteri penyebab *motile aeromonad septicaemia* (MAS). Bakteri ini merupakan batang pendek, gram negatif, dan motil karena memiliki flagel untuk bergerak. *A. hydrophila* bersifat oksidase positif dan dapat memfermentasi glukosa. Faktor yang mempengaruhi tingkat keganasan *A. hydrophila* dalam menginfeksi ikan meliputi virulensi bakteri, tingkatan stres ikan, dan genetik ikan. Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* memiliki gejala klinis seperti mata menonjol, warna tubuh menjadi gelap, hemoragi, dan meningkatnya lendir (Gambar 2). Menurut Duc *et al.* (2012), *A. hydrophila* dapat menyebabkan mortalitas 100 % pada kepadatan bakteri 10^6 cfu mL⁻¹. Virulensi bakteri disebabkan karena adanya enzim dan toksin dari sel tersebut.



Gambar 2 Gejala klinis ikan gabus yang mengalami hemoragi karena infeksi *Aeromonas hydrophila* (Duc *et al.* 2012).

2.3 Kandungan Ragi

Kandungan dalam ragi tempe maupun ragi kue adalah β -glukan. β -glukan merupakan polisakarida yang disintesis pada dinding sel khamir (*yeast*), bakteri, jamur, dan tanaman tertentu. Tipe dari β -glukan terdiri dari 3 yaitu linear β (1,3)-D- β -glukan (Curdlan), β (1,3) (1,4)-D-Glukan, dan β -(1,3) (1,6)-D-glukan. β -glukan ini tidak larut dalam air, alkohol, dan pelarut organik, tetapi larut dalam NaOH dan asam format (Ibrahim 2014). β -glukan biasanya berada di dinding sel dari fungi. Setiap bagian sel memiliki kandungan β -glukan yang berbeda-beda, seperti kandungan β -glukan yang berada di lapisan dalam adalah 30 - 35 %, lapisan tengah 20-22 %, dan lapisan luar hanya mengandung glikoprotein 30 % (Akramiené *et al.* 2007).

β -glukan di dalam ragi memiliki kemampuan memodulasi imun dengan mengaktifkan makrofag dan fagositosis (Navarrete dan Tovar-Ramirez 2014). β -glukan akan merangsang makrofag untuk selanjutnya makrofag memproduksi interleukin, kemudian sel limfosit mengalami peningkatan (Akramiene *et al.* 2007).

2.3 Gen Lisozim

Lisozim adalah enzim yang memutuskan ikatan 1,4- β -glikosida antara asam N asetil glukosamin dengan asam N asetil muramat pada peptidoglikan, sehingga dapat merusak dinding sel bakteri (Nasution *et al.* 2018). Aktivitas lisozim akan mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh menghadapi patogen. Lokasi tubuh yang banyak mengandung lisozim seperti mukus, hati, ginjal, limfoid, plasma, dan jaringan cairan. (Saurabh dan Sahoo 2008).

III METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Agustus 2019 di Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi, Subang Jawa Barat, Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB serta Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL), Serang, Banten.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri atas dua tahap. Penelitian tahap pertama adalah pemeliharaan ikan gabus di waring, yang terdiri atas lima perlakuan dan tiga ulangan (Tabel 1).

Tabel 1 Desain rancangan percobaan pemberian ragi komersial dalam pakan untuk ikan gabus di waring

Perlakuan	Keterangan
Kontrol	Pakan dengan penambahan ragi 0 g kg ⁻¹ pakan
F5	Pakan dengan penambahan ragi kue 5 g kg ⁻¹ pakan
R3	Pakan dengan penambahan ragi tempe 3 g kg ⁻¹ pakan
R5	Pakan dengan penambahan ragi tempe 5 g kg ⁻¹ pakan
R7	Pakan dengan penambahan ragi tempe 7 g kg ⁻¹ pakan

Penelitian tahap kedua adalah uji tantang ikan gabus dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang terdiri atas enam perlakuan dan masing-masing tiga ulangan (Tabel 2).

Tabel 2 Desain rancangan percobaan pemberian ragi komersial dalam pakan untuk ikan gabus di akuarium

Perlakuan	Keterangan
Kontrol +	Pakan dengan penambahan ragi 0 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi <i>A. hydrophila</i>
Kontrol -	Pakan dengan penambahan ragi 0 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi <i>phosphate buffered saline</i> (PBS)
F5	Pakan dengan penambahan ragi kue 5 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i>
R3	Pakan dengan penambahan ragi tempe 3 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i>
R5	Pakan dengan penambahan ragi tempe 5 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i>
R7	Pakan dengan penambahan ragi tempe 7 g kg ⁻¹ pakan serta diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i>

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan gabus *Channa striata* adalah komoditas ikan air tawar yang bernilai ekonomis karena permintaan yang tinggi. Hal ini disebabkan karena ikan gabus memiliki kandungan albumin yang bermanfaat untuk kesehatan manusia (Listyanto dan Andriyanto 2009; Chasanah *et al.* 2015). Albumin merupakan protein yang bermanfaat dalam penyembuhan luka pascaoperasi (Mustafa *et al.* 2012). Tingginya permintaan ikan gabus mendorong upaya peningkatan produksi dari sektor budidaya ikan gabus setiap tahunnya. Data statistik FAO (2018) melaporkan bahwa produksi ikan gabus mengalami peningkatan dari tahun 2010 hingga 2016, sebesar 377 ton, 481 ton, 511 ton, 518 ton. Meskipun demikian, beberapa kendala dalam kegiatan budidaya ikan gabus mulai terjadi, salah satunya disebabkan oleh faktor penyakit (Olga 2012).

Salah satu penyakit yang sering menginfeksi ikan gabus adalah *motile aeromonad septicaemia* (MAS), yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* (KKP BPBAT 2014). Penyakit MAS ditandai dengan pendarahan pada insang, kerusakan ginjal, dan dropsi. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian pada ikan gabus dari 23,30 % hingga 100 % (Olga 2012). Serangkaian upaya untuk mengatasi penyakit MAS telah dilakukan, diantaranya dengan meningkatkan imunitas ikan melalui pemberian imunostimulan, salah satunya adalah pemberian vitamin C (Dwinanti *et al.* 2019). Namun, vitamin C memiliki harga yang lebih mahal, sehingga dapat menambah biaya produksi.

Salah satu imunostimulan yang dapat meningkatkan imunitas adalah ragi. Penelitian tentang penggunaan ragi kue sebagai imunostimulan pada ikan telah banyak dilaporkan, di antaranya penambahan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan dapat meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pascainjeksi *Aeromonas hydrophila* dan menurunkan jumlah bakteri (Abdel-Tawab *et al.* 2008; Manoppo *et al.* 2015), penambahan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan pada ikan rohu dapat meningkatkan imunitas (Pal *et al.* 2007) dan penambahan ragi sebanyak 1,5 , 10 g kg⁻¹ pakan pada ikan kakap dapat meningkatkan respon imun (Ortuno *et al.* 2002). Penambahan ragi kue pada pakan dapat meningkatkan kelangsungan hidup ikan uji terhadap infeksi penyakit MAS, meningkatkan hemoglobin dan aktivitas fagositik. Penelitian tentang penggunaan ragi kue 5 g kg⁻¹ pakan sebagai imunostimulan pada ikan telah banyak dilakukan. Akan tetapi, informasi mengenai penggunaan ragi tempe, yang memiliki harga lebih murah, mudah didapatkan, dan mudah diaplikasikan sebagai imunostimulan pada ikan masih sangat terbatas.

