

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan

Sebelum melakukan penelitian inti, dilakukan beberapa uji pendahuluan diantaranya penentuan konsentrasi perendaman (maserasi) dan lama waktu perendaman ikan mas terbaik menggunakan ekstrak fenol *G. verrucosa* secara in vivo, penentuan pelarut yang terbaik untuk maserasi *G. verrucosa*, dan penentuan waktu terbaik untuk maserasi *G. verrucosa*.

Untuk penentuan konsentrasi perendaman dan lama waktu perendaman ikan mas menggunakan ekstrak fenol *G. verrucosa* secara in vivo, harus diketahui terlebih dahulu range konsentrasi dan waktu yang digunakan. Range konsentrasi diambil dari konsentrasi yang terendah sampai dengan konsentrasi yang tertinggi. Untuk mengetahui Lc 50, harus dilakukan uji pendahuluan terhadap konsentrasi.

Konsentrasi yang disarankan adalah 1 ppt, 1,5 ppt, 2 ppt, 3 ppt, 4 ppt dan 5 ppt, sedangkan waktu yang disarankan yaitu 8 jam, 10 jam dan 12 jam. Kemudian ikan-ikan uji dimasukkan kedalam media perendaman sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Selanjutnya, dilihat perubahan yang terjadi dengan melihat gejala klinis ikan uji.

Hasil uji perendaman dengan berbagai konsentrasi yang berbeda menunjukkan bahwa ikan uji pada dosis 3 ppt, 4 ppt dan 5 ppt terjadi kematian lebih awal pada 10 jam pertama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis yang bisa ditoleransi untuk Lc 50 ikan uji yang direndam dengan ekstrak fenol adalah dibawah 3 ppt. Sehingga untuk uji in vivo digunakan perendaman ekstrak fenol dengan dosis 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt. Sedangkan waktu perendaman yang optimal adalah 10 jam, karena pada saat 10 jam pertama, ikan mati pertama kali.

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui pelarut terbaik untuk maserasi, diujicobakan macam-macam pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu aseton 80%, etanol 96%, etanol 98% dan akuades. Setelah diuji cobakan ternyata pelarut aseton 80% telah menguap sebelum dilakukan proses penyaringan, sehingga tidak ada hasil yang diperoleh pada saat maserasi bahan menggunakan pelarut aseton 80%. Pada proses maserasi dengan menggunakan etanol 96%, 98% dan akuades didapatkan hasil sehingga saat penyaringan diperoleh ekstrak polifenol. Untuk menunjukkan kemampuan polifenol yang terdapat pada *G. verrucosa*, maka dilakukan uji lanjutan dengan uji daya hambat. Uji daya hambat dilakukan untuk mengetahui diameter daya hambat bakteri yang dihasilkan saat diberi ekstrak fenol. Pengukuran dilakukan selama 24 jam pertama dan kedua, hal tersebut dilakukan untuk mengantisipasi belum tumbuhnya zona hambat pada 24 jam pertama. Sedangkan bakteri yang digunakan yaitu bakteri *A. hydrophila*. Berikut hasil uji daya hambat pada bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan pelarut etanol 96%, etanol 98% dan akuades yang disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Daya Hambat pada Bakteri *A. hydrophila* (cm) dengan Pelarut Etanol 96%, Etanol 98% dan Akuades.

Pelarut	Ulangan		
	1	2	3
Etanol 96%	1	1	1
Etanol 98%	0,9	1,1	0,7
Akuades	0,7	0,8	0,7

Sehingga dari hasil uji daya hambat tersebut, dapat disimpulkan bahwa pelarut terbaik yang dapat digunakan untuk maserasi rumput laut *G. verrucosa* dan dapat mengikat polifenol lebih baik adalah etanol 96%. Setelah mengetahui hasil pelarut terbaik untuk maserasi, penelitian pendahuluan dilanjutkan dengan mencari waktu maserasi terbaik, range waktu yang disarankan adalah selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam.

Pengujian waktu terbaik untuk maserasi ini ditunjukkan dengan nilai absorbansi panjang gelombang pengukuran ekstrak polifenol, apabila nilai absorbansi hasil pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan nilai yang lebih tinggi, maka diasumsikan ekstrak polifenol yang dihasilkan akan semakin efektif. Metode ini turut diujicobakan pada pelarut etanol 98% dan akuades untuk mengetahui nilai panjang gelombang yang dihasilkan. Panjang gelombang fenol yang digunakan untuk polifenol sebesar 460 nm.

Pada maserasi ekstrak polifenol selama 72 jam tidak diperoleh hasil nilai absorbansinya, hal tersebut dikarenakan menguapnya polifenol saat dilakukan proses maserasi, sehingga pada saat proses penyaringan tidak mendapatkan hasil untuk dihitung nilai absorbansinya. Pada pengukuran absorbansi polifenol setelah proses maserasi selama 24 jam dan 48 jam ditampilkan pada Tabel 8 berikut :

Tabel 8. Hasil Absorbansi Ekstrak Polifenol Setelah Maserasi Selama 24 Jam dan 48 Jam dengan Pelarut Etanol 96%, Etanol 98% dan Akuades.

