

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah! Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penulisan skripsi ini.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan Bapak Ir. Maheno Sri Widodo, MS. selaku pembimbing II yang berkenan meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, saran, kritik, serta dukungan mulai dari pengajuan proposal sampai penulisan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Ir. Sri Andayani, MS. dan Ibu Ir. Soelistyowati selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak saran dan kritik untuk melengkapi penulisan skripsi ini.
3. Bapak dan Ibu tercinta yang telah memberikan segalanya pada penulis. 'Ijunk sayang' dan seluruh keluarga besar di Sumbawa dan di Malang atas do'a dan dorongan semangatnya. Semoga Allah selalu menyayangi mereka dan memberikan umur yang panjang.
4. Teman-teman ALJ '05, anak-anak Lab. PPI (Mbak Ti2n juga) dan anak-anak kos Sutami 1: 415 atas dukungannya, semoga kita kompak selalu.

Malang, November 2007

Penulis

RINGKASAN

MAINAR IKA ASFANTI. Pengaruh Pemberian Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Kekebalan Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). (Dibawah bimbingan **Dr. Ir. MAFTUCH, M.Si.** dan **Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS.**)

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 9 Juli – 20 Agustus 2007.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap kekebalan tubuh ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan melakukan ujiantang menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* serta untuk mengetahui dosis optimal penggunaan tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) sebagai immunostimulan.

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi bagi petani ikan dalam menentukan jumlah dosis tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) yang optimal untuk meningkatkan kekebalan tubuh pada ikan Mas (*Cyprinus carpio*) serta sebagai alternatif bagi upaya pemanfaatan cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) untuk pencegahan penyakit pada ikan yang ramah lingkungan.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Rancangannya menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 3 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah dosis tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) yang dicampurkan dalam pakan buatan (pellet) masing-masing adalah A (4 % tepung cacing Tanah/Kg pakan), B (6 % tepung cacing Tanah/Kg pakan), C (8 % tepung cacing Tanah/Kg pakan), K+ (0 % tepung cacing Tanah/Kg pakan), dan K- (0 % tepung cacing Tanah/Kg pakan) yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali. Ikan uji menggunakan ikan Mas berukuran 10 – 12 cm yang diperoleh dari petani ikan di Kabupaten Malang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian tepung cacing Tanah melalui pakan memberikan hasil yang berbeda sangat nyata terhadap jumlah total leukosit, persentase monosit, limfosit, trombosit, dan neutrofil. Ini berarti menerima H1 dan menolak H0. Terjadi peningkatan sistem kekebalan tubuh pada ikan Mas setelah dilakukan ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila* yang ditunjukkan dengan peningkatan jumlah total leukosit serta persentase monosit dan neutrofil. Sedangkan untuk parameter uji kelulus hidupan (SR), diperoleh hasil yang tidak berbeda sehingga ini berarti menerima H0 dan menolak H1.

Berdasarkan hasil uji hematologi setelah ujiantang, diperoleh jumlah total leukosit tertinggi pada perlakuan sebesar $11,616 \times 10^4$ sel/mm³ dan terendah pada perlakuan A sebesar $10,523 \times 10^4$ sel/mm³. Hubungan antara pemberian tepung cacing Tanah dengan jumlah total leukosit dinyatakan dalam persamaan garis

kuadratik dengan rumus $Y = 30466,63 + 27508,35X - 2204,168X^2$ dengan $R^2 = 0,9985$ dan $r = 0,9992$. Dengan titik puncak 6,24 % dan merupakan perlakuan terbaik.

Persentase monosit dan neutrofil mengalami peningkatan setelah dilakukan ujiantang dengan nilai tertinggi dicapai pada perlakuan B sebesar 72,3 % untuk monosit dan pada perlakuan C sebesar 53,3 % untuk neutrofil. Nilai terendah pada perlakuan A senilai 49,3 % untuk monosit dan pada perlakuan B senilai 6,6 % untuk persentase neutrofil. Hubungan antara dosis pemberian tepung cacing Tanah dengan peningkatan persentase monosit dinyatakan dengan persamaan garis kuadratik dengan rumus $Y = -177,62 + 86,9X - 7,54X^2$ dengan $R^2 = 0,9780$ dan $r = 0,9889$. Sedangkan untuk persentase neutrofil dinyatakan dengan persamaan garis kuadratik dengan rumus $Y = 176,665 - 67,0825X + 6,45825X^2$ dengan $R^2 = 0,977$ dan $r = 0,9882$ dengan titik puncak terendah 5,2. Perlakuan terbaik yaitu perlakuan B untuk monosit dan C untuk neutrofil.

Persentase limfosit dan trombosit mengalami penurunan setelah dilakukan ujiantang. Nilai tertinggi dicapai pada perlakuan A sebesar 16,3 % untuk limfosit dan pada perlakuan A sebesar 22,67 % untuk trombosit. Nilai terendah diperoleh pada perlakuan C senilai 6 % untuk persentase trombosit dan pada perlakuan C senilai 7,3 % untuk limfosit. Hubungan antara pemberian dosis tepung cacing Tanah dengan persentase trombosit dan limfosit dinyatakan dengan persamaan garis linier dengan rumus $Y = 20,44 - 1,5X$ dengan $R^2 = 0,796$ dan $r = 0,891$ untuk limfosit dan $Y = 29,667 - 2,7778X$ dengan $R^2 = 0,8507$ dan $r = 0,9223$ untuk trombosit. Berdasarkan uji BNT, perlakuan terbaik yaitu perlakuan A untuk persentase limfosit dan perlakuan C untuk persentase trombosit.

Berdasarkan hasil pengamatan, ikan yang telah diinfeksi berangsur – angsur mengalami kesembuhan selama masa pemeliharaan untuk pemulihan. Hal ini diduga karena adanya sistem pertahanan tubuh yang mempercepat proses penyembuhan luka dan juga mempercepat penyembuhan akibat infeksi oleh bakteri. Penyembuhan ini diduga akibat adanya zat *Lumbricin-1* yang bersifat sebagai senyawa peptida antimikroba yang dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit di dalam tubuh ikan.

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah pemberian tepung cacing tanah sebagai immunostimulan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata untuk uji hematologi dan tidak berpengaruh untuk kelulushidupan ikan Mas. Dosis terbaik penggunaan tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan adalah sebanyak 5,7 – 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan. Penggunaan tepung cacing Tanah ini juga aman bagi lingkungan karena tidak berpengaruh pada kualitas air media.

