

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR *Gracilaria verrucosa* DENGAN
DOSIS YANG BERBEDA TERHADAP HEMATOLOGI IKAN MAS (*Cyprinus
carpio*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :
VERYL HASAN
NIM. 0910850039

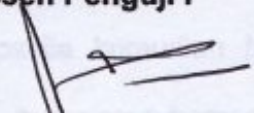


**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR *Gracilaria verrucosa* DENGAN DOSIS YANG BERBEDA TERHADAP HEMATOLOGI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh :
V ERYL HASAN
NIM. 0910850039

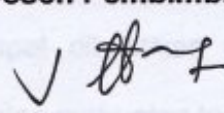
Dosen Penguji I



(Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS)
NIP. 1960042511985031002

Tanggal: 19 AUG 2013

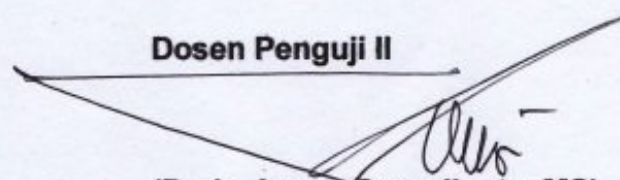
Dosen Pembimbing I



(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)
NIP. 19611061986022001

Tanggal: 19 AUG 2013

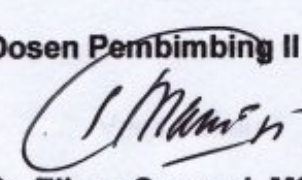
Dosen Penguji II



(Dr. Ir. Agoes Soeprijanto, MS)
NIP. 195908071986011001

Tanggal: 19 AUG 2013

Dosen Pembimbing II



(Ir. Ellana Sanoesi, MS)
NIP. 196309241998032002

Tanggal: 19 AUG 2013



(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 196003221986011001

19 AUG 2013

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 Juli 2013

Mahasiswa

Veryl Hasan



RINGKASAN

Veryl Hasan. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar *Gracilaria verrucosa* Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Hematologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Ir. Ellana Sanoesi, MP**

Dalam kegiatan budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) faktor lingkungan memegang peranan penting dalam keberhasilan produksi. Semakin intensifnya kegiatan budidaya maka penurunan mutu lingkungan mengakibatkan serangan bakteri patogen. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan kerugian besar bagi pembudidaya ikan mas adalah bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Salah satu solusi permasalahan tersebut adalah dengan pemberian senyawa bioaktif berbahan alami untuk meningkatkan sistem imun ikan sehingga tidak menyebabkan residu dan resistensi bakteri patogen. Bahan alami yang dapat digunakan sebagai imunostimulan adalah *Gracilaria verrucosa* atau rumput laut merah dimana didalamnya terkandung senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai imunostimulan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemanfaatan ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan cara perendaman pada dosis yang berbeda dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan mas melalui paramter hematologi (total leukosit, total eritrosit dan diferensial leukosit) sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi bakteri *A. Hydrophila* dan berapakah dosis ekstrak kasar *G. verrucosa* terbaik yang dapat meningkatkan sistem umun pada ikan mas sebelum infeksi dan sesudah infeksi.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratoruim Reproduksi, Pembenihan dan Pemuliaan ikan dan Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 27 Desember 2012 sampai 23 Maret 2013.

Metode yang digunakan yaitu metode eksperimen dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah dengan perendaman sebesar 1 ppt, 1,5 ppt, 2 ppt dan kontrol 0 ppt. Parameter utama yang diamati yaitu jumlah leukosit (sel/ml), jumlah eritrosit (sel/ml) dan diferensial leukosit (%) serta parameter penunjang yaitu gejala klinis dan kualitas air meliputi: suhu, oksigen terlarut (DO) dan derajat keasaman (pH).

Berdasarkan hasil penelitian untuk meningkatkan sistem imun ikan mas adalah dengan menggunakan perendaman ekstrak kasar *G. verrucosa* sebesar 1,5 ppt. Hal ini dapat diamati melalui paramter hematologi diantaranya peningkatan jumlah rata-rata leukosit ikan mas dari sebelum diinfeksi sebesar $34,50 \times 10^3$ sel/ml dan sesudah diinfeksi sebesar $36,56 \times 10^3$ sel/ml. Presentase monosit sebelum diinfeksi adalah 12,33% dan sesudah diinfeksi adalah 15,33%. Presentase neutrofil sebelum diinfeksi adalah 18% dan sesudah diinfeksi adalah 21,67%. Hasil pengamatan gejala klinis menunjukkan sesudah infeksi ikan mas mengalami pendarahan dan pembengkakan pada bagian tubuh dan disertai kematian pada ikan kontrol. Data kualitas air selama pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata kualitas air berada pada kisaran normal diantaranya suhu berkisar antara 25-26 °C, DO berkisar antara 5,64-6,39 ml/l dan pH berkisar antara 7,63-7,79.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Perkembangbiakan	7
2.1.4 Makanan dan Kebiasaan Makan	8
2.2 Alga Merah <i>Gracilaria verrucosa</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.2.2 Habitat dan Penyebaran	9
2.2.3 Manfaat dan Kegunaan	10
2.2.4 Bahan Aktif <i>Glacilaria verrucosa</i>	11
2.3 Ekstraksi Kasar <i>Gracilaria verrucosa</i>	11
2.4 Bakteri <i>Aeromonas hydrophilla</i>	12
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi	13
2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	13
2.4.3 Patogenitas Bakteri <i>A. hydrophilla</i>	14
2.4.4 Infeksi Bakteri <i>A. hydrophilla</i>	14
2.5 Hematologi	15
2.5.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)	15
2.5.2 Sel Darah Putih (Leukosit)	16
2.5.3 Limfosit	17
2.5.4 Monosit	18

2.5.4 Neutrofil	19
2.6 Kualitas Air	20
2.6.1 Suhu	20
2.6.2 pH	21
2.6.3 Oksigen Terlarut	21
3. METODOLOGI	22
3.1 Materi Penelitian	22
3.1.1 Peralatan Penelitian	22
3.1.2 Bahan Penelitian	22
3.1.2 Media Penelitian	22
3.1.4 Pembuatan Ekstrak Fenol <i>Gracilaria verrucosa</i>	22
3.2 Metode Penelitian	22
3.3 Rancangan Penelitian	24
3.4 Prosedur Penelitian	26
3.4.1 Persiapan Penelitian	26
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian	26
3.5 Parameter Uji	30
3.5.1 Parameter Utama	30
3.5.2 Parameter Penunjang	30
3.6 Analisis Data	30
4. PEMBAHASAN	31
4.1 Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	31
4.2 Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	35
4.3 Deferensial Leukosit Ikan Mas Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	38
4.3.1 Monosit	38
4.3.2 Limfosit	42
4.3.3 Neutrofil	46
4.4 Gejala Klinis Ikan Mas Yang Diinfeksi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	50
4.5 Kualitas Air	52
5. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
2. Alga Merah <i>Gracilaria Verrucosa</i>	9
3. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
4. Pembentukan Eritrosit.....	16
5. Pembentukan Leukosit	17
6. Pembentukan Limfosit	18
7. Pembentukan Monosit	19
8. Pembentukan Neutrofil	19
9. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
10. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosam</i> Terhadap Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	34
11. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	36
12. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucos</i> Terhadap Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	38
13. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhada Monosit kan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	40
14. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Monosit kan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	42
15. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Limfosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	44
16. Grfafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Limfosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	46
17. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Neutrofil Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	48
18. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i> Terhadap Neutrofil Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Perlakuan Uji Ekstrak Kasar <i>Gracilaria verrucosa</i> Secara <i>In Vivo</i>	24
2. Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas ($\times 10^3$ sel/ml) Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	31
3. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	31
4. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
5. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	33
6. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	33
7. Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas ($\times 10^5$ sel/ml) Sebelum Dan Sesudah diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	35
8. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	35
9. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	36
10. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	37
11. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	37
12. Presentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	39
13. Sidik Ragam Presentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	39
14. Uji Tukey Presentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	39
15. Sidik Ragam Presentase Monosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	41
16. Uji Tukey Presentase Monosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi	

Bakteri <i>A. hydrophila</i>	41
17. Presentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	43
18. Sidik Ragam Presentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	43
19. Uji Tukey Presentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	43
20. Sidik Ragam Presentase Limfosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	45
21. Uji Tukey Presentase Limfosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	45
22. Presentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	47
23. Sidik Ragam Presentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	47
24. Uji Tukey Presentase neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	47
25. Sidik Ragam Presentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	49
26. Uji Tukey Presentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	49
27. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Uji Yang Diinfeksi Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	51
28. Parameter Kualitas Air Selama Penelitian	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Dan Bahan Penelitian	60
2. Pembuatan Ekstrak Kasar <i>Gracilaria verrucosa</i>	62
3. Perendaman Ikan Mas Dengan Ekstrak Kasar <i>Gracilaria verrucosa</i> Dan Uji Tantang Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	63
4. Sampel Darah Dan Gambaran Sel Darah Ikan	64
5. Sertifikat Bakteri dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Kemananan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya	65
6. Hasil Uji Perlakuan dengan Total Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	66
7. Hasil Uji Perlakuan dengan Total Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	68
8. Hasil Uji Perlakuan dengan Total Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	70
9. Hasil Uji Perlakuan dengan Total Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	72
10. Hasil Uji Perlakuan Dengan Presentase Monosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	74
11. Hasil Uji Perlakuan Dengan Presentase Monosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	76
12. Hasil Uji Perlakuan dengan Presentase Limfosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	78
13. Hasil Uji Perlakuan dengan Presentase Limfosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	80
14. Hasil Uji Perlakuan dengan Presentase Neutrofil Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	82
15. Hasil Uji Perlakuan dengan Presentase Neutrofil Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Dengan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	84
16. Data Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu ($^{\circ}\text{C}$) pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian	86

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan perikanan budidaya di Indonesia pada saat ini mengalami kemajuan yang sangat pesat. Seiring dengan program nasional untuk mewujudkan Indonesia sebagai penghasil produk kelautan dan perikanan terbesar tahun 2015, maka untuk mencapai sasaran tersebut produksi perikanan budidaya pada tahun 2014 ditargetkan mencapai 16,89 juta ton atau meningkat 353% dibanding produksi tahun 2009 (Aslianti *et al.*, 2010). Hal tersebut tentu menjadi motivasi tersendiri bagi para pembudidaya untuk terus meningkatkan produktivitas budidaya. Berdasarkan data KKP (2012), produksi perikanan budidaya menunjukkan grafik positif berupa kenaikan signifikan sebesar 4,78 juta ton pada 2010 meningkat menjadi 6,97 juta ton pada tahun 2011.

Ikan mas adalah salah satu jenis ikan budidaya air tawar yang banyak dibudidayakan petani baik budidaya pembenihan, pembesaran di kolam ataupun air deras. Sebagai contoh masyarakat daerah Bogor, Sukabumi, Cianjur, Tasikmalaya, Jakarta telah lama mengenal dan melaksanakan kegiatan di kolam sekitar tempat tinggal (Mantau dan Sudarty, 2011). Produksi ikan mas pada tahun 2010 mencapai 374.112 ton. Jumlah ini melampaui target awal sebanyak 267.100 ton. Jumlah produksi ini diharapkan semakin meningkat dari tahun ke tahun (KKP, 2012).

Keberhasilan budidaya ikan mas dipengaruhi oleh beberapa faktor yang sering muncul pada budidaya ikan mas. Salah satu kendala yang perlu mendapat perhatian penting adalah serangan penyakit. Handajani dan Samsundari (2005), menyatakan bahwa penyakit yang sering menyerang ikan salah satunya adalah penyakit parasiter, yaitu hewan atau tumbuhan yang hidup di dalam atau pada tubuh organisme lain, sehingga memperoleh makanan dari

inangnya. Serangan parasit lebih sering mematikan pada ikan muda yang biasanya berukuran kecil karena belum berkembangnya sistem pertahanan tubuh sehingga dapat menghambat produksi. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan kerugian adalah *Aeromonas hydrophila*. Bakteri *A. hydrophila* dapat menimbulkan kerugian besar karena menyebabkan kematian masal. Hal ini terjadi karena kondisi padat tebar yang tinggi, suhu yang tinggi dan kandungan bahan organik yang tinggi dapat menimbulkan stres ikan sehingga daya tahan tubuh ikan menjadi lemah dan mudah terserang penyakit (Samsundari, 2006). *A. hydrophila* umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh disertai dengan pendarahan pada beberapa organ seperti insang, ginjal, otot dan usus yang ada di dalam tubuh ikan. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi yang bisa mengakibatkan kematian benih ikan air tawar sampai 90% (Prajitno, 2007).

Menurut Mariyono dan Sundana (2002), pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik biasanya diberikan melalui pakan, perendaman atau penyuntikan sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan. Penggunaan antibiotik pada saat ini tidak dianjurkan karena dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten. Salah satu alternatif pencegahan dari bakteri patogen yang menyerang ikan yaitu dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan (sistem imun) dengan memberikan senyawa bioaktif berbahan herbal. Menurut Mutdjiutami *et al.*, (2005), senyawa bioaktif yang terdapat pada bahan herbal seperti fenol, alkaloid dan flavonoid mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan.

Salah bahan alami yang dapat digunakan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan adalah rumput laut merah (*Gracilaria verrucosa*). Menurut Simanjutak (1995), kandungan kadar fenolik yang mengandung unsur sulfur merupakan bahan bioaktif alga merah mempunyai zat aktif yang bersifat sebagai

antibakteri. Eahamban dan Marimuthu (2012), berdasarkan uji fitokimia *G. verrucosa* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenol yang dapat digunakan sebagai bahan antibakteri alami pada ikan. Dari hasil penelitian pendahuluan menunjukkan perendaman ekstrak kasar *G. verrucosa* dosis 2 ppt mampu meningkatkan jumlah sel makrofag ikan mas sebelum diinfeksi bakteri *A. hydrophila* sebesar $2,75 \times 10^7$ sel/ml dan sesudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* sebesar $3,67 \times 10^7$ sel/ml.

Parameter yang dapat memperlihatkan perubahan patologi pada ikan adalah melalui pengamatan hematologi yang meliputi jumlah leukosit (sel darah putih), eritrosit (sel darah merah) dan diferensial leuukosit (monosit, limfosit dan neutrofil) (Bijanti, 2005).

1.2 Perumusan Masalah

Infeksi *Aeromonas* pada ikan secara umum dikenal sebagai MAS (*Motile Aeromonas septicaemia*) dengan luka yang meluas pada kulit, nekrosis fokal pada liver, spleen, ginjal dan jaringan lain. Apabila tidak ditangani secara tepat maka dapat menyebabkan kematian masal (Grandiosa, 2010).

Usaha pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan mas pada saat ini masih tertumpu pada penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik memiliki kekurangan yaitu dapat menyebabkan residu di dalam tubuh ikan dan bakteri patogen menjadi resisten. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memanfaatkan senyawa bioaktif dari *G. verrucosa* untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan. Dari hasil penelitian pendahuluan menunjukkan perendaman ekstrak kasar *G. verrucosa* dosis 2 ppt mampu meningkatkan jumlah sel makrofag ikan mas sebelum diinfeksi bakteri *A. hydrophila* sebesar $2,75 \times 10^7$ sel/ml dan sesudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* sebesar $3,67 \times 10^7$ sel/ml. Parameter yang digunakan untuk mengetahui respon patologi ikan mas adalah dengan pengamatan hematologi.

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan sebagai berikut :

Apakah pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan cara perendaman berpengaruh terhadap hematologi (total leukosit, total eritrosit dan diferensial leukosit) ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap hematologi (total leukosit, total eritrosit dan diferensial leukosit) ikan mas.

1.4 Hipotesis

1. H_0 : Pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan dosis yang berbeda diduga tidak mempengaruhi total eritrosit, total leukosit dan diferensial leukosit ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.
2. H_1 : Pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan dosis yang berbeda diduga dapat mempengaruhi total eritrosit, total leukosit, dan diferensial leukosit ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi, Pembenihan dan Pemuliaan ikan dan Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 27 Desember 2012 sampai tanggal 23 Maret 2013.

2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

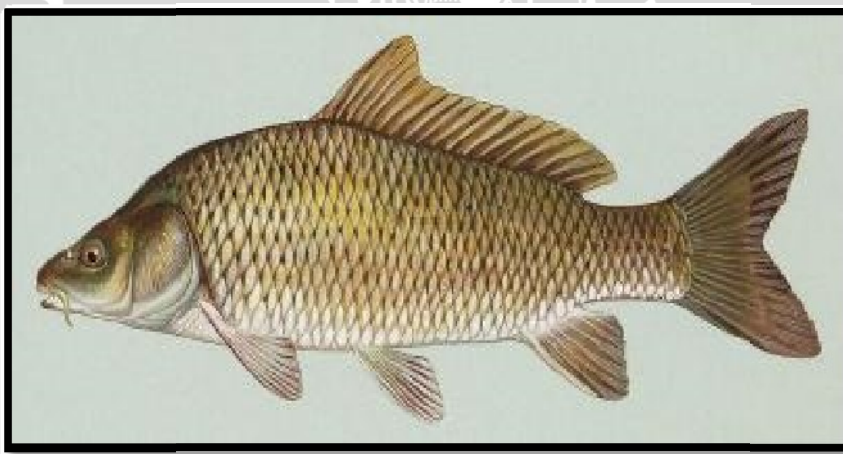
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan mas (*Cyprinus carpio*) menurut Khairuman *et al.* (2008), adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Super Kelas	: Pisces
Kelas	: Osteichthyes
Sub Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub Ordo	: Cripinoidea
Famili	: Cyprinidae
Sub Famili	: Cyprinenae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>

Ikan mas (*C. carpio*) berasal dari daratan Cina dan Russia. Ikan mas mempunyai bentuk badan agak memanjang pipih ke samping (*compressed*). Mulut (bibir) berada di ujung tengah (*terminal*), dapat disembulkan dan bersifat lunak (elastis). Memiliki kumis (*barbel*) 2 pasang (empat buah), kadang-kadang mempunyai sungut satu pasang (*rudimentir*). Untuk membedakan ikan mas koki (*Carasius auratus*) dari jenis ikan hias dengan ikan mas (*C. carpio*) adalah adanya kumis ini. Ikan mas memiliki jari-jari sirip punggung (*dorsal*) yang keduanya dapat mengeras seperti gergaji. Sedangkan letak antara kedua sirip, punggung dan perut berseberangan. Sirip dada (*pectoral*) terletak di belakang tutup insang (*operculum*) (Santoso, 1993).

Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), ikan mas berbadan panjang dengan perbandingan panjang total dan tinggi badan, yakni 3 : 1. Apabila bagian tengah badan dipotong, ikan mas memiliki perbandingan tinggi badan dan lebar badan, yakni 3 : 2. Warna tubuh ikan mas tergantung pada varietas, yaitu merah, kuning, abu-abu, kehijauan, dan ada yang belang. Tubuh ikan mas terbagi menjadi tiga bagian, yaitu kepala, badan dan ekor. Pada kepala terdapat mulut, sepasang mata, hidung dan tutup insang. Seluruh bagian tubuh ikan mas ditutupi dengan sisik yang besar dan berjenis *ctenoid*. Pada bagian tersebut terlihat ada gurat sisi (*linnea lateralis*), memanjang mulai dari belakang tutup insang sampai pangkal ekor. Berikut merupakan gambar ikan mas yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Khairuman *et al.*, 2002).

2.1.2 Habitat dan Daerah Penyebaran

Menurut Khairuman *et al.* (2008), bahwa ikan mas menyukai tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang airnya deras dan tidak terlalu deras, seperti di penggiriran sungai atau danau. Ikan mas hidup baik di daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl) pada suhu 25-30 °C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadar garam) 25-30 ppm.

Menurut Cahyono (2000), bahwa ikan mas banyak dijumpai di sungai-sungai, danau-danau dan genangan-genangan air. Ikan mas mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Ikan mas mudah beradaptasi dengan fluktuasi lingkungan yang relatif tinggi, misalnya perubahan suhu sampai 5 °C dan penurunan O₂ sampai 2 mg/liter.

Dari negara asalnya China dan Russia ikan ini menyebar ke berbagai daerah di Eropa, Asia Timur dan Asia Selatan pada sekitar abad pertengahan. Di wilayah tersebut perkembangannya semakin pesat, terutama dalam teknik pemeliharaan dan perkembangbiakannya, sehingga menjadikan ikan ini semakin populer dan memiliki banyak varietas (Djariah, 2001).

