

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

PENGARUH PENAMBAHAN ASAM HUMAT PADA PAKAN MENGANDUNG KADMIUM (Cd) DARI KERANG HIJAU TERHADAP BIOELIMINASI Cd, STATUS KESEHATAN, DAN PERTUMBUHAN IKAN KAKAP PUTIH *Lates calcarifer*

Rasidi^{1)*#}, Dedi Jusadi¹⁾, Mia Setiawati¹⁾, Munti Yuhana²⁾, Muhammad Zairin Jr.²⁾, dan Ketut Sugama²⁾

¹⁾ Departemen Budidaya, Fakultas Kelautan dan Perikanan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Babakan, Kec. Dramaga, Kota Bogor, Jawa Barat 16128

²⁾ Pusat Riset Perikanan
Gedung BRSDMKP II, Jl. Pasir Putih II, Ancol Timur, Jakarta 14430
E-mail: siflounder@gmail.com; dedidj@ipb.ac.id

(Naskah diterima: 13 Agustus 2019; Revisi final: 28 Januari 2020; Disetujui publikasi: 28 Januari 2020)

ABSTRAK

Asam humat (AH) terdiri atas AH alami (AHA) dan sintetik (AHS), namun efektivitasnya sebagai *feed additive* pada pakan ikan kakap putih belum dikaji. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas penambahan AH pada pakan yang mengandung kadmium (Cd) dari kerang hijau *Perna viridis* terhadap status kesehatan dan pertumbuhan ikan kakap putih, *Lates calcarifer*. Percobaan dirancang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan terdiri atas lima pakan uji mengandung AH yang berbeda, yaitu 0; 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹ (AHA) dan sebagai pembanding menggunakan AHS sebesar 1.600 mg.kg⁻¹ pakan. Benih ikan kakap putih (4,18 ± 0,25 g) dipelihara dalam akuarium ukuran 80 cm x 35 cm x 28 cm yang diisi air laut dengan sistem resirkulasi selama 70 hari. Ikan diberi pakan uji sesuai perlakuan tiga kali sehari sampai kenyang. Hasil penelitian menunjukkan penambahan AH baik jenis AHA maupun AHS pada pakan dapat menurunkan akumulasi Cd dalam daging, ginjal, dan hati; kedua jenis AH tersebut mampu mengeliminasi Cd di dalam daging ikan. Pada dosis 1.600 mg.kg⁻¹ kedua jenis AH tersebut mampu meningkatkan performa pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan, namun pada dosis AHA > 1.600 mg.kg⁻¹ pertumbuhannya relatif menurun. Pola respons pertumbuhan ikan bersesuaian dengan parameter hematologi, enzim pencernaan, dan status antioksidan di hati ikan. Kesimpulan penelitian ini, penambahan asam humat pada dosis yang sama (1.600 mg.kg⁻¹) pada pakan, AHS lebih efisien dibandingkan AHA dalam hal meningkatkan pertumbuhan. Penambahan AH dari jenis asam humat alami dan sintetik dalam pakan uji dapat meningkatkan status kesehatan dan mengeliminasi Cd di dalam daging ikan. Penambahan AHA pada dosis tinggi pada pakan memberikan respons negatif terhadap status kesehatan, kelangsungan hidup, dan kinerja pertumbuhan ikan kakap putih.

KATA KUNCI: asam humat; kakap putih *Lates calcarifer*; kerang hijau *Perna viridis*; logam berat Cd; pakan; pertumbuhan

ABSTRACT: *The effects of humic acid addition in reducing cadmium (Cd) concentration in green mussel used for feed and improving the health status and growth performance of Asian seabass, Lates calcarifer. By: Rasidi, Dedi Jusadi, Mia Setiawati, Munti Yuhana, Muhammad Zairin Jr., and Ketut Sugama*

Humic acids (HAs) are available in natural and synthetic forms. HA has potential applications in aquaculture, yet its effectiveness as a feed additive in Asian seabass, Lates calcarifer has not well studied. The purpose of this study was to assess the effectiveness of the addition of natural and synthetic humic acids to reduce cadmium (Cd) concentration in green mussels Perna viridis used for Asian seabass feed and evaluate the fish health status and growth performance. The experiment was designed using a completely randomized design (CRD) with five treatments and three replications. Five test feeds containing different levels of humic acid, i.e., 0; 1,600; 10,000; and 20,000 mg natural humic acid kg⁻¹ feed. As a comparison, a test feed was added with 1,600 mg synthetic humic acid kg⁻¹ feed. Asian seabass juveniles

Korespondensi: Departemen Budidaya, Fakultas Kelautan dan Perikanan, Institut Pertanian Bogor. Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Babakan, Kec. Dramaga, Kota Bogor, Jawa Barat 16128.
Tel. + 62 251 8622909
E-mail: siflounder@gmail.com; dedidj@ipb.ac.id

(4.18 ± 0.25 g) were cultivated in seawater aquarium equipped with a recirculation system for 70 days. Fifteen aquaria of 80 cm x 35 cm x 28 cm were used as the culture tanks. The fish were fed with the experimental diet three times every day at the satiation level. The results showed that the addition of both HAs (natural, AHA and synthetic, AHS) in feed could reduce Cd level in the fish meat, kidneys, and liver. At a dose of 1,600 mg.kg⁻¹, both HAs were able to improve the growth performance and survival of fish. However, at doses > 1,600 mg.kg⁻¹, fish growth was relatively suppressed. Fish growth response patterns were concomitant with the hematological parameters, digestive enzymes, and antioxidant status in fish liver. This study concludes that the addition of AHS at 1,600 mg.kg⁻¹ feed is more efficient in terms of increasing growth compared with the same AHA level. The addition of HA, either natural and synthetic humic acid in the feed, can improve the health status of Asian seabass and eliminate Cd in the fish meat. The addition of AHA at higher doses (> 1,600 mg.kg⁻¹ feed) might cause a negative response to health status, survival, and growth performance of Asian seabass.