Jenis Pelarut	Absorbansi Maserasi Selama 24 Jam	Absorbansi Maserasi Selama 48 Jam
Etanol 98%	0,007 mg/l	0,009 mg/l
Etanol 96%	0,015 mg/l	0,024 mg/l
Akuades	0,000 mg/l	0,000 mg/l

Pada Tabel 8 menunjukkan hasil pengukuran absorbansi pada jenis pelarut etanol 96% selama 24 jam sebesar 0,015 mg/l, sedangkan pada jenis pelarut etanol 96% selama 48 jam sebesar 0,024 mg/l tersebut, sehingga dapat disimpulkan bahwa pelarut yang menghasilkan absorbansi tertinggi adalah maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Persiapan bahan uji untuk diekstrak yaitu *G. verrucosa* dilakukan dengan membersihkan bahan dari kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian dijemur sampai kering dan dipotong hingga ukuran yang sangat kecil, selanjutnya bahan

tersebut dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 2 hari dengan perbandingan 1 : 3. Setelah proses maserasi, langkah berikutnya adalah melakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan ekstrak polifenol. Baru kemudian ekstrak polifenol diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak fenol, untuk mendapatkan ekstrak fenol dalam bentuk padat, maka bahan harus dikeringkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C sampai kadar air benar-benar berkurang.

4.2 Jumlah Sel Makrofag

Hasil pengamatan selama penelitian menggunakan ekstrak rumput laut *G. verrucosa* sebagai immunostimulan dengan dosis 0 ppt, 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt sebelum dan sesudah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* memberikan hasil jumlah sel makrofag ikan mas yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Jumlah Rata-rata Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Penelitian Pra Infeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
K (0 ppt)	1	1,75	1,5	4,25	1,42
A (1 ppt)	1,5	2	2,5	6	2
B (1,5 ppt)	2	2,25	2,75	7	2,33
C (2 ppt)	2,75	2,5	3	8,25	2,75

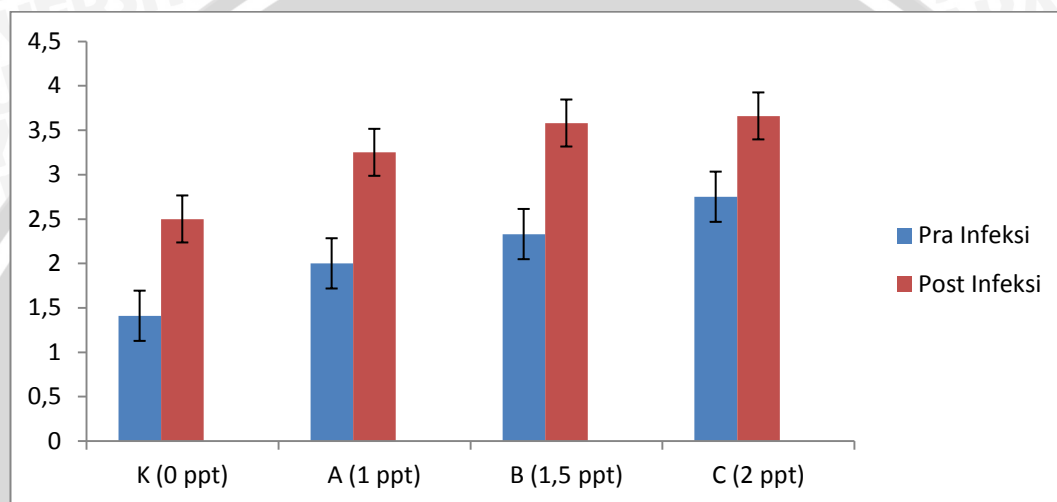
Post Infeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
K (0 ppt)	2,25	2,5	2,75	7,5	2,5
A (1 ppt)	3	3,5	3,25	9,75	3,25
B (1,5 ppt)	3,25	3,75	3,75	10,75	3,58
C (2 ppt)	3,75	3,5	3,75	11	3,67

Berdasarkan Tabel 9 di atas menunjukkan bahwa hasil penelitian dengan pemberian ekstrak *G. verrucosa* sebagai immunostimulan pada ikan mas melalui pengamatan makrofag menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel makrofag sebelum dan sesudah uji tantang menggunakan bakteri *A. hydrophila*. Hal ini

menunjukkan bahwa ekstrak *G. verrucosa* tersebut berpengaruh terhadap sistem kekebalan tubuh ikan mas. Pernyataan ini didukung oleh pendapat Sakai (1999) bahwa ikan yang diberi perlakuan dengan immunostimulan akan meningkatkan jumlah makrofag sehingga meningkatkan eliminasi terhadap patogen.

Berikut histogram jumlah sel makrofag sebelum dan sesudah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* kepadatan 10^7 sel/ml dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Histogram Makrofag Sebelum dan Sesudah Uji Tantang dengan Bakteri *A. hydrophila* dengan Kepadatan 10^7 sel/ml.

Pada Gambar 7 di atas dapat terlihat bahwa semakin tinggi dosis ekstrak *G. verrucosa* yang diberikan, maka semakin banyak pula jumlah sel makrofagnya. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan sebagai immunostimulan semakin besar pula peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan.

Secombes *et al.* (1982) menyatakan bahwa peningkatan kekebalan tubuh ikan mas ditunjukkan dengan peningkatan jumlah makrofag. Pada penelitian ini, makrofag yang diamati adalah makrofag pada ginjal bagian anterior. Ginjal sangat penting dalam pembekuan darah dan imunitas pada ikan, pada tahap pertumbuhan awal ginjal secara keseluruhan berkembang memproduksi sel-sel imun dan merupakan awal proses tanggap kebal tubuh ikan. Darah mengalir ke ginjal dengan lambat untuk mengenalkan antigen, hal ini menyebabkan

bertambahnya konsentrasi sel-sel imun meningkat pada ginjal bagian anterior. Sel-sel imun yang dimaksud adalah makrofag, limfosit dan plasma sel. Sel-sel tersebut berperan dalam penangkapan antigen dan menjalankan fungsi imun spesifik yang mempunyai memori.