Ikan mas di Indonesia mulai dipelihara sekitar tahun 1920. Ikan mas jenis Puntan dan Majalaya merupakan hasil seleksi beberapa jenis ikan mas. Ikan ini tidak memiliki naluri untuk merawat dan melindungi keturunannya serta dapat tumbuh dengan baik pada tempat dengan ketinggian antara 150 – 1000 meter diatas permukaan laut (Mantau dan Sundarty, 2011)

2.1.3 Perkembangbiakan

Perkembangbiakan ikan mas terjadi sepanjang tahun dan proses tersebut terjadi pada malam sampai dini hari. Pemijahan ikan mas dapat terjadi secara berpasangan atau secara masal. Perkembangbiakan secara alamiah dapat dipicu dengan pengeringan kolam, pemasukan air baru, dan pemberian substrat (kakaban atau rumput). Agar telur yang dihasilkan tidak banyak yang terbawa arus air, maka dalam pemijahan harus disediakan alat untuk menempelkan telur, misalnya berupa kakaban atau rumput (Cahyono, 2000).

Menurut Khairuman *et al.* (2008), siklus hidup ikan mas dimulai di dalam gonad (ovarium pada ikan betina yang menghasilkan telur dan testis pada ikan jantan yang menghasilkan sperma). Sebenarnya pemijahan ikan mas dapat terjadi sepanjang tahun dan tidak tergantung pada musim. Namun, di habitat

aslinya, ikan mas sering memijah pada awal musim hujan, karena adanya rangsangan dan aroma tanah yang tergenang air.

2.1.4 Makanan dan Kebiasaan Makan

Ikan mas termasuk pemakan segala. Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan mas menyukai memakan berupa jasad hewan atau tumbuhan yang hidup di dasar kolam, misalnya *chironomidae*, *olighochaeta*, *tubificidae*, *epimidae*, *trichoptera*, *molusca* dan sebagainya. Selain itu, ikan mas juga memakan protozoa dan zooplankton seperti *copepoda* dan *cladocera*. Ikan mas sering mencari sumber makanan (jasad-jasad renik) di sekeliling pematang. Oleh sebab itu, pematang sering rusak dan longsor. Ikan mas juga suka mengaduk-aduk dasar kolam untuk mencari makanan yang bisa dimanfaatkan sebagai sumber makanan seperti larva *insecta*, cacing-cacingan dan sebagainya (Santoso, 1990).

Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), ikan mas termasuk ikan yang aktif, ikan mas akan bergerak cepat ke arah makanannya dan menangkap pakan tersebut. Ikan mas akan lebih agresif apabila dalam kepadatan tinggi. Ikan mas tergolong jenis ikan omnivora, yakni pemakan segala. Pakan utama ikan mas adalah tumbuhan dan binatang yang terdapat di dasar dan tepi perairan. Agar pertumbuhannya optimal ikan mas biasa diberi pakan berupa pellet.

2.2 Alga Merah *Gracilaria verrucosa*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi alga merah *Gracilaria verrucosa* menurut Atmadja (1996), sebagai berikut :

- Filum : Rhodophyta
- Kelas : Florideophyceae
- Ordo : Gracilariales
- Famili : Gracilariaceae

Genus : *Gracilaria*

Spesies : *Gracilaria verrucosa*

G. verrucosa berbentuk rumpun, dengan tipe percabangan tidak teratur, *dichotomous*, *alternate*, *pinnate*, ataupun bentuk-bentuk percabangan yang lain. Thallus pada umumnya berbentuk silindris atau agak memipih. Ujung-ujung thallus umumnya meruncing, permukaan thallus halus atau berbintil-bintil. Keadaan permukaan thallus yang berbintil, umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk karposporofit. Panjang thallus sangat bervariasi, sampai mencapai lebih dari 60 cm (Sjafrie, 1990). Berikut merupakan gambar alga merah *G. verrucosa* yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Alga Merah *G. Verrucosa* (Zatnika dan Istini, 2012)

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Sjafrie (1990) menyatakan bahwa *G. verrucosa* umumnya hidup sebagai fitobentos, melekat dengan bantuan cakram pelekot pada substrat padat. Terdapat dari kurang lebih 100 spesies yang menyebar luas dari perairan tropis sampai subtropis. Hal ini menyebabkan beberapa ilmuwan menyebutnya sebagai spesies yang kosmopolit. *G. verrucosa* hidup di daerah litoral dan sub litoral, sampai kedalaman tertentu, yang masih dapat dicapai oleh penetrasi cahaya matahari. Beberapa jenis hidup di perairan keruh, dekat muara sungai. Berbeda dengan

jenis rumput laut lainnya, rumput laut merah dapat hidup pada salinitas rendah sehingga banyak dijumpai di tambak.

Rumput laut jenis *G. verrucosa* merupakan salah satu jenis alga merah (*Rhodophyta*) yang tumbuh di daerah tropik dan subtropik yang tumbuh dominan di perairan laut dangkal. Penyebaran alga merah terletak di daerah tropis terutama di Samudra Pasifik dan Samudra Hindia (Komarawidjaja dan Kurniawan, 2008).

Penyebaran rumput laut merah di Indonesia tersebar luas terutama pada daerah yang tidak memiliki gelombang atau ombak yang besar. Rumput laut jenis ini banyak dijumpai di pantai utara Pulau Jawa dan telah lama dikenal oleh penduduk sebagai komoditas budidaya pada tambak polikultur karena dapat bertahan pada salinitas yang rendah (Sjafrie, 1990)

2.2.3 Manfaat dan Kegunaan

G. verrucosa merupakan alga multiselular yang mengandung substansi yang aktif secara imunologi. Pemanfaatan rumput laut selama ini masih terbatas pada produk karagenan dan agar. Potensi rumput laut di bidang pengendalian penyakit masih belum banyak dieksplorasi dan dieksploitasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *G. verrucosa* mempunyai prospek yang masih terbuka bagi pengembangannya dalam bidang pengendalian penyakit. Ekstrak rumput laut telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai antitumor, meningkatkan aktivitas kemotaksis *macrophage*, menstimulasi aktivitas sekresi radikal oksigen dan fagositosis pada *peritoneal and splenic murine macrophage* (Castro *et al.*, 2004).

Selim (2012) menyatakan bahwa jenis rumput laut tertentu mendapatkan perhatian khusus, hal tersebut dikarenakan potensi rumput laut yang mempunyai efek farmasi yang telah dibuktikan sebelumnya pada penelitian *in vitro* yaitu kemampuannya sebagai antioksidan, imunostimulan dan aktivitas antibakteri. Penggunaan rumput laut merah sebagai bahan baku biokatif dikarenakan jenis

rumput laut ini banyak tersebar diperairan tropis. Pada penelitian secara *in vivo* telah dibuktikan bahwa ekstrak rumput dapat digunakan sebagai imunostimulan.

2.2.4 Bahan Aktif *Gracilaria verrucosa*

Komponen yang terdapat pada rumput laut merah seperti carotenoid, mycosporine yang berhubungan dengan asam amino dan terpenoid bersama-sama membentuk komponen fenol seperti asam sinamik, phlorotanin, dan bromofenol telah terbukti dapat ditemukan pada ekstrak rumput laut. Komponen-komponen kimia tersebut berperan penting terhadap aktivitas antimikroba dan telah banyak ditemukan pada makroalga. Salah satu jenis makroalga yang banyak mengandung senyawa bioaktif adalah *G. verrucosa* (Selim, 2012).

Kandungan fenolik total dari rumput laut merah bervariasi untuk setiap spesiesnya. Kandungan total fenolik pada *G. verrucosa* (45,29 mg/g ekstrak) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kandungan fenolik total rumput laut merah lain dari spesies yang berbeda yaitu *G. Edulis* 16,26 mg/g ekstrak maupun *G. Changii* 5,0 mg/g, namun lebih rendah bila dibandingkan dengan kandungan fenolik rumput laut coklat *Sargassum siliquastrum* (Cho, 2007).

2.3 Ekstraksi Kasar *Gracilaria verrucosa*

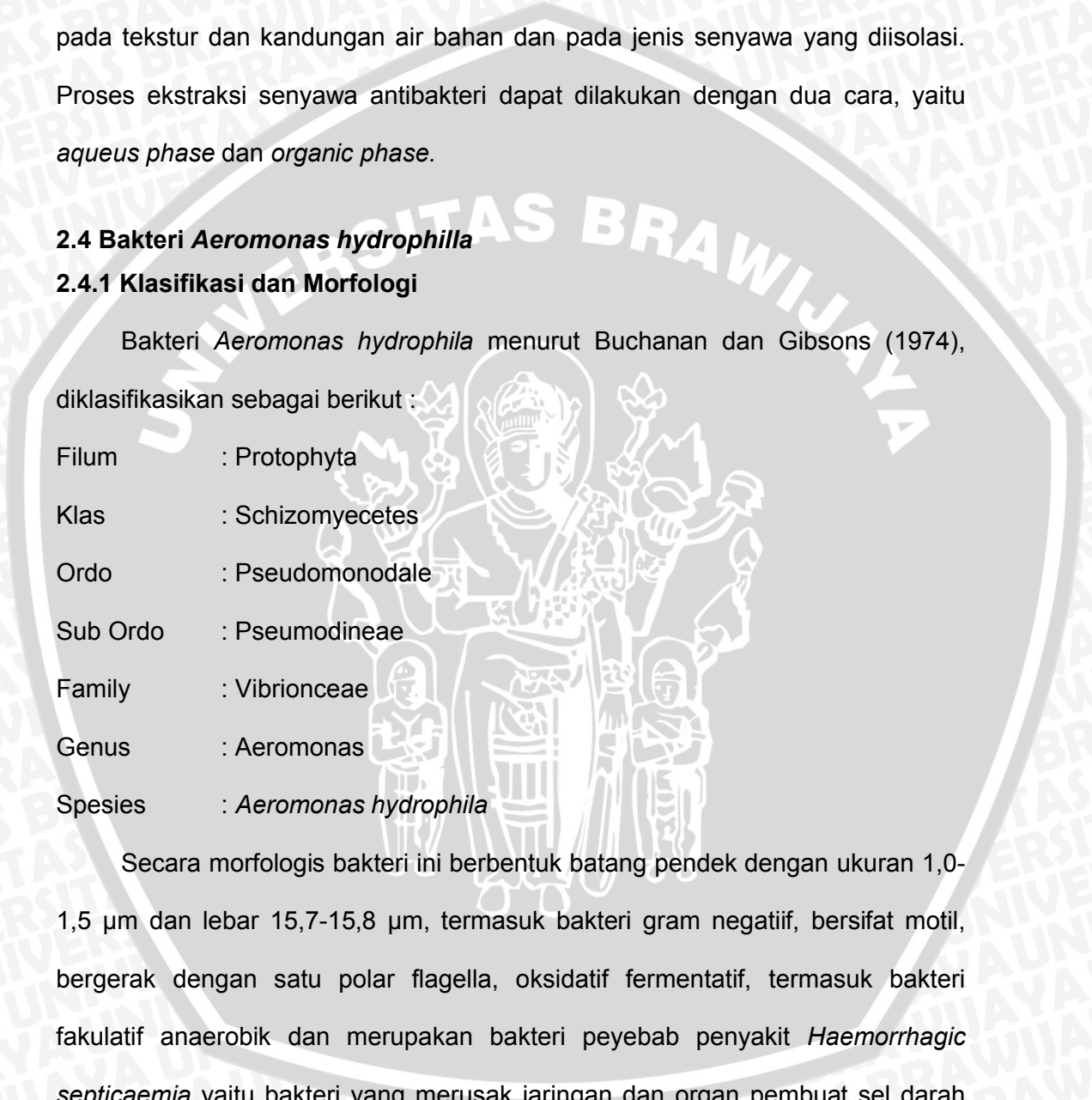
Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi, karena cara ini merupakan metode yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana, cukup dengan merendam sampel dalam pelarut. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar. Etanol mudah menguap, sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*). Bahan yang dapat diestrasek dengan maserasi meliputi bahan herbal atau dari hewan (Julyasih *et al.*, 2009).

Menurut Hukmah (2007), pemilihan metode maserasi dikarenakan senyawa polifenol rentan terhadap panas sehingga tidak baik menggunakan metode soxhlet. Penggunaan ekstraksi dengan metode soxhlet dapat merusak senyawa polifenol. Harborne (1987) menyatakan ragam ekstraksi tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*.

2.4 Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

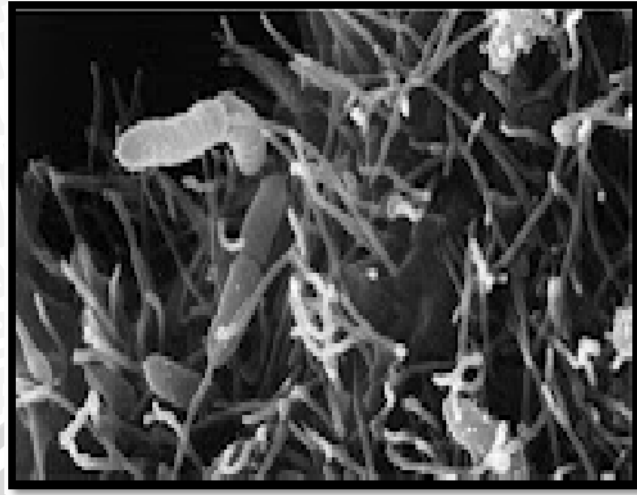
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Buchanan dan Gibsons (1974), diklasifikasikan sebagai berikut :



Filum	: Protophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0-1,5 μm dan lebar 15,7-15,8 μm , termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu polar flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakultatif anaerobik dan merupakan bakteri penyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah yang ditandai dengan pendarahan pada beberapa organ tubuh ikan. Bakteri *A. hydrophila* menyerang dengan ganas disaat kualitas lingkungan menurun. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37 °C (Kabata, 1985). Berikut merupakan gambar bakteri *A. hydrophila* ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Bakteri *Aeromonas hydrophila* (Holmes, 1996).

2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *A. hydrophila* tidak dapat hidup lama tanpa inangnya, suhu optimal bagi pertumbuhannya 22 – 28 °C, pada suhu 35 °C pertumbuhannya terhambat. Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar, keberadaan *Aeromonas* erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar (Holmes *et al.*, 1996).

Bakteri *A. hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen (Kabata, 1985) dan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair. Bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-30 °C, pH 5,5–9. Perkembangbiakannya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1993). *A. hydrophila* sering muncul pada musim kemarau, karena pada musim ini kandungan bahan organik perairan tinggi. Kandungan O₂ yang rendah, suhu tinggi, dan akumulasi sisa metabolisme ikan serta pola padat penebaran dengan kepadatan tinggi akan berkorelasi positif terhadap perkembangbiakannya. Apabila tidak ditangani secara tepat maka serangan bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan kerugian yang besar bagi pembudidaya ikan mas (Christian *et al.*, 2001)

2.4.3 Patogenitas Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Penyebab penyakit bakteri dari ikan adalah mikroorganisme yang komponennya terdiri dari sisa makanan dimana akan menjadi patogen bila terjadi perubahan lingkungan yaitu adanya kenaikan suhu mendadak, polusi, serta sisa makanan atau stress hormonal (Suprastyani, 1989).

Menurut Grandiosa (2010), untuk memenuhi permintaan produk perikanan yang terus meningkat, penerapan intensifikasi budidaya tidak dapat dihindarkan. Namun, intensifikasi budidaya dapat menimbulkan berbagai dampak penyakit. Salah satu kendala yang menghambat budidaya ikan mas adalah kehadiran patogen bakteri yaitu *A. hydrophila*. Bakteri ini menyebabkan penyakit (*Motile Aeromonas Septicemia*) atau penyakit bercak merah. Bakteri ini menyerang berbagai jenis ikan air tawar seperti lele dumbo, (*Clarias* sp.), ikan mas (*Cyprinus carpio*), gurami (*Osphronemus gouramy*) dan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dan dapat menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian tinggi (80-100%) dalam waktu 1-2 minggu.

2.4.4 Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila sebelum melakukan infeksi, terlebih dahulu melakukan penempelan menggunakan flagel ke dalam *host cell*. Faktor virulen dalam mikroba beradaptasi dalam sel inang dan memantapkan keberadaannya. Umumnya *Aeromonas* menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh ikan disertai dengan pendarahan pada organ dalam (Shome dan Shome, 1999).

Infeksi bakteri dapat terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau masuk melalui insang, kemudian masuk ke pembuluh darah dan akan menyebar pada organ dalam lainnya. Infeksi bakteri gram negatif ini bersifat laten (berkepanjangan), jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Organ yang dapat diserang antara lain insang, ginjal, pankreas, spleen bahkan otot tulang. Simptom penyakit ini

bervariasi mengingat kondisi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain virulensi dari bakteri, resistensi ikan terhadap infeksi, hadir atau tidaknya septicemia dan bacteremia serta faktor yang diasosiasikan dengan stres pada ikan (Kabata, 1985).

2.5 Hematologi

Hematologi merupakan cabang ilmu kedokteran yang mempelajari komponen sel darah baik struktur, sifat dan aliran darah. Hematologi sangat erat kaitannya dengan patologi, terutama untuk memperoleh gambaran ikan tersebut dalam kondisi sehat atau sakit (Bijanti, 2005). Darah terdiri dua kelompok besar yaitu sel dan plasma. Darah dianggap sebagai jaringan khusus sirkulasi, terdiri atas berbagai macam sel dalam cairan yang disebut plasma.

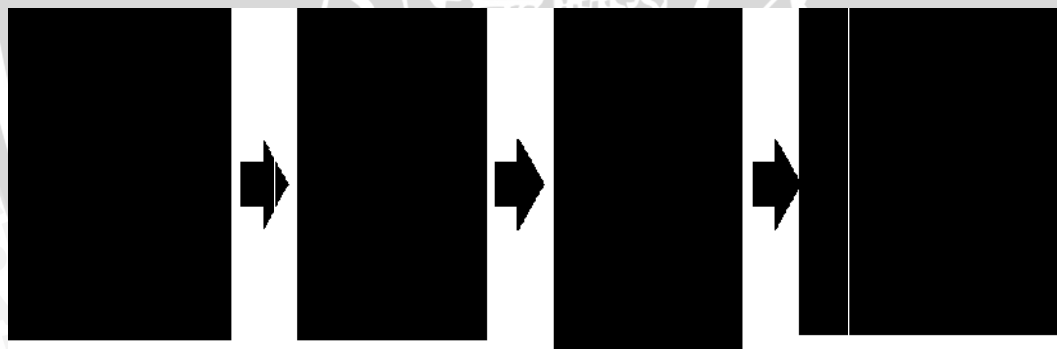
Darah tersusun atas cairan darah (plasma darah) dan elemen-elemen seluler (sel-sel darah). Plasma darah terdiri dari air, protein (albumin, globulin, dan faktor-faktor koagulasi), lipid dan ion (Fujaya, 2004). Berdasarkan warnanya sel darah dibagi menjadi sel darah merah dan sel darah putih. Darah mengandung sel-sel yang dirancang untuk mencegah infeksi, menghentikan pendarahan dan mengangkut hormon. Sel darah mempunyai peranan sangat penting dalam sistem kekebalan, terutama leukosit atau sel darah putih. Jenis-jenis leukosit mempunyai beberapa fungsi dalam melawan benda asing yang berhasil masuk ke dalam tubuh (Johnny *et.al.*, 2003).

2.5.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Ikan sebagaimana vertebrata lain, memiliki sel darah merah (eritrosit) berinti dengan bentuk dan ukuran bervariasi antara satu spesies dengan lainnya. Ada yang berbentuk lonjong, memiliki inti dengan ratio volume sel dan inti adalah 3,5-4,5. Eritrosit pada ikan mempunyai inti berbentuk elips, terletak ditengah sel dan dengan pewarnaan giemsa berwarna kebiruan. Eritrosit merupakan jenis sel

darah paling umum dengan presentase terbesar yaitu sekitar 60% eritrosit terdiri atas air dan sisanya 40% adalah konjugasi protein (Fujaya, 2004). Eritrosit mempunyai peranan utama sebagai pengangkut oksigen dalam tubuh (Jhonny *et al.*, 2003). Rendahnya jumlah sel darah merah menunjukkan ikan menderita kekurangan darah (anemia) dan kerusakan ginjal. Sedangkan tingginya jumlah sel darah merah menunjukkan ikan dalam keadaan stres (Nabib dan Pasaribu, 1989).