KEYWORDS: Asian seabass *Lates calcarifer*; feed; green mussel, *Perna viridis*; growth performance; humic acid

PENDAHULUAN

Ikan kakap putih *Lates calcarifer* merupakan salah satu komoditas budidaya laut yang prospektif dikembangkan. Produksi budidaya ikan kakap putih di Indonesia rata-rata selama tahun 2012-2016 sebesar 6.097 ton atau 10,70% produksi dunia sebesar 56.933 ton (FAO, 2019). Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) menargetkan peningkatan produksi budidaya ikan kakap putih pada tahun 2019 sebesar 6.471 ton (DJPB, 2016). Peningkatan target produksi tersebut akan meningkatkan kebutuhan pakan dan bahan bakunya. Bahan baku utama pakan khususnya tepung ikan yang selama ini masih tergantung impor akan berdampak pada kenaikan harga pakan.

Ketergantungan terhadap penggunaan tepung ikan perlu dikurangi salah satunya dengan memanfaatkan kekerangan sebagai bahan baku pakan untuk mensubstitusi tepung ikan. Berdasarkan penelitian terdahulu, kerang hijau *Perna viridis* telah dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan untuk beberapa jenis ikan (Mohanta *et al.*, 2013; Vidacovic, 2015), yang mengindikasikan kerang hijau dapat dijadikan alternatif sumber protein pakan ikan. Namun sesuai dengan sifat hidupnya sebagai nonselektif *filter feeder*, kekerangan seringkali mengandung logam berat salah satunya kadmium (Cd) (Riani *et al.*, 2018).

Kadmium berasal dari industri baterai, pelapisan logam dan plastik yang masuk ke perairan, melalui rantai makanan akan terakumulasi dalam tubuh kekerangan. Berdasarkan penelitian pendahuluan diketahui kandungan Cd pada daging kerang hijau sebesar 0,08 mg.kg⁻¹. Batas baku mutu Cd dalam produk kekerangan menurut standar FAO < 0,05 mg.kg⁻¹ (Bosch *et al.*, 2016). Kandungan Cd pada kerang hijau tersebut telah melewati baku mutu, sehingga akan bersifat toksik jika dikonsumsi baik oleh manusia maupun hewan. Cd diketahui dapat menyebabkan osteoporosis, anemia, dan gangguan saluran ginjal (Jaishankar *et al.*, 2014).

Salah satu alternatif pemanfaatan kerang hijau yang mengandung logam berat adalah sebagai bahan baku pakan ikan. Jika kerang hijau tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan, maka diharapkan permintaan kerang hijau akan semakin meningkat pada masa depan. Meningkatnya permintaan kerang hijau diperlukan peningkatan produksinya, dengan potensi lahan yang masih terbuka luas untuk pengembangan budidaya kerang hijau sehingga produksinya dapat ditingkatkan (Rajagopal *et al.*, 2006; Radiarta *et al.*, 2011). Pengembangan budidaya kerang hijau mempunyai manfaat ekologis sebagai biofilter perairan yang tercemar. Selain itu, teknologi budidayanya juga relatif sederhana dan tanpa *input* pakan sehingga lebih ekonomis. Selanjutnya dampak yang diharapkan, keberlanjutan usaha budidaya kerang hijau dapat berlanjut. Solusi atas pemanfaatan kerang hijau yang mengandung logam berat diyakini sebagai salah satu jalan untuk meningkatkan produksi kerang hijau di Indonesia.

Pemanfaatan kerang hijau yang mengandung Cd sebagai bahan baku pakan memungkinkan Cd akan terakumulasi dalam tubuh ikan dan dapat bersifat toksik. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mereduksi toksisitas Cd tersebut. Salah satu alternatifnya dengan menambahkan asam humat (AH) dalam pakan ikan. Asam humat memiliki gugus fungsional dan aromatik yang berpotensi untuk membentuk ikatan kompleks dengan logam berat sehingga digunakan sebagai agen *chelator* logam berat (Klocking, 1992). Berdasarkan proses pembuatannya, AH terdiri atas asam humat alami (AHA) dan sintetik (AHS). AHS telah digunakan untuk mengeliminasi Cd pada ikan nila (Osman *et al.*, 2009). Penambahan AHA pada pakan juga telah dilakukan untuk mengeliminasi logam berat Pb pada ikan nila (Marlinda, 2016; Robin *et al.*, 2017). Selain sebagai *chelator* logam berat, AH juga bermanfaat dapat meningkatkan status kesehatan saluran pencernaan, meningkatkan gambaran darah, dan pertumbuhan (Yoruk *et al.*, 2004; Yılmaz *et al.*,

2018). Berdasarkan penelitian terdahulu penambahan asam fulvat sintetik pada pakan dengan dosis optimal sebesar 1,5%-2% dapat meningkatkan pertumbuhan ikan *loach*, *Paramisgurnus dabryanus* (Gao *et al.*, 2017).

Berdasarkan penelitian terdahulu yang menggunakan AHA (kadar AH sebesar 4,92%), diperoleh dosis penambahan AHA sebesar 1.600 mg.kg⁻¹ pakan yang menghasilkan performa pertumbuhan terbaik, namun dosis tersebut belum mampu mengeliminasi Cd dalam daging ikan kakap putih (Rasidi *et al.*, 2019). Oleh karena itu, diperlukan penelitian lanjutan penambahan AHA dengan dosis yang semakin tinggi. Peningkatan dosis AHA yang semakin meningkat diharapkan dapat diperoleh hasil yang efektif dibandingkan dengan menggunakan AHS. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas penambahan AH pada pakan yang mengandung Cd dari kerang hijau *Perna viridis* terhadap status kesehatan dan pertumbuhan ikan kakap putih, *Lates calcarifer*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dari bulan Desember 2018 sampai dengan April 2019 di Laboratorium Riset Ikan Hias Laut, Balai Riset Budidaya Ikan Hias Depok. Analisis sampel dilakukan di beberapa laboratorium di lingkungan Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor; Instalasi Riset Kesehatan Ikan, Depok; dan Laboratorium Pusat Kajian Stres Oksidatif dan Hipoksia, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI), Salemba, Jakarta.