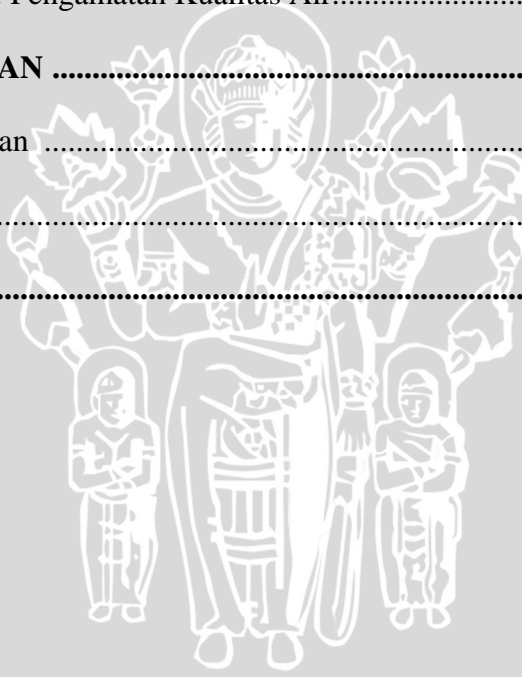
Disarankan untuk dapat meningkatkan kekebalan tubuh ikan Mas terhadap penyakit infeksi dapat digunakan tepung cacing Tanah dengan dosis 5,7 – 8 % dalam 1 Kg pakan ikan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemberian tepung cacing Tanah selama lebih dari 2 minggu sebelum ujiantang untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kekebalan tubuh ikan dan uji aktivasi makrofag.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	5
1.5 Hipotesis	5
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat Ikan Mas	7
2.1.3 Kebiasaan Makan	7
2.2 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.2.2 Habitat dan Penyebaran	9
2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	9
2.2.4 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan	10
2.3 Sistem Kekebalan	10
2.4 Darah Ikan	11
2.4.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)	13
2.4.2 Sel Darah Putih (Leukosit)	13
2.5 Cacing Tanah (<i>Lumbricus rubellus</i>)	17

2.5.1	Klasifikasi dan Morfologi	17
2.5.2	Ekologi Penyebaran	18
2.5.3	Kegunaan	19
2.5.4	Kandungan Bahan Aktif	19
III.	MATERI DAN METODE PENELITIAN	21
3.1	Materi Penelitian	21
3.1.1	Bahan-bahan Penelitian	21
3.1.2	Alat-alat Penelitian	22
3.2	Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan	22
3.2.1	Metode Penelitian	22
3.2.2	Rancangan Percobaan	23
3.3	Prosedur Penelitian	24
3.3.1	Persiapan Wadah	24
3.3.2	Persiapan Ikan Uji	24
3.3.3	Sterilisasi Alat	24
3.3.4	Pembuatan Tepung Cacing Tanah	25
3.3.5	Pencampuran Pakan Dengan Tepung Cacing Tanah	26
3.3.6	Penentuan Dosis Tepung Cacing Tanah	27
3.3.7	Pembuatan Suspensi Bakteri	28
A	Pembuatan Media	28
a	TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>)	28
b	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	28
B	Pembiakan Bakteri	29
3.3.8	Penentuan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang	29
3.3.9	Pelaksanaan Penelitian	30
3.4	Parameter Uji	31
3.4.1	Parameter Utama	31
A	Pengujian Darah	31
a	Pengambilan Darah Ikan	31
b	Penghitungan Sel Darah Putih (Leukosit)	31
c	Pembuatan Preparat Ulas Darah	32
B	Kelulus hidupan (SR)	32
3.4.2	Parameter Penunjang	32
3.5	Analisa Data	32
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1.1	Hasil Penelitian	33
4.1.1.1	Penentuan Dosis Tepung Cacing Tanah	33
4.1.1.2	Penentuan Konsentrasi Bakteri Untuk Ujiantang	33
4.1.1.3	Kelulus hidupan atau <i>Survival rate</i> (SR).....	34

4.1.4. Jumlah Total Leukosit	35
4.1.5. Diferensial Leukosit	39
a Monosit.....	41
b Limfosit.....	43
c Trombosit.....	46
d Neutrofil.....	48
4.1.6. Pengamatan Kualitas air	51
4.2. Pembahasan	51
4.2.1. Kelulus hidupan (SR / <i>Survival rate</i>)	51
4.2.2. Gejala Klinis Pada Ikan Uji Yang Terinfeksi	53
4.2.3. Jumlah Total Leukosit (Sel Darah Putih)	54
4.2.4. Diferensial Leukosit	56
a Monosit.....	57
b Limfosit.....	58
c Trombosit.....	60
d Neutrofil.....	60
4.2.5. Pengamatan Kualitas Air.....	62
V. KESIMPULAN	64
5.1 Kesimpulan	64
5.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65



I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kegiatan budidaya ikan terutama budidaya ikan air tawar, dewasa ini semakin berkembang seiring dengan perkembangan ilmu dan teknologi. Hal ini juga seiring dengan tuntutan untuk memenuhi kebutuhan pasar yang semakin hari semakin meningkat. Berbagai jenis ikan air tawar telah dapat dibudidayakan dan salah satu diantaranya adalah ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang mempunyai nilai ekonomis dan produksinya dapat mencapai di atas rata-rata ikan konsumsi lainnya. Ikan mas termasuk yang paling banyak dibudidayakan oleh petani baik budidaya pembenihan, pembesaran di kolam pekarangan atau kolam air deras (Lingga, 1994).

Kegiatan produksi ikan melalui usaha budidaya akan terganggu dengan adanya penyakit dan di daerah tropis dengan suhu yang tinggi, akan lebih sensitif. Ikan-ikan yang dibudidayakan tersebut dapat terserang oleh penyakit yang antara lain disebabkan oleh jasad biologik seperti bakteri, cendawan dan parasit. Penyakit oleh jasad biologik disebut sebagai penyakit infeksi yang dapat ditularkan ke individu ikan lainnya dengan berbagai cara.

Berjangkitnya penyakit infeksi dalam proses produksi budidaya ikan di pembenihan maupun di pembesaran mengakibatkan kerugian secara ekonomis. Hal ini signifikan dengan kegagalan panen yang dapat mencapai 100% (Alifuddin, 2003).

Menurut Sutjiati (1990), timbulnya penyakit ikan dapat disebabkan oleh fisika, kimiawi dan biologis. Penyakit yang timbul akibat penyebab fisik dan kimiawi pada umumnya tidak menular (non infeksi). Sedangkan penyakit yang ditimbulkan oleh

penyebab biologis kebanyakan menular, baik secara horizontal (dari individu ke individu lain) maupun secara vertikal (dari satu jenis ikan ke jenis ikan lain).

Tindakan pengendalian penyakit menurut Alifuddin (2003) dilakukan melalui tindak pencegahan dan pengobatan. Tindakan pengendalian penyakit infeksi harus dilakukan terhadap komponen-komponen budidaya seperti air, media, lingkungan, biota budidaya dan sarana produksi lainnya melalui desinfeksi, kemoprofilaksi, imunoprofilaksi, pengaturan tanam, pemuliaan, seleksi induk dan benih.