Ragi tempe merupakan biakan *Rhizopus oligosporus* yang memiliki kandungan β -glukan sebesar 8 % (Purwijantiningsih *et al.* 2005). Kandungan β -glukan yang masuk ke dalam tubuh dapat menginduksi aktivitas fagositik dan aktivitas lisozim (Stier *et al.* 2014). Kandungan ini akan mengaktifkan gen lisozim sehingga pertahanan tubuh bawaan akan lebih kuat dalam menghadapi penyakit bakterial. Pemanfaatan ragi tempe dalam meningkatkan imunitas ikan belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian tentang penambahan ragi tempe dengan ragi kue sebagai pembanding pada pakan di ikan gabus untuk melihat efektifitas, efisiensi, dan kepraktisan penerapannya dalam meningkatkan sistem imun ikan gabus sehingga dapat menanggulangi

Penelitian Tahap 2. Uji Tantang Ikan Gabus Dengan Bakteri *Aeromonas hydrophila* Di Akuarium

3.3.4 Penyediaan Bakteri *A. hydrophila* dan Uji Tantang

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BRPI Sukamandi, Subang. Isolat bakteri ditumbuhkan ke media *rimler shotts* (RS) agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri kemudian dikultur cair dengan menggunakan *Tryptone Soy Broth* (TSB) sebanyak 30 mL. Bakteri diinkubasi di *waterbath shaker* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi 800 g selama 15 menit. Bakteri kemudian dicuci dengan menggunakan PBS (Widyastuti 2016). Bakteri di karakterisasi kembali menggunakan uji fisiologi dan biokimia berdasarkan metode MacFaddin (1980), yakni dengan pewarnaan gram, uji oksidatif/fermentatif, uji motilitas, uji indol, uji oksidase, dan uji katalase. Identifikasi bakteri menggunakan KIT API 20 NE. Berdasarkan hasil uji biokimia (Lampiran 1) dan uji KIT API 20 NE, bahwa bakteri tersebut adalah *A. hydrophila*.

Uji postulat Koch dilakukan untuk menguji sediaan bakteri yang dapat menyebabkan sakit. Postulat Koch dilakukan dengan tahapan uji virulensi. Uji virulensi dilakukan dengan menyuntikkan bakteri ke 10 ekor ikan gabus dengan kepadatan 10^8 cfu mL⁻¹ sebanyak 0,1 mL. Ikan yang sakit kemudian dikultur ke dalam media RS. Bakteri kemudian dikonfirmasi secara fisiologi dan biokimia (Widyastuti 2016).

Uji LD₅₀ digunakan untuk penentuan dosis pada saat uji tantang. LD₅₀ dilakukan dengan menyuntikkan bakteri dari 10^4 hingga 10^8 cfu mL⁻¹. Pengamatan LD₅₀ dilakukan selama 7 hari pascainjeksi. Tingkat Mortalitas ikan diamati menggunakan rumus Reed and Muench (1938) (Lampiran 2).

3.3.5 Persiapan Wadah dan Pemeliharaan Ikan di Akuarium

Benih ikan gabus yang sudah dipelihara selama 30 hari di waring kemudian di pindahkan ke dalam akuarium yang berukuran (60×60×40) cm selama 18 hari dengan ketinggian air 10 cm. Setiap akuarium diberi *shelter*, aerasi, dan penutup waring. Pakan diberikan dua kali sehari secara *at satiation*. Selama pemeliharaan, kualitas air diupayakan sesuai untuk kehidupan ikan gabus, dengan mensifon sisa pakan dan mengganti air baru.

3.3.6 Uji Tantang Ikan

Uji tantang dilakukan dengan menginjeksi ikan gabus secara intramuskular dengan kepadatan 10^6 cfu mL⁻¹ sebanyak 0,1 mL (Sarkar dan Rashid 2012). Pengamatan pascauji tantang dilakukan selama 18 hari, dengan mengamati tingkat kelangsungan hidup ikan dan parameter imunitas. Bakteri yang diisolasi dari ikan yang mati diidentifikasi secara biokimia menggunakan KIT API 20 NE.

3.3.7 Ekspresi Gen Lisozim Tipe G

3.3.7.1 Ekstraksi RNA

Jaringan ginjal ditimbang sebanyak 25 mg diambil dari ikan uji dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian ditambahkan dengan 400 μ L RB buffer dan 4 μ L β -mercapetanol. Sampel dihaluskan dengan *micropastle*. Sampel dipindahkan ke filter kolom kemudian disentrifugasi (Thermo) selama 30 detik pada suhu 4 °C di 1000 g. Sebanyak 400 μ L etanol ditambahkan ke dalam tabung sampel dan dihomogenkan. Sampel dipindahkan ke RB kolom kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada suhu 4 °C di 15 000 g. Sebanyak 400 μ L *wash buffer* ditambahkan ke dalam tabung sampel dan disentrifugasi selama 30 detik pada suhu 4 °C di 15.000 g. Sebanyak 50 μ L DNase I ditambahkan ke dalam tabung sampel, kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Sebanyak 400 μ L W1 buffer ditambahkan, kemudian disentrifugasi selama 30 detik pada suhu 4 °C di 15.000 g. Sebanyak 600 μ L *wash buffer* ditambahkan ke dalam tabung sampel yang digunakan untuk mencuci sampel, kemudian disentrifugasi selama 30 detik pada suhu 4 °C di 15.000 g. Sampel disentrifugasi kembali selama 3 menit pada suhu 4°C di 15.000 g hingga kering. RB kolom diletakkan diatas *microtube* 1,5 mL, kemudian ditambahkan 50 μ L RNase *free water* dan diinkubasi selama 180 detik. Sampel disentrifugasi selama 60 detik pada suhu 4 °C di 15.000 g.

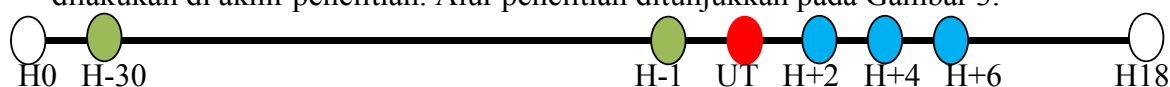
3.3.7.2 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA menggunakan *readytogo* (RTG) dengan menyiapkan media *nuclease free water* (NFW) 1,4 μ L, RNA template 30 μ L dan OligoDT 1,6 μ L. Pengerjaan sintesis cDNA dilakukan dalam keadaan dingin. Semua bahan dimasukkan ke dalam *microtube* 200 μ L kemudian di bolak-balik secara perlahan hingga homogen, kemudian disentrifugasi. Sampel kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C. Sampel kemudian di simpan di freezer -20 °C.

3.3.7.3 Real Time

Real time dilakukan dengan menyiapkan 5 μ L cDNA sampel, 10 μ L SensiFast SYBR (Bioline, UK), 3,4 μ L NFW dan 0,4 μ L primer spesifik (10 mM) CsLyzG dengan sense F1 : CTC TAA TCG CTG CCA TCA TCT C dan antisense R2 :CCG TTA TAC GCT CCT CTC TTT G, β - actin (*GenBank Accession* No. EU570219) adalah F5: TCT TCC AGC CTT CCT TCC TTG GTA and β actin R6: GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT GTT, SensiFast SYBR (Bioline). Semua bahan dimasukkan ke dalam tabung 200 μ L, pengerjaan dalam keadaan dingin. Sampel dimasukkan ke dalam alat *real time* PCR (Rotor-gene Q Qiagen, USA). Input waktu digunakan 95 °C selama 120 detik, 60 °C selama 60 detik kemudian suhu 95 °C selama 15 detik dengan 40 siklus, 58 °C selama 60 detik dan 72 °C selama 20 detik. (Kumaresan *et al.* 2015).