Asam humat (AH) yang digunakan terdiri atas dua jenis yaitu asam humat alami (AHA) (Humakos) dan asam humat sintetik (AHS) (Sigma Aldrich) sebagai pembanding. Asam humat alami yang digunakan mempunyai kadar asam humat sebesar 4,92% (Rasidi *et al.*, 2019), sedangkan AHS (Sigma Aldrich) dengan tingkat kemurnian 97% (sesuai label produk). Percobaan dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dengan tiga ulangan. Masing-masing perlakuan terdiri atas: pakan tanpa tambahan AH sebagai pakan kontrol (0 AH), pakan dengan penambahan asam humat sintetik sebesar 1.600 mg.kg⁻¹ pakan (1.600 AHS), pakan dengan penambahan asam humat alami (AHA) masing-masing sebesar 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹ pakan (1.600 AHA; 10.000 AHA; dan 20.000 AHA).

Bahan baku utama pakan berupa daging kerang hijau diperoleh dari Cilincing, Jakarta Utara. Daging kerang dikeringkan dan dibuat menjadi tepung. Tepung daging kerang hijau dan bahan baku pakan lainnya kemudian dianalisis proksimat, selanjutnya dilakukan formulasi pakan sesuai dengan perlakuan masing-masing dengan dosis penambahan AH yang berbeda (Tabel 1). Pakan

dan ikan uji kemudian dianalisis proksimat menggunakan metode standar (AOAC, 1984); selain itu, dianalisis kandungan logam berat Cd menggunakan metode *atomic absorption spectrofotometry* (AAS). Analisis kandungan asam humat pada pakan uji dilakukan menggunakan spektrofotometri di Pusat Litbang Bioindustri, Bogor.

Ikan uji berupa benih ikan kakap putih (bobot rata-rata awal 4,18 ± 0.25 g) diperoleh dari Balai Budidaya Laut (BBL) Lampung. Ikan uji diaklimatisasi terlebih dahulu sebelum diberi perlakuan pada akuarium selama 15 hari di Balai Riset Ikan Hias, Depok. Selanjutnya dilakukan pemuaian selama 24 jam. Ikan diseleksi, ditimbang, dan dimasukkan ke dalam akuarium berukuran 80 cm x 35 cm x 28 cm berisi air laut 61,6 L. Air laut diperoleh dari Seaworld Ancol, Jakarta. Penebaran ikan dilakukan sebanyak 25 ekor/akuarium. Ikan dipelihara selama 70 hari dengan pemberian pakan uji diberikan sampai kenyang (*at satiation*). Frekuensi pemberian pakan sebanyak tiga kali sehari pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00 WIB. Penyiponan dilakukan setiap hari, kemudian dilakukan pergantian air sebanyak 30% setiap dua hari. Penambahan air pada tandon resirkulasi dilakukan setelah penyiponan.

Pengukuran kualitas air secara *in situ* menggunakan alat *multiparameter water quality* merk YSI 556. Hasil pengukuran kualitas air untuk suhu berkisar antara 28,22°C-29,30°C; oksigen terlarut berkisar antara 5,42-6,29 mg.L⁻¹; pH berkisar antara 7,74-8,35; salinitas berkisar antara 26,98-27,70 mg.L⁻¹. Kadar amonia berkisar antara 0,034-0,210 mg.L⁻¹, nitrit berkisar antara 0,045-0,370 mg.L⁻¹; nitrat berkisar antara 2,45-3,10 mg.L⁻¹; logam berat Cd berkisar antara 0,002-0,004 mg.L⁻¹.

Pada awal dan akhir pemeliharaan dilakukan penimbangan bobot ikan untuk mengetahui pertumbuhannya. Jumlah pakan yang dihabiskan dicatat untuk mengetahui tingkat konsumsi pakan, yang berguna untuk menghitung konversi pakan, serta retensi protein. Setelah penimbangan selesai, diambil lima ekor ikan dari setiap akuarium untuk keperluan analisis lebih lanjut di laboratorium. Parameter yang diamati meliputi kelangsungan hidup, bobot ikan, laju pertumbuhan spesifik, jumlah konsumsi pakan, retensi protein, dan konversi pakan. Analisis di laboratorium meliputi proksimat pakan dan ikan, logam Cd di pakan dan ikan, gambaran darah (Hb, Hc, dan sel darah merah (SDM)), enzim pencernaan dan enzim oksidatif.

Parameter hematologis yang diukur meliputi hemoglobin (Hb), hematokrit (Hc), dan sel darah merah (SDM). Data hematologi tersebut kemudian dijadikan dasar dalam perhitungan *mean corpuscular hemoglobin* (MCH), berdasarkan Blaxhall & Daisley (1973).

Tabel 1. Komposisi, proksimat, logam berat Cd, dan kadar asam humat pada pakan untuk uji pertumbuhan ikan dengan perbedaan penambahan dosis asam humat (0; 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹)

Table 1. *Ingredient, proximate, heavy metal Cd, and humic acid content in feed for fish growth test with additional different dosage of humic acid (0; 1,600; 10,000; and 20,000 mg.kg⁻¹)*

Bahan <i>Ingredients</i> (g kg ⁻¹)	Penambahan dosis asam humat (<i>Dosage humic acid addition</i>) (mg kg⁻¹)				
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS <i>1,600 AHS</i>	1.600 AHA <i>1,600 AHA</i>	10.000 AHA <i>10,000 AHA</i>	20.000 AHA <i>20,000 AHA</i>
Tepung ikan (<i>Fish meal</i>)	260	260	260	260	260
Tepung kedelai <i>Soy bean meal (SBM)</i>	115	115	115	115	115
Tepung daging dan tulang <i>Meat and bone meal (MBM)</i>	115	115	115	115	115
Tepung terigu (<i>Wheat flour</i>)	130	128.4	128.4	120	110
Tepung kerang hijau <i>Green mussel meal (GSM)</i>	350	350	350	350	350
Minyak ikan (<i>fish oil</i>)	10	10	10	10	10
Campuran mineral <i>Mineral mix</i>	5	5	5	5	5
Campuran vitamin <i>Vitamin mix</i>	10	10	10	10	10
<i>Binder</i>	5	5	5	5	5
Asam humat sintetik (AHS) <i>Synthetic humic acid</i>	0	1.6	0	0	0
Asam humat alami (AHA) <i>Natural humic acid</i>	0	0	1.6	10	20
Jumlah	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Komposisi proksimat pakan (<i>Proximate composition</i>)					
Protein kasar <i>Crude protein (%)</i>	48.52	47.07	47.8	47.69	48.69
Lemak kasar (<i>Crude lipid (%)</i>)	6.22	6.14	6.11	6.22	6.36
Karbohidrat <i>Carbohydrat (%)</i>	19.66	19.26	21.03	23.46	23.33
Kadar abu (<i>Ash content (%)</i>)	13.54	13.32	13.18	13.33	13.34
Kadar air <i>Moisture content (%)</i>	11.23	13.18	10,135	7.86	7.26
Gross energi (kkal/100 g)* <i>Gross energy (kcal/100 g)</i>	413.17	402.60	413.70	424.11	430.54
Energi (kkal/%protein)	8.52	8.55	8.65	8.89	8.84
Protein (kkal/%protein)					
Hasil analisis (<i>Result analysis</i>)					
** Logam berat Cd					
<i>Heavy metal Cd (mg.kg⁻¹)</i>	0.10	0.11	0.12	0.13	0.13
Asam humat (mg.kg ⁻¹)	ttd	0.37	0.023	0.14	0.30