Dewasa ini telah banyak usaha yang dilakukan untuk menghindari serangan penyakit pada ikan budidaya terutama serangan dari bakteri pada ikan Mas. Salah satu cara yang sedang dikembangkan saat ini adalah upaya meningkatkan kekebalan tubuh pada ikan tanpa adanya efek samping dengan menggunakan immunostimulant yaitu senyawa yang merangsang aktifitas pertahanan tubuh.

Telah diketahui bahwa beberapa polisakarida mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan sistem pertahanan tubuh non-spesifik, seperti; macrofage, sel-sel natural killer. Komponen dalam serum darah, lysozyme dan interferon. Dijelaskan pula bahwa sistem kekebalan non-spesifik ini memegang peranan lebih banyak pada hewan tingkat rendah seperti ikan dan hewan air lainnya (Prajitno, 2004).

Pencegahan menggunakan bahan alami merupakan salah satu alternatif yang lebih ramah lingkungan. Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) merupakan hewan yang mempunyai banyak manfaat, baik dari kandungan gizinya yang cukup tinggi dan kandungan bahan aktif. Kandungan protein cacing tanah sekitar 72% serta mempunyai asam amino yang cukup lengkap (Palungun, 1999). Selain itu cacing tanah juga mengandung bahan antimikroba yaitu zat *Lumbricin* yang telah teruji secara *in vitro* mampu menghambat bahkan membunuh bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Zat antimikroba

ini yang akan diuji kembali apakah juga dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan sehingga selanjutnya dapat digunakan sebagai immunostimulant. Immunostimulant merupakan tindakan pencegahan yang aman untuk meningkatkan respon kekebalan pada ikan sehingga ketahanan tubuh ikan terhadap infeksi alamiah juga meningkat.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang sering timbul pada kegiatan budidaya ikan tawar terutama ikan Mas adalah adanya penyakit yang selalu menyerang ikan Mas yang dibudidayakan terutama infeksi oleh bakteri. Hal ini dapat menyebabkan menurunnya produktifitas ikan Mas karena dapat menyebabkan kematian. Tingginya infeksi oleh bakteri terhadap ikan budidaya khususnya ikan Mas, dikarenakan rendahnya kualitas media budidaya maupun kurangnya kekebalan tubuh ikan Mas dalam melawan serangan infeksi oleh bakteri.

Pemberian immunostimulan merupakan salah satu alternatif cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kekebalan tubuh ikan, sehingga ikan dapat terhindar dari serangan infeksi oleh bakteri. Bahan-bahan untuk immunostimulant pada ikan telah banyak digunakan yaitu dari jenis bahan kimia. Penggunaan bahan hewani yang lebih ramah lingkungan, saat ini masih belum banyak digunakan.

Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) memiliki zat antimikroba yaitu *Lumbricin 1*. Zat ini merupakan senyawa peptida antimikroba yang berdasarkan hasil uji *in vitro* dapat bersifat bakterisidal terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi efektif sebesar 6 % ekstrak cacing Tanah. Menurut Almendares (2001) dalam Kamiso (2004), senyawa peptida termasuk dalam 10 kelompok bahan yang dapat digunakan sebagai immunostimulan.

Pemberian tepung cacing Tanah dengan kandungan *Lumbricin 1* ini diharapkan dapat meningkatkan kekebalan tubuh pada ikan Mas. Hal ini dapat diketahui dengan melakukan pengujian pada darah ikan yaitu pada jumlah total leukosit dan differensial leukosit serta perlakuan ujiantang menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Berdasarkan uraian tersebut diatas, permasalahan yang dihadapi adalah sebagai berikut :

- Apakah pemberian tepung cacing Tanah melalui pakan memberikan pengaruh terhadap kekebalan tubuh ikan Mas setelah diujiantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*?
- Berapakah dosis yang optimal penggunaan tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap kekebalan tubuh ikan Mas dengan melakukan ujiantang menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Untuk mengetahui dosis optimal penggunaan tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi sumber informasi bagi petani ikan dan seluruh masyarakat pada umumnya, dalam menentukan jumlah dosis tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) yang optimal untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan

Mas (*Cyprinus carpio*). Dan juga sebagai alternatif bagi upaya pemanfaatan cacing Tanah untuk pencegahan penyakit pada ikan yang ramah lingkungan.

1.5 Hipotesis

Pemberian tepung cacing Tanah dengan dosis yang berbeda diduga dapat memberikan pengaruh yang berbeda terhadap peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan Mas.

Secara statistika hal tersebut dapat dinyatakan dengan:

- H₀ : Diduga pemberian tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) tidak berpengaruh terhadap peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan Mas (*Cyprinus carpio*).
- H₁ : Diduga pemberian tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) berpengaruh terhadap peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan Mas (*Cyprinus carpio*).

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit ikan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 9 Juli – 20 Agustus 2007.

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

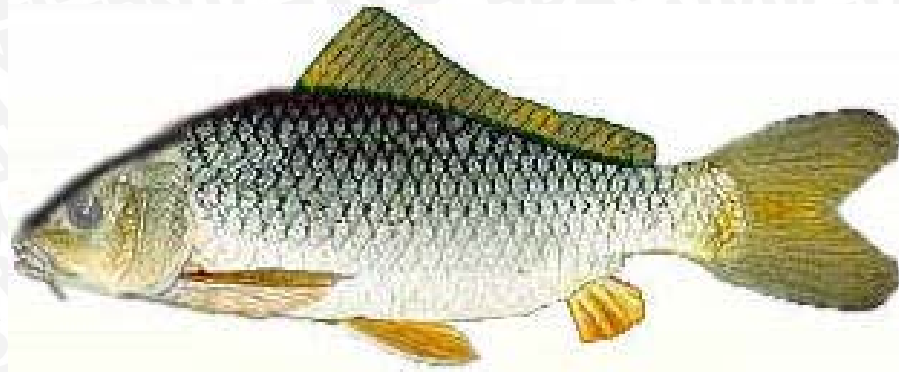
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan Mas menurut Webb (1981) adalah sebagai berikut:

Phyllum	: Chordata
Sub Class	: Vertebrata
Class	: Gnatostoma
Super Ordo	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysi
Sub Ordo	: Cyprinoidea
Family	: Cyprinidae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>

Ikan Mas memiliki bentuk badan memanjang dan sedikit pipih ke samping (*compresed*). Mulutnya terletak di ujung tengah (*terminal*) dan dapat disembulkan (Susanto dan Rochdianto, 2000), memiliki kumis (*barbel*) 2 pasang (4 buah), kadang-kadang mempunyai 1 pasang (*rudimenter*) yang digunakan untuk membedakan ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan ikan Mas Koki (*Carassius auratus*) (Santoso, 1993).

Ikan Mas bersisik besar bertipe *cycloid* (Gambar 1). Usus umumnya tidak begitu panjang jika dibandingkan dengan hewan pemakan tumbuh-tumbuhan asli. Ikan mas tidak mempunyai lambung, juga tidak bergigi, bila mencerna makanan sebagai pengganti penggerusnya adalah dengan pharing mengeras (Santoso, 1993).