Proses pembentukan eritrosit pada ikan berasal dari sel prekursor hemositoblast yang dapat berasal limpa yakni pada bagian pulpa merah. Stem sel merupakan tahap awal terbentuknya sel darah merah, kemudian stem sel berkembang menjadi myeloid dan akhirnya menjadi sel darah merah. Pada umumnya jumlah sel darah merah pada ikan teleostei berkisar antara $1,0-3,0 \times 10^6$ sel/ml (Moyle dan Cech 1988). Gambar sel darah merah ikan dapat dilihat pada Gambar 4.



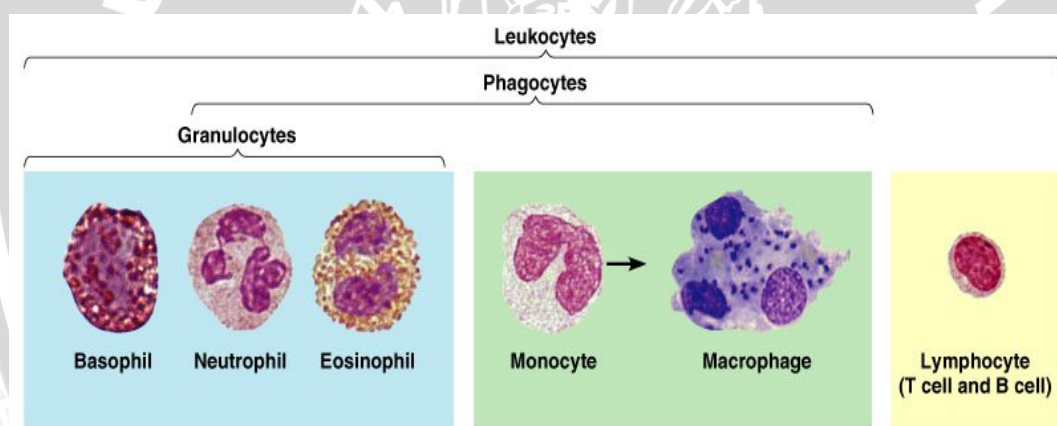
Gambar 4. Pembentukan Eristrosit (Robert, 2001)

2.5.2 Sel Darah Putih (Leukosit)

Menurut Bijanti (2005), Ikan mempunyai sel darah putih (leukosit) cukup banyak antara $137.000/\text{mm}^3 - 798.000/\text{mm}^3$. Proses pembentukan leukosit pada mamalia terbatas pada sumsum tulang, limpa dan limfnode, sedangkan pada ikan selain pada tempat-tempat tersebut juga pada ginjal dan timus turut berperan pada proses pembentukan leukosit. Fungsi primer sel darah putih

adalah melindungi tubuh dari infeksi. Sel darah putih ikan merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bersifat non spesifik atau seluler. Leukosit ikan terdiri atas neutrofil, basofil, eusinofil (*polymorphonuclear*), limfosit dan monosit (*morphonuclear*) serta sel darah putih yang belum matang (*leucocytoblas*).

Pembentukan sel darah putih (leukosit) ikan teleostei berasal dari kelenjar timus dan ginjal. Proses pembentukan leukosit berawal dari stem sel yang kemudian berkembang menjadi myeloid dan lymphoid. Pada tahap tersebut myeloid berkembang menjadi granulocyte dan menghasilkan basofil, neutrofil dan eusinofil. Sedangkan lymphoid berkembang menjadi lymphoblast yang kemudian berkembang menjadi sel T dan sel B (Chinabut *et al.*, 1991). Pembentukan sel darah putih dapat diamati pada Gambar 5.



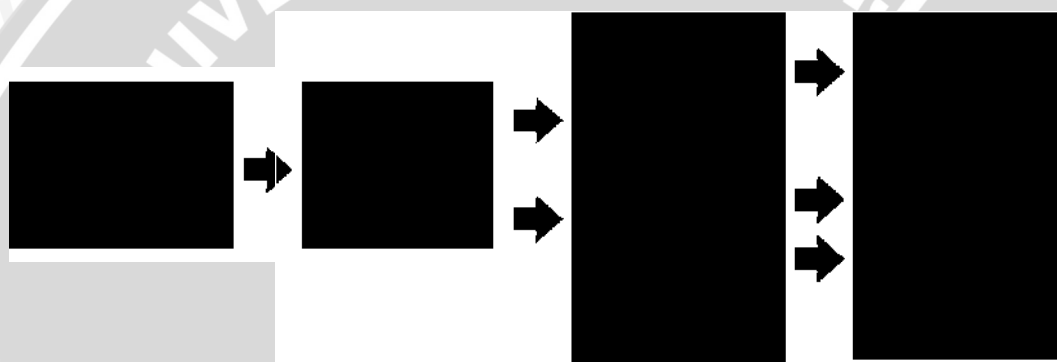
Gambar 5. Pembentukan Leukosit (Trewavas 1983).

2.5.3 Limfosit

Seperti pada mamalia, ikan memiliki sel T dan sel B, dimana secara morfologi tidak dapat dibedakan jika menggunakan mikroskop cahaya. Kedua bentuk sel ini sama-sama memiliki ukuran inti besar, yang mengisi hampir seluruh sel. Jumlah limfosit yang bersirkulasi pada ikan adalah 12×10^3 limfosit/mm³ (Affandi & Tang 2002).

Ikan tidak memiliki sumsum tulang dan limfonodus, sehingga pada bagian depan ginjal berfungsi sebagai organ limfoid utama, dengan timus dan limpa berfungsi sebagai organ limfoid sekunder. Limfosit di dalam timus pada ikan, setelah dewasa bermigrasi menuju limpa (Ardelli & Woo 2006).

Pembentukan limfosit pada ikan dimulai dengan stem sel yang berkembang menjadi lympholoid. Lympholoid kemudian berkembang menjadi lymphoblast dan berkembang lagi menjadi sel B dan sel T. Persentase limfosit ikan berkisar antara 71,12–82,88% dari total leukosit yang bersirkulasi (Affandi dan Tang 2002). Pembentukan limfosit dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 6. Pembentukan Limfosit (Roberts, 2001)

2.5.4 Monosit

Monosit lebih kuat dibandingkan dengan netrofil dalam memfagositosis bakteri, bahkan dapat memfagositasi partikel yang lebih besar karena itu, monosit matang disebut makrofag dan mampu memfagosit 100 bakteri di dalam jaringan yang terinfeksi. Peningkatan jumlah monosit dapat dijadikan indikator peningkatan respon imun ikan. (Fujaya, 2004).

Organ penghasil monosit adalah kelenjar timus dan ginjal. Proses pembentukan monosit dimulai dari stem sel kemudian berkembang menjadi myeloid. Myeloid berkembang myeloblast dan myeloblast berkembang menjadi granulocyte. Selanjutnya granulosit berkembang menjadi monosit (Chinabut *et al.*, 1991). Pembentukan monosit dapat dilihat pada Gambar 7.

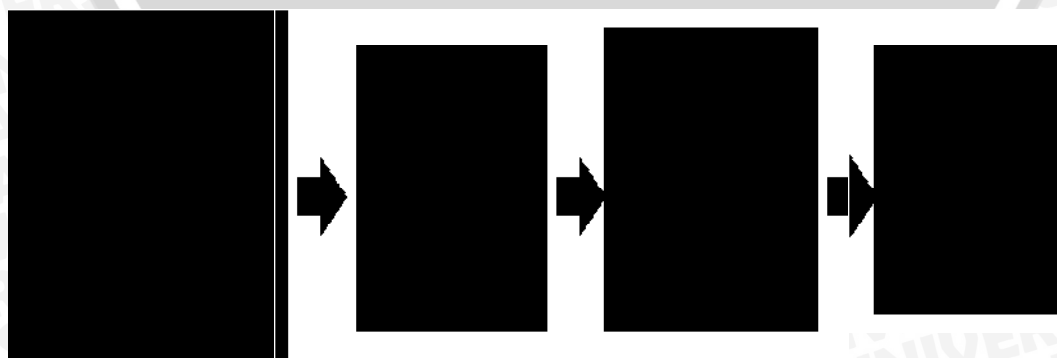


Gambar 7. Pembentukan Monosit (Roberts, 2001)

2.5.6 Neutrofil

Neutrofil berbentuk bundar dan berukuran besar (diameter 9-13 μm), dengan sitoplasma yang besar dan mengandung granula. Sitoplasma neutrofil berwarna biru cerah atau ungu pucat, sedangkan inti berwarna biru gelap dan memperlihatkan gumpalan kromatin (Chinabut *et al.*, 1991). Neutrofil ikan teleost dibentuk di dalam organ ginjal dan limpa (Moyle dan Cech 2004).

Proses pembentukan neutrofil pada ikan dimulai dari stem sel kemudian berkembang menjadi myeloid. Myeloid berkembang menjadi myeloblast dan selanjutnya myeloblast berkembang menjadi granulocyte. Granulocyte kemudian berkembang menjadi neutrofil. Proporsi neutrofil dalam populasi leukosit darah sangat rendah, yaitu sekitar 6 – 8 %. Neutrofil memiliki kemampuan fagositosis meski tidak sekuat monosit (Roberts 2001). Pembentukan neutrofil dapat diamati pada Gambar 8.



Gambar 8. Pembentukan Neutrofil (Roberts, 2001)

2.6 Kualitas Air

Air menjadi kebutuhan utama dalam budidaya ikan. Selain sebagai media internal, air juga sebagai media eksternal bagi ikan. Sebagai media internal, air sebagai pengangkut bahan pakan dan memperlancar metabolisme dalam tubuh ikan. Sebagai media eksternal, air berfungsi sebagai habitat ikan (Wiyanto dan Rudi, 2007).

Kegunaan air bagi organisme hidup harus memenuhi berbagai persyaratan, baik fisik, kimia maupun biologis. Dari segi fisik air merupakan tempat hidup dan menyediakan ruang gerak bagi organisme di dalamnya. Dari segi kimia air sebagai pembawa unsur hara, mineral dan gas-gas esensial. Dari segi biologis air merupakan media yang baik untuk kegiatan biologis dalam pembentukan dan penguraian bahan-bahan organik. Kualitas air yang baik merupakan faktor penting dalam kegiatan budidaya (Subarijanti, 2000).

2.6.1 Suhu

Suhu adalah kapasitas panas. Pengukuran suhu sebaiknya secara siklus harian dengan termometer, sehingga suhu yang terukur benar-benar akurat tanpa banyak dipengaruhi oleh suhu sekitarnya (Sutisna dan Ratno, 1995). Menurut Kordi dan Andi (2007), kisaran suhu optimal bagi kehidupan ikan di perairan tropis adalah antara 28 – 32 °C. Fluktuasi suhu dapat mengakibatkan metabolisme tubuh ikan tidak stabil sehingga dapat menyebabkan stress.

Menurut Khairuman *et al.* (2008) ikan mas menyukai tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras seperti di pinggiran sungai atau danau. Ikan mas dapat hidup baik di daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl) dan pada suhu 25-30° C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadar garam) 25-30 ppt.

2.6.2 pH

pH (singkatan dari *puissance negatif de H*) yaitu logaritma dari kepekatan ion-ion H (hidrogen) yang terlepas dalam suatu cairan (Kordi dan Andi, 2007). Derajat keasaman (pH) adalah suatu ukuran dari konsentrasi ion hidrogen yang menunjukkan suasana air tersebut bereaksi asam atau basa. Menurut Susanto (1990), pada umumnya pH yang sangat cocok untuk semua jenis ikan berkisar antara 6,7 – 8,6.

Menurut Susanto (1990), pada umumnya pH yang sangat cocok untuk semua jenis ikan berkisar antara 6,7 - 8,6. Santoso (1993) menambahkan ikan mas dapat tumbuh normal jika lokasi pemeliharaan berada pada ketinggian 150-1000 m di atas permukaan laut dengan pH air antara 7-8.

2.6.3 Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut merupakan perubahan mutu air paling penting bagi kehidupan organisme air. Oksigen terlarut dalam air pada konsentrasi tertentu dapat diserap oleh haemosianin dalam pembuluh darah lamella insang akibat perbedaan tekanan parsial. Oksigen yang diserap kemudian dimanfaatkan dalam proses metabolisme baik untuk pembentukan sel baru (pertumbuhan) dan untuk penggantian sel yang hilang (Asmawi, 1986).

Sumber utama oksigen terlarut dalam air adalah difusi dari udara dan hasil fotosintesis biota yang berklorofil yang hidup di dalam perairan. Partosuwiryo dan Warseno (2011) menambahkan ikan mas menyukai perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras di daerah dengan ketinggian 150-600 m di atas permukaan laut dengan suhu 20 - 30° C.

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian (Lampiran 1) ini yaitu akuarium yang berukuran 40 x 40 x 40 cm sebanyak 12 buah, timbangan digital dengan ketelitian 1×10^{-2} gram, aerator, selang aerasi, batu aerasi, selang air, nampan, serok, ember plastik, toples, filter, heater akuarium, thermometer, DO meter, pH meter, pipet tetes, nampan, pipet thoma leukosit, pipet thoma eritrosit, *handtally counter*, *haemocytometer*, objek glass, cover glass, dan mikroskop cahaya.

3.1.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian (Lampiran 1) ini yaitu, ikan uji yang digunakan adalah ikan mas yang diperoleh dari Balai Benih Ikan (BBI) Punten, Malang Jawa Timur dengan ukuran 10-12 cm sebanyak 200 ekor. Rumput laut *G. verrucosa* berasal dari perairan di Kabupaten Pasuruan.

Bakteri yang digunakan adalah *A. hydrophila* kepadatan 10^7 sel/ml, diperoleh Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya dengan kepadatan awal 10^9 sel /ml. Bahan yang digunakan adalah kapas, tissue, etanol 96%, kertas saring, kertas label, methanol, aquadest, giemsa, larutan hayem, larutan turk, dan anti koagulan (Nasitrat 3,8%), spuit 1 ml dan sampel darah.

3.1.3 Media Penelitian

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah air tawar pada Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Air diperoleh dari sumur kemudian dialirkan lewat pipa menuju akuarium berukuran 40 x 40 x 40 cm sebanyak 12 buah dan diberi aerasi sebagai penyuplai oksigen.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan dosis 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt. Untuk mempermudah dalam menganalisis diperlukan kontrol sebagai

pembanding yaitu ikan mas diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa*. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali yaitu:

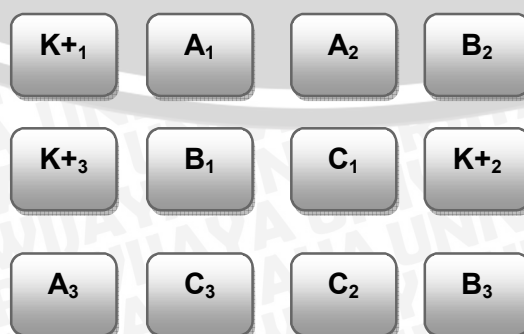
- K : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa*
- A : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* 1 ppt.
- B : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* 1,5 ppt.
- C : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* 2 ppt.

Rancangan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1. berikut:

Tabel 1. Rancangan Perlakuan Uji Ekstrak Kasar *G. verrucosa* Secara *in vivo*

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
K	K ₁	K ₂	K ₃
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃

Untuk denah penelitian *in vivo* disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Denah Penelitian *In vivo*

Keterangan:

K : Kontrol

A, B, C : Perlakuan

1, 2, 3 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Persiapan Penelitian meliputi persiapan perendaman, alat dan hewan uji.

a. Persiapan perendaman

- Ekstraksi *G. verrucosa* berdasarkan Himaya *et al.* (2010) yaitu 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 kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kasar dalam bentuk ml, untuk mendapatkan ekstrak kasar dalam bentuk gram, maka bahan harus dikeringkan menggunakan *water bath* pada suhu 50⁰ C sampai kadar air benar-benar berkurang. Bagan pembuatan ekstrak kasar *G. verrucosa* dapat dilihat pada Lampiran 2.
- Penimbangan ekstrak kasar *G. verrucosa* ke dalam media penelitian sesuai dosis (1 ppt, 1,5 ppt, 2 ppt dan kontrol 0 ppt)

b. Persiapan alat

- Pencucian akuarium
- Persiapan alat-alat pendukung (aerasi, termometer, heater dan filter)
- Pengisian air pada akuarium

c. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan mas sebanyak 120 ekor dengan berat 30-35 gram dan panjang 10-12 cm. Masing-masing akuarium diisi 10 ekor ikan mas. Wu *et al.*, (2010) menyatakan kepadatan ikan untuk uji *in vivo* eksperimen dapat dilakukan dengan jumlah 10 ekor/akuarium.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Perendaman ikan mas dengan ekstrak kasar *G. verrucosa* (Lampiran 3)

- Akuarium diisi air sebanyak 20 liter dan ditambahkan ekstrak kasar *G. verrucosa* sesuai dosis (1 ppt, 1,5 ppt, 2 ppt dan kontrol 0 ppt).
- Akuarium dipasang aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut
- Diambil sampel darah ikan mas sebelum perendaman sebagai kontrol dan dihitung total eritrosit, total leukosit dan diferensial leukosit.
- Direndam ikan mas masing-masing 10 ekor/akuarium selama 10 jam kemudian diadabtasikan selama 3 hari pada lingkungan yang normal.
- Dilakukan perendaman ke-2 selama 10 jam kemudian ikan diadabtasikan selama 1 hari dan diamati total eritrosit, total leukosit dan diferensial leukosit.

b. Penginfeksian bakteri *Aeromonas hydrophila*

- Mempersiapkan 15 akuarium dan diisi 19,8 liter

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya (Lampiran 5) dengan kepadatan 10^9 sel/ml, untuk mendapatkan kepadatan bakteri 10^7 sel/ml dilakukan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino (1998): $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

Dimana :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume yang diinginkan

- Ditunggu selama 24 jam.
- Dilakukan infeksi dengan bakteri *A. hydrophila* selama 24 jam kemudian dihitung total eritrosit, total leukosit dan diferensial leukosit ikan mas sesudah diinfeksi.
- Diamati gejala klinis ikan mas sesudah infeksi dengan bakteri *A. hydrophila*.
- Pengukuran suhu, pH dan DO dilakukan setiap hari pada pagi dan sore (Pukul 08.00 dan 16.00 WIB).

c. Pengambilan Sampel Darah Ikan Mas (Lampiran 4)

Ikan diambil sampel darah dengan jarum suntik yang telah berisi Na sitrat 3,8% di *caudal peduncle*. Disuntik dengan posisi jarum 45° kearah dan tarik perlahan-lahan sampai darah masuk kedalam spuit. Darah ikan segera di amati total eritrosit, total leukosit dan diferensial leukosit. Pengamatan darah dilakukan dengan cepat agar tidak terjadi koagulasi (Bijanti, 2005).

d. Uji Hematologi

• Penghitungan Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

Jumlah sel darah putih (leukosit) dihitung dengan cara pertama-tama sampel darah yang telah bercampur dengan antikoagulan (Na sitrat 3,8%) dihisap dengan menggunakan pipet thoma leukosit sampai 0,5, dilanjutkan dengan menghisap lautan truk sampai skala 11, kemudian pipet thoma leukosit digoyang-goyangkan agar darah dan larutan truk's tercampur rata (pengenceran 1:20). Empat tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya baru ditetaskan pada Haemositometer hal ini dilakukan karena diperkirakan pada tetesan ke 5 (lima) darah dan larutan truk telah tercampur rata sehingga memudahkan kita pada saat perhitungan sel darah putih pada mikroskop. Haemositometer ditutup dengan cover glass dan diamati di atas mikroskop (Gandasoebrata, 1867).

Kamar hitung dengan bidang bergaris diletakkan di bawah lensa obyektif 40x dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis tersebut. Leukosit dihitung

pada 4 kotak besar (warna hijau). Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung, sedangkan sel yang menyinggung garis sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005). Jumlah leukosit dihitung dengan menggunakan rumus berdasarkan Trewavas (1983) :

$$\text{Jumlah leukosit} = N \times \frac{\text{Jumlah sel}}{\text{Jumlah kotak}} \times 20 \text{ (pengenceran)}$$

Keterangan :N = jumlah leukosit yang diamati

- **Penghitungan Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)**

Jumlah sel darah merah (eritrosit) dihitung dengan cara pertama-tama sampel darah yang telah bercampur antikoagulan (Na sitrat 3,8%) dihisap dengan menggunakan pipet thoma eritrosit sampai skala 0,5, kemudian larutan Hayem juga dihisap sampai skala pada pipet menunjukkan angka 101. Perbandingan 1:200. Pipet bulir digoyang-goyangkan agar darah dan larutan hayem bercampur, kemudian setelah bercampur rata 4 (empat) pertama dibuang dan tetesan selanjutnya baru ditetaskan pada haimositometer hal ini dilakukan karena diperkirakan pada tetesan ke lima darah dan larutan hayem telah tercampur rata. Kemudian *Haemocytometer* ditutup dengan cover glass, lalu diamati dibawah mikroskop dengan cara lensa kondensor diturunkan atau diafragma diturunkan secara perlahan (Gandasoebrata, 1967).