Penelitian penambahan ragi dilakukan selama 30 hari, kemudian dilanjutkan uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* selama 18 hari. Pengumpulan data dilakukan pada hari pertama perlakuan (H-30), hari terakhir perlakuan /prauji tantang (H-1), hari kedua pascauji tantang (H+2), hari keempat pascauji tantang (H+4), hari keenam pascauji tantang (H+6). Parameter pertumbuhan yang diukur pada hari terakhir perlakuan /prauji tantang (H-1) yaitu jumlah konsumsi pakan (JKP), laju pertumbuhan spesifik (LPS), rasio konversi pakan (RKP), tingkah kelangsungan hidup (TKH). Parameter imun yang diukur pada H-30, H-1, H+2, H+4, dan H+6 adalah total eritrosit, hemoglobin, total leukosit, aktivitas fagositik. Parameter aktivitas lisozim dan ekspresi gen tipe G diukur pada H-1 dan H+2. Sedangkan tingkat kelangsungan hidup (TKH) pascauji tantang dilakukan di akhir penelitian. Alur penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.



Keterangan Gambar:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| ○ Hari Pra-perlakuan (H0) | ● Hari kedua pascauji tantang (H+2) |
| ● Hari pertama perlakuan (H-30) | ● Hari keempat pascauji tantang (H+4) |
| ● Hari terakhir perlakuan/ prauji tantang (H-1) | ● Hari keenam pascauji tantang (H+6) |
| ● Uji Tantang (UT) | ○ Hari ke18 pascauji tantang (H+18) |

Gambar 3 Alur penelitian penambahan ragi komersial pada ikan gabus yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

3.4 Parameter Penelitian

3.4.1 Jumlah Konsumsi Pakan (JKP)

Ikan gabus diberi pakan dengan metode *at satiation*, jumlah konsumsi pakan dihitung sesuai Watanabe (1988)

$$\text{JKP} = \text{Jumlah pakan awal (g)} - \text{Jumlah pakan akhir (g)}$$

3.4.2 Laju Pertumbuhan Spesifik (LPS)

Laju pertumbuhan spesifik (LPS) dihitung berdasarkan rumus sesuai Schulz *et al.* 2005:

$$\text{LPS} = \frac{\ln W_t - \ln W_o}{t} \times 100$$

Keterangan :

- LPS : Laju pertumbuhan spesifik (% hari⁻¹)
 Wt : Bobot rata-rata individu di akhir penelitian (g)
 W0 : Bobot rata-rata individu di awal penelitian (g)
 T : Lama penelitian (hari)

3.4.3 Rasio Konversi Pakan (RKP)

Rasio konversi pakan dihitung berdasarkan rumus Goddard (1996):

$$RKP = \frac{F}{(Wt+Wd)-W0}$$

Keterangan :

RKP : Rasio konversi pakan

Wt: Biomassa ikan pada akhir penelitian (g)

W0 : Biomassa ikan pada awal penelitian (g)

Wd : Biomassa ikan yang mati selama penelitian (g)

F : Jumlah pakan selama pemeliharaan (g)

3.4.4 Tingkat Kelangsungan Hidup (TKH)

Pengamatan tingkat kelangsungan hidup ikan gabus dilakukan setiap hari selama penelitian dan tingkat kelangsungan hidup ikan gabus diakumulasi di akhir penelitian. Rumus tersaji sebagai berikut:

$$\text{Tingkat kelangsungan hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan akhir}}{\text{Jumlah ikan awal}} \times 100$$

3.4.5. Gejala Klinis

Gejala klinis diamati pascauji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Pengamatan dilakukan pada H+2, H+4, dan H+6 dengan mengamati perubahan morfologi ikan gabus.

3.4.6. Perhitungan Total Eritrosit

Prosedur perhitungan total eritrosit adalah dengan menghisap darah dengan pipet yang berisi bulir pengaduk warna merah sampai skala 1. Darah kemudian ditambah dengan hayem's sampai skala 101, pengadukan darah dilakukan dengan mengayunkan tangan membentuk angka 8 selama 3-5 menit. Larutan awal dibuang 2 tetes, kemudian di larutan ditetaskan di *haemocytometer*. Perhitungan total eritrosit menggunakan rumus (Blaxhall dan Daisley 1973) sebagai berikut:

$$\Sigma \text{Eritrosit (sel mm}^{-3}\text{)} = \Sigma \text{sel terhitung} \times \frac{1}{\text{Vol kotak besar}} \times \frac{1}{\text{tingkat pengenceran}}$$

3.4.7 Perhitungan Kadar Hemoglobin

Prosedur perhitungan kadar hemoglobin adalah dengan menghisap darah dengan pipet sahli pada skala 20 mm³ atau 0,2 mL, darah kemudian dipindahkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi HCL 0,1 N sampai skala 10 aduk selama 3-5 menit. Akuades ditambahkan hingga warna sesuai dengan warna standar dalam Hb meter. Skala dibaca dengan melihat permukaan cairan dan dicocokkan dengan skala tabung sahli yang dilihat pada skala jalur g % yang berarti banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 mL darah. Kadar Hemoglobin diukur dengan metode Sahli (Wedemeyer dan Yasutake 1977) dan dinyatakan dalam g % pada skala kuning.

3.4.8 Perhitungan Total Leukosit

Prosedur perhitungan total eritrosit adalah dengan menghisap darah dengan pipet yang berisi bulir pengaduk warna putih sampai skala 0,5. Darah kemudian ditambah dengan Turk's sampai skala 11, pengadukan darah dengan mengayunkan tangan membentuk angka 8 selama 3-5 menit. Larutan awal dibuang 2 tetes, kemudian di larutan ditetaskan di *haemocytometer*. Total leukosit dihitung dengan menggunakan rumus (Blaxhall dan Daisley 1973) sebagai berikut :

$$\Sigma \text{leukosit (sel mm}^{-3}\text{)} = \Sigma \text{sel terhitung} \times \frac{1}{\text{Vol kotak besar}} \times \frac{1}{\text{tingkat pengenceran}}$$

3.4.9 Aktivitas fagositik

Aktivitas fagositik diamati dengan cara menyiapkan preparat ulas darah dari sampel darah yang dicampur dengan suspensi *Staphylococcus aureus* 10^7 cfu mL^{-1} dalam inkubasi selama 20 menit. Larutan diambil sebanyak 5 μL pada preparat ulas. Preparat ulas difiksasi dengan metanol selama 5 menit dan dikeringkan kembali, kemudian diberikan warna giemsa selama 20 menit. Preparat ulas kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop. Aktivitas fagositik (Anderson dan Siwicky 1993) dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas fagositik (\%)} = \frac{\text{Fagositosis}}{\text{Total leukosit}} \times 100$$

3.4.10 Aktivitas Lisozim

Pengujian aktivitas lisozim ini dilakukan berdasarkan metode Hanif *et al* (2004). Darah diambil sebanyak 100 μL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 detik. Plasma 10 μL ditambahkan dengan bakteri *Microoccus lysodeikticus* 100 μL . Pengukuran menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm. Selanjutnya aktivitas lisozim dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi Lisozim (IU/mL/menit)} = [(\text{OD}_{0\text{m}} - \text{OD}_{30\text{m}}) \times 1000] \times [1 / (t \times s)]$$

Keterangan:

- 1000 = Konversi hasil absorbansi (OD) menjadi IU
- t = Waktu (menit)
- s = Jumlah sampel plasma (mL)
- $\text{OD}_{0\text{m}}$ = Optik densitas detik menit ke-0
- $\text{OD}_{30\text{m}}$ = Optik densitas menit ke-30

3.5 Analisis data

Data hasil penelitian ditabulasikan menggunakan program Ms. Office Excel 2010. Analisis data dilakukan menggunakan *one way-ANOVA* melalui program SPSS versi 20. Hasil berbeda nyata, diuji lanjut dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 95 %.

