

Penggunaan probiotik untuk meningkatkan respon imun nonspesifik
ikan mas (*Cyprinus carpio*)

(The use of *Lactobacillus* sp to induce nonspecific immune response
of carp juvenile (*Cyprinus carpio*)

**Chintia S. Undi¹, Henky Manoppo², Reni L. Kreckhoff², Reiny Tumbol², Henneke
Pangkey²**

- 1) Mahasiswa program studi budidaya perairan FPIK Unsrat manado
 - 2) Staff prngajar program studi budidaya periran FPIK unsrat manado
- Penulis kornspondensi: H. Manoppo, henkympo@unsrat.ac.id

Abstract

The aim of this research was to count the total leukocytes and phagocytosis activity of goldfish seeds treated with probiotics. The test fish used were goldfish seeds measuring 5-8 cm. 500 fish will be taken from the Tateli Fish Cultivation and Development Center (BP3I). This study used a completely randomized design (CRD) with 5 treatments, where each treatment had 3 replications. The treatments used were probiotic bacteria from the intestines of goldfish with different concentrations. The treatments tested consisted of: A: without the addition of probiotics, B: addition of probiotics 1×10^6 cfu / mL, C: addition of probiotics 1×10^7 cfu / mL, D: addition of probiotics 1×10^8 cfu / mL, E: addition of probiotics 1×10^9 cfu / mL. Each concentration of bacteria that has been prepared is then sprayed on the commercial feed evenly using a sprayer and then dried to room temperature. After drying the feed was coated with 2% egg yolk and dried again at room temperature. Fish are stocked in an aquarium measuring $60 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$ with a density of 20 fish / aquarium. Each aquarium is equipped with an aerator and a water pump for recirculation. The fish were then given feed that had been added with probiotics at the same dose and frequency of administration as in the acclimatization process. The treatment is given for 6 weeks. At the end of the treatment feeding, fish samples were taken from each experimental unit to measure immune parameters, namely total leukocytes and phagocytic activity. Based on the results of research using the probiotic *Lactobacillus* sp. which originated from the intestines of goldfish and added to the feed had a significant effect on increasing total leukocytes and phagocytosis activity and the optimal concentration was $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cfu / mL with a duration of 6 weeks of administration.

Keywords: probiotik, total leukosit, akuakultur, penyakit ikan

PENDAHULUAN

Akuakultur merupakan sektor perikanan yang penting dalam memproduksi makanan terutama untuk memenuhi kebutuhan protein hewani manusia dan telah berkembang secara cepat karena adanya metode budidaya yang semakin maju. Chauhan and Singh (2018) menyatakan bahwa akuakultur berperan penting dalam memenuhi permintaan protein dunia dibandingkan dengan perikanan tangkap dan daging hewan. Peranan akuakultur untuk meningkatkan status sosial ekonomi daerah sangat penting karena tidak hanya terbatas pada penyediaan sumber esensial tetapi juga menciptakan berbagai kesempatan kerja. Penyakit merupakan suatu fenomena yang nyata dalam akuakultur. Untuk mencegah kejadian penyakit maka telah terdapat berbagai metode yang diterapkan meliputi penggunaan anti-biotik/bahan kimia, vaksin, imunostimulan, dan probiotik. Penggunaan bahan-bahan kimia dan obat-obatan sebagai metode pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit telah menghasilkan atau menimbulkan resistensi mikroba dan merusak kondisi lingkungan (Hai, 2015). Laporan-laporan tentang kerugian akibat adanya serangan penyakit semakin banyak dan hal ini merupakan faktor penghambat dalam peningkatan produksi akuakultur serta memberikan pengaruh negatif terhadap perkembangan ekonomi di berbagai negara. Tan *et al.* (2019) melaporkan bahwa dalam beberapa dekade terakhir penyakit *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus iniae* merupakan penyakit yang banyak menyerang ikan nila dan telah

menyebabkan kematian yang tinggi serta kerugian ekonomi yang signifikan dan juga telah menjadi penghambat utama terhadap budidaya ikan nila secara berkelanjutan.