Keterangan (*Note*):

¹⁾ *Gross energy (GE)* dihitung berdasarkan konversi NRC (2002) yaitu 5,64 kkal/g protein; 9,44 kkal/g lemak; dan 4,11 kkal/g BETN (*Gross energy (GE) calculated based in conversion NRC (2002): 5.64 kcal/g; 9.44 kcal/g lipid; and 4.11 kcal/g NFE*)

²⁾ Analisis Cd menggunakan metode *atomic absorption spectrofotometry (AAS)* (*Analysis Cd used atomic absorption spectrofotometry (AAS) method*)

Pengambilan sampel dari saluran pencernaan untuk analisis kelimpahan total dan jenis bakteri, dan enzim pencernaan. Kelimpahan bakteri total dihitung dengan menggunakan metode *total plate count* (TPC) pada media TSA yang ditambahkan NaCl (SNI 01-2332.3-2006). Identifikasi spesies bakteri dilakukan secara biokimiawi (Benson, 2001). Pengukuran aktivitas enzim protease diukur mengikuti prosedur menurut Walter (1984), aktivitas enzim amilase (Bernfeld, 1955), dan aktivitas enzim lipase (Linfield *et al.*, 1984). Pengukuran enzim oksidatif dan antioksidan meliputi kadar enzim *malonealdehyde* (MDA), *katalase* (CAT), *superoxida dismutase* (SOD), dan *glutathione peroxidase* (GPx) pada organ hati ikan kakap putih. Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri (Wills, 1987). Aktivitas enzim SOD dan GPx diukur menggunakan metode spektrofotometri dengan berpedoman pada standar operasional prosedur dari kit komersial (Randox). Pemeriksaan aktivitas enzim katalase dilakukan dengan spektrofotometri mengacu pada Muradian *et al.* (2002).

Analisis Data

Data kelangsungan hidup, bobot ikan, laju pertumbuhan spesifik, jumlah konsumsi pakan, retensi protein dan konversi pakan, enzim pencernaan dan enzim oksidatif dianalisis menggunakan uji sidik ragam dengan taraf kepercayaan 95%. Jika ada

perbedaan nyata dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan menggunakan program IBM SPSS versi 21.0. Kelimpahan bakteri dan gambaran darah (Hb, Hc, dan SDM) dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN BAHASAN

Ikan yang diberi pakan dengan penambahan asam humat (AH) dengan dosis yang berbeda berpengaruh nyata terhadap kinerja pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan jika dibandingkan dengan ikan kontrol selama 70 hari pemeliharaan (Tabel 2).

Kinerja pertumbuhan pada ikan yang diberi pakan dengan penambahan AH meningkat dibandingkan dengan ikan kontrol, hal ini menunjukkan bahwa penambahan AH dalam pakan dapat meningkatkan pemanfaatan nutrisi pakan. Kinerja pertumbuhan dan tingkat pemanfaatan pakan yang meningkat terkait dengan aktivitas enzim pencernaan, retensi nutrisi pakan, dan konversi pakan. Berdasarkan jenis AH yang ditambahkan, AHA dan AHS pada dosis yang sama sebesar 1.600 mg.kg⁻¹ dalam pakan memberikan respons positif terhadap pertumbuhan. Hasil ini menunjukkan bahwa sesuai dengan penelitian sebelumnya penambahan dosis AHA sebesar 1.600 mg.kg⁻¹ dalam pakan menghasilkan kinerja pertumbuhan yang terbaik pada ikan kakap putih (Rasidi *et al.*, 2019). Namun demikian jika dibandingkan dengan jenis AH yang ditambahkan pada dosis yang sama penambahan AHS pada pakan

Tabel 2. Bobot awal (W_0), bobot akhir (W_t), jumlah konsumsi pakan (JKP), retensi protein (RP), kelangsungan hidup (KH), laju pertumbuhan spesifik (LPS), dan rasio konversi pakan (RKP) dengan perbedaan penambahan dosis asam humat (0; 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹ pakan)

Table 2. *Initial weight (W_0), final weight (W_t), feed consumption (AFC), protein retention (RP), survival rate (SR), specific growth rate (SGR), and feed conversion ratio (FCR) with addition of different dosages of humic acid (0; 1,600; 10,000; and 20,000 mg.kg⁻¹ feed)*

Parameter Parameters	Penambahan dosis AH/HA dosage addition (mg.kg ⁻¹)				
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA
Bobot awal (<i>Initial weight</i>) (g)	4.10 ± 0.24 ^a	4.09 ± 0.34 ^a	4.06 ± 0.04 ^a	4.06 ± 0.12 ^a	4.01 ± 0.02 ^a
Bobot akhir (<i>Final weight</i>) (g)	7.63 ± 0.39 ^a	10.90 ± 0.69 ^b	10.05 ± 0.14 ^b	8.77 ± 0.59 ^b	7.77 ± 0.19 ^a
Jumlah konsumsi pakan (g.ikan ⁻¹) <i>Feed consumption (g.fish⁻¹)</i>	13.15 ± 0.85 ^c	11.18 ± 0.39 ^{bc}	12.75 ± 0.20 ^{ab}	12.21 ± 1.26 ^{ab}	10.59 ± 0.96 ^b
Retensi pakan (<i>Protein retention</i>) (%)	7.13 ± 2.10 ^a	17.61 ± 1.02 ^c	14.87 ± 2.91 ^{bc}	12.87 ± 1.63 ^b	11.94 ± 1.36 ^b
Sintasan (<i>Survival rate</i>) (%)	76.00 ± 4.00 ^a	94.67 ± 4.61 ^c	86.67 ± 2.31 ^{bc}	78.67 ± 6.11 ^{ab}	77.33 ± 6.11 ^a
Laju pertumbuhan spesifik (%.hari ⁻¹) <i>Specific growth rate (%.days⁻¹)</i>	0.76 ± 0.02 ^a	1.35 ± 0.06 ^e	1.29 ± 0.12 ^d	1.13 ± 0.02 ^c	0.95 ± 0.04 ^b
Rasio konversi pakan <i>Feed conversion ratio</i>	3.89 ± 1.02 ^a	1.65 ± 0.10 ^c	2.34 ± 0.07 ^{bc}	2.60 ± 0.30 ^b	2.82 ± 0.50 ^b