Gambar 1. Gambar Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Anonymous,2007)

2.1.2 Habitat Ikan Mas

Habitat asli ikan Mas di alam bebas meliputi sungai berarus tenang sampai sedang dan di area dangkal danau. Menyukai perairan hangat dengan warna air yang agak keruh serta banyak menyediakan pakan alami. Ikan Mas menyukai suatu tempat tertentu selain karena ketersediaan pakan alami tetapi juga adanya tanaman air yang berguna sebagai tempat pemijahan (Anonymous, 2007).

Menurut Santoso (1993), ikan Mas dapat tumbuh normal, jika lokasi pemeliharaan berada pada ketinggian antara 150-1.000 meter di atas permukaan laut, suhu air 20-25 °C dan pH air antara 7-8.

2.1.3 Kebiasaan Makan

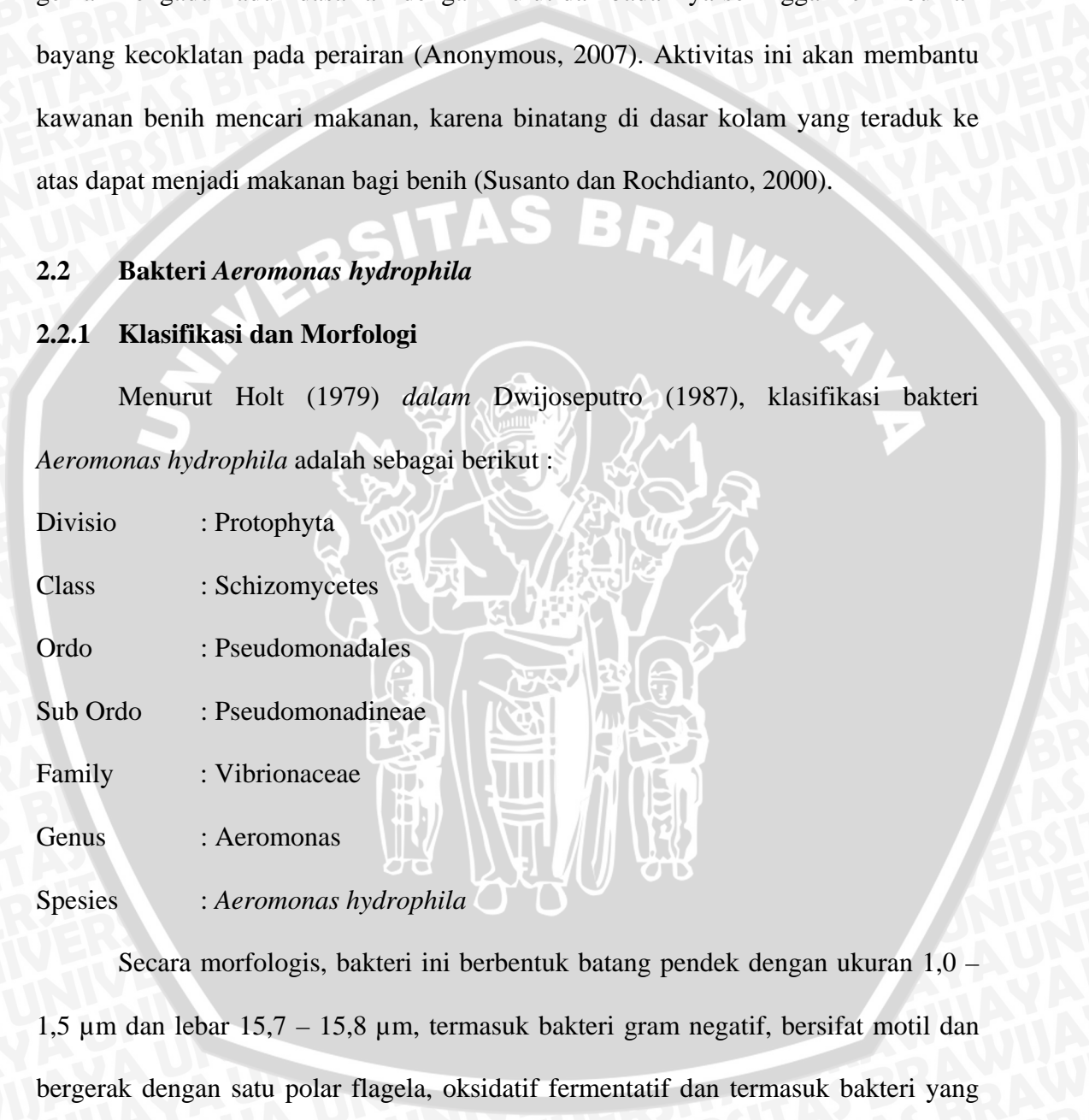
Ikan Mas termasuk pemakan segala (*omnivora*). Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan Mas senang memakan jasad pakan hewan dan tumbuhan yang hidup di dasar perairan/kolam, misalnya *Chironomidae*, *Dighochaeta*, *Tubificidae*, *Epimidae*, *Molusca*, *Copepoda* dan *Cladocera*. Hewan-hewan kecil tersebut disedot bersama lumpurnya, diambil dan dimanfaatkan sedangkan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Santoso, 1993).

Ikan Mas sering mencari sumber makanan di pematang. Cara makan ikan Mas cukup unik yakni dengan membuka mulutnya lebar-lebar dan kemudian menyedot makanannya seperti alat penghisap. Dengan cara makan seperti ini, maka ikan Mas gemar mengaduk-aduk dasar air dengan mulut dan badannya sehingga menimbulkan bayang kecoklatan pada perairan (Anonymous, 2007). Aktivitas ini akan membantu kawanan benih mencari makanan, karena binatang di dasar kolam yang teraduk ke atas dapat menjadi makanan bagi benih (Susanto dan Rochdianto, 2000).

2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Holt (1979) dalam Dwijoseputro (1987), klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut :



Divisio	: Protophyta
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadineae
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 dan bergerak dengan satu polar flagela, oksidatif fermentatif dan termasuk bakteri yang fakultatif anaerobik serta merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat

sel darah (Kabata, 1985). Pada dasarnya bakteri ini bersifat oportunistik karena penyakit yang disebabkan olehnya mewabah pada ikan-ikan yang mengalami stress atau pada pemeliharaan dengan padat tebar tinggi (Irianto, 2004).

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu spesies bakteri yang hidup di lingkungan perairan tawar dan perairan payau. Perairan yang mengandung bahan organik tinggi dan bersuhu 15 – 30 °C serta tingkat pH 5,5 – 9 menjadi tempat yang ideal bagi perkembangan dan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* (Afrianto dan Liviawati, 1998).

Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* ini banyak menyerang ikan di daerah tropis dan subtropis dibandingkan di daerah dingin. Pada daerah tropis dan subtropis penyakit *Haemorrhagic septicaemia* pada umumnya muncul pada musim kemarau (panas) karena pada musim tersebut kandungan bahan organik cukup tinggi. *Aeromonas* ini banyak ditemukan pada insang, kulit, hati, ginjal dan jantung (Kabata, 1985).

2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen (Kabata, 1985). Bakteri akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Dwijoseputro, 1987). Dapat tumbuh pada kisaran suhu 15 - 30 °C dengan pH 5,5 – 9. pembiakannya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1988).

2.2.4 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan

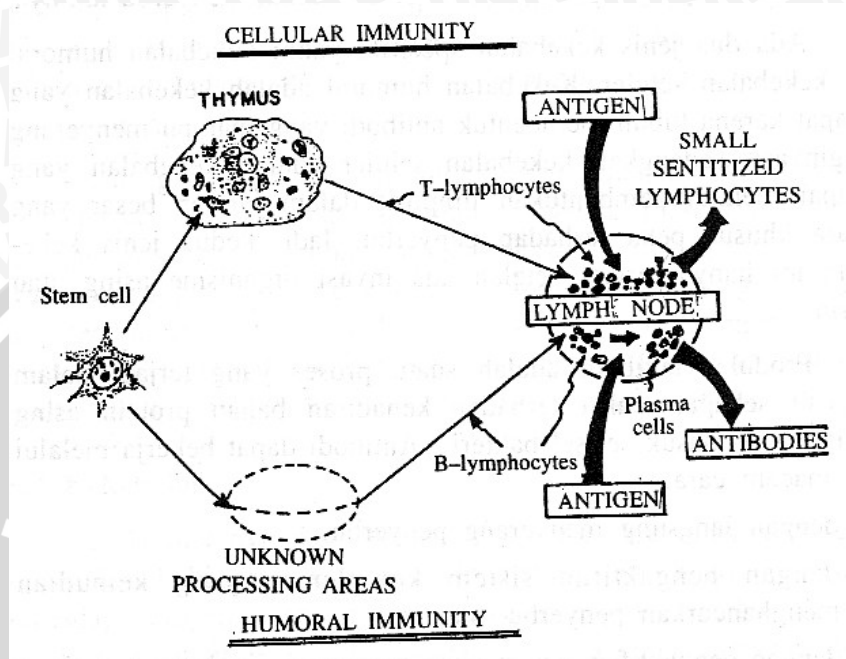
Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat oportunistis yaitu mampu berkembangbiak menjadi ganas pada keadaan optimum (Sutjiati, 1990). Penularan penyakit ini dapat melalui kontak langsung dengan ikan sakit, melalui alat, penanganan, bagian sisa-sisa tubuh ikan, hewan atau tumbuhan air serta aliran air bekas ikan yang terserang. Menurut White (2006), *Aeromonas hydrophila* akan menunjukkan tanda-tanda pada ikan yang terserang sebagai berikut :

- Warna tubuh berubah menjadi agak gelap
- Kulitnya menjadi kesat dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*haemorrhagic*)
- Kemampuan berenang menurun dan sering berenang di permukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernafas.
- Sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limfa.
- Seluruh siripnya rusak dan insangnya berwarna keputih-putihan

2.3 Sistem Kekebalan

Sistem kekebalan adalah kemampuan organisme untuk melawan semua jenis organisme atau toksin yang cenderung merusak jaringan atau organ. Pada organisme sistem kekebalan ada dua yaitu kekebalan bawaan dan kekebalan didapat. Kekebalan bawaan yaitu kekebalan sebagai akibat proses-proses umum. Kekebalan didapat yaitu kekebalan khusus yang membentuk antigen dan membuat limfosit untuk segera menyerang dan menghancurkan organisme spesifik atau toksin. Kekebalan ini dibagi menjadi dua yaitu kekebalan humoral yaitu kekebalan yang didapatkan karena tubuh

membentuk antibodi yang mampu menyerang penginvansi dan kekebalan seluler yaitu kekebalan yang dicapai melalui pembentukan limfosit dan makrofag dalam jumlah yang besar (Fujaya, 2004).



Gambar 2. Pembentukan antibodi dan limfosit
(Guyton, 1992 dalam Fujaya, 2004)

Pada ikan, respon kekebalan baru terbentuk sempurna manakala ikan sudah dewasa. Meskipun pada larva atau ikan muda sudah terbentuk, tetapi kerjanya kurang efisien, sehingga rentan terhadap penyakit. Pertahanan bawaan utama pada ikan yaitu berupa sel-sel fagositik yaitu monosit, makrofag, dan granulosit (Irianto, 2004).

2.4 Darah Ikan

Darah merupakan cairan yang memiliki fungsi membawa nutrisi, transportasi oksigen dan karbon dioksida, menjaga keseimbangan suhu tubuh serta berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh. Fungsi utama darah adalah untuk mensuplai

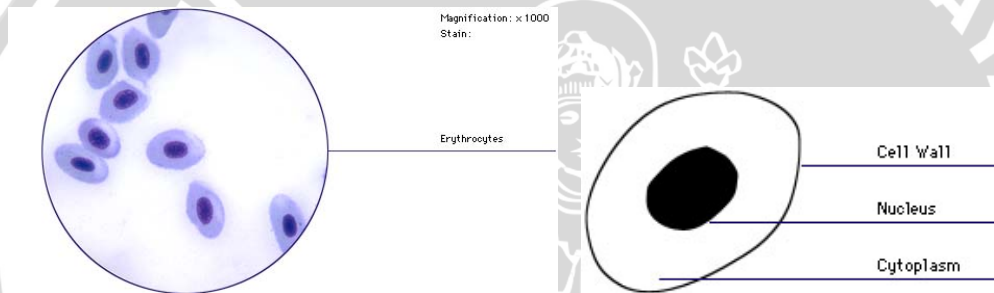
nutrien seperti, glukosa dan elemen-elemen penting serta oksigen ke jaringan dan untuk mengangkut hasil buangan metabolisme seperti karbon dioksida dan asam laktat. Darah terdiri dari beberapa jenis korpuskula yang membentuk 45% bagian dari darah. Bagian 55% yang lain berupa cairan kekuningan yang membentuk medium cairan darah yang disebut plasma darah (Wikipedia, 2007).

Darah ikan terdiri dari dua kelompok besar yaitu sel dan plasma. Komponen dari plasma yaitu fibrinogen, ion-ion organik dan aneka komponen organik untuk fungsi metabolik (Fujaya, 2004). Sel terdiri atas sel-sel darah yang terdiri atas sel darah merah (*eritrosit*) dan sel darah putih (*leukosit*) yang tersuspensi dalam plasma yang diedarkan keseluruh tubuh melalui sistem sirkulasi tertutup (Bijanti, 2005). Alifuddin (2003) menyatakan bahwa gambaran darah ikan memberikan informasi yang sangat penting tentang status kesehatan ikan. Pemeriksaan darah rutin meliputi tentang kuantitas sel darah merah dan sel darah putih; kadar hemoglobin, hematokrit.