Pada udang, Arias-Moscoso *et al.* (2018) melaporkan bahwa penyakit virus dan bakteri telah menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi pada usaha budidaya udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Kesarcodi-watson *et al.* (2008) melaporkan bahwa produksi udang Filipina menurun sebesar 55% akibat serangan penyakit yaitu dari 90.000 ton turun menjadi 41.000 ton antara tahun 1995 dan 1997. Di Taiwan produksi udang menurun sebesar 40% akibat serangan penyakit baik yang disebabkan oleh bakteri maupun virus. Vaksin juga telah ditemukan sangat efektif mencegah penyakit. Sekalipun demikian, penggunaan vaksin memiliki beberapa kelemahan antara lain vaksin hanya bekerja secara spesifik yaitu hanya bekerja pada penyakit tertentu sehingga efektivitasnya terbatas. Vaksin juga belum banyak tersedia dipasaran sehingga harganya menjadi mahal.

Dari berbagai metode yang digunakan seperti penggunaan vaksin, imunostimulan, dan bioflog, probiotik telah mendapat perhatian yang lebih serius karena probiotik dapat diproduksi secara lokal dengan biaya produksi yang murah dibandingkan dengan metode kontrol yang lain (Newaj-Fyzul and Austin, 2014). Berbagai produk tanaman dan vaksin juga telah ditemukan dapat meningkatkan respon imun ikan (Austin and Austin, 2012).

Alternatif yang memungkinkan untuk mencegah penyakit adalah dengan menggunakan probiotik yang membantu ikan bertahan terhadap serangan patogen.

Allameh *et al.* (2015) telah mengevaluasi pengaruh probiotik terhadap performa pertumbuhan, fisiologi, dan status kesehatan ikan. Pentingnya probiotik dalam akuakultur tidak hanya terbatas pada saluran pencernaan tapi juga memainkan peranan penting dalam memperbaiki kesehatan organisme secara keseluruhan seperti sebagai promotor pertumbuhan, mencegah penyakit, meningkatkan respon imun, dan memperbaiki kualitas air dengan cara mengatur komunitas mikroba dalam air.

Penggunaan probiotik dalam akuakultur meliputi bakteri dan nonbakteri dengan aplikasi melalui air dan suplemen pakan. Probiotik dapat berkerja baik dalam lingkungan perairan yang meliputi air tawar, air payau, dan air laut. Secara umum probiotik adalah mikroba hidup atau mati sebagai suplemen pakan dalam bentuk tunggal dengan kombinasi prebiotik imunostimulan yang diberikan untuk memperbaiki kualitas air pemeliharaan, meningkatkan fisiologi dan respon imun serta mengurangi penggunaan bahan kimia dan anti-biotik dalam akuakultur (Hai, 2015).

METODE PENELITIAN

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan mas berukuran 5-8 cm. Ikan sebanyak 500 ekor diambil dari Balai Pengembangan dan Pembinaan Pembudidayaan Ikan (BP3I) Tateli. Ikan yang diambil dimasukan kedalam kantong plastik berisi oksigen kemudian diangkat ke Laboratorium Teknologi Akuakultur FPIK Unsrat.

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah bakteri probiotik *Lactobacillus* sp yang diisolasi dari usus

ikan mas yang tersedia di Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi.

Pembuatan Media Agar

Media agar yang digunakan untuk kultur bakteri probiotik adalah MRS. Media MRS disiapkan dengan cara berikut: Pertama, media agar MRS dalam bentuk bubuk ditimbang 61,15 g kemudian dilarutkan secara merata dalam 1 L aquades. Selanjutnya larutan dimasak sampai mendidih diatas lampu bunsen. Setelah mendidih media diangkat dan dimasukan ke dalam autoclave untuk disterilkan pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Secara bersamaan cawan petri juga dimasukan untuk disterilkan. Setelah proses sterilisasi selesai media dipindahkan ke dalam laminar flow yang sudah disterilkan untuk didinginkan. Selanjutnya media dalam keadaan hangat media agar dituangkan ke dalam cawan petri dengan ketebalan 5-6 mm dan didinginkan sampai tidak terdapat lagi uap air pada cawan tersebut. Sebelum dituang, bagian pinggiran cawan petri disterilkan dengan api bunsen. Media yang sudah dingin ditutup rapat menggunakan selotip untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Media MRS sudah siap digunakan untuk perbanyakan bakteri.