Keterangan: Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05)

Note: Number in the same row follows by different characters meaning significantly different (P<0.05)

mengakibatkan pertumbuhan ikan lebih tinggi dibandingkan ikan yang diberi pakan dengan penambahan AHA. Perbedaan respons pertumbuhan tersebut dalam dalam penelitian ini dapat dilihat dari ikan yang mengonsumsi pakan 1.600 AHS bersesuaian dengan nilai-nilai parameter yang diamati yang lebih baik dibandingkan dengan 1.600 AHA (Tabel 2). Hal ini diduga disebabkan terkait spesifikasi gugus fungsional dan kemampuan masing-masing jenis AH dalam fungsinya sebagai *chelator* logam berat, dan meningkatkan pemanfaatan nutrisi pakan. Respons positif juga ditunjukkan pada penelitian terdahulu yang menggunakan AHS secara signifikan meningkatkan pertambahan bobot ikan *swordtails* (*Xiphophorus helleri*) (Meinelt *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini, meningkatnya penambahan AH pada pakan uji berkorelasi positif dengan kelimpahan mikrobiota di usus ikan (Tabel 3). Menurut Ringo *et al.* (2006), jenis pakan yang masuk dalam sistem pencernaan akan memengaruhi kelimpahan dan jenis mikrobiota dalam saluran pencernaan. Penambahan AH memberikan keuntungan secara tidak langsung sebagai prebiotik, karena mikrobiota di dalam saluran pencernaan dapat memanfaatkan asam humat sebagai sumber energi seperti karbon, N, dan P (Stevenson, 1994). Selanjutnya Islam *et al.* (2005) menyatakan bahwa asam humat mampu menstabilkan mikrobiota di usus. Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui mikrobiota yang dominan diperoleh tiga jenis bakteri. Ketiga jenis bakteri dominan tersebut berpotensi sebagai probiotik. Menurut penelitian terdahulu, *Ba-*

cillus sp. berperan dalam proses pencernaan yang dapat menghasilkan enzim pencernaan yang meningkatnya retensi protein dan sistem imun sehingga berdampak pada pertumbuhan ikan yang semakin meningkat (Widanarni *et al.*, 2015).

Kelimpahan dan jenis bakteri dominan yang ditemukan di usus ikan uji diduga berdampak pada aktivitas enzim pencernaan. Aktivitas enzim pencernaan berbeda nyata antara ikan yang diberi perlakuan penambahan AH dan ikan kontrol, namun tidak berbeda nyata antar ikan yang diberi pakan dengan penambahan AHA maupun AHS ($P > 0,05$) (Tabel 4). Meningkatnya kelimpahan mikrobiota ini diduga berdampak pada meningkatnya enzim pencernaan di usus ikan yang merupakan indikator kemampuan dalam mencerna dan memanfaatkan pakan yang diberikan. Pakan dengan penambahan AH dapat dimanfaatkan lebih baik sehingga lebih efisien dibandingkan pakan kontrol. Tingkat pemanfaatan pakan dapat dilihat dari nilai konversi pakan yang semakin menurun yang menunjukkan pakan yang dikonsumsi lebih efisien dimanfaatkan untuk pertumbuhan. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya pada ikan *loach* yang diberi pakan dengan penambahan asam fulvat dalam pakan uji mampu memperbaiki pemanfaatan pakan sehingga pertumbuhan ikan dan efisiensi pakan meningkat (Gao *et al.*, 2017).

Penambahan AH baik jenis alami maupun sintesis dalam pakan uji mampu menurunkan Cd di dalam organ hati dan ginjal; Cd dalam daging ikan tidak

Tabel 3. Kelimpahan total mikrobiota di usus ikan dan identifikasi bakteri, enzim pencernaan dari usus ikan yang diberi pakan dengan perbedaan penambahan dosis asam humat (0; 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹ pakan)

Tabel 3. Total plate count of fish intestine microbiota and identification of species bacteria in fish intestine, enzyim digestion, with addition of different dosages of humic acid (0; 1,600; 10,000; and 20,000 mg.kg⁻¹ feed)

Parameter Parameters	Penambahan AH (HA addition) (mg kg ⁻¹)				
	0 HA (kontroll/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA
Kelimpahan total mikrobiota TPC microbiota (log CFU.mL ⁻¹ g ⁻¹)	1.56 ± 0.43	2.18 ± 0.44	2.86 ± 0.12	2.89 ± 0.32	3.13 ± 0.33
Gram positif/negatif Gram positive/negative (gram +/-) ¹⁾	+	+	+	+	+
Identifikasi spesies bakteri Identification of species bacteria					
<i>Bacillus</i> sp.	√ ²⁾	√	√	nd	nd
<i>Staphylococcus</i> sp.-1	nd ³⁾	√	√	√	√
<i>Staphylococcus</i> sp.-2	nd	√	√	√	√

Keterangan (Note): ¹⁾ Bakteri Gram positif/negative (*Bacteria Gram positive/negative*); √ = dominan (*dominant*); nd = tidak dominan ditemukan (*not dominant found*)

Tabel 4. Aktivitas enzim pencernaan dari usus ikan yang diberi pakan dengan perbedaan penambahan dosis AH selama 70 hari pemeliharaan

Tabel 4. Digestive enzyme activity in fish intestine with addition of different dosages of humic acid for 70 days cultivation