Hematologi dan patologi merupakan salah satu cara diagnostik penting untuk menentukan status kesehatan ikan (Angka, Priosoeryanto, Lay dan Harris., 2004). Hematologi merupakan ilmu pengetahuan yang sangat penting dalam imunologi, karena mempelajari morfologi, fisiologi, biokimia dan bentuk jaringan darah (Anderson, 1974). Hematologi sangat berhubungan dengan patologi, terutama untuk memperoleh gambaran kondisi kesehatan ikan apakah ikan dalam keadaan sehat atau sakit (Johnny, Zafran, Roza, dan Mahardika, 2003). Sedangkan patologi adalah kajian tentang penyakit atau kajian tentang adaptasi yang tak cukup terhadap perubahan-perubahan lingkungan eksternal dan internal (Spector, 1993).

2.4.1 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. Jumlah sel darah merah pada masing-masing spesies juga berbeda, tergantung aktivitas ikan tersebut (Fujaya, 2004). Rendahnya jumlah sel darah merah menunjukkan ikan menderita anemia, kerusakan ginjal. Sedangkan tingginya jumlah sel darah merah menandakan ikan dalam keadaan stress (Nabib dan Pasaribu, 1989).



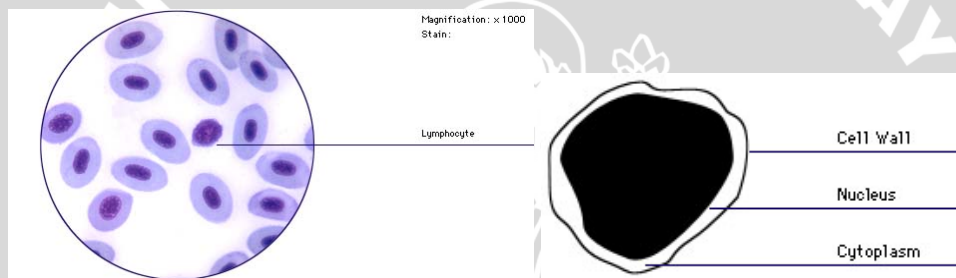
(*cell wall* = dinding sel)

Gambar 3. Gambar Sel Darah Merah (Eritrosit) (Anonymous, 2005)

2.4.2 Sel Darah Putih (*Leukosit*)

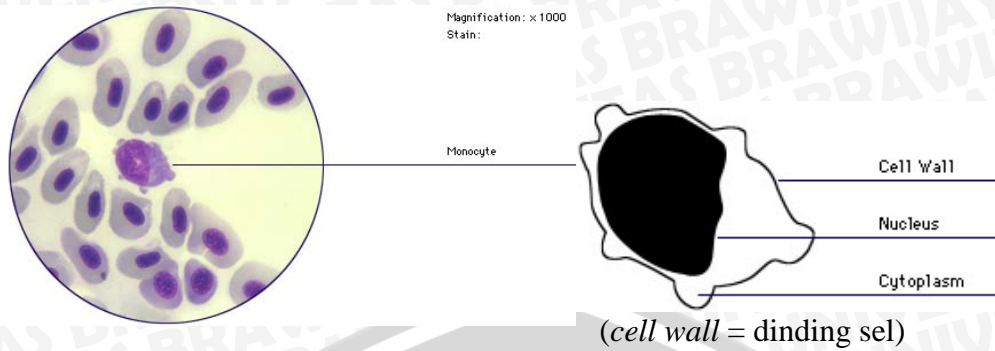
Sel darah putih berfungsi untuk membantu tubuh melawan berbagai infeksi, sebagai bagian dari sistem kekebalan tubuh (Wikipedia, 2007). Ikan memiliki sel-sel darah putih yang lebih banyak dibanding manusia yaitu terdapat $137.000/\text{mm}^3$ – $798.000/\text{mm}^3$ sel darah putih (Fujaya, 2004). Bijanti (2005) mengemukakan bahwa leukosit ikan terbagi menjadi 2 bagian besar yaitu granulosit dan agranulosit. Agranulosit terdiri dari limfosit, monosit dan trombosit, sedangkan granulosit terdiri dari basofil, neutrofil dan eosinofil.

Limfosit tidak bersifat fagositik tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit. Selain itu, suhu yang rendah dapat menurunkan kadar limfosit (Fujaya, 2004). Limfosit mempunyai peranan dalam respon imunitas. Sel-sel ini bersirkulasi dalam darah dan cairan limfe pada hewan vertebrata dimana jumlahnya pada ikan lebih besar daripada jumlahnya pada mamalia dengan kepadatan 48.000 sel/mm³ pada ikan dan pada manusia hanya 2.000 sel/mm³ (Nabib dan Pasaribu, 1989).



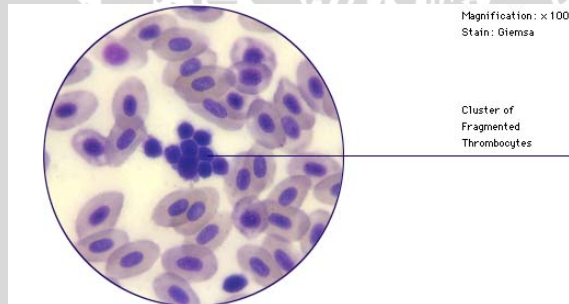
Gambar 4. Gambar Limfosit (Anonymous, 2005)

Monosit lebih kuat dibandingkan dengan neutrofil dalam memfagositosis bakteri, bahkan dapat memfagositasi partikel yang lebih besar. Karena itu, monosit matang disebut makrofag dan mampu memfagosit 100 bakteri (Fujaya, 2004). Makrofag dihasilkan oleh organ thymus, ginjal, hati dan limfa (Bijanti, 2005). Monosit ikan berbentuk bulat oval, intinya terletak di tengah sel dengan sitoplasmanya tidak bergranula dan meningkatnya monosit terjadi karena adanya radang (Angka *et al*, 2004).