Kultur Bakteri

Isolat bakteri probiotik diambil dari stok yang tersedia di Laoratorium KILT. Pekerjaan kultur bakteri harus dilakukan secara aseptik. Semua peralatan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan kawat ose kemudian digoreskan di atas permukaan media MRS dengan metoda zig- zag. Media agar yang sudah berisi koloni bakteri ditutup rapat dengan selotip dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 28⁰C selama 24-48 jam

dengan posisi terbalik (media agar pada bagian atas). Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya diperbanyak dengan menggunakan media dan cara yang sama. Bakteri probiotik yang sudah dimurnikan, diperbanyak pada media MRS dan diinkubasi pada suhu 28⁰C selama 24-48 jam dalam inkubator. Koloni bakteri selanjutnya diambil dengan menggunakan jarum ose dan di suspensikan dalam larutan NaCl kemudian dibandingkan dengan larutan Mc Farland

Masing-masing konsentrasi bakteri yang sudah disiapkan selanjutnya disemprotkan pada pakan komersil secara merata dengan menggunakan sprayer dan dikering anginkan dalam temperatur ruang. Banyaknya larutan probiotik yang dicampurkan kedalam pakan adalah 100 mL untuk pembuatan 1 kg pakan (perbandingan larutan bakteri : pakan = 1:10), jadi 100 mL larutan probiotik dengan konsentrasi 1x10⁶, 1x10⁷, 1x10⁸, 1x10⁹ cfu/mL disemprotkan masing-masing kedalam pakan sebanyak 1 kg dan dicampur secara merata kemudian dikering anginkan. Setelah kering pakan selanjutnya dilapisi (coating) dengan 2% kuning telur dan dikeringkan kembali dalam temperatur ruang. Pakan yang sudah kering disimpan dalam kotak plastik dan dimasukkan dalam lemari pendingin, pakan siap diberikan pada ikan.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dimana masing-masing perlakuan memiliki 3 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah bakteri probiotik yang berasal dari usus ikan mas dengan konsentrasi berbeda. Konsentrasi probiotik

untuk menyetarakan konsentrasi 1x10⁹ cfu/mL. selanjutnya untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 1x10⁸ cfu/mL, diambil 1 mL dari konsentrasi 1x10⁹ cfu/mL dan dimasukkan dalam 9 mL NaCl. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 1x10⁷ cfu/mL, diambil 1 mL dari konsentrasi 1x10⁸ cfu/mL dan dimasukkan dalam 9 mL NaCl dan seterusnya sampai mendapatkan konsentrasi bakteri probiotik 1x10⁶ cfu/mL.

yang digunakan dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya oleh Mudeng *dkk.* (2020).

Penempatan unit-unit percobaan dilakukan secara acak untuk menjamin homogenitas percobaan. Perlakuan yang dicobakan terdiri dari:

- A: tanpa penambahan probiotik.
- B: probiotik 1x10⁶ cfu/mL per kg pakan.
- C: probiotik 1x10⁷ cfu/mL per kg pakan.
- D: probiotik 1x10⁸ cfu/mL per kg pakan.
- E: probiotik 1x10⁹ cfu/mL per kg pakan.

Prosedur Penelitian dan Pengambilan Data

Ikan uji yang diperoleh dari BP3I pertamanya diaklimatisasikan selama seminggu dalam kondisi laboratorium. Selama masa aklimatisasi ikan diberi pakan pellet yang belum ditambahkan probiotik. Dosis pemberian pakan adalah 5%/bb perhari dengan frekuensi pemberian 2 kali sehari yaitu pagi hari jam 09.00 dan sore hari jam 16.00. Kondisi air selama proses aklimatisasi dijaga agar tetap baik dengan