Parameter Parameters	Penambahan AH (HA addition) (mg kg ⁻¹)				
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA
Protease (IU.mL ⁻¹)	0.87 ± 0.0 ^a	2.45 ± 0.5 ^b	2.63 ± 0.38 ^b	2.22 ± 0.75 ^b	1.75 ± 0.2 ^b
Amilase (IU.mL ⁻¹)	0.08 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.24 ± 0.07 ^b	0.31 ± 0.07 ^b	0.10 ± 0.01 ^a
Lipase (μmol menit ⁻¹ /minute ⁻¹)	1.32 ± 0.4 ^a	3.01 ± 0.2 ^b	7.03 ± 0.90 ^b	7.64 ± 0.1 ^b	7.42 ± 0.32 ^b

Keterangan: ¹⁾ Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05)

The numbers in the same row follows by different characters meaning significantly different (P<0.05)

terdeteksi (< 0,005 mg.kg⁻¹); sedangkan di dalam daging ikan kontrol masih terdeteksi Cd sebesar 10,11 ± 0,40 μg.kg⁻¹ (Tabel 4). Dengan demikian penambahan AH pada pakan uji dapat mencegah akumulasi Cd di dalam daging ikan sehingga aman dikonsumsi manusia. Hal ini disebabkan AH melalui gugus karboksilat dan fenol yang mampu membentuk ikatan kompleks dengan Cd. Ikatan yang terbentuk lebih stabil sehingga toksisitasnya juga berkurang, dan mengurangi kemungkinan penyerapan logam oleh jaringan sehingga tidak terakumulasi di dalam daging ikan. Selanjutnya Cd tersebut akan diekskresikan bersama feses (Osman *et al.*, 2009). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan AH dalam air mampu mengeliminasi logam berat Cd (Kamunde & MacPhail, 2011). Demikian juga pada penambahan AH melalui pakan dapat mengeliminasi logam berat Pb pada ikan nila (Marlinda, 2016; Robin *et al.*, 2017).

Status kesehatan ikan dapat diamati dari gambaran darahnya meliputi hemoglobin (Hb), hematokrit (Hc),

dan jumlah sel darah merah (SDM). Pada penelitian ini ikan yang diberi pakan dengan penambahan AH mempunyai gambaran darah yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan kontrol (Tabel 6).

Penambahan AH ada pakan mampu meningkatnya nilai-nilai gambaran darah, hal ini diduga AH berperan dalam menekan toksisitas Cd sehingga proses pembentukan sel darah merahnya tetap berlangsung (Osman *et al.*, 2009). Hal ini disebabkan penambahan AH mampu meningkatkan mineral Fe yang berkontribusi dalam pembentukan SDM sehingga jumlah SDM meningkat. Meningkatnya Fe dalam darah akan berkontribusi dalam meningkatnya jumlah oksigen yang dapat diikat oleh ion Fe, semakin banyak ion Fe dapat mengikat oksigen akan bertambah Hb dalam SDM. MCH merupakan salah satu indikator untuk mengetahui jumlah Hb dalam sel darah merah. Pada penelitian ini, nilai hematologi darah ikan masih berada pada kisaran normal ikan kakap putih (Anderson *et al.*, 1996). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya pada pemanfaatan asam humat

Tabel 5. Kadar Cd di organ (hati, ginjal, dan daging) ikan kakap putih yang diberi pakan dengan perbedaan penambahan dosis AH selama 70 hari pemeliharaan

Tabel 5. Cd content in fish organ (liver, kidney, and fishmeat) in fish with addition of different dosages of humic acid after 70 days cultivation period

Cd pada organ ikan CD in fish organs (μg.kg ⁻¹)	Dosis AH (mg kg ⁻¹) pakan AH dosage (mg kg ⁻¹) feed				
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA
Hati (Liver)	34.43 ± 2.42 ^c	11.41 ± 1.52 ^a	15.95 ± 3.19 ^b	11.79 ± 1.06 ^a	11.43 ± 1.63 ^a
Ginjal (Kidney)	10.88 ± 1.01 ^c	4.67 ± 0.87 ^a	6.27 ± 1.62 ^b	5.23 ± 0.68 ^b	4.97 ± 0.44 ^a
Daging (Meat)	10.11 ± 0.40	ttd ¹⁾	ttd	ttd	ttd

Keterangan (Note): ¹⁾ Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05) (The numbers in the same row follows by different characters meaning significantly different (P<0.05))

²⁾ ttd = tidak terdeteksi (not detected)

Tabel 6. Nilai hemoglobin (Hb), hematokrit (Hc), sel darah merah (SDM), *mean corpuscular hemoglobin* (MCH), dan Fe dalam darah pada ikan uji dengan perbedaan penambahan dosis asam humat (0; 1.600; 10.000; dan 20.000 mg.kg⁻¹ pakan)

Table 6. Value of hemoglobin (Hb), hematokrit (Hc), red blood cell (RBC), mean hemoglobin corpuscular (MCH), and Fe in whole fish blood with additional different dosage of humic acid (0; 1,600; 10,000; and 20,000 mg.kg⁻¹ feed)

Parameter Parameters	Penambahan asam humat (mg.kg ⁻¹ pakan)					Kisaran normal ¹⁾ Normal range ²⁾
	Humic acid addition (mg.kg ⁻¹ feed)					
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA	
Hemoglobin (g.dL ⁻¹)	4.4-5.6	5.6-6.0	5.2-6.6	5.0-6.8	5.0- 6.6	6.0-9.5
Hematokrit (%)	13.1-17	20.8-22.9	21.70-22.9	20.0-20.8	22.0-23.4	26.0-40.0
Sel darah merah (x10 ⁶ sel.mm ³) <i>Red blood cell (x10⁶ cell.mm³)</i>	1.26-1.97	2.13-2.55	2.1-2.31	1.52-2.23	1.9-2.23	1.70-5.20
<i>Mean hemoglobin corpuscular</i> (pg)	28..43–34.92	23.53–26.32	22.51-29.60	27.80-30.91	22.42-34.74	16.7-20.6
Fe darah (<i>Fe blood</i>) (mg.L ⁻¹)	48.76±1.63 ^a	68.32±1.75 ^b	66.36±1.66 ^b	72.15±1.13 ^c	75.66±1.07 ^d	

Keterangan: ¹⁾ Anderson *et al.* (1996); ²⁾ Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05)

Note: The numbers in the same row follows by different characters meaning significantly different (P<0.05)

mampu meningkatkan gambaran darah pada ikan sil-ver catfish, *Rhamdia quelen* (Da Costa *et al.*, 2015) dan ikan rainbow trout (Yılmaz *et al.*, 2018).