Gambar 5. Gambar Monosit (Anonymous, 2005)

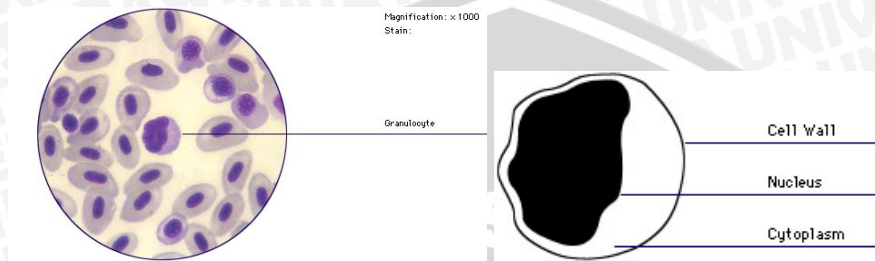
Trombosit merupakan sel tanpa bentuk dengan inti besar dan berbentuk bola (Fujaya, 2004). Trombosit berperan penting dalam proses pembekuan darah dan juga berfungsi untuk mencegah kehilangan cairan tubuh pada kerusakan-kerusakan di permukaan (Nabib dan Pasaribu, 1989). Trombosit meningkat karena adanya *hemorrhagi* dan tukak karena trombosit diproduksi agar darah membeku guna mencegah terjadinya pendarahan lebih banyak (Angka *et al.*, 2004).



Gambar 6. Gambar Trombosit (Anonymous, 2005)

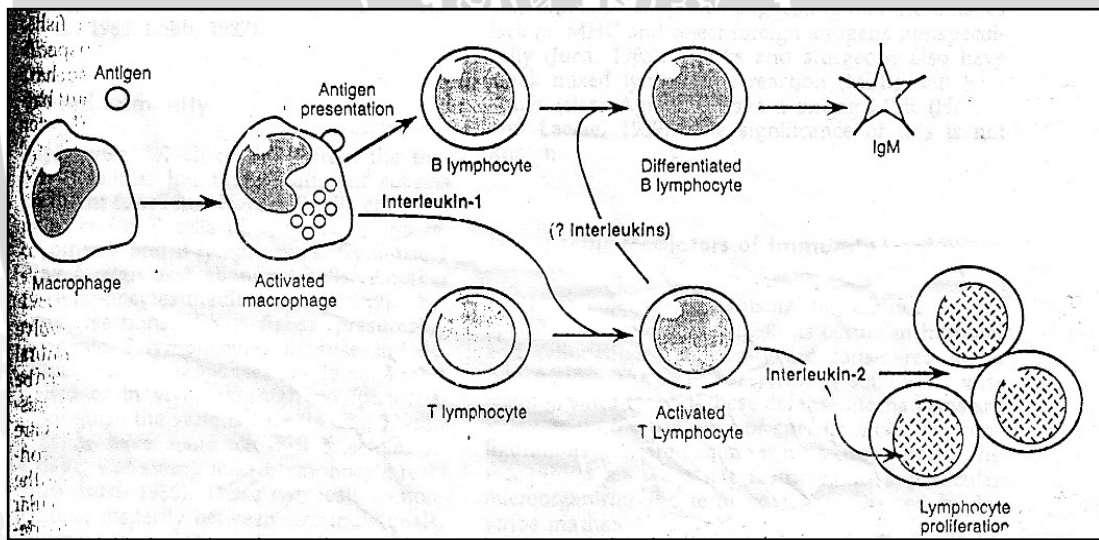
Neutrofil berhubungan dengan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri serta proses peradangan kecil lainnya, serta biasanya juga yang memberikan tanggapan pertama terhadap infeksi bakteri; aktivitas dan matinya neutrofil dalam jumlah yang banyak menyebabkan adanya nanah. Eosinofil terutama berhubungan dengan infeksi parasit, dengan demikian meningkatnya eosinofil menandakan banyaknya parasit.

Basofil terutama bertanggung jawab untuk memberi reaksi alergi dan antigen dengan jalan mengeluarkan histamin kimia yang menyebabkan peradangan (Wikipedia, 2007).



(cell wall = dinding sel)

Gambar 7. Gambar Neutrofil (Anonymous, 2005)



Gambar 8. Interaksi antara makrofag, antigen dan limfosit pada ikan yang membentuk sistem kekebalan (Stoskopf, 1992)

2.5 Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

2.5.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi cacing tanah menurut Linnaeus (1758) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Annelida
Class	: Clitellata
Sub Class	: Oligochaeta
Ordo	: Haplotaxida
Family	: Lumbricidae
Genus	: Lumbricus
Species	: <i>Lumbricus rubellus</i>

Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) tergolong dalam kelompok hewan avertebrata. Tubuhnya terdapat segmen luar dan dalam, berambut, tidak mempunyai kerangka luar, tubuhnya dilindungi oleh kutikula (kulit bagian luar), tidak memiliki alat gerak dan tidak memiliki mata (Palungkun, 1999).

Permukaan tubuh dilapisi oleh lendir yang dihasilkan oleh kelenjar epidermis. Fungsi lendir adalah untuk mempermudah pergerakan dan pertahanan diri. Pada tubuhnya terdapat seta. Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) tidak memiliki mata tetapi ditubuhnya terdapat prostomium. Prostomium merupakan organ saraf dan berbentuk bibir. Prostomium terletak pada bagian depan tubuhnya dan pada bagian akhir tubuhnya terdapat anus.

Pernafasan cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) menggunakan kulit. Oksigen yang digunakan untuk proses metabolisme tubuh diambil dari udara dengan bantuan

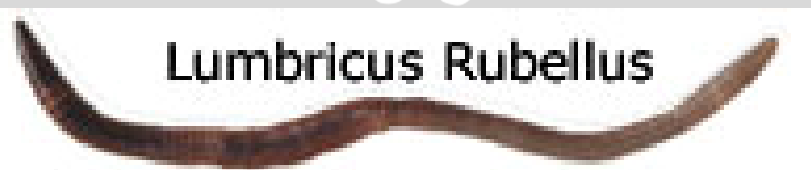
pembuluh darah yang terdapat pada bagian bawah kutikula. Cacing dewasa mempunyai alat kelamin yang disebut *klitelum*.

Lumbricus rubellus merupakan cacing berukuran relatif kecil dengan panjang antara 4-6 cm. Bagian punggungnya berwarna merah violet. Selain warna dasar tersebut cacing ini juga memiliki warna *indescent* atau warna pelangi. Pada umumnya cacing ini akan mencapai usia dewasa pada umur 179 hari, sedangkan umumnya bisa mencapai 2,5 tahun (Hoffmester, 1843).

2.5.2 Ekologi Penyebaran

Dalam klasifikasi biologi, cacing tanah termasuk kelas *Oligochaeta*, phylum *Annelida*. Phylum *Annelida* mempunyai 1.800 spesies cacing tanah yang dikelompokkan menjadi lima famili yang tersebar di seluruh dunia. Jumlah terbesar ada di Amerika Utara, Eropa dan Asia Barat, untuk famili *Lumbricidae* dengan 220 spesies.

Cacing tanah dikelompokkan dalam tiga plasma yaitu; *epigeic*, *endogeic* dan *anecic*. *Epigeic* biasanya hidup di atas permukaan tanah dan memakan kotoran. *Endogeic* hidup di bawah permukaan tanah secara horizontal. *Anecic* hidup di lapisan tanah lebih dalam.