cara melakukan penyimpanan sisa-sisa pakan dan kotoran ikan. Selain itu juga dilakukan penggantian air sebanyak 30% dari total volume yang ada. Setelah proses aklimatisasi selesai, ikan ditebar dalam akuarium berukuran $60 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$ dengan kepadatan 20 ekor/akuarium. Setiap akuarium dilengkapi dengan sebuah aerator dan sebuah pompa air untuk resirkulasi. Ikan selanjutnya diberi pakan yang sudah ditambahkan probiotik dengan dosis dan frekuensi pemberian yang sama seperti pada proses aklimatisasi. Perlakuan diberikan selama 6 minggu. Pada akhir pemberian pakan perlakuan, dilakukan pengambilan sample ikan dari setiap satuan percobaan untuk mengukur parameter imun yaitu total leukosit dan aktivitas fagositosis.

Analisis Data

Pengaruh konsentrasi probiotik berbeda terhadap total leukosit, aktivitas fagositosis ikan mas dianalisis menggunakan ANOVA (Analisis of variance). Jika perlakuan memberikan pengaruh berbeda nyata maka analisis dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan untuk mengkaji perbedaan pengaruh antar perlakuan. Uji statistik dikerjakan dengan bantuan program SPSS 24 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Leukosit

Hasil penelitian mendapatkan bahwa total leukosit rata-rata benih ikan mas yang diberi probiotik mencapai nilai tertinggi pada perlakuan D, kemudian perlakuan C sedangkan yang paling rendah pada perlakuan A (lihat tabel 1). Data yang diperoleh memperlihatkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan total leukosit sampai

pada dosis 1×10^8 cfu/mL (perlakuan D) namun pada dosis yang lebih tinggi yaitu 1×10^9 cfu/mL total leukosit menurun. Hal ini menunjukkan bahwa dosis yang diberikan berlebihan sehingga probiotik yang diberikan tidak mampu lagi untuk meningkatkan jumlah leukosit ikan malah sebaliknya menekan sistim imun. Menurut Post (1987), infektivitas suatu bahan seperti probiotik yang diberikan pada ikan dipengaruhi oleh faktor lama waktu dan dosis pemberian. Pada dosis yang rendah bahan tersebut mungkin masih kurang atau belum mampu untuk meningkatkan leukosit ikan namun sebaliknya pada dosis yang lebih tinggi bahan tersebut tidak lagi meningkatkan tetapi justru menekan produksi leukosit ikan karena terjadi efek *immunosuppretion*.

Tabel 1. Total Leukosit rata-rata benih ikan mas setelah diberi probiotik *Lactobacillus* sp selama 6 minggu.

Perlakuan	Jumlah Leukosit (x10 ⁵ cfu/mL)
A	101,33±5.33
B	106,67±5.33
C	177,78±3,08
D	181,33±5,33
E	142,22±6,15

Hasil analisis ragam (anova) menunjukkan bahwa pemberian probiotik pada benih ikan mas berpengaruh sangat nyata terhadap total leukosit ikan dengan nilai sig <0,01 atau nilai F hitung lebih besar dari F tabel.

Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, terlihat bahwa perlakuan D dan C tidak saling berbeda nyata namun berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan E, B, dan A. Perlakuan E berbeda nyata dibandingkan

dengan perlakuan B dan A. Perlakuan B dan A tidak saling berbeda nyata

Aktivitas Fagositosis

Hasil penelitian mendapatkan bahwa aktivitas fagositosis tertinggi dicapai pada perlakuan C kemudian perlakuan D sedangkan yang paling rendah pada perlakuan A sebagaimana pada total leukosit, data yang diperoleh memperlihatkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan aktivitas fagositosis pada dosis 1×10^7 cfu/mL dan sampai 1×10^8 cfu/mL namun pada dosis yang lebih tinggi yaitu 1×10^9 cfu/mL aktivitas fagositosis nampak menurun (lihat pada tabel 4).

Tabel 4. Aktivitas Fagositosis benih ikan mas setelah diberi probiotik *Lactobacillus* sp. selama 6 minggu.