Gasperz (1991) menyebutkan bahwa transformasi dalam bentuk logaritma (log) diharapkan memberikan kestabilan ragam sehingga proses pengujian dapat mendekati kestabilan. Untuk nilai data yang sangat besar perlu ditransformasikan dalam bentuk log agar data dapat menjadi homogen. Setelah ditransformasikan dalam bentuk log, data hasil perhitungan jumlah makrofag tersebut dimasukkan dalam uji sidik ragam. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* pada derajat kepercayaan 95%. Hasil uji sidik ragam jumlah sel makrofag ikan mas dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Analisis Sidik Ragam Jumlah Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Penelitian.

Pra infeksi					
	JK	Db	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	0,147	3	0,049	5,694	0,022*
Acak	0,069	8	0,009		
Total	0,215	11			
Post infeksi					
	JK	Db	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	0,050	3	0,017	15,165	0,001**
Acak	0,009	8	0,001		
Total	0,059	11			

Keterangan: Sig. <0,05 berbeda nyata, sig. <0,01 berbeda sangat nyata

Tabel 10 menunjukkan bahwa sel makrofag pra infeksi berbeda nyata, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *G. verrucosa* sebagai immunostimulan pada ikan mas berpengaruh nyata terhadap jumlah sel makrofag ikan mas. Sedangkan sel makrofag post infeksi berbeda sangat nyata, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak immunostimulan *G. verrucosa* pada ikan mas setelah uji tantang memberikan pengaruh sangat nyata

terhadap jumlah sel makrofag. Selanjutnya dilanjutkan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Hasil uji Tukey sel makrofag ikan mas pra infeksi dan post infeksi dapat dilihat pada Tabel 11.

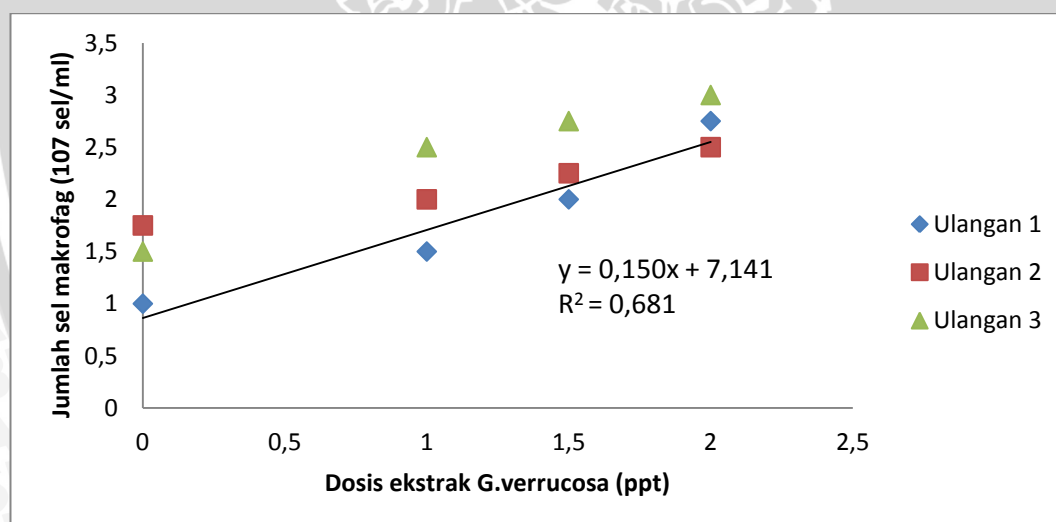
Tabel 11. Uji Tukey Jumlah Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Pra Infeksi dan Post Infeksi

Pra Infeksi				
Perlakuan	N	1	2	Notasi
K (0 ppt)	3	7,1400	-	a
A (1 ppt)	3	7,2933	7,2933	ab
B (1,5 ppt)	3	7,3633	7,3633	ab
C (2 ppt)	3	-	7,4400	b
Sig.		0,071	0,286	
Post Infeksi				
Perlakuan	N	1	2	Notasi
K (0 ppt)	3	7,3967	-	a
A (1 ppt)	3	-	7,5100	b
B (1,5 ppt)	3	-	7,5500	b
C (2 ppt)	3	-	7,5600	b
Sig.		1,000	0,324	

Berdasarkan notasi pada uji tukey sel makrofag pra infeksi di atas dapat diketahui bahwa perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan A dan B, begitu pula perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan A dan B. Akan tetapi perlakuan C berbeda sangat nyata dengan perlakuan K. Pada uji tukey sel makrofag post infeksi dapat diketahui bahwa perlakuan K berbeda nyata dengan ketiga perlakuan yaitu A, B dan C. Akan tetapi perlakuan A, B dan C tidak berbeda nyata satu dengan lainnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa berdasarkan efisiensi penggunaan immunostimulan ekstrak fenol terbaik menggunakan dosis A (1ppt).

Pada Tabel 9 di atas menunjukkan bahwa hasil tertinggi dalam penelitian ini adalah perlakuan C (2 ppt) dengan peningkatan jumlah sel makrofag dari