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

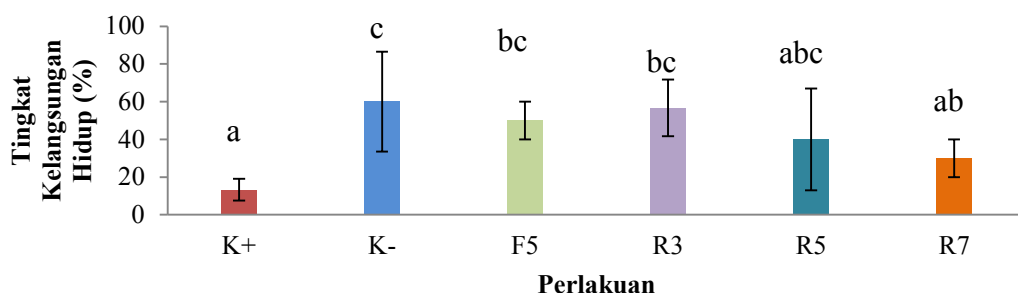
Kinerja pertumbuhan ikan gabus selama 30 hari pemeliharaan menunjukkan KP perlakuan R5 berbeda nyata ($P < 0,05$) dibanding dengan perlakuan lainnya. KP pada perlakuan F5, R3, R5, dan R7 memiliki nilai yang lebih tinggi dibanding dengan K. Nilai rasio konversi pakan (RKP) dan tingkat kelangsungan hidup (TKH) pada perlakuan R3 lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan F5, R5, dan R7 dan tidak berbeda nyata di antara semua perlakuan ($P > 0,05$) (Tabel 5). TKH ikan gabus pada semua perlakuan memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan pada K. Laju pertumbuhan spesifik (LPS) tertinggi dihasilkan pada perlakuan R3 ($5,08 \pm 0,12 \text{ g hari}^{-1}$) dan berbeda nyata ($P < 0,05$) (Tabel 5).

Tabel 5 Jumlah konsumsi pakan (JKP), laju pertumbuhan spesifik (LPS), rasio konversi pakan (RKP), dan tingkat kelangsungan hidup (TKH) ikan gabus selama pemeliharaan 30 hari.

Parameter	Perlakuan				
	K	F5	R3	R5	R7
JKP (g)	128,68 $\pm$ 1,33a	132,81 $\pm$ 2,01a	131,92 $\pm$ 1,27a	140,12 $\pm$ 1,4b	132,63 $\pm$ 1,42a
LPS (g hari ⁻¹)	4,78 $\pm$ 0,08abc	4,57 $\pm$ 0,17ab	5,08 $\pm$ 0,12c	4,51 $\pm$ 0,20bc	4,96 $\pm$ 0,38a
RKP	0,70 $\pm$ 0,06a	0,86 $\pm$ 0,11a	0,74 $\pm$ 0,16a	0,95 $\pm$ 0,01a	0,78 $\pm$ 0,20a
TKH (%)	88,33 $\pm$ 1,58a	92,22 $\pm$ 1,18a	88,89 $\pm$ 1,70a	91,11 $\pm$ 1,62a	90,00 $\pm$ 1,61a

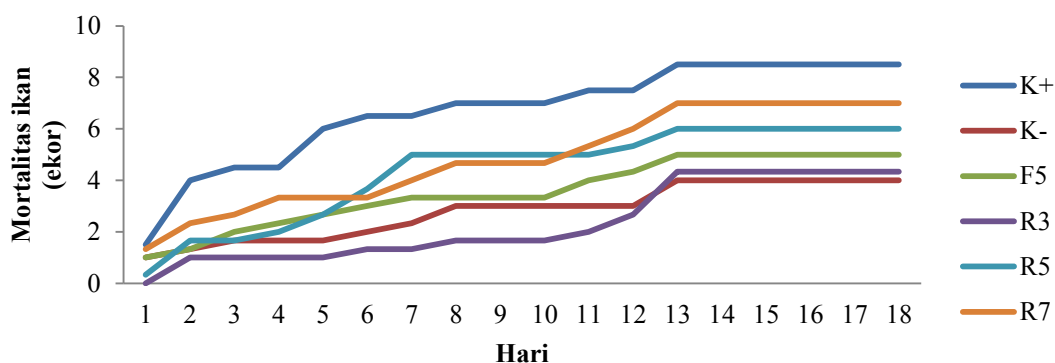
^aAngka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % (uji selang berganda Duncan). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Persentase TKH ikan gabus pascauji tantang dengan *A. hydrophila* menunjukkan perbedaan ($P < 0,05$) antara K+ dengan K-, F5, R3, sedangkan perlakuan lainnya tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) (Gambar 4). TKH pada perlakuan R3 (56,67 %) lebih tinggi dibandingkan dengan K+ (13,33 %) (Gambar 4).



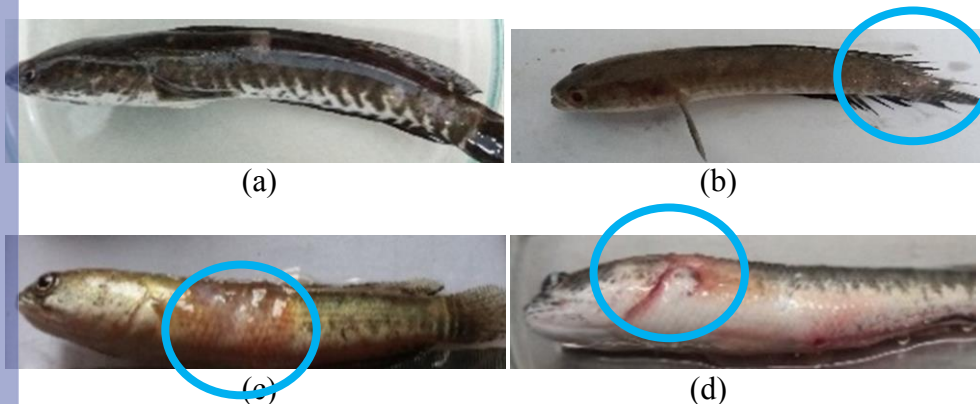
Gambar 4 Tingkat kelangsungan hidup ikan gabus pascainjeksi bakteri *A. hydrophila* pada akhir perlakuan. Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Infeksi bakteri patogen *A. hydrophila* telah menyebabkan kematian ikan uji pada hari pertama (H+1) pascainfeksi (Gambar 5). Perlakuan K+ memiliki jumlah kematian tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.



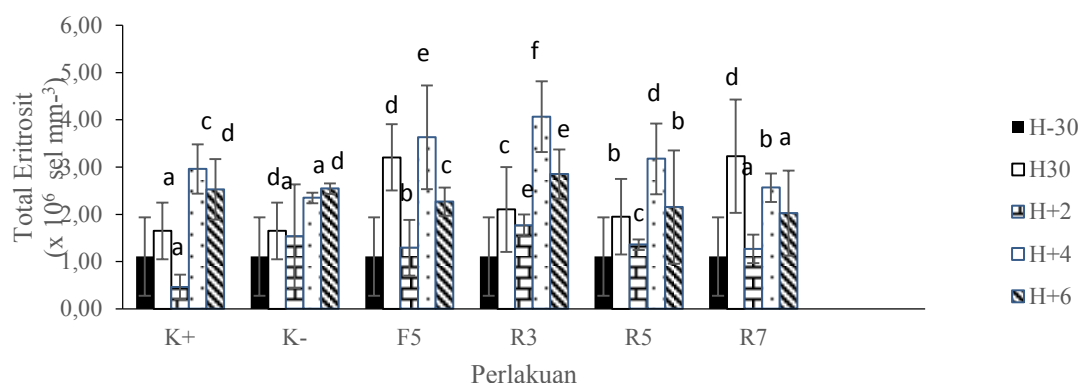
Gambar 5 Pola kematian ikan gabus pascauji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Ikan gabus sehat memiliki warna lebih gelap (Gambar 6a) dibanding dengan ikan gabus yang terinfeksi *A. hydrophilla*. Ikan gabus yang terinfeksi *A. hydrophilla* memiliki gejala seperti hemoragi (Gambar 6c dan Gambar 6d) geripis pada sirip punggung dan sirip ekor (Gambar 6b).