Kamar hitung dengan bidang bergaris diletakkan di bawah lensa objektif 40x dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis tersebut. Eritrosit ikan berbentuk bulat lonjong dengan satu ini di dalamnya. Eritrosit dihitung pada lima kotak kecil (warna merah). Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung, sedangkan sel yang menyinggung garis batas kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005). Selanjutnya jumlah eritrosit dihitung dengan menggunakan rumus menurut Trewavas (1983):

$$\text{Jumlah eritrosit} = N \times \frac{\text{Jumlah sel}}{\text{Jumlah kotak}} \times 200 \text{ (pengencer)}$$

Keterangan N = Jumlah eritrosit yang diamati

- **Penghitungan Jumlah Differensial Leukosit**

Satu tetes darah yang telah diberi anti koagulan Na sitrat 3,8% diambil dan diletakkan pada slide kering dan bersih. Selanjutnya dibuat apusan darah tipis, kemudian dikeringkan, selanjutnya dilakukan difiksasi menggunakan etanol absolut selama 1-2 menit untuk melarutkan lemak. Dilakukan pengecatan pada hapusan darah dengan pengecatan giemsa, ditunggu selama ± 5 menit setelah itu slide dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah preparat apusan darah dibuat, pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop pembesaran 1000x untuk menentukan persentase jenis leukosit yaitu neutrofil, monosit dan limfosit (Bijanti, 2005).

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengamatan terhadap sel darah yang terdapat pada ikan mas yang meliputi :

- Perhitungan Sel Darah Putih (Leukosit)
- Perhitungan Sel Darah Merah (Eritrosit)
- Perhitungan Differensial Leukosit (Limfosit, Neutrofil, Monosit)

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah gejala klinis dan kualitas air (suhu, DO dan pH).

3.6 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap hematologi ikan mas yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*, maka data yang diperoleh dari hasil penelitian, akan di uji normalitas untuk mengetahui kenormalan dari sebuah data, kemudian dianalisis secara

statistik dengan menggunakan analisis keragaman (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan rancangan acak lengkap (RAL). Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*) ($F_{hitung} > F_{tabel}$) maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey/BNT (Beda Nyata Terkecil). Dari uji ini dilanjutkan dengan analisis polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Jumlah Rata-rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perhitungan statistik yang dilakukan pada jumlah rata-rata leukosit ikan mas pada setiap perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan K=0 ppt, A=1,5 ppt, B=1,5 ppt dan C=2 ppt sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas ($\times 10^3$ sel/ml) Sebelum Dan Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Pengambilan									
	Sebelum Infeksi					Sesudah Infeksi				
	Ulangan			Total	Rata-rata	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3			1	2	3		
K	15,11	11,12	17,08	43,31	14	20,11	20,78	12,37	53,26	17,75
A	20,24	26,25	27,19	73,63	24,56	35,01	35,95	33,57	104,53	34,84
B	36,13	33,16	34,21	103,50	34,50	37,90	36,02	35,77	109,69	36,56
C	21,22	20,19	23,14	64,55	21,52	30,22	31,33	32,87	94,42	31,47
Total	Total			284,99	94,58	Total			361,9	203,78

Berdasarkan tabel di atas dilakukan sidik ragam jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata antar perlakuan. Hasil analisis data sebelum diinfeksi menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% F_{hit} :14,81,76 dan nilai Sig.0,01<0,01 (Lampiran 6). Data sidik ragam jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat diamati pada Tabel 3.

Tabel 3. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	623,834	207,9447	14,881	0,01
Acak	8	55,891	6.986375		
Total	11	679,752			

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

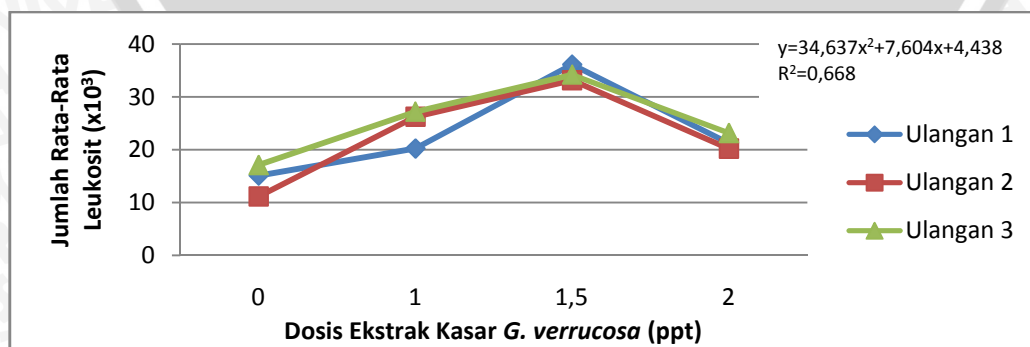
Hasil data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N			Notasi
		1	2	
K	3		34,84	b
A	3	-	36,56	b
B	3	-	37,71	b
C	3	31,47	-	a
Sig.		1,000	0,79	

Hasil uji Tukey menunjukkan pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan A dan B tetapi perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan C. Perlakuan A dan B tidak berbeda nyata tetapi perlakuan A dan B berbeda nyata dengan perlakuan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi didapatkan analisa regresi kuadratik (Lampiran 6) dengan persamaan $y=34,637x^2+7,604x+4,438$ dimana nilai koefisien determinasi (R^2)=0,668. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai x maksimum 1,2 ppt dan nilai y maksimum $37,37 \times 10^3$ sel/ml. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap Leukosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya jumlah rata-rata leukosit ikan mas sebelum diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peningkatan jumlah leukosit setelah diberi perendaman ekstrak kasar *G. verrucosa* terjadi karena didalamnya terdapat senyawa biokatif yang dapat merangsang kelenjar timus dan ginjal untuk memproduksi leukosit yang kemudian melakukan pembelahan sel dan berdiferensiasi sehingga jumlah rata-rata leukosit meningkat.

Hasil sidik ragam jumlah rata-rata leukosit ikan mas sesudah diinfeksi menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata antar perlakuan (Lampiran 7). Data sidik ragam jumlah rata-rata leukosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat diamati pada Tabel 5.

Tabel 5. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	0,0115	0,0038	29,762	0,00*
Acak	8	0,0048	0,0006		
Total	11	0,0067			

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

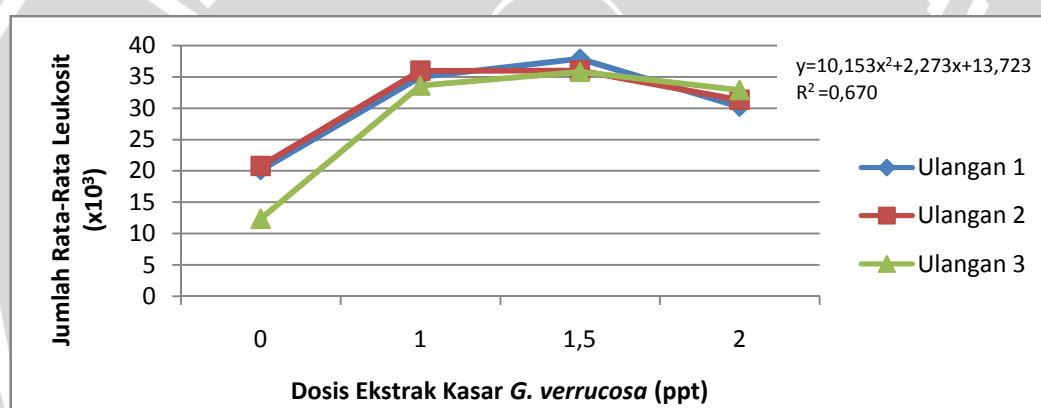
Data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey jumlah rata-rata leukosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat diamati pada Tabel 6.

Tabel 6. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Leukosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
K	3	14,43	-	-	a
A	3	-	24,56	-	b
B	3	-	-	34,50	c
C	3	-	21,51	-	b
Sig.		1,000	0,527	1,00	

Hasil uji Tukey menunjukkan pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap leukosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan C tetapi perlakuan C berbeda nya dengan perlakuan B.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata leukosit ikan mas sesudah diinfeksi didapatkan analisa regresi kuadratik dengan persamaan (Lampiran 7) $y=10,153x^2+25,273x+13,723$ dimana nilai koefisien determinasi (R^2)=0,670. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai x maksimum 0,8 ppt dan nilai y maksimum $40,42 \times 10^3$ sel/ml. Analisa regresi dapat diamati pada Gambar 10.



Gambar 10. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Leukosit Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya jumlah rata-rata leukosit ikan mas sesudah diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peingkatan jumlah rata-rata leukosit ikan mas setelah diinfeksi karena leukosit berfungsi mengeleminasi bakteri patogen yang masuk. Pada saat terjadi infeksi, aktivitas pembelahan leukosit meningkat. Hal tersebut terjadi karena senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak kasar *G. verrucosa* bersifat mitogenik. Senyawa mitogenik kemudian meningkatkan kinerja leukosit untuk berdiferensiasi sehingga terjadi sintesa DNA pada limfosit yang menyebabkan jumlah rata-rata leukosit setelah

diinfeksi meningkat. Menurut Moyle dan Cech (2004) jumlah rata-rata leukosit ikan akan meningkat seiring dengan meningkatnya infeksi bakteri patogen.

4.2 Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum dan Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Jumlah rata-rata eritrosit ikan mas pada setiap perlakuan sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas ($\times 10^5$ sel/ml) Sebelum Dan Sesudah diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Pengambilan									
	Sebelum Infeksi					Sesudah Infeksi				
	Ulangan			Total	Rata-rata	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3			1	2	3		
K	20	21	23	64	21,00	13	11	17	41	13,66
A	25	28	24	77	25,67	16	19	17	52	17,33
B	27	28	29	84	28,00	21	22	19	62	20,67
C	34	31	33	98	32,67	25	28	30	83	27,67
Total	Total			323	107,34	Total			238	79,33

Hasil analisis data sidik ragam jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi menggunakan analisis keragaman satu arah didapat sangat berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% $F_{hit}: 26,789$ dan nilai $Sig. 0,00 < 0,01$ (Lampiran 8). Data sidik ragam jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat diamati pada Tabel 8.

Tabel 8. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	200,972	66,9723	26,789	0,00*
Acak	8	20	2,5		
Total	11	220,972			

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

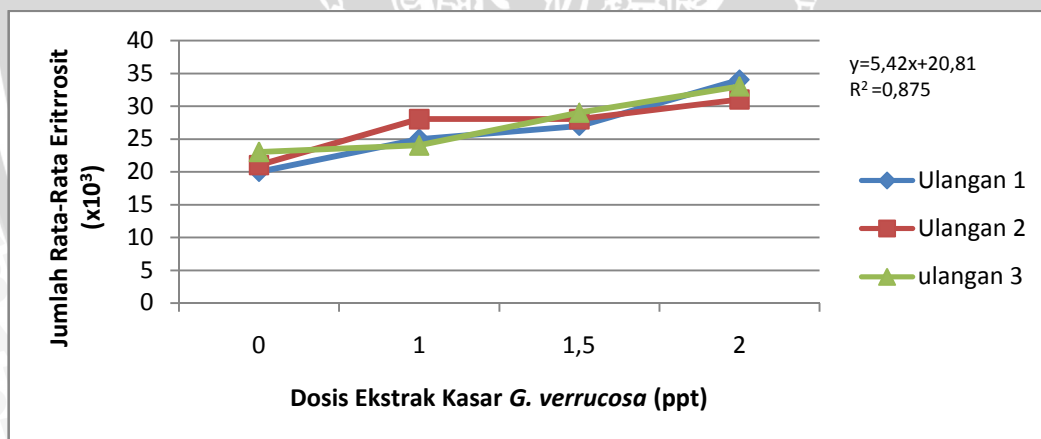
Hasil analisa sidik ragam tersebut perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
K	3	21,33	-	-	a
A	3	-	25,66	-	b
B	3	-	28,00	-	b
C	3	-	-	32,66	c
Sig.		1,000	0,337	1,00	

Hasil uji Tukey menunjukkan pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nya dengan perlakuan A, B dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B tetapi perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi didapatkan analisa regresi linier dengan persamaan (Lampiran 8) $y = 5,42x + 20,81$ dimana koefisien determinasi (R^2) = 0,875. Hasil analisa regresi dapat diamati pada Gambar 11.



Gambar 11. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Eritrosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi dengan tingginya dosis yang diberikan dibandingkan dengan ikan mas kontrol. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar *G. verrucosa* dapat menjadi racun apabila dosis yang diberikan terlalu tinggi.

Semakin tinggi dosis yang diberikan maka dapat menyebabkan ikan mengalami stres sehingga jumlah rata-rata eritrosit meningkat.

Hasil analisis data sesudah diinfeksi menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi sangat berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% F_{hit} :20,918 dan nilai Sig 0.00<0,01 (Lampiran 9). Data sidik ragam jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat diamati pada Tabel 10.

Tabel 10. Sidik Ragam Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	623.834	207.9447	20,918	0,00*
Acak	8	55.891	6.986375		
Total	11	679.752			

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

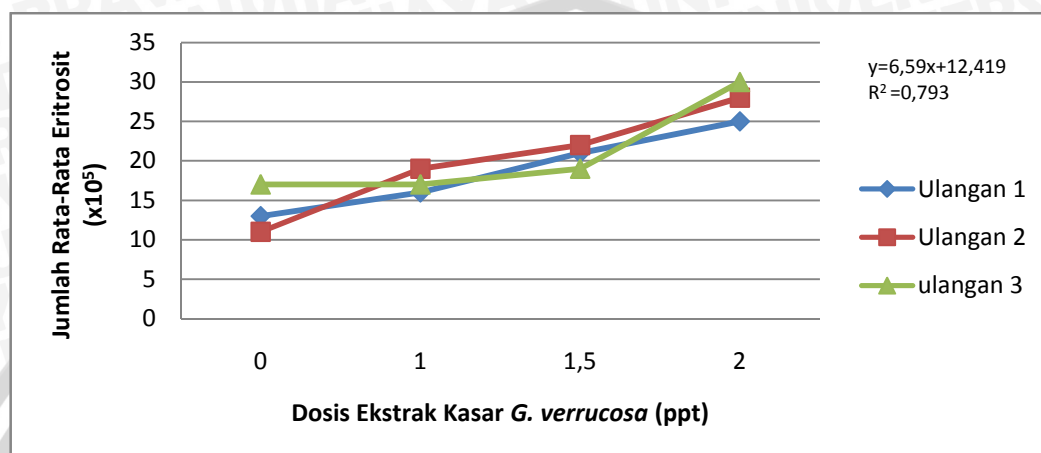
Data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi dan dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Uji Tukey Jumlah Rata-Rata Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
K	3	13,66	-		a
A	3	17,33	17,33		ab
B	3	-	26,6		b
C	3	-	-	27,66	c
Sig.		0,26	0,33	1,00	

Hasil uji Tukey pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan A tetapi perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan B dan C. Perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi didapatkan analisa regresi linier dengan persamaan (Lampiran 9) $y=6,59x+12,419$ dimana koefisien determinasi (R^2)=0,793. Hasil analisa regresi dapat diamati pada Gambar 12



Gambar 12. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Eritrosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh menurunnya jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi. Hal tersebut terjadi karena pada saat infeksi ikan mas mengalami pendarahan akibat pecahnya pembuluh dan rusaknya organ pembentuk eritrosit sehingga jumlah darah yang hilang tidak sebanding dengan jumlah darah yang diproduksi oleh tubuh. Selain itu senyawa toksik yang dihasilkan oleh ekstra dan intra seluler bakteri menyebabkan eritrosit mengalami lisis sehingga jumlahnya menurun di dalam tubuh ikan. Menurut Wedemeyer (1997), Rendahnya jumlah rata-rata eritrosit menunjukkan ikan menderita kekurangan darah dan kerusakan ginjal.

4.3 Diferensial Leukosit Ikan Mas Sebelum dan Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. Hydrophila*

4.3.1 Monosit

Persentase monosit ikan mas pada setiap perlakuan sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Persentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Pengambilan									
	Sebelum Infeksi					Sesudah Infeksi				
	Ulangan			Total	Rata-rata	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3			1	2	3		
K	1	1	2	4	2	4	2	5	11	3,67
A	8	11	10	29	9,67	14	10	13	37	12,33
B	10	12	15	37	12,33	13	15	18	46	15,33
C	8	5	9	22	7,33	9	13	10	32	10,67
Total	Total			92	31,33	Total			126	42

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan persentase monosit ikan mas sebelum diinfeksi sangat berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% $F_{hit}:19,80$ dan nilai $Sig.0,00<0,01$ (Lampiran 10). Data sidik ragam jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat diamati pada Tabel 13.

Tabel 13. Sidik Ragam Persentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	198.00	66.00	19.80	0,00*
Acak	8	26,67	3.33		
Total	11	224,67			

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

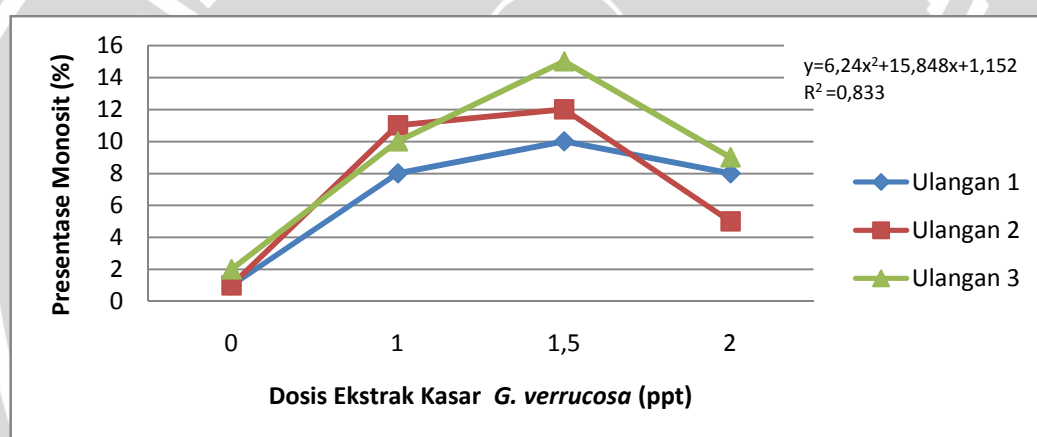
Hasil analisa sidik ragam tersebut perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase monosit ikan mas sebelum diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Uji Tukey Persentase Monosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
K	3	1,33	-		a
A	3	-	9,66		b
B	3	-	-	12,33	c
C	3	-	7,33	-	b
Sig.		1,00	4,47	0,34	

Hasil uji Tukey pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase monosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan B tetapi perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase monosit ikan mas sebelum diinfeksi bakteri didapatkan analisa regresi kuadratik dengan persamaan (Lampiran 10) $y=6,24x^2+15,848x+1,152$ dimana koefisien determinasi (R^2)=0,833. Dari persamaan diperoleh nilai x maksimum 1,26 ppt dan nilai y maksimum 3,69%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 13.



Gambar 13. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Monosit Mas Sebelum Dinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya presentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peningkatan persentase monosit disebabkan karena senyawa bioaktif yang terkandung didalam ekstrak kasar *G. verrucosa* direspon oleh monosit yang sudah matang (makrofag) sebagai benda asing yang harus dieleminasi dari tubuh. Hal tersebut menyebabkan leukosit didalam tubuh akan berdiferensiasi untuk menghasilkan monosit lebih banyak.

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu didapatkan persentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi sangat berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% F_{hit} :20,918 dan nilai Sig.0,00<0,01 (Lampiran 11). Data sidik ragam jumlah rata-rata eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat diamati pada Tabel 15.

Tabel 15. Sidik Ragam Persentase Monosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	220.33	73.44	20,918	0,00*
Acak	8	34.67	4.33		
Total	11	255			

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

Berdasarkan data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 16.