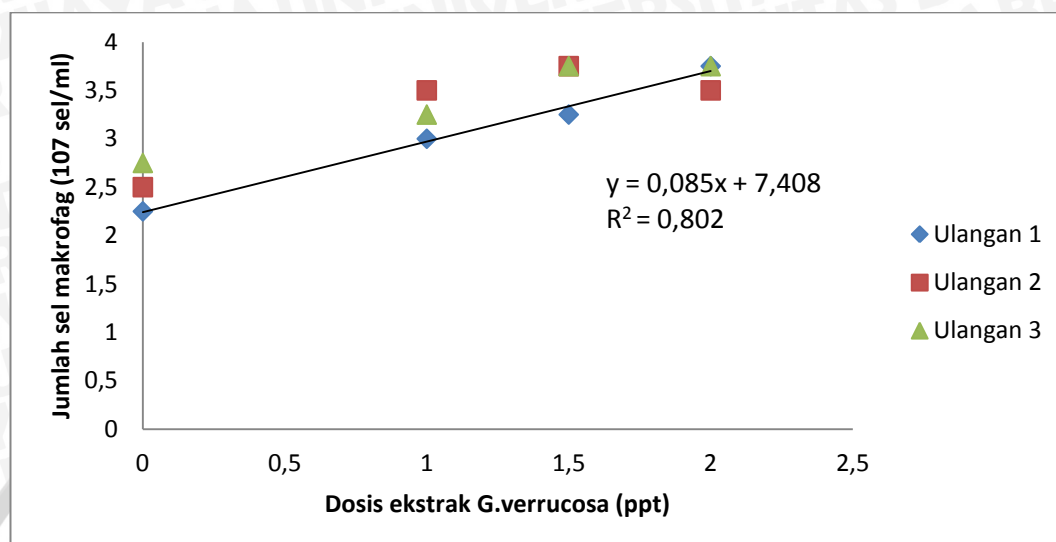
($2,75 \times 10^7$ sel/ml menjadi $3,67 \times 10^7$ sel/ml) kemudian diikuti perlakuan B (1,5 ppt) dengan peningkatan jumlah sel makrofag dari ($2,33 \times 10^7$ sel/ml menjadi $3,58 \times 10^7$ sel/ml) dan perlakuan A (1 ppt) mengalami peningkatan dari (2×10^7 sel/ml menjadi $3,25 \times 10^7$ sel/ml). Pada kontrol dengan perlakuan K (0 ppt) jumlah sel makrofag mengalami peningkatan paling rendah yaitu ($1,42 \times 10^7$ sel/ml menjadi $2,5 \times 10^7$ sel/ml). Pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian Samad (2010) bahwa pemberian senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) pada ikan mas yang diinfeksi bakteri *A.hydrophila* mampu meningkatkan jumlah sel makrofag sebesar $2,01 \times 10^7$ sel/ml – $2,78 \times 10^7$ sel/ml sebelum ujiantang dan $2,45 \times 10^7$ sel/ml – $3,92 \times 10^7$ sel/ml setelah ujiantang. Berikut grafik hubungan pemberian ekstrak *G. verrucosa* terhadap jumlah sel makrofag ikan mas pra infeksi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak *G. verrucosa* Terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Mas Pra Infeksi.

Berdasarkan Gambar 8 menunjukkan bahwa grafik berbentuk linier dengan persamaan $y = 0,150x + 7,141$ dengan $R^2 = 0,681$. Hal ini berarti jumlah sel makrofag meningkat seiring bertambahnya dosis imunostimulan yang diberikan. Untuk perhitungan lengkap jumlah sel makrofag pra infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 10. Sedangkan grafik hubungan

pemberian ekstrak *G. verrucosa* terhadap jumlah sel makrofag ikan mas post infeksi dapat dilihat pada Gambar 9 berikut ini.

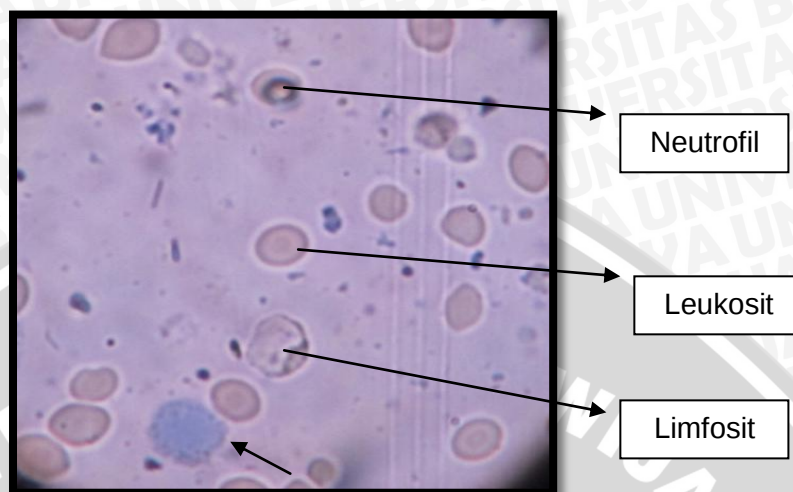


Gambar 9. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak *G. verrucosa* Terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Mas Post Infeksi.

Gambar 9 menunjukkan bahwa grafik berbentuk linier dengan persamaan $y = 0,085x + 7,408$ dan $R^2 = 0,802$. Hal ini berarti jumlah sel makrofag akan meningkat seiring bertambahnya dosis ekstrak *G. verrucosa* yang diberikan sebagai immunostimulan pada ikan mas. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis tertinggi ekstrak *G. verrucosa* sebagai immunostimulan yang dapat meningkatkan jumlah sel makrofag pada penelitian ini yaitu dosis C (2 ppt). Untuk perhitungan lengkap jumlah sel makrofag post infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 11.

Norum *et al.* (2005), mengatakan bahwa sel makrofag dapat meningkat disebabkan adanya jaringan yang rusak akibat aktivitas bakteri, dimana bakteri tersebut akan mengeluarkan zat-zat kimia yang dapat mendatangkan lebih banyak makrofag dan bakteri itu sendiri seperti endotoksin (lipoposakarida) juga dapat mengaktifkan makrofag. Selain itu, makrofag memiliki sifat seperti halnya sel fagosit yang lain, yaitu mempunyai sifat melindungi yang dilakukan oleh sel

fagosit terhadap adanya infeksi bahan asing atau mikroorganisme. Gambar sel makrofag dapat dilihat pada Gambar 10 sebagai berikut :



Gambar 10. Pengamatan Jumlah Makrofag pada Ikan Mas (*C. carpio*) dengan Pembesaran 400x (↗).