Hasil pengukuran parameter uji untuk mengetahui tingkat stres oksidatif meliputi peroksidase lemak *Malonaldehyde* (MDA) dan enzim antioksidan meliputi *katalase* (CAT), *superoksida dismutase* (SOD), dan *gluthatione peroksidase* (GPx) pada hati ikan kakap putih disajikan pada Tabel 7. Ikan yang diberi pakan dengan penambahan AH mampu menurunkan stres oksidatif ditandai dengan kadar MDA yang menurun dibandingkan dengan kontrol. Hal ini sesuai dengan menurunnya akumulasi Cd di hati ikan uji akibat

penambahan AH pada pakan (Tabel 5). Peran AH melalui gugus fungsi karboksil yang mengkhelat ion Cd sehingga toksisitasnya menurun dan tingkat stresnya juga menurun. Namun dengan meningkatnya dosis AHA sampai dengan 20.000 mg.kg⁻¹ pakan menunjukkan kadar MDA meningkat lagi. Menurut Hseu & Yang (2002), penambahan AH pada dosis yang berlebih dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu tidak seimbangnya produksi oksigen reaktif dan hidrogen peroksida dengan enzim antioksidan dalam sel. Peningkatan peroksidasi lemak disebabkan karena sel kekurangan enzim antioksidan, seperti SOD dan GPx. SOD akan mengonversi oksigen reaktif menjadi H₂O₂

Tabel 7. Aktivitas peroksidase lemak, *Malonaldehyde* (MDA), enzim *Katalase* (CAT) dan *Superoksida Dismutase* (SOD), *Gluthatione Peroksidase* (GPx) di hati ikan kakap putih yang diberi pakan dengan perbedaan dosis dan jenis AH selama 70 hari pemeliharaan.

Table 7. Activity of lipid peroxidase, *Malonealdehyde* (MDA), enzym *Catalase* (CAT) and *Superoksida Dismutase* (SOD), *Gluthatione Peroksidase* (GPx) from liver fish fed feed with different humic acid addition (0,1600,10000 and 20000 mg Kg⁻¹ feed)

Parameter Parameters	Dosis AH dalam pakan				
	AH dosage in feed (mg.kg ⁻¹)				
	0 HA (kontrol/control)	1.600 AHS 1.600 AHS	1.600 AHA 1.600 AHA	10.000 AHA 10.000 AHA	20.000 AHA 20.000 AHA
MDA (nmol mL ⁻¹)	58.7 ± 1.08 ^c	28.27 ± 2.10 ^a	33.40 ± 2.56 ^b	56.66 ± 1.79 ^c	57.32 ± 1.74 ^c
CAT (U mL ⁻¹)	0.08 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.03 ^a
SOD (U mL ⁻¹)	43.14 ± 2.8 ^a	48.01 ± 1.93 ^b	45.09 ± 2.18 ^b	53.65 ± 2.69 ^c	52.91 ± 1.89 ^c
GPx (U mL ⁻¹)	0.49 ± 0.05 ^a	0.80 ± 0.08 ^b	0.71 ± 0.17 ^b	0.59 ± 0.09 ^a	0.56 ± 0.04 ^a

Keterangan: ¹⁾ Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ada taraf uji 95% (uji selang berganda Duncan)

Note: The numbers in the same row follows by different characters meaning significantly different results at the 95% test level (Duncan's multiple interval test)

yang kemudian oleh GPx akan dikonversi menjadi H₂O (Muradian *et al.*, 2002). Ikan yang mengonsumsi pakan dengan penambahan AH, aktivitas enzim antioksidan (CAT, SOD, dan GPx) lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini mengindikasikan penambahan AH berperan dalam meningkatkan status antioksidan. Kedua jenis AH ini mempunyai spesifikasi yang berbeda, perbedaan keduanya terletak pada jumlah gugus fungsi dan aromatik. AHS lebih banyak mengandung gugus fenol dibandingkan AHA yang lebih banyak mengandung gugus karboksilatnya (Pompe *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 2001). Gugus fungsi yang terdapat pada AHS yang sebagian besar terdiri atas gugus fenolik (-OH), bersifat reaktif terhadap ion logam esensial seperti Zn dan Mn, kemampuan ini meningkatkan enzim antioksidan yang diperlukan untuk melawan radikal bebas (Zheng & Shiow 2001).

KESIMPULAN

Pada dosis asam humat yang sama (1.600 mg.kg⁻¹ pakan), AHS lebih efisien dibandingkan AHA dalam meningkatkan pertumbuhan ikan. Penambahan AH dari jenis asam humat alami dan sintetik dalam pakan uji, keduanya dapat meningkatkan status kesehatan dan mengeliminasi Cd di dalam daging ikan. Penambahan AHA dosis tinggi pada pakan memberikan respons negatif terhadap status kesehatan, kelangsungan hidup, dan kinerja pertumbuhan ikan kakap putih.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Pendidikan, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan yang telah memberikan beasiswa dan bantuan dana penelitian; Kepala Balai Riset Budidaya Ikan Hias, Depok yang telah memberikan izin dan sarana untuk melakukan penelitian. Teknisi dan laboran yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Anderson, I.G., Schaumuller, L.F., & Kramer, H.L. (1996). A preliminary study on the hematology of freshwater-reared seabass/barramundi *Lates calcarifer*. *Asian Fisheries Sci.*, 9, 101-107.

Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1984). Official methods of analysis. 15th Ed. Helrich, K. (Ed.). Arlington: AOAC.

Benson, H.J. (2001). Benson's microbiological applications: Laboratory manual in general microbiology. 8th Ed. New York: McGraw-Hill, xi + 478 pp.

Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6), 771-781.

Bernfeld, P. (1955). Amylases á and à: *Method Enzymol.*, 1, 149-158.

Bosch, A.C., O'Neill, B., Sigge, G.O., Kerwath, S.E., & Hoffman, L.C. (2016). Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. *J. Sci. Food & Agric.*, 96, 32-48.