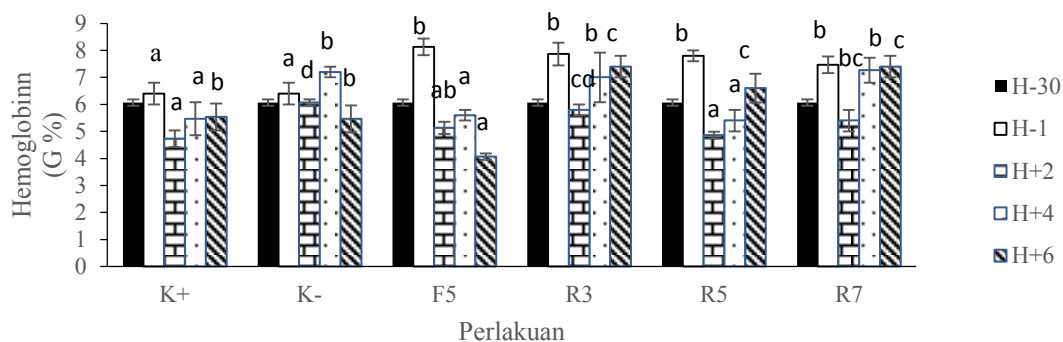
Gambar 6 Ikan gabus sehat (a), gejala klinis ikan gabus pascauji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophilla* adalah geripis (b) dan hemoragi (c dan d).

Pemberian imunostimulan berpengaruh terhadap parameter gambaran darah. Beberapa parameter gambaran darah menunjukkan nilai fluktuasi. Total eritrosit pada hari kedua pascauji tantang (H+2) mengalami penurunan dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan K+. Total eritrosit pada perlakuan R3 memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan K+ (Gambar 7).



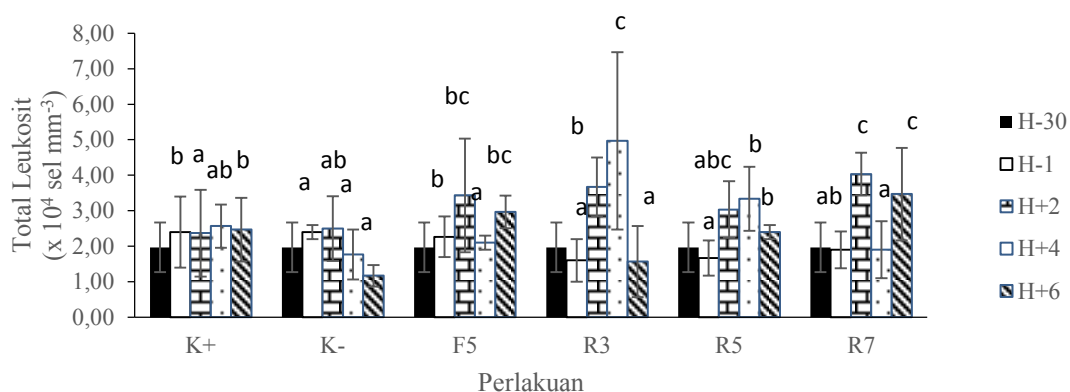
Gambar 7 Total eritrosit ikan gabus selama pemeliharaan (H-30 dan H-1) dan pascauji tantang (H+2, H+4, dan H+6). Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Kadar hemoglobin ikan gabus pascauji tantang mengalami penurunan. Namun demikian, hemoglobin pada hari keempat pascauji tantang (H+4) mengalami peningkatan dan berbeda nyata ($P<0,05$). Hemoglobin pada perlakuan R3 memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan K+. Kadar hemoglobin memiliki nilai sebanding dengan total eritrosit (Gambar 8).



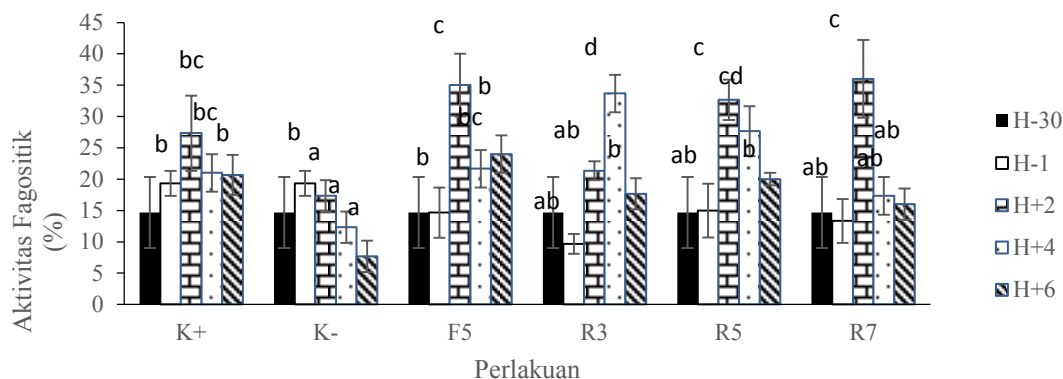
Gambar 8 Hemoglobin ikan gabus selama pemeliharaan (H-30 dan H-1) dan pascauji tantang (H+2, H+4, dan H+6). Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Berbeda dengan eritrosit, pascauji tantang total leukosit pada ikan gabus yang diberi pakan yang ditambah ragi mengalami peningkatan. Namun demikian, total leukosit pada hari kedua pascauji tantang (H+2) tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antar perlakuan. Total leukosit tertinggi pada H+2 teramati pada perlakuan R3 (Gambar 9).



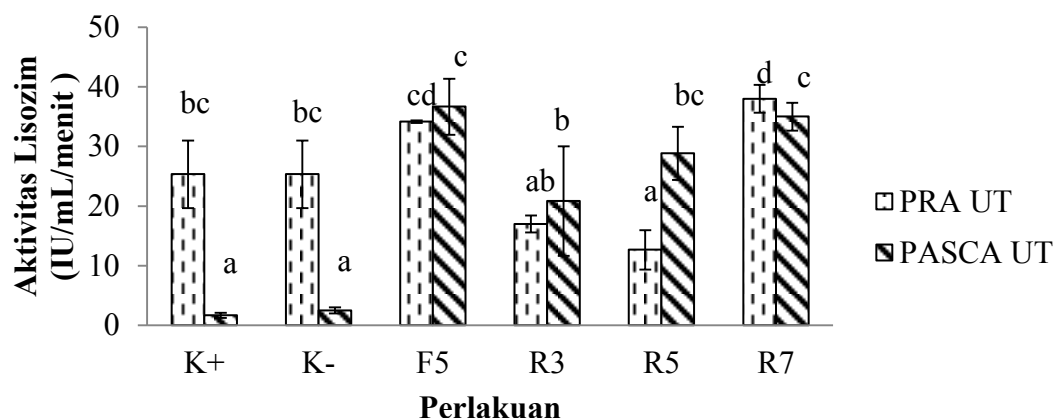
Gambar 9 Total leukosit ikan gabus selama pemeliharaan (H-30 dan H-1) dan pascauji tantang (H+2, H+4, dan H+6). Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3 g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

Selaras dengan nilai total leukosit, aktivitas fagositik ikan gabus juga mengalami peningkatan pada hari keempat pascauji tantang (H+4). Perlakuan R3, aktivitas fagositik teramati pada hari keempat pascauji tantang (H+4), dengan nilai lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Gambar 10).