Makrofag merupakan sel monosit (*mononuclear*) yang bermigrasi ke jaringan. Ketika menjadi makrofag, sitoplasma monosit membesar. Makrofag dapat hidup lama, mempunyai beberapa granul dan melepaskan berbagai bahan antara lain lisozim, komplemen, interferon, dan sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan non-spesifik (Bratawijaya, 2004).

Menurut Kennedy dan Stoskopf (1993) dalam Andayani (2007), makrofag mengeluarkan interleukin untuk merangsang sel T berpoliferasi dan membentuk limfokin, kemudian akan menarik makrofag lebih banyak menuju tempatnya. Makrofag yang didatangkan adalah makrofag yang beredar di aliran darah dalam bentuk monosit yang mengalami pematangan dalam perjalanannya menuju luka.

4.3 Aktivitas Fagositosis Makrofag

Hasil pengamatan yang dilakukan selama penelitian menggunakan ekstrak rumput laut *G. verrucosa* sebagai immunostimulan dengan dosis A (1 ppt), B (1,5 ppt), C (2 ppt) dan K (ikan kontrol) sebelum dan sesudah uji tantang dengan

bakteri *A. hydrophilla* memberikan hasil persentase aktivitas fagositosis ikan mas yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Rata-rata Aktivitas Fagositosis (%) Ikan Mas
Pra Infeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
K (0 ppt)	29,49	30,12	30,68	90,29	30,10
A (1 ppt)	34,15	37,65	35,48	107,28	35,76
B (1,5 ppt)	34,48	39,77	37,11	111,37	37,12
C (2 ppt)	36,56	38,54	39,80	114,90	38,30

Post Infeksi

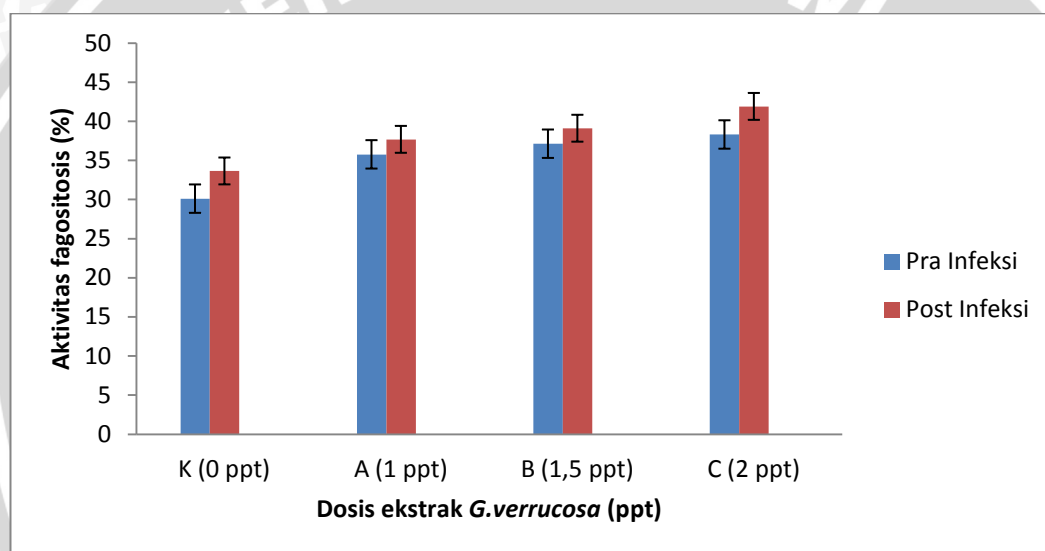
Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
K (0 ppt)	31,33	32,94	36,67	100,93	33,64
A (1 ppt)	36,90	38,64	37,50	113,04	37,68
B (1,5 ppt)	37,78	38,71	40,82	117,30	39,10
C (2 ppt)	40,86	41,67	43,14	125,66	41,89

Untuk perhitungan lengkap aktivitas fagositosis makrofag pra infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 12. Sedangkan untuk perhitungan lengkap aktivitas fagositosis makrofag post infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 13.

Berdasarkan Tabel 12 dapat dilihat bahwa persentase aktivitas fagositosis ikan mas yang telah diberi immunostimulan berupa ekstrak *G. verrucosa* setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophilla* (post infeksi) mengalami peningkatan dibanding sebelum uji tantang (pra infeksi). Hasil yang diperoleh tersebut dikarenakan pemberian ekstrak *G. verrucosa* sebagai immunostimulan berpengaruh terhadap sistem kekebalan tubuh ikan mas yang ditunjukkan dengan meningkatnya aktivitas sel fagosit. Hal ini didukung pernyataan Sakai (1999) bahwa ikan yang diberi perlakuan menggunakan immunostimulan dapat meningkatkan aktivitas sel fagosit. Aktivitas sel fagosit dapat diketahui melalui aktivitas fagositosis, *killing* maupun kemotaksis. Peningkatan pembunuhan patogen sangat penting bagi makrofag pada ikan yang diberi immunostimulan.

Abbas dan Litchman (2005) menambahkan, kenaikan aktivitas fagisitosis disebabkan makrofag selain diakibatkan oleh interaksi langsung dengan agen penginvasi seperti mikroorganisme, dapat juga diaktifkan lewat rangsangan berupa bahan aktif ekstrak, salah satunya ekstrak dari *G. verrucosa*.