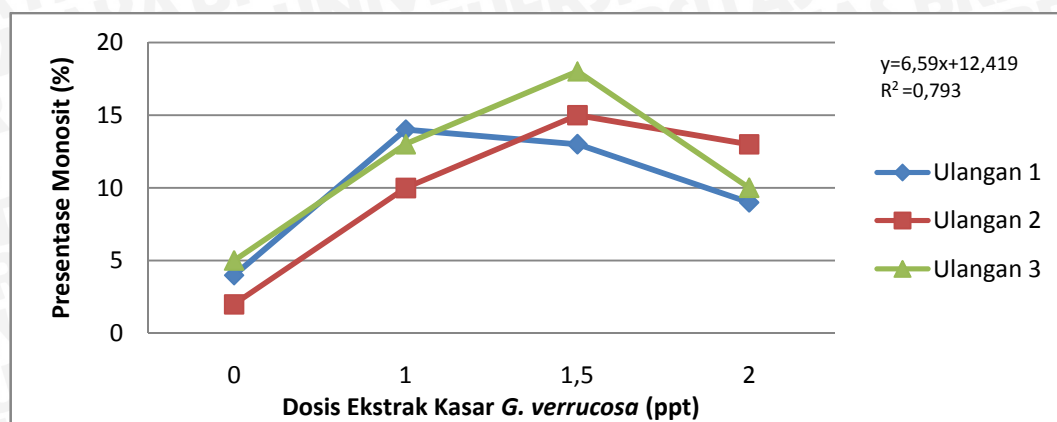
Tabel 16. Uji Tukey Persentase Monosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	Notasi		
		1	2	3
K	3	3,66	-	-
A	3	-	10,66	-
B	3	-	12,33	-
C	3	-	15,33	-
Sig.		1,00	0,095	-

Notasi uji Tukey pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi didapatkan analisa regresi kuadratik dengan persamaan (Lampiran 11) $y=6,091x^2+16,488x+7,112$ dimana koefisien determinasi (R^2)=0,820. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai

x maksimum 1,31 ppt dan nilai y maksimum 34,95%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 14.



Gambar 14. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Monosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya persentase monosit ikan mas sesudah diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peningkatan jumlah monosit terjadi karena bakteri merupakan agen asing yang harus dieleminasi sehingga monosit akan berkembang menjadi makrofag untuk melakukan proses fagositosis. Semakin terinfeksi tubuh oleh bakteri maka produksi leukosit akan menjadi lebih banyak dimana leukosit tersebut akan berdiferensiasi menjadi monosit. Menurut Andayani (2009), saat terjadi infeksi persentase jumlah monosit ikan dapat mengalami peningkatan 2,4% sampai 8,45%. Pada saat mengalami pematangan monosit berkembang menjadi makrofag. Pada proses pembengkakan (inflamasi) saat terjadi kerusakan jaringan oleh infeksi maupun reaksi antigen-antibodi, tubuh ikan akan meningkatkan produksi monosit menjadi dua kali lebih banyak (Maftuch 2007).

4.3.2 Limfosit

Persentase limfosit ikan mas pada setiap perlakuan sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 17 di bawah ini.

Tabel 17. Persentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Pengambilan									
	Sebelum Infeksi				Sesudah Infeksi					
	Ulangan			Total	Rata-rata	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3			1	2	3		
K	91	93	91	275	91	82	94	85	261	87,00
A	79	71	73	223	74,33	64	76	67	207	69,00
B	70	76	69	215	71,67	69	63	57	189	63,00
C	80	80	77	237	79,00	75	69	71	215	71,67
Total	Total			950	316	Total			872	290,67

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi sangat berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% F_{hit} :26,21 dan nilai Sig.0,00<0,01 (Lampiran 12).

Tabel 18. Sidik Ragam Persentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	707,67	235,89	26,21	0,00*
Acak	8	72,00	9,00		
Total	11	679,752			

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

Data hasil sidik ragam tersebut perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi dan dapat dilihat pada Tabel 19.

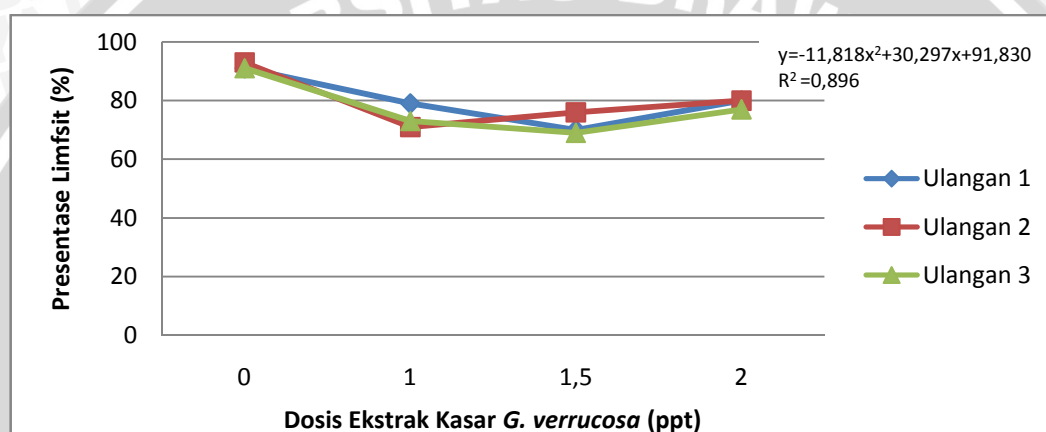
Tabel 19. Uji Tukey Persentase Limfosit Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
K	3	-	91,66		b
A	3	74,33	-		a
B	3	71,66	-	-	a
C	3	79,00	-	-	a
Sig.		0,67	1,00	-	

Hasil uji Tukey pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan

perlakuan A, B dan C, sedangkan perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi didapatkan regresi kuadratik dengan persamaan (Lampiran 12) $y = -11,818x^2 + 30,297x + 91,830$ dimana koefisien determinasi sebesar (R^2) = 0,896. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai x maksimum 1,28 ppt dan nilai y maksimum 72,41%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 15.



Gambar 15. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Limfosit Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi diatas menunjukkan bahwa ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh menurunnya persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Penurunan persentase limfosit terjadi karena senyawa bioaktif yang terkandung dalam *G. verrucosa* menyebabkan limfosit yang ada dialiran darah sebagian besar ditarik ke dalam jaringan atau organ untuk meningkatkan sistem kekebalan secara seluler maupun humoral.

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan persentase limfosit sesudah diinfeksi berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% F_{hit} : 10,16 dan nilai Sig. 0,04 < 0,01 (Lampiran 13). Data sidik ragam persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi dapat diamati pada Tabel 15.

Tabel 20. Sidik Ragam Persentase Limfosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	940.00	313.33	10.16	0,04*
Acak	8	246.67	30.83		
Total	11	679.752			

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

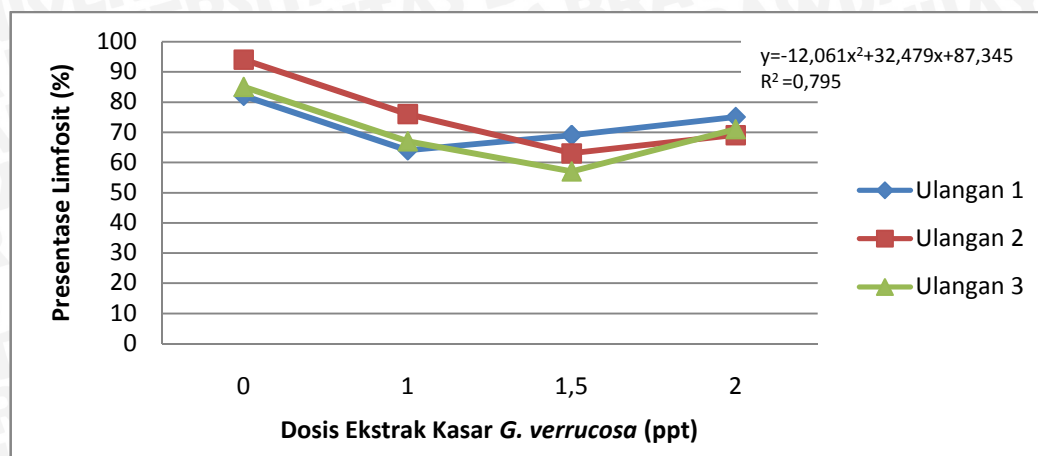
Hasil data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi dan dapat dilihat pada Tabel 21.

Tabel 21. Uji Tukey Persentase Limfosit Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N	1	2	Notasi
K	3	-	87,00	b
A	3	69,00	-	a
B	3	63,00	-	a
C	3	71,66	-	a
Sig.		0,29	1,00	

Hasil uji Tukey pengaruh ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Akan tetapi perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi didapatkan analisa regresi kuadratik (lampiran 13) $y = -12,061x^2 + 32,479x + 87,345$ dengan koefisien determinasi sebesar $(R^2) = 0,759$. Dari persamaan di peroleh nilai x maksimum 1,35 ppt dan nilai y maksimum 65,84%. Persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi adalah 63% sampai 87%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 16.



Gambar 16. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Limfosit Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi diatas menunjukkan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh menurunnya persentase limfosit ikan mas sesudah diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Pada saat terjadi infeksi penurunan persentase limfosit disebabkan karena limfosit yang beredar didalam aliran darah digunakan untuk mekanisme pertahanan tubuh dengan cara membelah menjadi sel B dan sel T. Sel B berfungsi untuk mempresentasikan antigen yang dihasilkan oleh makrofag untuk membentuk antibodi yang bersifat spesifik. Sel T berperan untuk menghasilkan interferon yang berfungsi meningkatkan kinerja makrofag dalam melakukan fagositosis. Menurut Tizard (1982), penurunan persentase limfosit di dalam tubuh ikan paska infeksi bakteri disebabkan karena darah perifer ditarik dari sirkulasi kedalam jaringan yang mengalami peradangan sehingga meningkatkan kadar kortisol dalam darah dan menyebabkan hilangnya limfosit dalam sirkulasi darah. Hal tersebut dapat mengakibatkan persentase limfosit didalam tubuh menurun.

4.3.3 Neutrofil

Persentase neutrofil ikan mas pada setiap perlakuan sebelum dan sesudah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 22.

Tabel 22. Persentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Pengambilan									
	Sebelum Infeksi				Sesudah Infeksi					
	Ulangan			Total	Rata-rata	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3			1	2	3		
K	8	6	7	21	7,00	20	4	13	37	12,33
A	13	18	17	48	16,00	19	18	20	57	19,00
B	20	18	16	54	18,00	18	22	25	65	21,67
C	12	15	14	41	13,67	16	18	19	53	17,67
Total	Total			164	54,67	Total			212	70,67

Hasil analisis data sebelum diinfeksi menggunakan analisis keragaman satu arah didapatkan bahwa persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% $F_{hit}:11,95$ dan nilai $Sig.0,03<0,01$ (Lampiran 23).

Tabel 23. Sidik Ragam Persentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	5100.67	1700.22	11,95	0,03*
Acak	8	4866	608.25		
Total	11	9966.67			

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

Data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi dapat dilihat di Tabel 24.

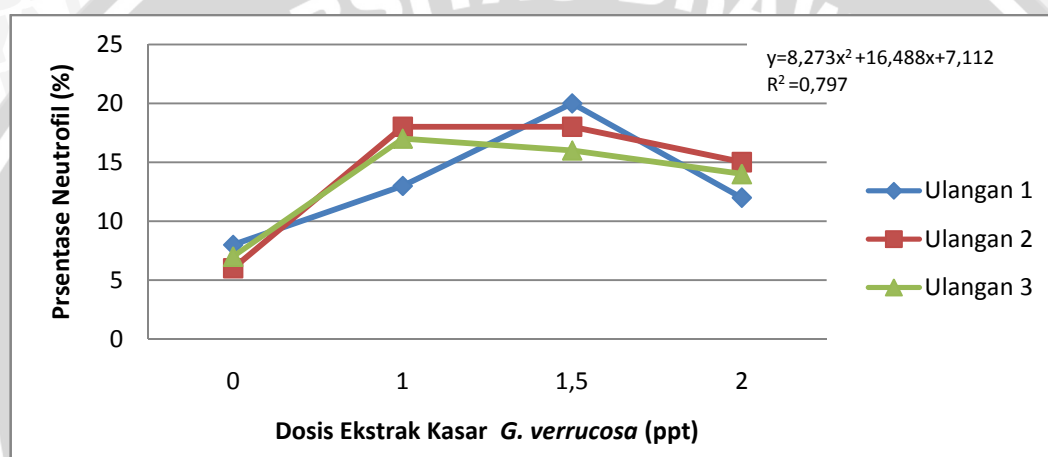
Tabel 24. Uji Tukey Persentase neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N			Notasi
		1	2	
K	3	7,00	-	a
A	3	-	16,00	b
B	3	12,33	-	a
C	3	7,33	-	a
Sig.		0,64	0,23	

Hasil uji Tukey pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A tetapi perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan B

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

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi didapatkan analisa regresi kuadratik dengan persamaan (Lampiran 14) $y=8,273x^2 +16,488x+7,112$ dimana nilai koefisien determinasi (R^2)=0,797. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai x maksimum 0,99 ppt dan nilai y maksimum 15,32%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 17.



Gambar 17. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Neutrofil Ikan Mas Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi diatas menunjukkan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya persentase limfosit ikan mas sebelum diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peningkatan persentase neutrofil terjadi karena ekstrak kasar *G. verrucosa* mengandung senyawa bioaktif dimana didalam tubuh ikan senyawa tersebut dianggap benda asing yang harus dihancurkan sehingga kelenjar timus dan ginjal akan memproduksi leukosit lebih banyak dan berdiferensiasi menjadi neutrofil.

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu didapatkan persentase neutrofil sesudah diinfeksi berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf

5% F_{hit} :36,49 dan nilai Sig.0,00<0,01 (Lampiran 15). Hasil sidik ragam persentase neutrofil sebelum diinfeksi dapat diamati pada Tabel 25.

Tabel 25. Sidik Ragam Persentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sebelum Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	138.67	46.22	36.49	0,00*
Acak	8	160	20		
Total	11	298.67			

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

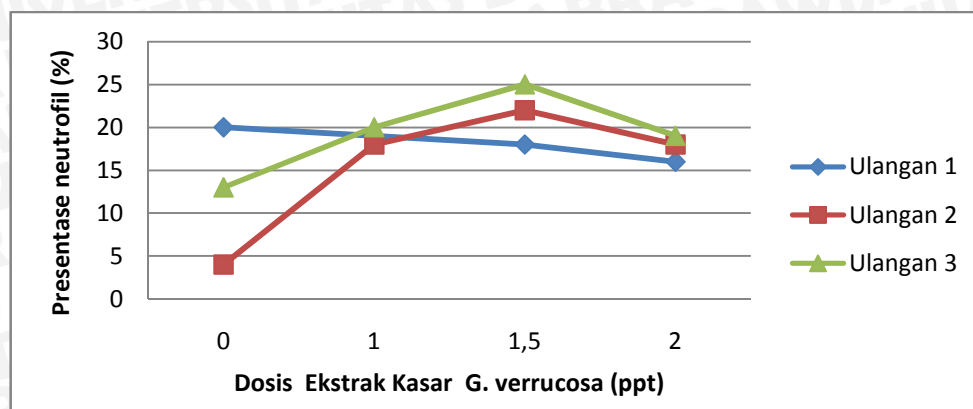
Data sidik ragam diatas perlu dilakukan uji Tukey pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan. Data uji Tukey persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi dapat dilihat di Tabel 26.

Tabel 26. Uji Tukey Persentase Neutrofil Ikan Mas (%) Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	N				Notasi
		1	2	3	
K	3	3,66	-	-	a
A	3	-	16,0	-	b
B	3	-	15,33	15,33	bc
C	3	-	10,66	-	b
Sig.		1,00	0,62	-	

Hasil uji Tukey pengaruh pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi pada perlakuan K berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C, sedangkan perlakuan B dan C tidak berbeda nyata.

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap persentase neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi didapatkan analisa regresi liner dengan persamaan (Lampiran 15) $y=10,93x^2+25,021x+3,845$ dimana koefisien determinasi (R^2)=0,909 dari persamaan di peroleh nilai x maksimum 1,41 ppt dan nilai y maksimum 18,15%. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat diamati pada Gambar 18.



Gambar 18. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kasar *G. verrucosa* terhadap Persentase Neutrofil Ikan Mas Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hasil analisa regresi diatas menunjukkan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* pada setiap perlakuan memberikan pengaruh meningkatnya persentase neutrofil ikan mas sesudah diinfeksi dibandingkan ikan mas kontrol. Peningkatan persentase neutrofil terjadi karena neutrofil merupakan jenis leukosit yang pertama kali melakukan proses fagositosis saat terjadi serangan bakteri. Setelah melakukan fagositosis neutrofil akan mengalami otolisis dan menghasilkan sitokin dan interleukin yang merangsang kelenjar timus dan ginjal untuk melepaskan cadangan neutrofil sehingga produksi neutrofil akan meningkat. Menurut Andayani (2009), jumlah neutrofil mengalami peningkatan dengan semakin terinfeksi ikan oleh bakteri. Neutrofil menunjukkan aktivitas fagositik yaitu mampu menyerang dan membunuh bakteri, virus-virus dan agen-agen lain yang merugikan atau berbahaya yang menyerang tubuh. Adanya infeksi penyakit (oleh parasit, bakteri dan protozoa) akan menyebabkan produksi neutrofil meningkat.

4.4 Gejala Klinis Ikan Mas Yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Gejala klinis menjadi salah satu parameter penunjang yang perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi fisik secara visual dan tingkah laku pada ikan uji yang telah diberi perlakuan pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan dosis yang berbeda maupun yang tidak diberi perlakuan. Gejala klinis adalah gejala akibat

gangguan patogen yang ditunjukkan oleh adanya kelainan pada tubuh dan kelainan perilaku ikan. Pada umumnya ikan mas yang terserang bakteri patogen dapat ditandai dengan gerakan yang lambat dan berenang dengan tidak seimbang, pendarahan pada insang, sirip mengalami geribis, pembangkakan pada bagian dorsal, ventral dan caudal (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Pengamatan gejala patologi klinis dilakukan pada ikan mas selama 3 hari masa penginfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* ditunjukkan pada Tabel 27 berikut.

Tabel 27. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Mas Uji Yang Diinfeksi Bakteri *A. Hydrophila*

Hari	Dosis	Ikan Direndam Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i>	Dosis	Ikan Tanpa Direndam Ekstrak Kasar <i>G. verrucosa</i>
1	1 ppt	- Ikan bergerak normal - Sisik ekor mengelupas	0 ppt	- Ikan bergerak normal - Kondisi tubuh normal
	1,5 ppt	- Ikan bergerak cepat - Tidak ada kerusakan pada tubuh		
	2 ppt	- Ikan bergerak agresif - Tidak ada kerusakan pada tubuh		
2	1 ppt	- Ikan bergerak lambat - Pada bekas suntikan ditemukan pendarahan	0 ppt	- Gerakan ikan lambat - Terjadi inflamasi pada bagian ekor
	1,5 ppt	- Ikan bergerak normal - Terjadi inflamasi pada bagian ekor		
	2 ppt	- Ikan bergerak lambat - Terdapat pendarahan pada bagian ventral.		
3	1 ppt	- Ikan bergerak lambat - Luka pada bagian suntikan semakin besar	0 ppt	- Mengalami kematian pada beberapa ekor ikan - Terjadi pendarahan pada insang
	1,5 ppt	- Ikan bergerak lambat - Sirip ekor mengalami geribis		
	2 ppt	- Ikan bergerak lambat - Pada insang mengalami pendarahan		

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa ikan yang diberi ekstrak kasar *G. Verrucosa* dengan dosis yang berbeda mempunyai ketahanan tubuh yang lebih

prima dibandingkan dengan ikan yang tidak diberi ekstrak kasar *G. verrucosa*. Hal tersebut dapat ditunjukkan pada hari ke-3 ikan yang tidak beri perendaman dengan ekstrak kasar *G. verrucosa* mengalami kematian. Ikan yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* tidak mengalami kematian pada hari ke-3, akan ikan tersebut juga mengalami kerusakan fisik seperti pendarahan, sirip geribis dan pembengkakan (inflamasi). Menurut Lesmanawati (2006), senyawa bioaktif yang terkandung dalam bahan herbal mampu bekerja dengan meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap infeksi bakteri patogen dengan meningkatkan pertahanan seluler ikan sehingga dapat mengurangi tingkat gejala klinis yang dapat ditimbulkan.