Gambar 10 Aktivitas fagositik ikan gabus selama pemeliharaan (H-30 dan H-1) dan pascauji tantang (H+2, H+4, dan H+6). Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg^{-1} (F5), ragi tempe 3 g Kg^{-1} (R3), ragi tempe 5 g Kg^{-1} (R5), dan ragi tempe 7g Kg^{-1} (R7).

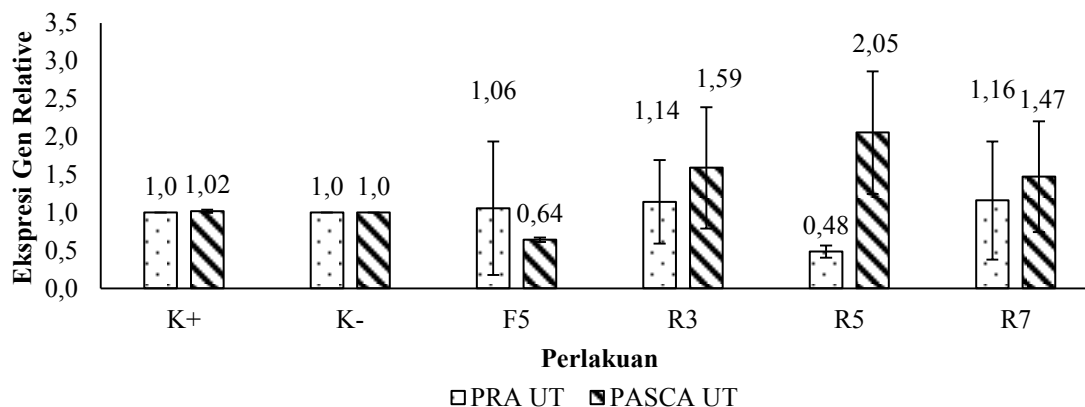
Sebagaimana sistem imun yang lain, aktivitas lisozim pascauji tantang pada ikan gabus yang diberi pakan dengan penambahan ragi juga mengalami peningkatan dengan nilai lebih tinggi dibandingkan perlakuan K+ dan K- (Gambar 11). Aktivitas lisozim tertinggi pada prauji tantang adalah pada perlakuan R7, sedangkan pascauji tantang teramati pada perlakuan F5.



Gambar 11 Aktivitas lisozim prauji tantang (H-1) dan pascauji tantang (H+2)

Huruf yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg^{-1} (F5), ragi tempe 3 g Kg^{-1} (R3), ragi tempe 5 g Kg^{-1} (R5), dan ragi tempe 7g Kg^{-1} (R7).

Ekspresi gen lisozim tipe G pada hampir seluruh perlakuan meningkat dari prauji tantang ke pascauji tantang ke pascauji tantang. Gen lisozim tipe G pada perlakuan R3 terekspresi 1.5 kali dibanding dengan K, sedangkan pada perlakuan R5 terekspresi 4 kali lipat dibandingkan dengan K (Gambar 12).



Gambar 12 Ekspresi gen lisozim ikan gabus prauji tantang (H-1) dan pascauji tantang (H+2). Kontrol (K), ragi kue 5 g Kg⁻¹ (F5), ragi tempe 3g Kg⁻¹ (R3), ragi tempe 5 g Kg⁻¹ (R5), dan ragi tempe 7g Kg⁻¹ (R7).

4.2 Pembahasan

Pada pemeliharaan ikan gabus selama 30 hari di waring, pemberian pakan yang diperkaya dengan ragi tidak berpengaruh nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup (TKH), jumlah konsumsi pakan (JKP), dan rasio konversi pakan selama 30 hari pemeliharaan. Hal tersebut dikarenakan selama pemeliharaan ikan dipelihara dalam kondisi yang optimal bagi kehidupan ikan gabus, tanpa pemberian perlakuan yang bersifat sebagai pemicu stress pada ikan. Hasil yang diperoleh tersebut sesuai dengan hasil penelitian Adloo *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa pemberian ragi pada pakan tidak memberikan efek signifikan, baik TKH, JKP, maupun RKP pada ikan patin yang dipelihara dalam kondisi normal dan tidak ada pemicu stres terhadap ikan. Sementara itu, Misra *et al.* (2006), melaporkan bahwa penambahan pakan dengan ragi yang memiliki kandungan glukosa dapat meningkatkan kekebalan tubuh, pertumbuhan, dan TKH ikan *Labeo rohita* yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Adanya perbedaan hasil yang diperoleh pada penelitian-penelitian tersebut dikarenakan perbedaan perlakuan yang diberikan. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Pilarski *et al.* (2017) dan Whittington *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa pengaruh penambahan imunostimulan terhadap TKH, JKP, dan RKP dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, jenis pakan, lama pemeliharaan ikan, dan jenis ikan yang dibudidayakan.

Efek pemberian ragi, dengan kandungan β -glukan, terhadap kelangsungan hidup ikan uji sangat nyata pasca ikan diuji tantang dengan bakteri patogen, *A. hydrophila*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian β -glukan dalam jumlah yang sesuai efektif meningkatkan imunitas ikan gabus. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian Kumari dan Sahoo (2006) dan Domenico *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa pemberian ragi yang mengandung β -glukan meningkatkan imunitas ikan pascainfeksi bakteri patogen, dengan cara mengaktifkan makrofag sehingga dapat melawan infeksi bakteri tersebut. Mekanisme β -glukan dalam meningkatkan daya tahan tubuh ikan adalah β -glukan yang berikatan dengan *toll like receptor* (TLR) dan *Complement reseptor 3* (CR 3) akan mengaktifkan makrofag, selanjutnya akan meningkatkan aktivitas enzim hidrolitik dan proses persinyalan yang mengarah ke aktivasi fagositik dan sekresi sitokin (Vetvicka 2013; Kumar *et al.* 2014). Namun demikian, pemberian β -glukan

dalam jumlah berlebihan akan mengakibatkan terhambatnya mekanisme imun ikan sehingga memicu terjadinya kematian. Kadar β -glukan dalam tubuh akan memberikan rangsangan kepada sel-sel fagositik ikan yang melebihi kemampuannya, sehingga menurunkan aktivitas sel fagositik tersebut dalam membunuh bakteri (Vechklang *et al.* 2011).

Hasil ini mengindikasikan bahwa dalam aplikasi imunostimulan, dosis dan lama waktu pemberian perlu mendapat perhatian sebab pemberian yang terlalu lama dengan dosis yang tinggi dapat menekan sistem imun (*immunosuppression*) ikan (Sakai 1999). Lebih lanjut dinyatakan oleh Sajeevan *et al.* (2009), bahwa dosis dan lama waktu pemberian imunostimulan sangat penting dalam manajemen kesehatan ikan.

Ikan gabus yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis berupa hemoragi hingga nekrosis pada sirip. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Duc *et al.* 2012), yang menyatakan bahwa gejala klinis ikan gabus yang terinfeksi *A. hydrophila* memiliki gejala yang sama dengan ikan lain seperti hemoragi, sirip hilang, hingga kematian.

Ikan gabus yang diberi pakan dengan kandungan ragi memiliki tingkat kelangsungan hidup lebih tinggi pascainfeksi bakteri *A. hydrophila*, karena β -glukan menstimulus sistem imun bekerja lebih cepat. Eritrosit pada ikan gabus pascauji tantang cenderung menurun disebabkan bakteri patogen melisis eritrosit sehingga pascainfeksi jumlahnya menurun. Jumlah Eritrosit normal pada ikan gabus adalah $2,17-2,47 \times 10^6$ sel mm^{-3} (Wahyu 2015), sedangkan jumlah eritrosit ikan gabus pada K+ di bawah $2,0 \times 10^6$ sel mm^{-3} . Total eritrosit ikan gabus mengalami penurunan pascauji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Menurunnya total eritrosit disebabkan karena infeksi *A. hydrophila* sehingga menyebabkan aktivitas hemolitik. Dinyatakan oleh Ray *et al.* (2016), bahwa *A. hydrophila* memproduksi eksotoksin berupa hemolysin, merupakan enzim yang dapat melisis eritrosit dan membebaskan hemoglobin, sehingga eritrosit ikan yang terinfeksi menurun. Total eritrosit pada perlakuan K+ lebih rendah dibandingkan K- dan perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan sistem imun pada ikan gabus yang diberi ragi bekerja lebih cepat sehingga dampak infeksi bakteri terhadap lisis eritrosit lebih rendah.