Histogram peningkatan persentase aktivitas fagositosis ikan mas yang diberi immunostimulan ekstrak *G. verrucosa* sebelum dan sesudah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml dapat dilihat pada Gambar 11 sebagai berikut :



Gambar 11. Histogram Aktivitas Fagositosis Sebelum dan Sesudah Uji Tantang dengan Bakteri *A. hydrophila* dengan Kepadatan 10^7 sel/ml.

Pada Gambar 11 di atas dapat terlihat bahwa persentase aktivitas fagositosis meningkat seiring bertambahnya dosis ekstrak yang diberikan. Persentase aktivitas fagositosis tertinggi yaitu pada perlakuan C dengan dosis 2 ppt. Akan tetapi peningkatan yang terlihat tidak terlalu jauh antara sebelum dan sesudah uji tantang. Samad (2010) menyatakan pemberian senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) pada ikan mas yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sebesar 36,51 – 46,34% sebelum uji tantang dan 45,51 – 58,89% setelah uji tantang.

Menurut Abbas *et al.* (2012), peningkatan aktivitas fagositosis makrofag selain diakibatkan oleh interaksi langsung dengan agen penginfeksi seperti mikroorganisme, dapat juga diaktifkan oleh produk limfosit (limfokin) yang dirangsang oleh antigen atau bahan aktif ekstrak *G. verrucosa*. Sekali sel makrofag diaktifkan maka akan menunjukkan aktivitas metabolitnya dan peningkatan fungsi yaitu untuk memfagositosis dan membunuh kuman serta memproses kuman tersebut.

Proses fagositosis terjadi diawali dengan adanya kontak antara bakteri atau partikel dengan permukaan sel fagosit (makrofag). Agar terjadi fagositosis, sel-sel fagosit tersebut harus berjarak dekat dengan mikroorganisme tersebut dapat melekat pada permukaan sel fagosit. Untuk mencapai hal ini, maka sel fagosit harus bergerak menuju sasaran yang dibantu oleh mediator yang disebut kemotaktik yang diproduksi oleh bakteri (Darwin, 2006).

Penghitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* pada derajat kepercayaan 95%. Hasil uji sidik ragam persentase aktivitas fagositosis ikan mas dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Analisis Sidik Ragam Persentase Aktivitas Fagositosis (%) Selama Penelitian.

Pra infeksi					
	JK	Db	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	118,792	3	39,597	12,054	0,002**
Acak	26,279	8	3,285		
Total	145,070	11			
Post infeksi					
	JK	Db	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	106,133	3	35,378	11,747	0,003**
Acak	24,094	8	3,012		
Total	130,227	11			

Keterangan: sig. <0,01 sangat berbeda nyata

Analisis sidik ragam persentase aktivitas fagositosis pra infeksi di atas dapat diketahui sig. < 0,01 yang berarti bahwa pemberian ekstrak *G. verrucosa*

sebagai immunostimulan pada ikan mas berbeda sangat nyata terhadap persentase aktivitas fagositosis ikan mas. Persentase aktivitas fagositosis post infeksi juga didapatkan sig. $< 0,01$ yang berarti bahwa pemberian ekstrak *G. verrucosa* berbeda sangat nyata terhadap persentase aktivitas fagositosis ikan mas setelah ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya dilanjutkan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Hasil uji Tukey persentase aktivitas fagositosis pada ikan mas pra infeksi dan post infeksi dapat dilihat pada Tabel 14.

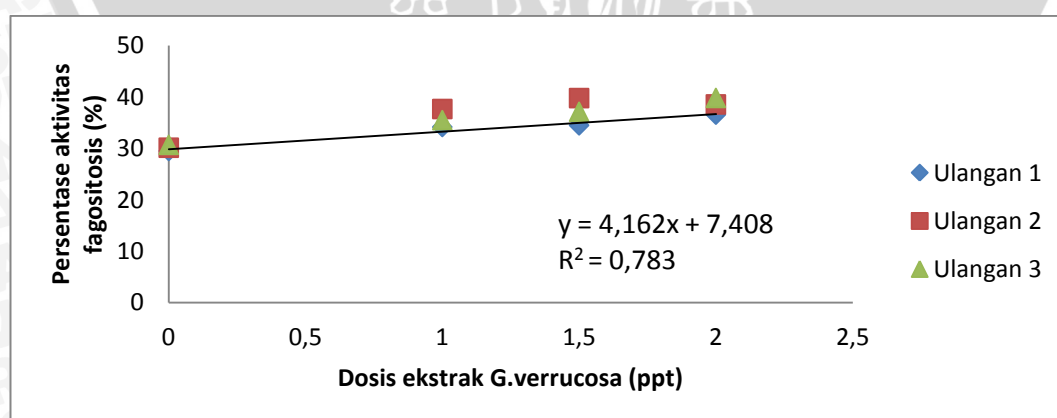
Tabel 14. Uji Tukey Persentase Aktivitas Fagositosis (%) Pra Infeksi dan Post Infeksi.