4.5 Kualitas Air

Dalam penelitian ini kualitas air merupakan parameter penunjang yang perlu diamati meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Berikut hasil pengukuran kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 28 dan secara rinci pada Lampiran 17.

Tabel 28. Parameter Kualitas Air Selama Penelitian

No.	Parameter Kualitas Air	Kisaran Parameter Kualitas Air
1.	Suhu (C)	25-26 °C
2.	pH	7,63-7,79
3.	Oksigen Terlarut (DO) (mg/l)	5,64-6,39 ppm

Pada tabel diatas nilai suhu berkisar antara 25-26 °C, pH berkisar antara 7,63-7,79 dan DO berkisar antara 5,64-6,39 (mg/l). Menurut Praseno *et.al.* (2010), kualitas air yang baik bagi ikan antara lain suhu berkisar antara 25-26 °C, pH berkisar antara 6-8 dan DO berkisar antara 6-8 ppm. Dari data tersebut dapat dianalisa bahwa parameter kualitas air telah memenuhi syarat agar ikan dapat hidup dengan normal. Media pemeliharaan yang sesuai dapat menjaga agar kondisi fisiologis ikan tetap stabil.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang penggunaan ekstrak kasar *G. verrucosa* terhadap hematologi ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

Hasil penelitian pemberian ekstrak kasar *G. verrucosa* berpengaruh terhadap hematologi Ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, dimana dengan dosis 1,5 ppt dapat meningkatkan jumlah rata-rata leukosit sebelum diinfeksi adalah $34,50 \times 10^3$ sel/ml dan sesudah diinfeksi adalah $36,56 \times 10^3$ sel/ml. Persentase neutrofil sebelum diinfeksi adalah 18% dan setelah diinfeksi adalah 21,67%. Persentase monosit sebelum diinfeksi adalah 12,33% dan setelah diinfeksi adalah 15,33%. Gejala klinis yang diamati ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* memiliki ketahanan tubuh yang lebih baik dari pada ikan mas yang tidak diberi ekstrak kasar *G. verrucosa*. Kualitas air selama penelitian berada pada kisaran normal yaitu suhu sebesar 25-26 °C, pH sebesar 7,63-7,79 dan DO sebesar 5,64-6,39 ppm.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan dosis ekstrak kasar *G. Verrucosa* yang digunakan untuk meningkatkan sistem imun ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* adalah sebesar 1,5 ppt. Penelitian selanjutnya disarankan agar ekstrak kasar *G. verrucosa* digunakan untuk meningkatkan sistem imun ikan ekonomis jenis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi R, Tang U.M. 2002. **Fisiologi Hewan Air**. Riau. Uni Press.
- Afrianto, E. Dan Liviawaty, 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Andayani. S. 2009. **Respon Non Spesifik Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Terhadap Immunostimulan Senyawa Aktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia* sp) Melalui Pakan**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang. Hayati Edisi Khusus: 3B (67–73).
- Anderson, D.P. 1992. **Immunostimulant, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish Applications to Aquaculture**. Annual Review Fish Diseases.
- Anderson, D.P., 1974. **Fish Immunology**. In Disease of Fishes. Ed. S.F. Snieszko dan H.R. Axelrod T.F.H. Publications Inc. Ltd. U.S.A.
- Anderson, D.P., A.K., Siwicki and G.L., Rumsey, 1995. **Injection or Immersion Delivery of Selected Immunostimulants to Trout Demonstrate Enhancement of Non Specific Defense Mechanisms and Protective Immunity**. In Disease in Asia Aquaculture II. Fish Health Section Asian Fisheries Society.
- Ardelli BF, Woo PTK. 2006. **Immunocompetent Cells and Their Mediators in Fin Fish**. Fish Disease and Disorders. Vol 3. Ed ke-2. UK: CABI Publishing.
- Aslianti, T., Afifah dan S. Z. Musthofa. 2010. **Dosis efektif probiotik dalam pemeliharaan Larva bandeng, *chanos chanos* secara terkontrol**. Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indonesia 2010. Sekolah Tinggi Ilmu Perikanan, Jakarta 2-3 Desember 2010.
- Asmawi. S.1986 . **Parameter Kualitas Air Tambak**. PT.Gramedia. Jakarta.
- Atmadja, W.S. 1996. **Pengenalan Jenis-Jenis alga Merah (Rhodophyta)**. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta
- Atmodjo, J.T. 2011. **Modul 9 dan 10 Jenis Metode Penelitian**. Universitas Mercubuana. Jakarta.
- Bijanti, R. 2005. **Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner**. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibsons (ed), 1974. **Determinative Bacteriology**. Eighty edition. Avelly Press. Inc. USA.

- Cahyono, B. 2000. **Budidaya Ikan Air Tawar Ikan Gurami, Ikan Nila, Ikan Mas**. Kanisius. Yogyakarta.
- Capuccino and Sherman, 1988. **Microbiology, A laboratory Manual**. Benjamin/Cumming Science Publishing. Menlo Park. California.
- Castro, R., I. Zarrab and J. Lams. 2004. **Water soluble seaweed extract modulate the pantoea agglomerans lipopolisaccharidae (LPS)**. Journal of Fish Shellfish Immunol. 10(10):505-14.
- Chinabut S, Limsuwan C, Kiswatat P. 1991. **Histology of The Walking Catfish, *Clarias bathracus***. Canada :IDRC.
- Cho, S.H. 2007. **The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts**. Journal of Med Food. 10(3):479-485.
- Christian, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., and Warnes, C., 2001. **Detection of *Aeromonas hydrophilla* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study**. Can. J. Microbiol. 47 (8): 782-786.
- Djariah, A. S., 2001. **Pembenihan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Kanisius. Jakarta.
- Eahamban, K dan J. Marimuthu. 2012. **Preliminary Phytochemical, UV-VIS, HPLC and Anti-bacterial Studies on *Gracilaria corticata* J. Ag.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012) S568-S574
- Ellis, A.E., 1998. **Fish Vaccination**. Academia Press. London.
- Endarti. 2009. **Pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) sebagai imunostimulan terhadap hematologi ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) setelah uji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophilla***. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang. Skripsi.
- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi ikan. Dasar pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta.
- Galindo-Villegas, J., dan H. Hosokawa, 2004. **Immunostimulants : toward temporary prevention of diseases in marine fish**. Kochi University, Faculty of Agriculture. Laboratory of Fish Nutrition B200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502 Japan: 279 - 469.
- Gandasoebrata, R. 1967. **Penentu Laboratorium Klinik**. Dian Rakyat. Jakarta.
- Grandiosa, R. 2010. **Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Secara In Vitro dan Uji Toksisitasnya Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Bandung.

- Gusrina. 2008. **Budidaya Ikan Jilid 1. Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan.** Jakarta.
- Handajani, H. dan S. Samsundari. 2005. **Parasit dan Penyakit Ikan.** UMM Press. Malang.
- Harikrishnan, R., M. N. Rani, and C. Balasundaram, 2003. **Haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophilla* infection.** Aquaculture. 221: 41-50.
- Harborne, J. B., 1987. **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.** Cetakan Keempat. ITB Bandung.
- Himaya, SWA, B.M Ryu, Z.J Qian, S. K. Kim, 2010. **Sea Cucumber, *Stichopus japonicus* Ethyl Acetate Fraction Modulates The Lipopolysaccharide Induced iNOS and COX-2 via MAPK Signaling Pathway in Murine Macrophages.** Environmental Toxicology and Pharmacology.
- Holmes, P., Niccolls, L. M. And Sartory, D.P. 1996. **The ecology of Mesophilic *Aeromonas* in The Aquatic Environment. In The Genus *Aeromonas*,** Edited by: B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. New York: Wiley.
- Hukmah, S. 2007. **Aktivitas Antioksi Dan Katekin Dari Teh Hijau (*Camellia sinensis* o.k. var. *assamica* (mast)) Hasil Ekstraksi Dengan Variasi Pelarut dan Suhu.** Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.
- Jhony, F., Zafran, D. Roza dan K. Mahardika, 2003. **Hematologi Beberapa Spesies Ikan Laut Budidaya.** Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia, 9 (4).
- Julyasih, K. Sri., I.G.P. Wirawan., W.S Harijani dan W. Widajati. 2009. **Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial Di Bali.** Disampaikan pada Seminar Nasional, Surabaya, 2 Desember 2009.
- Jorgensen JB., GJE. Sharp, CJ. Secombes, and B. Robertsen. 1993. **Peritoneal And Head Kidney Cell Response to Intraperitoneally Injected Yeast Glucan in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L).** J. Fish Dis. 16:313-325.
- Kabata, Z., 1985. **Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic.** Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelphia.
- Khairuman, Dodi S. dan Bambang G., 2008. **Budidaya Ikan Mas Secara Intensif.** Agromedia Pustaka. Jakarta.
- KKP. 2012. **Rencana Strategis Kementerian Kelautan dan Perikanan 2010-2014.** <http://www.kkp.go.id>. Diakses pada tanggal 21 September 2012.
- Komarawidjaja, W. dan D.A Kurniawan. 2008. **Tingkat Filtrasi Rumput Laut (*Glacilaria* sp.) Terhadap Kandungan Ortofosfat (P_2O_5).** Jurnal Teknik Lingkungan. 9 (2):180-183.

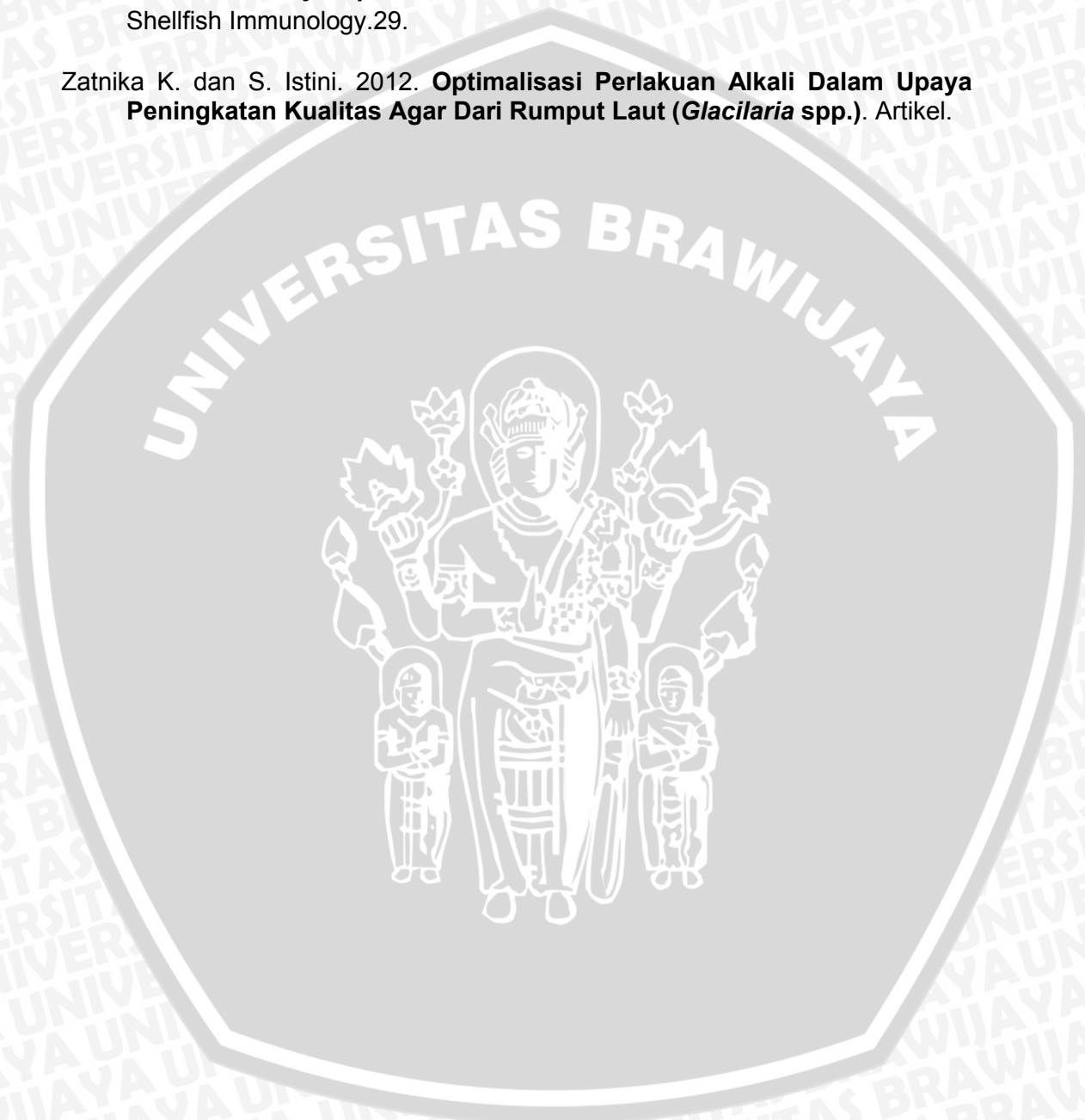
- Kordi, M. G. dan Andi. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan**. PT Rineka Cipta. Jakarta.
- Lesmanawati, Wida. 2006. **Potensi mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* sebagai antibakteri dan imunostimulan pada ikan patin *Pangasianodon hypophthalmus* yang diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila***. Skripsi. IPB. Bogor.
- Maftuch, 2007. **Paparan *Vibrio Alginolyticus* Terhadap Histopatologi Usus Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dan Peningkatan Jumlah Serta Aktivitas Sel Makrofag**. Jurnal Penelitian Perikanan Vol. 10 no.1. Faperik Unibraw.
- Mantau, Z. dan Sudarty. 2011. **Buku Terlengkap Pembenihan Ikan Mas yang Efektif dan Efisien**. Pustaka Mina. Jakarta.
- Mariyono dan A. Sundana. 2002. **Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila***. Buletin Teknik Pertanian. 7 (1).
- Moyle P.B dan Cech Jr J. 2004. **Fishes. An Introduction to Ichthyology**. 5th ed. Prentice Hall. USA
- Mutdjiutami, E., Ciptoroso, Z. Zainun, Sumarjo dan Rahmat. 2005. **Pemanfaatan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas**. Jurnal Budidaya Air Tawar. 4(1):1-9.
- Nabib dan F.H. Pasaribu. 1989. **Patologi dan Penyakit Ikan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Natzir. 1983. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Partosuwiryo, S dan Y. Warseno. 2011. **Kiat Sukses Budidaya Ikan Mas**. Citra Aji Parama. Yogyakarta.
- Prajitno, A. 2007. **Penyakit Ikan–Udang Bakteri**. UM Press. Malang.
- Praseno, A., H. Krettiawan., S. Asih., A. Sudradjat. 2010. **Uji Ketahanan Beberapa Strain Ikan Mas yang Dipelihara di Akuarium**. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010.
- Raa, Jan. 2000. **The Use of Immune-stimulants in Fish and Shellfish Feeds. Memorias del V. Simposium Internacional de Nutricion Acuicola**. 19 – 22 November 2000. Merida, Yucatan, Mexico.
- Roberts R.J. 1978. **Fish Pathology**. Ballier Tindall, London.
- Santoso, B. 1993. **Ikan Mas**. Kanisius. Yogyakarta.
- Sakai, M. 1999. **Current Research Status of Fis Immunostimulants**. *Aquaculture* 172 (2):63-92.

- Samsundari, Sri. 2006. **Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri aeromonas hydrophila yang menyerang ikan mas (cyprinus carpio)**. Jurnal GAMMA. 2(1):71:83.
- Santoso, B. 1993. **Ikan Mas**. Kanisius. Yogyakarta.
- Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi**. Kanisius. Yogyakarta.
- Selim, S. A. 2012. **Antimicrobial, antiplasmid and cytotoxicity potentials of marine algae halimeda opuntia and sarconema filiforme collected from red sea coast**. world academy of science. Engineering and Technology Journal. 2(1):1154-1159.
- Shome, R., and B.R. Shome, 1999. **A. Typical Chronic From of Aeromonas hydrophilla Infection in Indian Major Carp, Calta calta, from Andaman**. Curr. Sci.76: 1188-1190.
- Simanjutak, Partomuan. 1995. Ulas balik senyawa bioaktif dari alga. Jurnal Hayati.2(2): 49-54
- Sjafrie, N.D.M. 1990. **Beberapa Catatan Mengenai Rumput Laut Glacilaria**. Jurnal Oseana 15 (4).
- Subarijanti, H. U. 2000. **Pemupukan dan Kesuburan Perairan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suhermanto, A, Andayani, S. dan Maftuch. 2011. **Pemberian total fenol teripang pasir (Holothuria scabra) untuk meningkatkan leukosit dan diferensial leukosit ikan mas (Cyprinus carpio) yang diinfeksi bakteri Aeromonas Hydrophila**. Jurnal Kelautan. ISSN : 1907-9931. 4(2):49-56.
- Suprastyani, H. 1989. **Dasar-dasar Mempelajari Penyakit Bakterial Pada Ikan**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Surachmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar**. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Susanto, H. 1990. **Budidaya Ikan di Pekarangan**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sutisna, D. H. dan Ratno S. 1995. **Pembenihan Ikan Air Tawar**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tizard, I.R., 1982. **An Introduction of Veterinary Immunology**. W. B. Saunders Company.
- Trewavas E. 1983. **Tilapiine Fishes of The Genera Sarotherodon, Oreochromis, and Danakilia**. Cornel University Press: Itacha, New York.
- Volk, W. dan M. Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar**. Erlangga. Jakarta.
- Wedemeyer, G.A. 1997. **Fish Stres And Health In Intensive Culture**. Society for Experimental Biologi Seminar Series 62. Cambridge: Cambridge University Press.

Wiyanto, R. H dan Rudi, H. 2007. **Pembenihan dan Pembesaran Gurami**. Penebar Swadaya. Jakarta.

Wu, C.C., Liu C.H., Chang Y. P., Hsieh S.L., 2010. **Effect of Hot Water Extract of *Toona sinensis* on Immune Response and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus***. Fish and Shellfish Immunology.29.

Zatnika K. dan S. Istini. 2012. **Optimalisasi Perlakuan Alkali Dalam Upaya Peningkatan Kualitas Agar Dari Rumput Laut (*Glacilaria* spp.)**. Artikel.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Dan Bahan Penelitian

NO	Alat	Fungsi
1	Akuarium	Sebagai wadah air media
2	Aerator dan Batu Aerasi	Sebagai alat bantu penghasil oksigen
3	Selang Aerator	Sebagai alat bantu aerasi
4	Scoop Net	Untuk memindahkan ikan uji
5	Termometer	Untuk mengukur suhu
6	pH Meter	Untuk mengukur pH air media
7	Lap basah	Sebagai pengkondisian agar ikan tetap hidup saat diambil darahnya
8	DO Meter	Untuk mengukur kandungan oksigen terlarut
9	Mikroskop	Sebagai alat mengamati sel makrofag dalam darah
10	Obyek Glass	Untuk tempat darah yang diamati di mikroskop
11	Cover Glass	Sebagai penutup objek glass
12	Spuut	Untuk mengambil darah ikan uji
13	Haemocytometer	Untuk menghitung jumlah sel makrofag
14	Handtally Counter	Sebagai alat bantu menghitung jumlah sel makrofag
15	Filter	Untuk menyaring air media
16	Tissue	Sebagai alat pembersih peralatan penelitian
17	Oven	Sebagai alat pemanas
18	Kamera digital	Sebagai alat dokumentasi pengambilan gambar
19	Appendof	Sebagai tempat sampel darah ikan uji
20	Pipet thoma eritrosit	Mengambil sampel eritrosit
21	Pipet thoma leukosit	Mengambil sampel leukosit
22	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan
23	Hot Plate	Sebagai alat pemanas
24	Baskom	Sebagai tempat bahan <i>G. verrucosa</i>
25	Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
26	Beaker Glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
27	Gelas Ukur	Sebagai alat dalam mengukur bahan larutan
28	Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
29	Nampan	Sebagai tempat bahan dalam proses waterbath
30	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur panjang gelombang bahan
31	Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
32	Vortex	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
33	Toples 2L	Sebagai wadah untuk maserasi
34	Waterbath	Sebagai alat pemanas
35	Rotary evaporator	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak kasar

Lampiran 1 (Lanjutan)

NO	Bahan	Fungsi
1	Ikan Mas	Sebagai hewan uji
2		
3	<i>Aeromonas hydrophilla</i>	Sebagai bahan penginfeksi
4	Air Media	Sebagai media hidup hewan uji
5	Pakan Ikan	Sebagai nutrisi ikan uji
6	Na Citrat 3,8%	Sebagai antikoagulan
7	Hayem	Sebagai larutan pewarna eritrosit
8	Turk	Sebagai larutan pewarna leukosit
9	Giemsa	Pewarna diferensial leukosit
10	<i>Glacilaria verrucosa</i>	Sebagai bahan ekstrak kasar untuk meningkatkan sistem imun ikan mas
11	Etanol 96%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
12	Kertas Label	Sebagai penanda
13	Kertas Saring	Sebagai bahan untuk menyaring ekstrak
14	Tissue	Sebagai bahan pembersih
15	Masker	Sebagai penutup mulut
16	Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan



Lampiran 2. Bagan Pembuatan Ekstrak Kasar *Gracilaria verrucosa*

Persiapan Bahan Ekstrak

Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*.