Perlakuan	Aktivitas Fagositosis (%)
A	43,55±1,99
B	49,85±1,67
C	74,8±1,69
D	74,45±1,52
E	45,43±4,84

Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa pemberian probiotik dalam pakan dengan dosis yang berbeda pada benih ikan mas berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas fagositosis ikan dengan nilai sig <0,01 atau F hitung lebih besar dari F tabel (lihat tabel 5).

Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, terlihat bahwa aktivitas fagositosis ikan pada perlakuan C tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan D namun kedua perlakuan ini berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan A,E, dan B.

Budidaya Perairan 2020, Vol. 8 No. 2: 42-50

aktivitas fagositosis pada perlakuan B tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan E namun aktivitas fagositosis berbeda nyata dengan perlakuan A. Selanjutnya aktivitas fagositosis pada perlakuan E tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan A

Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. yang berasal dari usus ikan mas dapat meningkatkan respon imun ikan inang itu sendiri yang diindikasikan dengan meningkatnya total leukosit dan aktivitas fagositosis. Hasil penelitian yang sama dilaporkan oleh Pangalila *dkk.* (2020) dimana pemberian probiotik *Lactobacillus* sp. yang berasal dari usus ikan lele mampu meningkatkan respon imun ikan mas (berukuran rata-rata 2,27 g) setelah diberikan selama empat minggu dengan dosis optimal 1×10^8 cfu/mL. Probiotik dapat meningkatkan respon imun ikan diduga karena sel bakteri probiotik mengandung bahan-bahan yang berfungsi sebagai imunostimulator seperti lipopolisakarida (LPS) dan β -glucan. Menurut Raa (2000), kedua bahan ini dapat meningkatkan sistim imun dengan cara pertama-tama berikatan dengan sel fagosit dimana setelah berikatan sel akan mengeluarkan molekul-molekul signal (sitokin) yang merangsang membentuk sel fagosit yang baru. Misra *et al.* (2006) juga melaporkan penggunaan β -glucan pada ikan roau dapat meningkatkan total leukosit. Selanjutnya Harikrishnan *et al.* (2012), melaporkan bahwa penambahan probiotik *Lactobacillus* dalam pakan dapat meningkatkan respon imun nonspesifik dan resistensi ikan Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Nguyen *et al.* (2017) melaporkan

bahwa probiotik *L. lactis* yang diisolasi dari ikan laut liar dan diberikan pada ikan berukuran rata-rata 80,84 g selama 8 minggu dapat meningkatkan respon imun nonspesifik ikan Olive Flounder (*P. olivaceus*). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Dawood *et al.* (2016), ikan red sea bream (*Pagrus major*) berukuran rata-rata 3,29 g yang diberi pakan dengan penambahan probiotik *L. rhamnosus* dan *L. lactis* selama 56 hari secara nyata dapat meningkatkan respon imun ikan yang diindikasikan dengan meningkatnya hematokrit, total plasma protein, aktivitas bakterisida, peroksidase sehingga kedua jenis probiotik tersebut disimpulkan dapat merangsang peningkatan status kesehatan ikan jika ditambahkan dalam pakan.

Pada udang, Wang *et al.* (2019) melaporkan bahwa probiotik *L. pentosus*, *L. fermentum*, *Bacillus subtilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam bentuk campuran yang diberikan pada udang putih *Litopenaeus vannamei* pada konsentrasi 1×10^8 cfu/mL per kg pakan selama 56 hari secara nyata meningkatkan status kesehatan udang yang diindikasikan dengan meningkatnya kelangsungan hidup setelah udang diuji tantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Xie *et al.* (2019) juga melaporkan bahwa pemberian campuran probiotik *Lactobacillus*, *B. subtilis* dan *B. licheniformis* dapat meningkatkan respon imun nonspesifik maupun pertumbuhan udang putih..