Hemoglobin merupakan pigmen merah yang membawa oksigen dalam eritrosit. Hemoglobin pada ikan gabus yang terinfeksi patogen menurun, diduga karena jumlah oksigen di dalam tubuh ikan berkurang karena menurunnya jumlah eritrosit. Dinyatakan oleh Ray *et al.* (2016), bahwa infeksi *A. hydrophila* menyebabkan eritrosit mengalami lisis dan kadar hemoglobin turun. Hubungan antara total eritrosit dengan kadar hemoglobin dinyatakan oleh Harikrishnan *et al.* (2003), yang menyatakan bahwa infeksi patogen menyebabkan eritrosit rusak sehingga oksigen yang masuk ke dalam sel berkurang. Tingkat kelangsungan hidup ikan gabus yang tinggi berkaitan erat dengan efektivitas sistem imun ikan, yang ditunjukkan dengan jumlah leukosit, aktivitas fagositik, dan aktivitas lisozim. Total leukosit dalam tubuh menggambarkan status kesehatan ikan, terlebih ketika terjadi infeksi patogen. Total pada ikan gabus pascauji tantang meningkat, sebagai dampak dari infeksi bakteri *A. hydrophila*. Infeksi patogen menyebabkan inflamasi, yang merupakan salah satu bentuk respons imun ikan terhadap adanya infeksi tersebut sehingga terjadi peningkatan imunitas tubuh melalui produksi leukosit yang bertugas menfagosit bakteri dan menyintesis antibodi (Lagler *et al.* 1977; Moyle dan Cech 2004). Total leukosit pascauji tantang meningkat hingga lebih dari $3,0 \times 10^5$ sel mm^{-3} , hampir dua kali lipat dibandingkan total leukosit pada ikan gabus dalam kondisi normal, yaitu sekitar $1,86 \times 10^5$ sel mm^{-3} (Wahyu 2015).

Aktivitas fagositik adalah suatu kemampuan dari sistem imun non spesifik untuk menfagositosis benda asing. Aktivitas fagositik pada ikan gabus meningkat karena infeksi bakteri *A. hydrophila*. Sel yang bekerja untuk menfagosit benda asing adalah makrofag dan monosit. Mekanisme makrofag sebagai bentuk fagosit dalam membunuh antigen asing adalah secara oksidatif. Mekanisme ini juga diperankan oleh β -glukan, yang membunuh bakteri dengan cara oksidatif. Pada mekanisme tersebut, sel-sel fagosit menghasilkan oksigen reaktif (ROS) yang berlebih sehingga dapat membunuh kuman (Amin 2016).

Lisozim terdistribusi secara luas di tubuh ikan dan merupakan bagian dari sistem imun non spesifik (Uribe *et al.* 2011), merupakan enzim yang bersifat bakterisidal, dengan cara memutuskan ikatan β -1.4-glikosida antara asam-N-asetil-glukosamin dengan asam-N-asetilmuramat pada peptidoglikan sehingga dapat merusak bakteri (Nasution *et al.* 2018). Aktivitas lisozim pada ikan gabus yang diberi pakan mengandung ragi meningkat, baik prauji tantang maupun pascauji tantang. Hal ini diduga karena kandungan β -glukan mengaktifkan sel fagosit. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Paulsen *et al.* (2003), yang menyatakan bahwa penambahan β -glukan pada ikan salmon akan meningkatkan neutrofil dan makrofag yang merupakan sumber utama lisozim, sehingga aktivitasnya akan meningkat.

Ekspresi gen lisozim tipe G dan serum lisozim pada ikan gabus, baik prauji maupun pascauji tantang secara umum meningkat. Hal tersebut dikarenakan β -glukan meningkatkan respons imun non spesifik ikan, salah satunya dengan mensintesis lisozim. Dinyatakan oleh Sirimanapong *et al.* (2015), bahwa β -glukan akan merangsang ekspresi gen imun pada sebagian besar organ penting ikan.

V SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Penambahan ragi tempe 3 g Kg⁻¹ pada pakan memberikan efek positif terhadap imunitas ikan gabus yang ditandai dengan peningkatan gambaran darah (leukosit, eritrosit, dan aktivitas fagositik) dan tingkat kelangsungan hidup ikan gabus pascauji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penambahan ragi tempe dengan dosis yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Tawwab M, Abdel-Rahman AM, Ismael NEM. 2008. Evaluation of commercial live bakers'yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a grow than immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 280:185-189. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.055.
- Adloo MN, Soltanian S, Ghadim N. 2015. Effects of long term dietary administration of β -Glucan on the growth, survival and some blood parameters of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Siluriformes: Pangasiidae). *Iranian Society of Ichthyology*. 2(3):194-200.
- Akramine D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. 2007. Effect of beta-glucans on the immune system. *Medicina*. 43(8):597-606.
- Amin M. 2016. Evaluasi ragi bir (*Saccharomyces cerevisiae*) sebagai sumber protein dan imunostimulan pada benih dan induk ikan nila (*Oreochromis niloticus*) [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Anderson DP dan Siwicki AK. 1993. *Basic Hematology and Serology for Fish Health Programs. Paper Presented in Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and The Environment"*. Phuket, Thailand. 25-29 th October 1993. 17 hlm.
- Blaxhall PC dan Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal Fish Biology*. 5:577-581.
- Chasanah E, Nurlimala M, Purnamasari AR, Fithriani D. 2015. Komposisi kada albumin dan bioaktivasi ekstrak ikan gabus (*Channa striata*) alam dan hasil budidaya. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*.10(2):123-132.
- Domenico JD, Canova R, Soveral LF Nied CO, Costa MM, Frandoloso R, Kreutz C. 2017. Immunomodulatory effects of dietary β -glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*.37(1):73-78.
- Duc PM, Tuan TN, Hatai K. 2012. *Aeromonas hydrophila* infection in fingerlings of snakehead *Channa striata* in Vietnam. *Fish Pathology*. 48(2):48-51.
- Dwinanti SH, Afriani S, Sasanti AD. 2019. Pemanfaatan vitamin C untuk meningkatkan performa imunitas benih ikan gabus (*Channa striata*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 7(1):67-76.

- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture Meeting The Sustainable Development Goals*. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Goddard S. 1996. *Feed Management in Intensive Aquaculture*. Chapman & Hall. New York. 194 hal.
- Hanif A, Bakopoulos V, Dimitriadis GJ. 2004. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish & Shellfish Immunology*. 17 :411–435.
- Harikrishnan R, Rani MN, Balasundaram C. 2003. Haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio* following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 221:41–50.
- Ibrahim HK. 2014. Effect of β glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on angiogenesis [Thesis]. Baghdad (Ba): Baghdad University
- [KKP BPBAT] Kementrian Kelautan dan Perikanan Balai Perikanan Budidaya Air Tawar Mandiangin. 2014. *Naskah Akademik Ikan Gabus Haruan (Channa striata Bloch 1793) Hasil Domestikasi (ID)*. Mandiangin : Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 67 hlm.
- Kumar P, Jain KK, Munilkumar S, Chalal RS. 2014. Beta Glucan : a valuable nutraceutical for promoting health in aquaculture. *Biosciences Regular Paper*. 9(2):70-77.
- Kumaresan V, Bhatt P, Ganesh MR, Harikrishnan R, Arasu M, Al—Dhabi NA, Paupuleti M, Marimuthu K, Arockiaraj J. 2015. A novel antimicrobial peptide derived from fish goose type lysozyme disrupts the membrane of *Salmonella enterica*. *Molecular Immunology*. 30:1-13.
- Kumari J, Sahoo PK. 2006. Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal Fish Disease*. 29(2):95-101.
- Lagler KF, Bardach JE, Miller RR, Passino DRM. 1977. *Ichthyology*. Translated from New York by John Wiley and Sons, Inc, 506 p.
- Listyanto N dan Andriyanto S. 2009. Ikan gabus (*Channa striata*) manfaat pengembangan dan alternatif teknik budidayanya. *Media Akuakultur*. 4(1):18-25.
- MacFaddin JF. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria 2nd Edition* Williams dan Wilskin. USA: Waferly Press.
- Manoppo H, Tumbol RA, Manurung UN. 2015. Incorporation of baker's yeast cells as immunostimulant in feed enhance resistance of nile tilapia to *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Pharmacy Technology Research*. 8(5): 797-802.
- Marimuthu K, Haniffa MA. 2007. Embryonic and larval development of the striped snakehead *Channa striatus*. *Taiwania*. 52(1):84-92.
- Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Journal of Aquaculture*. 255: 82-94.
- Moyle PB dan Cech JrJ. 2004. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. USA: Parentice Hall.

- Mu X, Pridgeon JW, Klesius PH. 2011. Transcriptional profiles of multiple genes in the anterior kidney of channel catfish vaccinated with an attenuated *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 31:1162-1172.
- Mustafa A, Widodo MA, Kristianto Y. 2012. Albumin and zinc content of snakehead fish (*Channa striata*) extract and its role in health. *IEESE International Journal of Science and Technology.* 1(2):1-8.
- Nasution S, Kusumaningtyas E, Faridah DN, Kusumaningrum HD. 2018. Lisozim dan putih telur ayam sebagai agen antibacterial. *Wartazoa*, 28(4):175-188.
- Navarrete P, Tovar-Ramirez D. 2014. Use of yeast as probiotics in fish aquaculture. *Sustainable Aquaculture Technology.* 135-172
- Olga. 2012. Patogenisitas bakteri *Aeromonas hydrophila* ASB01 pada ikan gabus (*Ophicephalus striatus*). *Sains Akuatik.* 14(1):33-39.
- Ortuno J, Cuesta A, Rodriguez A, Estaben MA, Meseguer J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhance the cellular innate immune response of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 85:41-50.
- Pal D, Joardart SN, Roy B. 2007. Immunostimulatory effects of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall feed supplement on rohu (*Labeo rohita*) an Indian Major Carp. *The Israeli Journal of Aquaculture.* 59(3):175-181.
- Paulsen SM, Lunde H, Engstad RE, Robersten B. 2003. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology.* 14(1): 39–54. doi:10.1006/fsim.2002.0416.
- Pilarski F, Ferreira de Oliveira CA, Darpossolo de Souza FPB, Zanuzzo FA. 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology.* doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.059.
- Purwijantiningih E, Dewanti-Hariyadi R, Nurwitri CC, Istiana. 2005. Pemberian produksi aflatoksin dari *Aspergillus flavus* oleh kapang dan khamir yang diisolasi dari ragi tempe. *Biota.* 10(3):146-153.
- Ray SD, Roy D, Pal S, Homechaudhuri S. 2016. Effects of beta glucan as immunostimulant on *Labeo rohita* challenged with a bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Innovative Studies in Aquatic Biology and Fisheries.* 2(5):10-19.
- Reed LJ dan Muench H. 1983. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 27(3):493-497.
- Requieron EA, Torres MAJ, Demayo CG. 2012. Applications of relative warp analysis in describing of scale morphology between sexes of the snakehead fish *Channa striata*. *International Journal of Biological, Etiological and Environmental Science.* 1(6):205-209.
- Sajeevan TP, Philip R, Singh ISB. 2009. Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fennerpenaeus indicus*. *Aquaculture* 287: 248-252.
- Sakai, M., 1999. Current Research Status of Fish Immunostimulant. *Aquaculture* 172 : 63-92.
- Sarkar MJA dan Rashid MM (2012). Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. *Journal of the*

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.

- Bangladesh Agricultural University, 10(1), 157–161. doi:10.3329/jbau.v10i1.12108.
- Saurabh S, Sahoo PK. 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*.39 : 232-239. Doi :10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.
- Schulz C, Knaus u, Wirth M, Rennert B. 2005. Effect of varying dietary fatty acid propile on growth performance, fatty acid, body and tissue composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture Nutrition*, XI: 403–413.
- Sirimanapong W, Thompson KD, Ooi EL, Bekaert M, Collet B, Taggart JB, Bron JE, Green DM, Shimp AP, Adams A, Leaver MJ. 2015. The effect of feeding β -glukan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella tarda ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 47:595-605.
- Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. 2014. Immune-modulatory effects of dietary yeast beta-1,3/1,6-d-glucan. *Journal Nutrition*. 13(1):1-9 Doi: 10.1186%2F1475-2891-13- 38.
- Supandi TI, Tang UM, Putra I. 2015. Feeding made with different protein on growth and survival rate (*Channa striata*) fingerlings. Universitas Riau.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, E., Moran G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10): 486–503.
- Vechklang K, Boonanuntanasarn S, Ponchunchoovong S, Pirarat N, Wanapu C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at the juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*. 17(6):685–694.
- Vetvicka V, Vetvickova J. 2016. Comparison of immunological effect of commercially available β :part III. *International Clinical Pathology Journal*. 2(4).
- Wahyu. 2015. Respon fisiologis juvenil ikan gabus *Channa striata* pada transposrtasi system tertutup [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- War M, Altaff K, Haniffa MA. 2011. Growth and survival of larval snakehead *Channa striatus* (Bloch, 1793) fed different live feed organisms. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 11:523-528.
- Watanabe T. 1988. *Fish Nutriotion And Mariculture*. Kanagawa international fisheries training centre japan international cooperation agency (JJICA).
- Wedemeyer IWT dan Yasutake WT. 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. *Journal Fish & Wildlifeservice*. 89:1-17.
- Whittington R, Lim C, Klesius PH. 2005. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 248(1):217-225.
- Widyastuti HSC. 2016. Pemberian probiotik *Saccharomyces cerevisiae* dan prebiotik mannan oligosakarida untuk pengendalian infeksi *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas *Cyprinus carpio*. [Tesis]. Bogor (ID). Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Yulisman, Fitriani M, Jubaedah D. 2012. Peningkatan pertumbuhan dan efisiensi pakan ikan gabus (*Channa striata*) melalui optimasi kandungan protein dalam pakan. *Berkala Perikanan Terubuk*. 40(2):47-55.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Semarang pada 7 Januari 1994 sebagai anak ke dua dari pasangan bapak Alip dan ibu Mukti Nuryahni Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Budidaya Perairan , Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro , dan lulus pada tahun 2016 Pada tahun 2017, penulis diterima sebagai mahasiswa program magister (S-2) di Program Studi Ilmu Akuakultur pada Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor dan menamatkannya pada tahun 2020.

Selama mengikuti program S-2, Selama menempuh program magister (S-2), penulis pernah menjadi asisten praktikum Mikrobiologi Akuakultur (S-2) pada tahun ajaran 2018/2019. Karya ilmiah berjudul Evaluasi Penambahan Ragi Komersial dengan kandungan β glukukan dalam Pakan terhadap imunitas ikan gabus *Channa striata* yang Diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* telah di review pada Journal of Aquaculture Fish and Health UNAIR

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