Pra Infeksi				
Perlakuan	N	1	2	Notasi
K (0 ppt)	3	30,0967	-	a
A (1 ppt)	3	-	35,7600	b
B (1,5 ppt)	3	-	37,1200	b
C (2 ppt)	3	-	38,3000	b
Sig.		1,000	0,376	
Post Infeksi				
Perlakuan	N	1	2	Notasi
K (0 ppt)	3	33,6467	-	a
A (1 ppt)	3	37,6800	37,6800	ab
B (1,5 ppt)	3	-	39,1033	b
C (2 ppt)	3	-	41,8900	b
Sig.		0,083	0,069	

Berdasarkan notasi uji tukey di atas dapat diketahui bahwa persentase aktivitas fagositosis pra infeksi perlakuan K berbeda nyata dengan ketiga perlakuan lainnya yaitu A, B dan C. Sedangkan perlakuan A, B dan C tidak berbeda nyata satu dengan lainnya. Uji tukey persentase aktivitas fagositosis post infeksi perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan A, akan tetapi berbeda nyata dengan perlakuan B dan C. Sedangkan perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

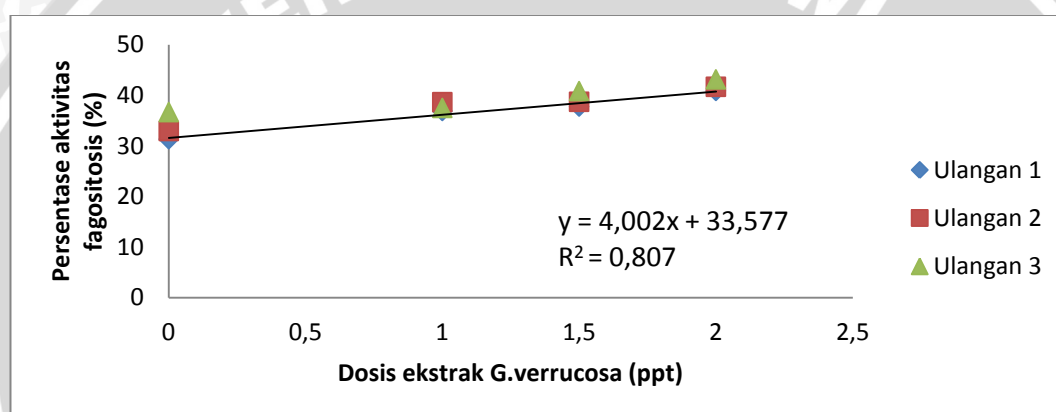
Pada Tabel 12 di atas dapat diketahui bahwa peningkatan persentase aktivitas fagositosis tertinggi yaitu pada perlakuan C dengan dosis 2 ppt yaitu (38,30% menjadi 41,89%), diikuti dengan perlakuan B dengan dosis 1,5 ppt yaitu (37,12% menjadi 39,10%) dan perlakuan A dengan dosis 1 ppt yaitu (35,76% menjadi 37,68%). Peningkatan persentase aktivitas fagositosis terendah yaitu pada perlakuan K atau kontrol dengan dosis 0 ppt yaitu (30,10% menjadi 33,64%). Perbedaan hasil tersebut dikarenakan oleh perbedaan dosis ekstrak yang diberikan selama penelitian. Hendriawan (2009) menyatakan pemberian ekstrak *Sargassum polycystum* pada ikan patin (*Pangasius pangasius*) dengan ujiantang bakteri *A. hydrophila* mampu memberikan peningkatan aktivitas fagositosis sebesar 3,50 - 11,57% sebelum infeksi dan meningkat menjadi 7,98 - 18,78% setelah proses penginfeksian. Aktivitas fagositosis oleh makrofag ginjal ikan mas sebelum dan sesudah infeksi terdapat perbedaan yang signifikan.

Efektivitas penggunaan imunostimulan, waktu dan dosis serta metode pemberian serta kondisi fisiologi ikan saling berhubungan (Sahan dan Duman, 2010 dalam Samad, 2010). Berikut merupakan grafik hubungan pemberian ekstrak *G. verrucosa* terhadap jumlah presentase aktivitas fagositosis ikan mas pra infeksi dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak *G. verrucosa* Terhadap Jumlah Persentase Aktivitas Fagositosis Ikan Mas Pra Infeksi.

Berdasarkan Gambar 12 menunjukkan bahwa grafik berbentuk linier dengan persamaan $y = 4,162x + 7,408$ dengan $R^2 = 0,783$. Hal ini berarti persentase aktivitas fagositosis meningkat seiring bertambahnya dosis immunostimulan yang diberikan. Untuk perhitungan lengkap aktivitas fagositosis makrofag pra infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 12. Sedangkan grafik hubungan pemberian ekstrak *G. verrucosa* terhadap presentase aktivitas fagositosis ikan mas post infeksi dapat dilihat pada Gambar 13.

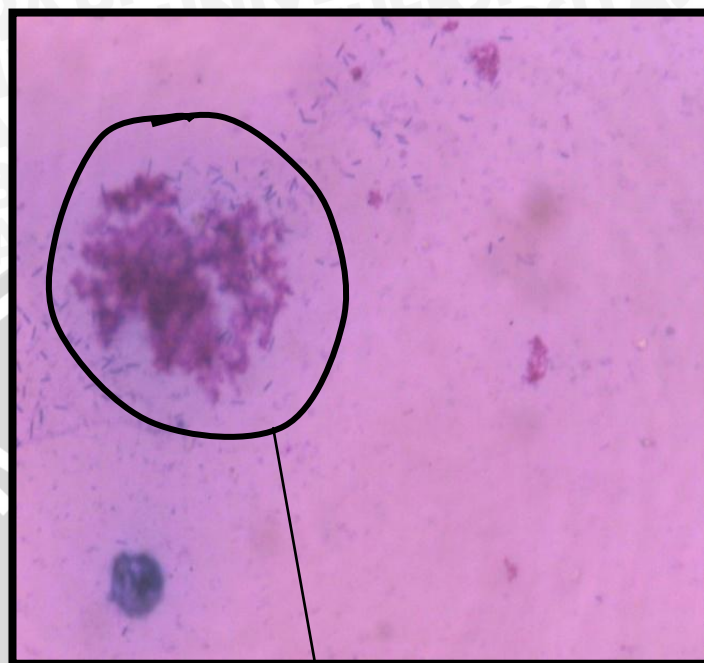


Gambar 13. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak *G. verrucosa* Terhadap Jumlah Persentase Aktivitas Fagositosis Ikan Mas Post Infeksi.