Da Costa, S.T., Gressler, L.T., Sutilli, F.J., Loebens, L., Lazzari, R., & Baldisserotto, R. (2015). Effect of humic acid on survival, ionoregulation and hematology of the silver catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae), exposed to different pHs. *Zoologia*, 32(3), 215-224.

Datta, A., Sanyal, S.K., & Saha, S. (2001). A study on natural and synthetic humic acids and their complexing ability towards cadmium. *Plant and Soil*, 235(1), 115-125.

Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya [DJPB]. (2016). Data Teknis Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Jakarta (ID): DJPB.

Food Agriculture Organization of The United Nations [FAO]. (2019). Fishery Statistics. Diunduh pada tanggal 10 Oktober 2019. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.

Gao, Y., Jie, H., Zhuliu, H., Zhiwei, L., Zhao, B., Yi, M., Jeong-Yeol, L., & Zhangjie, C. (2017). Effects of fulvic acid on growth performance and intestinal health of juvenile loach *Paramisgurnus dabryanus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 62, 47-56.

Hseu, Y.C. & Yang, H.L. (2002). The effects of humic acid-arsenate complexes on human red blood cells. *Environmental Research*, 89(2), 131-137.

Islam, K.M.S., Schuhmacher, A., & Gropp, J.M. (2005). Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(3), 126-134.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., & Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdis Toxic*, 7(2), 60-72.

Kamunde, C. & MacPhail, R. (2011). Effect of humic acid during concurrent chronic waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium and zinc. *Ecotox Environment Safety*, 74, 259-269.

Klößing, R. (1992). Humic substances in the global environment and implications in human health. *Monopoli*, 129 pp.

Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serota, S., & Barauskas, R.A. (1984). Lipid-lipase interaction I. Fat splitting with *Candida rugosa*. *JAOCS*, 61(6), 1067-1071.

Marlinda, S. (2016). *Humic acids addition for use in diets of tilapia **Oreochromis niloticus** which contained heavy metals from green mussel **Perna viridis***. Tesis.

- Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, 138 hlm.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Pietrock, M., Heidrich, S., & Steinberg, C.E.W. (2008). Humic substances - Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(1), 17-22.
- Mohanta, K.N., Subramanian, S., & Korikanthimath, V.S. (2013). Evaluation of different animal protein sources in formulating the diets for blue gourami, *Trichogaster Trichopterus* fingerlings. *J. Aquac. Res. Development*, 4(2), 7 pp.
- Muradian, K.K., Utoko, N.A., Fraifeld, V., Mozzhukhina, T.G., Pishel, I.N., & Litoshenko, A.Y. (2002). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: Linear regression and correlation. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 35(3), 205-214.
- National Research Council [NRC]. (2002). Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington D.C. (U.S.): National Academy Press, 114 pp.
- Osman, H.A., Ibrahim, T.B., Ali, A.T., & Derwa, H.I.M. (2009). Field application of humic acid against the effect of cadmium pollution on cultured tilapia *Oreochromis niloticus*. *World Applied Sci. J.*, 6(11), 1569-1575.
- Pompe, S., Bubner, M., Denecke, M.A., Reich, T., Brachmann, Á., Geipel, G., & Nitsche, H. (1996). A comparison of natural humic acids with synthetic humic acid model substances/ : Characterization and interaction with uranium (VI). *Radiochimica Acta*, 74, 1-6.
- Rajagopal, S., Venugopalan, V.P., Van Der Velde G., & Jenner, H.A. (2006). Greening of the coasts: A review of the *Perna viridis* success story. *Aquatic Ecology*, 40, 273-297.
- Radiarta, I N., Saputra, A., & Ardi, I. (2011). Analisis spasial kelayakan lahan budidaya kerang hijau (*Perna viridis*) berdasarkan kondisi lingkungan di Kabupaten Cirebon, Jawa Barat. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(2), 169-352.
- Rasidi, Jusadi, D., Setiawati, M., Yuhana, M., Zairin, Jr.M., & Sugama, K. (2019). Effect of humic acid addition to feeds with heavy metal cadmium contamination from green mussels on growth performance of Asian seabass. *Biotropia*, 26(3), 214-216.
- Ringo, E., Spertad, S., Myklebus, R., Refstie, S., & Krogdahl, A. (2006). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261(3), 829-841.
- Riani, E., Cordova, M.R., & Arifin, Z. (2018). Heavy metal pollution and its relation to the malformation of green mussels cultured in Muara Kamal waters, Jakarta Bay, Indonesia. *Mar. Pollution Bull.*, 133, 664-670.
- Robin, Supriyono, E., Nirmala, K., Harris, E., Affandi, R., & Jusadi, D. (2017). Bio-elimination of lead (Pb) from the organs of red tilapia (*Oreochromis* sp.) using *Gliricidia sepium* compost as a feed additive. *AAFL Bioflux*, 1(10), 38-47.
- Stevenson, F.J. (1994). Humus chemistry-genesis, composition, reactions. New York: John Wiley & Sons, 443 pp.
- Walter, H.E. (1984). Method with haemoglobin, casein, and azocoll as substrate. in: Bergmeyer (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. 3th Ed. Weinheim (JE): Verlag Chemie.
- Widanarni, Nopitawati, T., & Jusadi D. (2015). Screening of probiotic bacteria candidates from gastrointestinal tract of pasific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and their effect on the growth performance. *Research journal of Microbiology*, 10(4), 145-157.
- Wills, E.D. (1987). Evaluation of lipid peroxidation in lipid and biological membran. *Biochemical Toxicology*. New York: John Wiley & Sons.
- Vidacovic, E. (2015). *Fungal and mussel protein sources in fish feed*. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Yoruk, M.A., Gul, M., Hayirli, A., & Macit, M. (2004). The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science*, 83, 84-88.
- Yılmaz, S., Ergun, S., Çelik, E.S., & Yigit, M. (2018). Effects of dietary humic acid on growth performance, haematoimmunological and physiological responses and resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to *Yersinia ruckeri*. *Aquac. Res.*, p. 1-12. <https://doi.org/10.1111/>; <https://doi.org/10.1111/are.13798>.
- Zheng, W. & Shiow, Y.W. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.