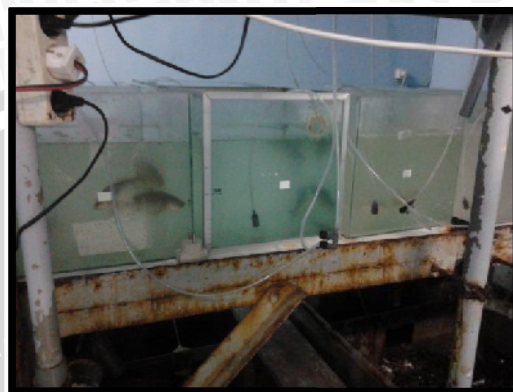
- Dijemur hingga kering
- Dibersihkan dari pengotornya
- Dipotong sampai ukuran kecil
- Dimaserasi (direndam) dengan menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3 selama 2 hari
- Disaring dengan menggunakan kertas saring

Ekstrak Kasar

- Dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*
- Didapatkan ekstrak kasar (ml)
- Dikeringkan dengan menggunakan *water bath* dengan suhu 50 °C sampai kering
- Diperoleh ekstrak kasar (gr)

Hasil

Lampiran 3. Perendaman ikan mas dengan ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dan uji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*



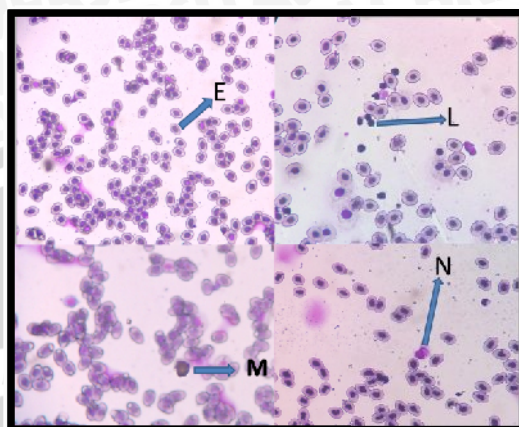
Perendaman Ekstrak Kasar *G. verrucosa* Uji Tantang Bakteri *A. hydrophila*



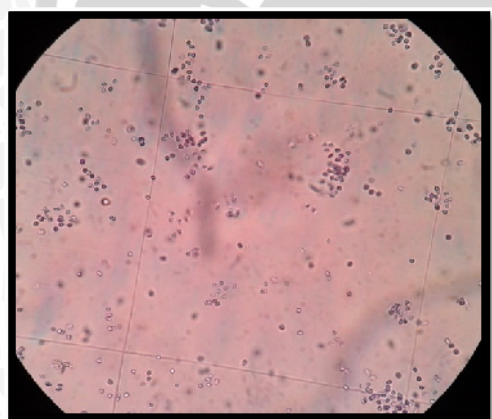
Lampiran 4. Sampel darah dan Gambaran sel darah ikan mas



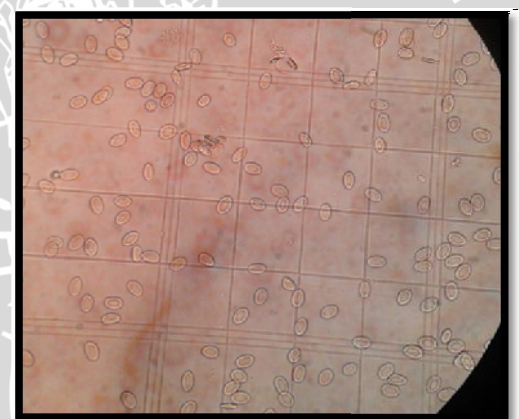
Sampel Darah Ikan M



Eritrosit dan diiferensial Leukosit Ikan Mas
(E=Eritrosit, L=Limfosit, M=Monosit, N=Neutrofil)



Leukosit Ikan Mas



Eritrosit Ikan Mas

Lampiran 5. Sertifikat Bakteri Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya





KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
LABORATORIUM PENGUJI
BALAI KARANTINA IKAN PENGENDALIAN MUTU
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
KELAS I SURABAYA I
 Jl. Raya Bendera Utara Ir. H. Juanda No. 33, Sidoarjo, 61254
 Telp/fax : 031 - 8688099 - 8688118 - 8678471 E-mail : sikuenda@yuhes.co.id

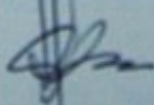
LAPORAN HASIL UJI
 Report of Analysis
 No. 04979a /A.10/BKLI/XI/2012

KODE SAMPEL : 04979a/A.10
 Sampel Code
 NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat
 Type of Sample
 NAMA PELANGGAN : Nurul Ricita Sari / 0910850063
 Customer
 ALAMAT : Mahasiswa Universitas Brawijaya - Malang
 Address
 TANGGAL ANALISA : 12 - 19 Nopember 2012
 Date of Analysis
 PARAMETER ANALISA : Identifikasi spesies Bakteri
 Analysis of Parameters
 SPESIFIKASI METODE : Konvensional
 Method Specification
 HASIL ANALISA :

NO	KODE SAMPEL Sample Code	HASIL IDENTIFIKASI Result Identification
1.	04979a/A.10	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Test Result
 CATATAN : Analisa dengan Metode Konvensional
 Note Conventional method analysis



Surabaya, 20 Nopember 2012
 Penanggung Jawab Lab Bakteriologi,

 Laminem, S.P.LMP →
 NIP. 19701206 199203 2 002

Lampiran 6. Hasil uji perlakuan dengan total leukosit ikan mas sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum Diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	20,24	26,25	27,19	73,63	24,56
1,5 ppt	36,13	33,16	34,21	103,50	34,50
2 ppt	21,22	20,19	23,14	64,55	21,52
0 ppt	15,11	11,12	17,08	43,31	14

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	623,834	207,9447	14,881	0,01*
Acak	8	55,891	6.986375		
Total	11	679,752			

Keterangan: * berbeda nyata (sig<0,05)

Uji Tukey

Perlakuan	N	1		Notasi
		1	2	
0 ppt	3		34,84	B
1 ppt	3	-	36,56	b
1,5 ppt	3	-	37,71	b
2 ppt	3	31,47		a
Sig.		1,000	0,79	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	34.843	.705	33.219	36.468
1	36.563	.705	34.939	38.188
1.5	37.710	.705	36.085	39.335
2	31.473	.705	29.849	33.098

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	7.604	2.236	2.200	3.401	.008
DOSIS ** 2	-4.438	1.107	-2.593	-4.009	.003
(Constant)	34.637	.977		35.460	.000

Lampiran 6 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } y = 34,637x^2 + 7,604x + 4,438$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 34,637x^2 + 7,604x + 4,438$$

$$Y = 7,604 - 2(4,4387)$$

$$0 = 8,876x + 7,604$$

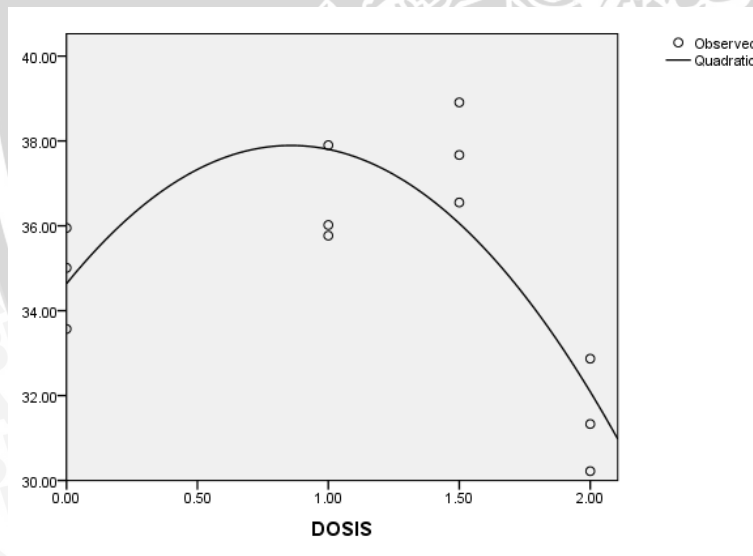
$$X = 1,2$$

$$Y = 34,637 + 7,604(1,2) - 4,438(1,2)^2$$

$$Y = 34,637 + 9,1248 - 6,3972$$

$$Y = 37,371$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum total leukosit ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* pada dosis 1,2 ppt dengan nilai total leukosit $37,371 \times 10^3 \text{ sel/m}^3$.



Lampiran 7. Hasil uji perlakuan dengan total leukosit ikan mas sesudah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sesudah diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	35,01	35,95	33,57	104,53	34,84
1,5 ppt	37,90	36,02	35,77	109,69	36,56
2 ppt	30,22	31,33	32,87	94,42	31,47
0 ppt	20,11	20,78	12,37	53,26	17,75

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	0,0115	0,0038	29,762	0,00*
Acak	8	0,0048	0,0006		
Total	11	0,0067			

Keterangan: * sangat berbeda nyata ($\text{sig} < 0,01$)

Uji Tukey

Perlakuan	N	Ulangan			Notasi
		1	2	3	
0 ppt	3	14,43	-	-	a
1 ppt	3	-	24,56	-	b
1,5 ppt	3	-	-	34,50	c
2 ppt	3	-	21,51	-	b
Sig.		1,000	0,527	1,00	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	14.437	1.526	10.917	17.956
1	24.560	1.526	21.041	28.079
1.5	34.500	1.526	30.981	38.019
2	21.517	1.526	17.997	25.036

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	25.273	6.563	2.483	3.851	.004
DOSIS ** 2	-10.153	3.250	-2.015	-3.124	.012
(Constant)	13.723	2.868		4.785	.001

Lampiran 7 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } y = 10,153x^2 + 25,273x + 13,723$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 10,153x^2 + 25,273x + 13,723$$

$$Y = 2(-10,153) + 25,273$$

$$0 = 20,306x + 25,273$$

$$20,306x = 25,273$$

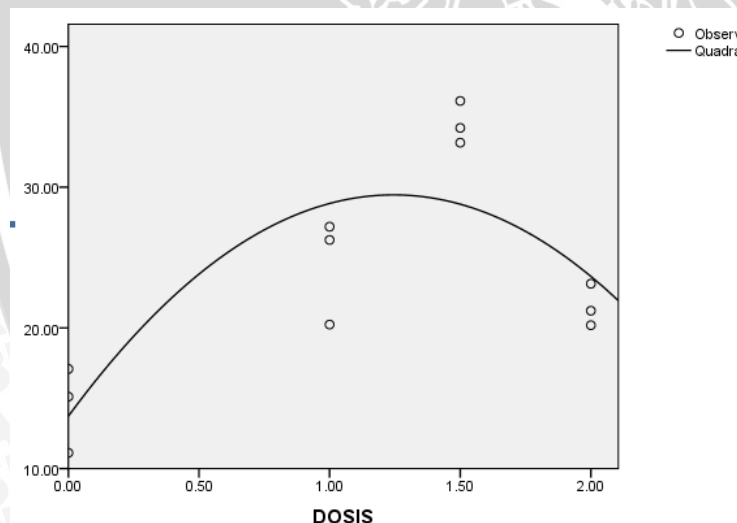
$$X = 0,8$$

$$Y = 10,153(0,8)^2 + 25,273(0,8) + 13,723$$

$$Y = 6,49 + 20,21 + 13,732$$

$$Y = 40,423$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum total leukosit ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* pada dosis 0,8 ppt dengan nilai total leukosit $40,423 \times 10^3 \text{ sel/m}^3$.



Lampiran 8. Hasil uji perlakuan dengan total eritrosit ikan mas sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum infeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	25	28	24	77	25,67
1,5 ppt	27	28	29	84	28,00
2 ppt	34	31	33	98	32,67
0 ppt	20	21	23	64	21,00

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	200.972	66.9723	26.789	0,00*
Acak	8	20	2,5		
Total	11	220.972			

Keterangan: * sangat berbeda nyata (sig<0,00)

Uji Tukey

Perlakuan	N				Notasi
		1	2	3	
0 ppt	3	21,33	-	-	a
1 ppt	3	-	25,66	-	b
1,5 ppt	3	-	28,00	-	b
2 ppt	3	-	-	-	c
Sig.		1,000	0,337 1,00	32,66	

Perlakuan

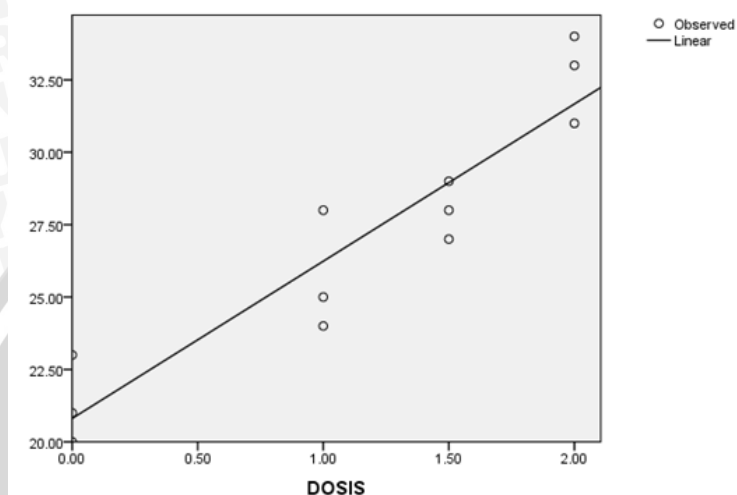
DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	21.333	.913	19.228	23.438
1	25.667	.913	23.562	27.772
1.5	28.000	.913	25.895	30.105
2	32.667	.913	30.562	34.772

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	5.429	.648	.936	8.382	.000
(Constant)	20.810	.872		23.867	.000

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk linier yaitu $Y = 5,42x + 20,81$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kasar *G. verrucosa* yang diberikan maka semakin tinggi nilai total eritrosit ikan mas seudah diinfeksi.



Lampiran 9. Hasil uji perlakuan dengan total eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sesudah diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	16	19	17	52	17,33
1,5 ppt	21	22	19	62	20,67
2 ppt	25	28	30	83	27,67
0 ppt	13	11	17	41	13,66

ANOVA

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	623.834	207.9447	20,918	0,00*
Acak	8	55.891	6.986375		
Total	11	679.752			

Keterangan: * berbeda nyata (sig<0,05)

Uji Tukey

Perlakuan	N				Notasi
		1	2	3	
0 ppt	3	13,66	-		A
1 ppt	3	17,33	17,33		ab
1,5 ppt	3	-	2,66		b
2 ppt	3	-	-	27,66	c
Sig.		0,26	0,33	1,00	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	13.667	1.302	10.665	16.668
1	17.333	1.302	14.332	20.335
1.5	20.667	1.302	17.665	23.668
2	27.667	1.302	24.665	30.668

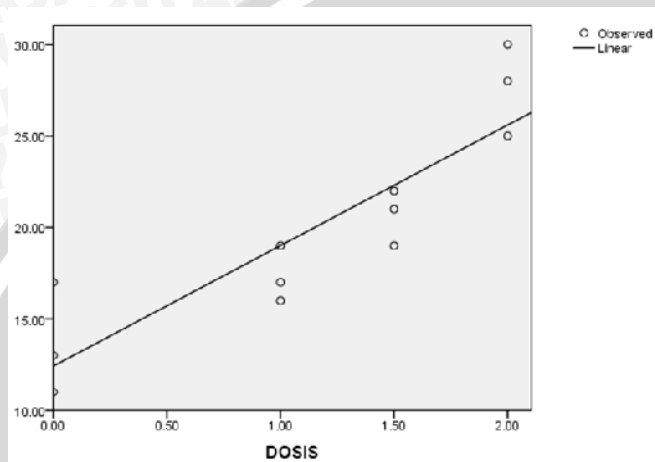
Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	6.590	1.066	.890	6.180	.000
(Constant)	12.419	1.436		8.650	.000

Lampiran 9 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk linier yaitu $Y = 6,59x + 12,419$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kasar *G. verrucosa* yang diberikan maka semakin tinggi nilai total eritrosit ikan mas sesudah diinfeksi.



Lampiran 10. Hasil uji perlakuan dengan total Monosit ikan mas sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	8	11	10	29	9,67
1,5 ppt	10	12	15	37	12,33
2 ppt	8	5	9	22	7,33
0 ppt	1	1	2	4	2

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	198.00	66.00	19.80	0,00*
Acak	8	26,67	3.33		
Total	11	224,67			

Uji Tukey

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
0 ppt	3	1,33	-		a
1 ppt	3	-	9,66		b
1,5 ppt	3	-	-		c
2 ppt	3	-	12,33		b
Sig.		1,00	7,33	-	
			4,47	0,34	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	1.333	1.054	-1.097	3.764
1	9.667	1.054	7.236	12.097
1.5	12.333	1.054	9.903	14.764
2	7.333	1.054	4.903	9.764

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	15.848	2.688	2.709	5.896	.000
DOSIS ** 2	-6.242	1.331	-2.155	-4.690	.001
(Constant)	1.152	1.174		.981	.352

Lampiran 10 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } Y = 6,242x^2 + 15,848x + 1,152$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 6,242x^2 + 15,848x + 1,152$$

$$Y = 2(-6,242)x + 15,848$$

$$12,484x = 15,848$$

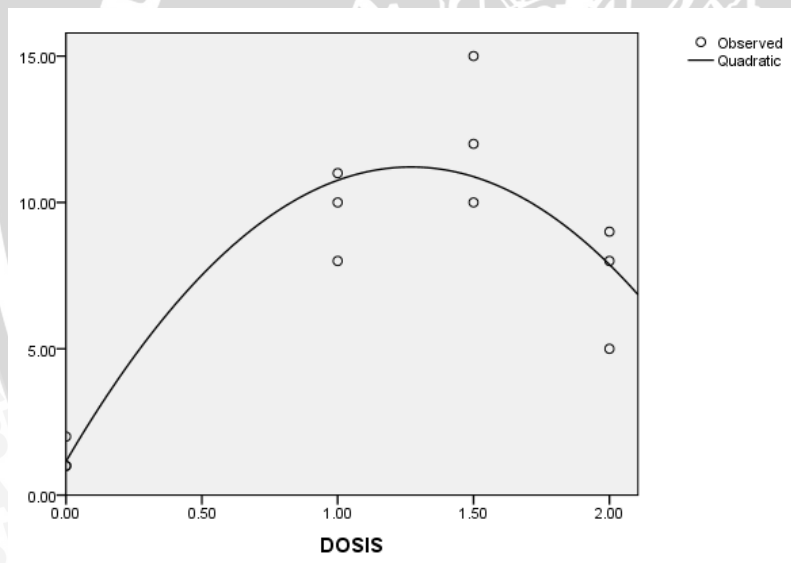
$$X = 1,26$$

$$Y = 6,242(1,26)^2 + 15,848(1,26) + 1,152$$

$$Y = 6,242(1,58) + 15,848(1,26) + 1,152$$

$$Y = 3,6$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase monosit ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sebelum infeksi yaitu pada dosis 1,26 ppt dengan nilai presentase sebesar monosit 3,6%.