Berdasarkan Gambar 13 menunjukkan bahwa grafik berbentuk linier dengan persamaan $y = 4,002x + 33,577$ dengan $R^2 = 0,807$. Hal ini berarti persentase aktivitas fagositosis meningkat seiring bertambahnya dosis immunostimulan yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa dosis tertinggi dalam penelitian ini yang dapat meningkatkan persentase fagositosis yaitu pada perlakuan C dengan dosis 2 ppt. Menurut Jian dan Wu (2004), respon imun non-spesifik seperti fagositosis dan produksi radikal oksidatif secara cepat distimulasi oleh immunostimulan dan melindungi ikan dari serangan patogen ikan. Untuk perhitungan lengkap aktivitas fagositosis makrofag post infeksi bakteri *A. hydrophilla* dapat dilihat pada Lampiran 13.

Berikut gambar pengamatan aktivitas fagositosis yang dapat dilihat pada

Gambar 14.



Aktivitas Fagositosis

Gambar 14. Pengamatan Aktivitas Fagositosis pada Ikan Mas (*C. carpio*) dengan perbesaran 1000x (↗).

4.4 Gejala Patologi Klinis Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Selain jumlah sel makrofag dan aktifitas fagositosis makrofag, faktor gejala klinis juga perlu dilakukan untuk mengetahui perubahan sistem kekebalan tubuh (sistem imun) pada ikan mas yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Pengukuran gejala klinis dilakukan selama masa penginfeksi dan 3 hari setelah ikan uji diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Pengamatan gejala klinis bisa dilihat dari pergerakan ikan, ciri-ciri morfologis ikan, kerusakan-kerusakan yang terjadi pada tubuh ikan maupun kondisi dari air sebagai media pemeliharaan ikan. Pengamatan gejala klinis pada ikan uji dengan kepadatan bakteri 10^7 selama 3 hari ditampilkan pada Tabel 15 berikut :

Tabel 15. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Tanpa Perlakuan dan Ikan Perlakuan Setelah Uji Tantang Menggunakan Bakteri *A. hydrophila* Kepadatan 10^7 sel/ml.

Hari	Gejala Klinis	
	Ikan Tanpa Perlakuan	Ikan Perlakuan
1	• Gerakan ikan agresif dan berenang ke permukaan. • Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh ikan.	• Gerakan ikan cenderung tenang dan menyebar. • Belum ditemukan kerusakan fisik pada bagian tubuh ikan. • Media pemeliharaan tidak keruh.
2	• Gerakan ikan melambat dan sebagian besar berada di dasar. • Pada bagian dorsal mengalami pembengkakan. • Media pemeliharaan keruh.	• Gerakan ikan relatif tenang dan banyak berkumpul di permukaan. • Media pemeliharaan sedikit keruh. • Bagian dorsal mengalami memar.
3	• Gerakan ikan lambat, pada beberapa ikan mengalami kematian. • Media air keruh dan berbusa pada bagian permukaan.	• Gerakan ikan melambat dan cenderung berada di dasar. • Bagian dorsal mengalami memar. • Media pemeliharaan mulai keruh.

Hasil gejala klinis yang disajikan pada tabel diatas dapat disimpulkan bahwa pada ikan perlakuan lebih baik dibandingkan pada ikan tanpa perlakuan. Hal ini dapat dilihat terutama pada hari ketiga setelah uji tantang, ikan perlakuan hanya mengalami memar pada bagian dorsal. Sedangkan pada ikan tanpa perlakuan gerakan ikan melambat dan beberapa ikan mengalami kematian. Taukhid *et al.* (2004) menunjukkan beberapa gejala-gejala yang timbul pada genus *Cyprinus* khususnya pada ikan mas dan koi yang terinfeksi bakteri adalah sebagai berikut:

1. Produksi lendir (mukus) berlebih, hal tersebut diindikasikan sebagai respon fisiologis terhadap kehadiran patogen, selanjutnya produksi lendir menurun drastis sehingga kulit ikan terasa kasar.
2. Insang berwarna pucat dan terdapat bercak putih atau coklat (sebenarnya adalah kematian sel-sel insang atau nekrosa insang), selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tapis insang dan akhirnya membusuk.

3. Kulit ikan melepuh.
4. Ginjal (anterior dan posterior) berwarna pucat.

4.5 Kualitas Air

Kualitas air selama masa pemeliharaan berlangsung merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan karena kualitas air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 16 dan Lampiran 14.

Tabel 16. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

No.	Parameter Kualitas Air	Kisaran Parameter Kualitas Air pada Perlakuan	Partosuwiryo dan Warseno (2011)
1.	Suhu	25,4-26,6 ⁰ C	25-30 ⁰ C
2.	pH	7,63-7,79	6,7-8,2
3.	Oksigen Terlarut	5,64-6,39 ppm	>5 ppm

Berdasarkan hasil parameter kualitas air di atas (Tabel 16) menunjukkan bahwa air sebagai media pemeliharaan ikan mas masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologisnya. Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), keberhasilan dalam budidaya ikan mas salah satunya yaitu dipengaruhi oleh kualitas air. Pada lokasi harus terdapat sumber air yang memenuhi syarat, baik kualitas maupun kuantitas (debit) air.

Mantau dan Sudarty (2011) menambahkan, ikan mas hidup dan berkembangbiak pada daerah dengan ketinggian 50-600 meter di atas permukaan laut. Suhu air yang baik untuk pemeliharaan dan pertumbuhan ikan ini berkisar 20-30⁰ C, pH 7-8 dan kandungan oksigen terlarut lebih besar dari 5 ppm.