Jang *et al.* (2019) menyatakan bahwa penambahan probiotik dalam pakan dapat meningkatkan imunitas ikan. Dalam penelitiannya, ikan Olive Flounder (*P. olivaceus*) yang diberi pakan yang ditambahkan probiotik *L. plantarum* selama

Budidaya Perairan 2020, Vol. 8 No. 2: 42-50

8 minggu secara nyata meningkatkan imunitas ikan dibandingkan dengan kontrol. Tingkat mortalitas ikan setelah diuji tantang dengan bakteri *Streptococcus iniae* mencapai 12,5% sedangkan ikan kontrol mencapai 100%. Ullah *et al.* (2018) melaporkan bahwa probiotik komersial yang diberikan pada ikan selama 90 hari dapat meningkatkan respon imun nonspesifik ikan mori (*Cirrhinus mrigala*) yang ditandai dengan meningkatnya total leukosit maupun aktivitas lisosim, total plasma protein dan imunoglobulin dibandingkan dengan ikan kontrol.

KESIMPULAN

1. Penambahan probiotik *Lactobacillus* sp. yang berasal dari usus ikan mas dalam pakan berpengaruh nyata terhadap peningkatan respon imun yang diindikasikan dengan meningkatnya total leukosit dan aktivitas fagositosis.
2. Konsentrasi probiotik *Lactobacillus* sp. yang optimal meningkatkan total leukosit dan aktivitas fagositosis ikan mas berkisar $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cfu/mL per kg pakan dengan lama waktu pemberian 6 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

- 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). *Aquac. Nutr.* 22:367-373.
- Arias-Moscoso JL, Espinoza-Barron LG, Miranda-Baeza A, Rivas-Vega ME, Nieves-Soto M. 2018. Effect

- of commercial probiotics addition in a bioflog shrimp farm during the nurseru phase in zero water exchange. *Aquaculture Report* 11: 47-52.
- Austin, B, Austin DA. 2012. *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Animals*, 5th edn. Springer, the Netherland.
- Chauhan A, Singh R. 2018. Probiotis of aquaculture a promising emerging alternative approach. Departement of zoologi, School of Bioengineering & Biosiences. Springer, Lovely Professional University, India.
- Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini EEM,
- Hossain SM, Nhu HT, Dossou S, Moss SA. 2016. Effect of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology* 49: 275-285.
- Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119:917-935.
- Harikrishnan R, Balasundaramb C, Soo MH.. 2012. Effect of probiotic enriched diet on *Paralichthys olivaceus* affected with Lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish And Shellfish Immunology* 29: 868-874.
- Jang WJ, Leeb JM, Hasana MT, Leed BJ., Lim SG, Konga IS. 2019. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology* 92: 719-727.
- Kesarcodi-watson A., Kaspar, H. Lategan, M.J. Gibson, M.J. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14.
- Misra CK, Das KB, Mukherjee CS, Pattnaik P. 2006 Effect of multiple injections of β -glucan on non- specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 305-319.
- Mudeng CC, Manoppo H, Lantu S, Kreckhoff RL, Tumbol RA. 2020. Suplementasi bakteri probiotik meningkatkan performa pertumbuhan dan efisiensi pakan benih ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Ejournal Budidaya Perairan* 8(1):8-18.
- Nguyen TL, Park IC, Kim DH. 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Fish & Shellfish Immunology* 471: 113-120.
- Newaj-Fyzul A, Austin B. 2014. Probiotics, immunostimulants,

- plant products and oral vaccine, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases* 2014:1-19.
- Pangalila N, Manoppo H, Tumbol RA, Lumenta C, Kreckhoff RL, Warouw V. 2020. Respon imun benih ikan mas, *Cyprinus carpio*, yang diberikan paka probiotik *Lactobacillus* sp. dengan konsentrasi berbeda. *Ejournal Budidaya Perairan* 8(1):38-47.
- Raa J. 2000. The use of immune-stimulants in fish bacterial pathogens. University of Tromso Norway, pp 47-65.
- Tan HY, Chena SW, Hua SY.. 2019. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 92: 265-275
- Ullah A , Zuberi A, Ahmad BM, Shaha AB, Younus N, Ullah S, Khattak MNK. 2018. Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (*Cirrhinus mrigala*) in a natural earthen polyculture system. *Fish and Shellfish Immunology* 72:266-272.
- Wang YC Hu YS, Chiu SC,. Liu HC. 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.
- Xie JJ, Liu QQ, Liao S, Fang HH, Yin P, Xie WS, Tian XL,. Liu JY, Niu J. 2019. Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 90: 456-465.