Lampiran 11. Hasil uji perlakuan dengan total monosit ikan mas sesudah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sesudah diinfeksi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Sig.
Perlakuan	3	220.33	73.44	20,918	0,00*
Acak	8	34.67	4.33		
Total	11	255			

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	220.33	73.44	20,918	0,00
Acak	8	34.67	4.33		
Total	11	255			

Uji Tukey

Perlakuan	N	1	2	3	Notasi
0 ppt	3	3,66	-		a
1 ppt	3	-	10,66		b
1,5 ppt	3	-	12,33		b
2 ppt	3	-	15,33		b
Sig.		1,00	0,095		

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	3.667	1.202	.895	6.438
1	12.333	1.202	9.562	15.105
1.5	15.333	1.202	12.562	18.105
2	10.667	1.202	7.895	13.438

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	16.052	2.972	2.575	5.401	.000
DOSIS** 2	-6.091	1.472	-1.973	-4.139	.003
(Constant)	3.482	1.299		2.681	.025

Lampiran 11 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } y = 6,091x^2 + 16,052x + 3,482$$

$$Y = 6,091x^2 + 16,052x + 3,482$$

$$Y = (6,091)2x + 16,052 = 0$$

$$12,182x = -16,052$$

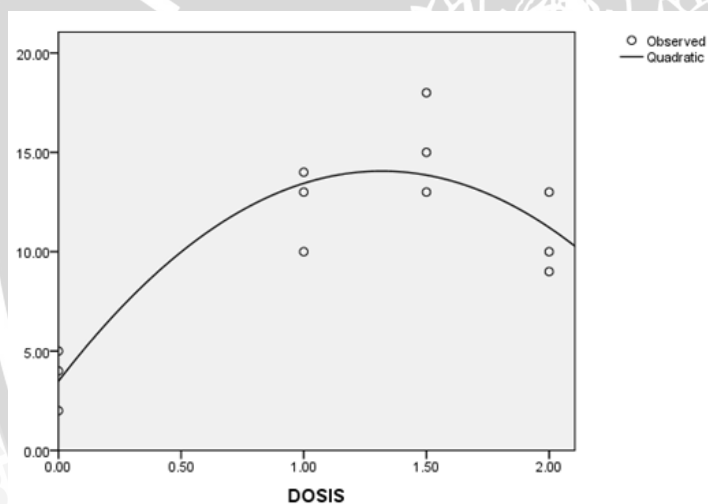
$$X = 1,31$$

$$Y = 6,091(1,3)^2 + 16,052(1,3) + 3,482$$

$$Y = 10,45 + 21,02 + 3,482$$

$$Y = 34,952$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase monosit ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sesudah infeksi yaitu pada dosis 1,31 ppt dengan nilai persentase sebesar 34,952%



Lampiran 12. Hasil uji perlakuan dengan total limfosit ikan mas sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	79	71	73	223	74,33
1,5 ppt	70	76	69	215	71,67
2 ppt	80	80	77	237	79,00
0 ppt	91	93	91	275	91

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	707.67	235.89	26.21	0,00*
Acak	8	72.00	9.00		
Total	11	679.752			

Uji Tukey

Perlakuan	N	1		Notasi
		1	2	
0 ppt	3	-	91,66	b
1 ppt	3	74,33	-	a
1,5 ppt	3	71,66	-	a
2 ppt	3	79,00	-	a
Sig.		0,67	1,00	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	91.667	1.732	87.673	95.661
1	74.333	1.732	70.339	78.327
1.5	71.667	1.732	67.673	75.661
2	79.000	1.732	75.006	82.994

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	-30.297	3.942	-2.780	-7.685	.000
DOSIS **2	11.818	1.952	2.190	6.054	.000
(Constant)	91.830	1.722		53.315	.000

Lampiran 12 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } y = 11,818x^2 - 30,297x + 91,830$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 2(11,818)x - 30,279$$

$$2(11,818)x - 30,279 = 0$$

$$23,636x = 30,279$$

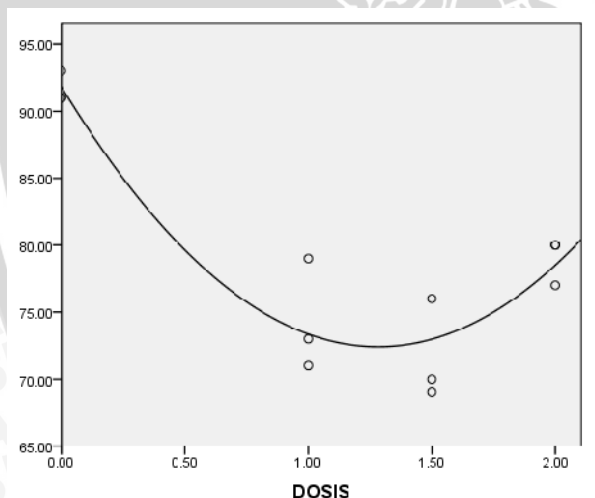
$$x = 1,28$$

$$Y = 11,818x^2 - 30,297x + 91,830$$

$$Y = 19,36 - 38,78 + 91,830$$

$$Y = 72,41$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase limfosi ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sebelum infeksi yaitu pada dosis 1,28 ppt dengan nilai presentase limfosit sebesar 72,41%.



Lampiran 13. Hasil uji perlakuan dengan total limfosit ikan mas sesudah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	64	76	67	207	69,00
1,5 ppt	69	63	57	189	63,00
2 ppt	75	69	71	215	71,67
0 ppt	82	94	85	261	87,00

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	940.00	313.33	10.16	0,04*
Acak	8	246.67	30.83		
Total	11	679.752			

Uji Tukey

Perlakuan	N	Uji Tukey		Notasi
		1	2	
0 ppt	3	-	87,00	b
1 ppt	3	69,00	-	a
1,5 ppt	3	63,00	-	a
2 ppt	3	71,66	-	a
Sig.		0,29	1,00	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	87.000	3.206	79.607	94.393
1	69.000	3.206	61.607	76.393
1.5	63.000	3.206	55.607	70.393
2	71.667	3.206	64.274	79.059

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	-32.479	7.416	-2.415	-4.380	.002
DOSIS ** 2	12.061	3.672	1.811	3.284	.009
(Constant)	87.345	3.240		26.958	.000

Lampiran 13 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadrat

$$\text{yaitu } Y = 12,061x^2 - 32,479x + 87,345$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 12,061x^2 - 32,479x + 87,345$$

$$2(12,061)x - 32,479 = 0$$

$$24,122x = 32,479$$

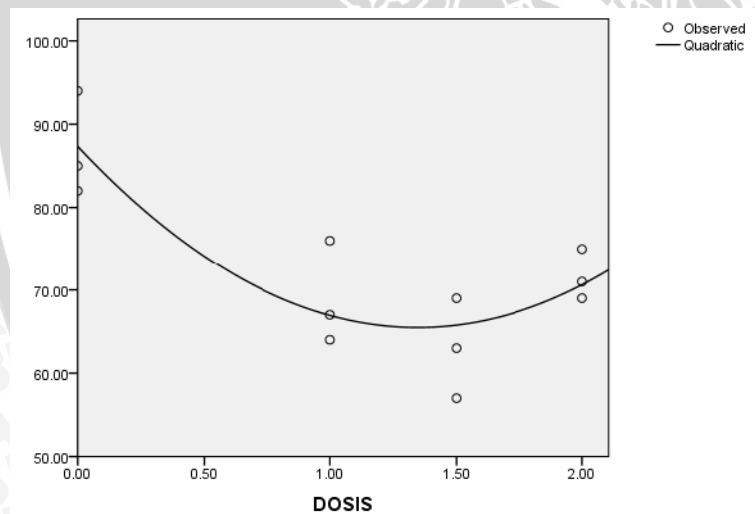
$$x = 1,35$$

$$Y = 12,061(1,35)^2 - 32,479(1,35) + 87,345$$

$$Y = 21,98 - 43,84 + 87,345$$

$$Y = 65,485$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase limfosit ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sesudah infeksi yaitu pada dosis 1,35 ppt dengan nilai presentase limfosit sebesar 65,485%.



Lampiran 14. Hasil uji perlakuan dengan total neutrofil ikan mas sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sebelum diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	13	18	17	48	16,00
1,5 ppt	20	18	16	54	18,00
2 ppt	12	15	14	41	13,67
0 ppt	8	6	7	21	7,00

ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	5100.67	1700.22	11.95	0,03*
Acak	8	4866	608.25		
Total	11	9966.67			

Uji Tukey

Perlakuan	N	1		Notasi
		1	2	
0 ppt	3	7,00	-	a
1 ppt	3	-	16,00	b
1,5 ppt	3	12,33	-	a
2 ppt	3	7,33	-	a
Sig.		0,64	0,23	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	7.000	1.247	4.124	9.876
1	16.000	1.247	13.124	18.876
1.5	12.333	1.247	9.457	15.209
2	7.333	1.247	4.457	10.209

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	16.488	2.824	2.952	5.838	.000
DOSIS ** 2	-8.273	1.398	-2.992	-5.916	.000
(Constant)	7.112	1.234		5.764	.000

Lampiran 14 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } Y = 8,273x^2 + 16,488x + 7,112$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 2(-8273)x + 16,488 + 7,112$$

$$Y = 2(-8,273x) - 16,488$$

$$16,546x = 16,488$$

$$x = 0,99$$

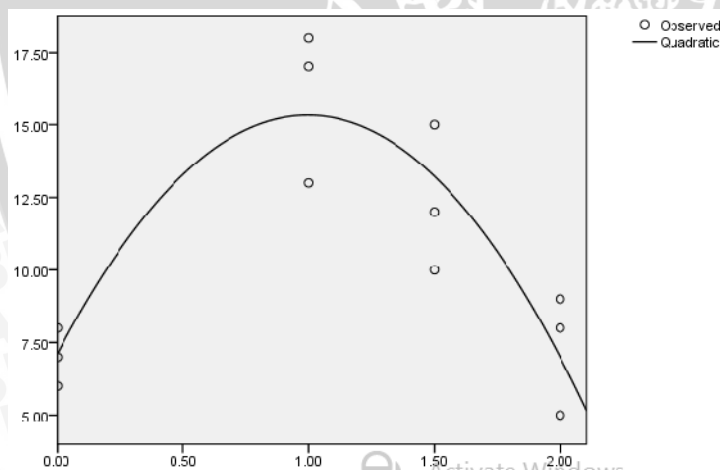
$$Y = 8,273x^2 + 16,488x + 7,112$$

$$Y = 8,273(0,99)^2 + 16,488(0,99) + 7,112$$

$$Y = 8,108 + 16,32 + 7,12$$

$$= 15,332$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase neutrofil ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sebelum infeksi yaitu pada dosis 10,99 ppt dengan nilai presentase neutrofil sebesar 15,332%.



Lampiran 15. Hasil uji perlakuan dengan total neutrofil ikan mas sesudah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sesudh diinfeksi

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
1 ppt	19	18	20	57	19,00
1,5 ppt	18	22	25	65	21,67
2 ppt	16	18	19	53	17,67
0 ppt	20	4	13	37	12,33

ANOVA

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	138.67	46.22	36.49	0,00*
Acak	8	160	20		
Total	11	298.67			

Uji Tukey

Perlakuan	N				Notasi
		1	2	3	
0 ppt	3	3,66	-		a
1 ppt	3	-	16,0		b
1,5 ppt	3	-	15,33		bc
2 ppt	3	-	15,33		b
Sig.		1,00	10,66	0,62	

Perlakuan

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	3.667	1.080	1.176	6.157
1	19.000	1.080	16.509	21.491
1.5	15.333	1.080	12.843	17.824
2	10.667	1.080	8.176	13.157

Koefisien

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
DOSIS	25.021	2.722	3.121	9.191	.000
DOSIS ** 2	-10.939	1.348	-2.756	-8.115	.000
(Constant)	3.845	1.189		3.233	.010

Lampiran 15 (Lanjutan)

Sehingga persamaan hubungan antara dua variable tersebut berbentuk kuadratik

$$\text{yaitu } Y = 10,939x^2 + 25,021x + 3,845$$

Selanjutnya mencari titik puncak

$$Y = 10,939x^2 + 25,021x + 3,845$$

$$2(-10939)x + 25,021x = 0$$

$$2(-10,939)x = -25,021$$

$$-21,878x = -25,021$$

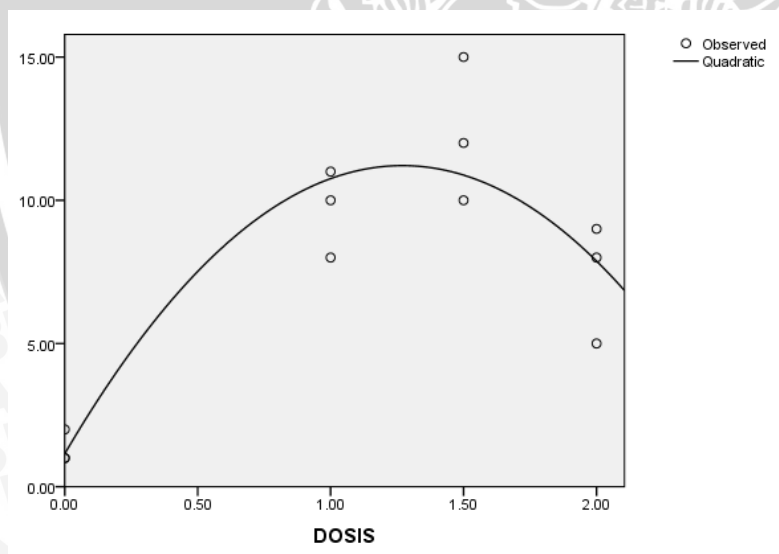
$$x = 1,14$$

$$Y = 10,939(1,14)^2 + 25,021(1,14) + 3,845$$

$$Y = 14,21 + 28,52 + 3,845$$

$$Y = 18,55$$

Dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai perlakuan maksimum persentase neutrofil ikan mas yang diberi ekstrak kasar *G. verrucosa* sesudah infeksi yaitu pada dosis 1,44 ppt dengan nilai presentase neutrofil sebesar 18,55%.



Lampiran 16. Data Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu ($^{\circ}\text{C}$) pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

DATA DO (ppm)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi													
	Sore	6.03	6.55	5.67	6.23	6.12	6.35	6.23	6.21	5.37	6.32	6.75	5.43	5.37 - 6.75
2	Pagi	5.32	5.02	5.43	5.6	5.37	5.75	5.43	5.23	5.46	5.34	5.54	5.21	5.02 – 5.75
	Sore	5.73	6.53	6.24	6.45	5.67	5.59	6.2	6.02	6.06	6.32	6.12	5.96	5.59 – 6.45
3	Pagi	5.02	5	5.12	6.4	5.3	5.7	5.42	5.01	5.38	5.21	5.1	5.2	5 – 6.4
	Sore	6.02	6.21	6.12	6.22	6.23	6.11	6.32	5.92	5.78	6.03	6.13	6.13	5.78 – 6.32
4	Pagi	5.04	5.35	5.76	5.34	5.27	5.84	5.63	5.75	5.38	5.57	5.53	5	5 – 5.84
	Sore	6.04	6.14	6.45	6.03	6.01	6.02	6.21	6.22	6.31	5.94	5.87	6.04	5.87 – 6.45
5	Pagi	5.03	5.14	5.53	5.22	5.34	5.15	5.25	5.67	5.64	5.67	5.73	5.47	5.03 – 5.73
	Sore	5.97	6.03	5.97	6.04	6.17	6.14	6.26	5.93	6.08	6.01	5.97	6.01	5.93 – 6.17
6	Pagi	5.52	5.46	5.67	5.37	5.67	5.76	5.68	5.37	5.73	5.16	5.37	5.28	5.16 – 5.76
	Sore	6.03	6.15	6.27	6.33	6.29	6.25	5.98	6.36	6.48	6.37	6.28	6.25	6.03 – 6.48
7	Pagi	5.58	5.37	5.28	5.58	5.37	5.37	5.39	5.42	5.48	5.38	5.39	5.32	5.28 – 5.58
	Sore	6.03	6	6.11	6.14	6.25	6.23	6.15	6.22	6.34	6.35	6.33	6.37	6 – 6.37
8	Pagi	5.45	5.48	5.29	5.39	5.67	5.45	5.48	5.36	5.28	5.48	5.68	5.34	5.28 – 5.68
	Sore	6.01	6.05	6.22	6.35	6.55	6.31	6.33	5.97	6.01	6.17	5.95	6.01	5.95 – 6.55

Lampiran 16 (Lanjutan)

DATA pH

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi													
	Sore	7.78	7.75	7.73	7.78	7.29	7.39	7.84	7.67	7.69	7.29	7.69	7.38	7.29 – 7.84
2	Pagi	7.28	7.75	7.78	8.21	8.24	7.38	7.84	7.63	7.74	7.46	7.55	7.65	7.28 – 8.24
	Sore	8.03	8.05	8.31	8.35	8.31	7.89	7.83	7.37	8.05	7.29	7.84	7.65	7.29 – 8.35
3	Pagi	7.57	7.65	7.34	7.46	7.28	7.59	7.27	7.37	7.38	7.48	7.53	7.41	7.27 – 7.65
	Sore	7.89	7.95	8.01	8.05	8.14	7.59	7.38	8.06	7.87	8.03	8.05	8.13	7.38 – 8.13
4	Pagi	7.23	7.28	7.35	7.29	7.37	7.52	7.56	7.72	7.17	7.62	7.61	7.58	7.17 – 7.62
	Sore	8.04	8.29	8.29	8.17	7.59	8.03	8.01	8.22	8.23	7.83	7.61	7.62	7.59 – 8.29
5	Pagi	7.12	7.18	6.58	7.52	7.53	7.42	7.43	7.44	7.24	7.52	7.35	7.33	6.58 – 7.53
	Sore	8.01	7.59	7.78	7.89	7.86	7.88	7.98	7.85	7.76	7.63	7.95	8.01	7.59 – 8.01
6	Pagi	7.56	7.55	7.47	7.48	7.56	7.58	7.47	7.55	7.58	7.45	7.57	7.58	7.58 – 7.45
	Sore	7.89	7.95	8.01	8.03	7.95	7.88	7.96	7.84	7.88	7.83	7.92	7.84	7.83 – 8.03
7	Pagi	7.59	7.55	7.84	7.74	7.56	7.58	7.67	7.45	7.67	7.56	7.37	7.36	7.36 – 7.84
	Sore	8.25	8.05	7.95	7.89	8.02	8.05	7.96	7.89	7.95	7.89	7.93	7.95	7.96 – 7.89
8	Pagi	7.79	7.89	7.58	7.35	7.56	7.55	7.56	7.68	7.48	7.49	7.37	7.45	7.35 – 7.89
	Sore	8.01	8.04	8.04	8.04	7.96	8.01	7.98	7.95	7.88	7.92	7.91	7.88	7.88 – 8.04

Lampiran 16 (Lanjutan)

DATA SUHU (°C)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi													
	Sore	25.6	26.2	26.1	26	26.4	26.5	26.6	26.4	26.3	26.1	26.5	26.6	26 – 26.6
2	Pagi	26.6	26.1	26	26.1	26.3	26.5	26.6	26.4	26.2	26.3	26.2	25.9	25.9 – 26.6
	Sore	26.1	26.4	25.9	25.7	25.5	25.6	25.7	25.8	25.7	26	25.7	25.6	25.5 – 26.1
3	Pagi	26.4	26.5	26.6	26.5	26.4	26.5	26.3	26.4	26.3	26.4	26	26.1	26 – 26.6
	Sore	25.5	26.1	25.6	25.7	25.8	25.5	25.6	25.8	25.7	25.8	25.7	25.6	25.5 – 26.1
4	Pagi	26.1	26.4	26.1	26.3	26.4	26.2	26.1	26.5	26.4	26.3	25.9	26.1	25.9 – 26.5
	Sore	25.7	25.7	25.8	25.9	25.6	25.5	25.5	25.7	25.8	25.8	25.5	25.7	25.5 – 25.9
5	Pagi	26.6	26.3	25.7	26.2	26.4	26.5	25.9	26.1	26	25.9	25.8	25.7	25.7 – 26.6
	Sore	25.9	25.8	25.9	25.8	25.7	25.8	25.8	25.7	25.6	25.7	25.6	25.8	25.6 – 25.9
6	Pagi	26.4	26.1	26.2	26.3	26.1	25.9	26.1	26.2	26.5	26.4	26.6	26.2	25.9 – 26.6
	Sore	25.8	25.9	25.8	26.1	26.2	25.9	26.1	25.8	25.8	25.8	25.7	25.9	25.7 – 26.2
7	Pagi	25.9	26.3	26.5	26.4	26.5	26.3	26.5	26.3	26.4	26.1	26.3	26.3	25.9 – 26.5
	Sore	25.4	25.9	25.7	26.1	25.9	25.9	25.8	25.9	26.1	25.8	25.7	25.9	25.4 – 26.1
8	Pagi	25.6	25.8	26.1	26.5	26.4	26.3	26.3	26.2	26.5	26.4	26.1	26.2	25.8 – 26.5
	Sore	26.1	25.9	25.7	25.9	25.8	25.9	25.7	25.9	25.8	26.1	25.8	25.7	25.7 – 26.1