Gambar 9. Gambar Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) (Pacyna, 2003)

2.5.3 Kegunaan

Menurut Palungkun (1999), cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) mempunyai banyak manfaat yaitu sebagai pupuk organik, pendaur ulang limbah, bahan baku pakan, bahan baku obat dan kosmetik. Sebagai bahan baku pakan, obat-obatan serta kosmetik biasanya cacing dibuat dalam bentuk tepung cacing.

Cacing biasanya digunakan sebagai penghasil pupuk organik dapat diambil dari sisa kotoran cacing (kascing). Kascing mengandung berbagai bahan atau komponen yang bersifat biologis maupun kimiawi sangat dibutuhkan untuk perkembangan dan pertumbuhan tanaman. Komponen yang terkandung dalam kascing ialah hormon *giberelin*, *sitokinin* dan *auxin*. Sebagai obat, cacing tanah bisa sebagai obat penyakit tifus dengan pengolahan yang sederhana. Ekstrak cacing tanah mengandung enzim lumbrikinase yang dapat mengobati gangguan peredaran darah (Palungkun, 1999).

2.5.4 Kandungan Bahan Aktif

Cacing Tanah memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi, terutama kandungan proteinnya yang mencapai 64 – 76 % dan kandungan gizi lainnya yaitu lemak, kalsium, fosfor, dan serat kasar (Palungkun, 1999). Cacing Tanah sangat mudah dicerna dalam alat pencernaan dan mudah pula dipecah menjadi asam amino yang berguna untuk tubuh. Hampir semua protein daging cacing tanah dapat diserap oleh tubuh pemakannya. Lagipula asam aminonya mempunyai kualitas yang sangat baik (Simanjuntak, 1992). Protein yang sangat tinggi pada cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terdiri setidaknya sembilan macam asam amino esensial dan empat macam asam amino nonesensial.

**Tabel 1. Kandungan Gizi Dari Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)
(Palungun, 1999)**

Bahan	Komposisi (%)
Protein	64-76
Lemak	7-10
Kalsium	0,55
Fosfor	1
Serat Kasar	1,08

Lengkapnya jenis asam amino yang terkandung memberikan indikasi bahwa cacing tanah juga mengandung berbagai jenis enzim yang bermanfaat bagi kesehatan. Berdasarkan uji laboratorium tepung cacing Tanah mengandung enzim lumbrikinase, perokdase, katalase dan selulose yang sangat baik untuk pengobatan penyakit degeneratif; diabetes militus, kolestrol tinggi dan reumatik. Komponen lain adalah zat antipretik (penurun panas), yaitu asam arakhidonat, antipurin, antiracun dan vitamin. Kandungan zat –zat itulah yang menyebabkan cacing tanah mampu menghambat pertumbuhan bahkan mematikan bakteri (Anonymous,2004)

Cacing tanah dapat digunakan sebagai obat tradisional salah satunya adalah obat penurun panas bagi penderita tifus. Daya antipretik dari protein hasil ekstraksi cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan *Pheretima* sp dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae*, *Stephylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Peptida antimikroba dari cacing tanah *Lumbriucus rubellus* disebut *Lumbricin I* yang merupakan peptida antimikroba yang mengandung asam amino prolin 15% dari total berat kering dan mempunyai berat molekul 7,231 kDa (Waluyo, 2005).

III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan-bahan Penelitian

- Ikan Mas dengan ukuran panjang total 10-12 cm (72 ekor)
- Tepung cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)
- Biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila*
- Pakan buatan (pellet FF 999)
- Putih telur
- TSA (*Tryptic Soya Agar*)
- NB (*Nutrient Broth*)
- Akuades
- Metanol
- Pewarna Giemsa
- Larutan Turk's
- Alkohol
- Desinfektan
- Tissue dan Tissue lensa
- Kapas
- Minyak Imersi
- Na sitrat
- Aluminium foil
- Kertas label

3.1.2 Alat-alat Penelitian

- | | | |
|---------------------------------|------------------|------------------|
| - Bak plastik 5 Liter (12 buah) | - Blender | - Gelas ukur |
| - Baskom | - Tabung reaksi | - Kulkas |
| - Panci | - Nampan | - Inkubator |
| - Kompor | - Aerator | - Autoclave |
| - Selang siphon | - Mikroskop | - Bunsen |
| - Pipet volume | - Haemositometer | - Jarum Ose |
| - Pipet Thoma Leukosit | - Cover glass | - Erlenmeyer |
| - Pipet tetes | - Petri Disc | - Beacker glass |
| - Spatula | - Objec glass | - Tube |
| - Jarum suntik | - Syringe | - Hot Plate |
| - Thermometer | - pH paper | - Oven |
| - Timbangan | - DO meter | - Kamera Digital |

3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan

3.2.1 Metode Penelitian

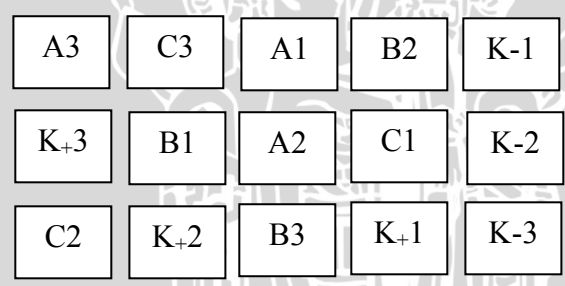
Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Teknik pengumpulan

data dilakukan dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 1988).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena media yang digunakan homogen, artinya keragaman antara satuan percobaan tersebut terkecil, sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanyalah perlakuan dan galat (Hanafiah, 1991).

Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan, dua kontrol yaitu kontrol negatif dan kontrol positif, dan 3 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah perbedaan dosis ekstrak cacing tanah. Ulangan yang dipergunakan sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian sebagai berikut (Gambar 1).



Gambar 10. Denah Percobaan

- Keterangan :
- A, B, C = Perlakuan
 - K(+) = Kontrol Positif
 - K(-) = Kontrol Negatif
 - 1, 2, 3 = Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Wadah

Wadah yang digunakan berupa bak plastik kapasitas 5 Liter air sebanyak 15 buah. Sebelum digunakan, wadah dicuci bersih, diberi desinfektan dan dikeringkan selama sehari. Kemudian diisi air bersih sebanyak 4 Liter dan dilengkapi dengan instalasi aerasi untuk menjaga ketersediaan oksigen.

3.3.2 Persiapan Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan Mas yang diperoleh dari Petani di Kabupaten Malang. Dipilih ikan Mas yang sehat sebanyak 75 ekor dengan ukuran panjang total 10-12 cm kemudian dilakukan aklimatisasi pada ikan selama 7 hari pada akuarium penampung. Ini dilakukan untuk membiasakan ikan pada kondisi di akuarium. Selama aklimatisasi ikan diberi pakan pellet secukupnya dan diberikan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pukul 09.00 WIB dan pukul 15.00 WIB, serta dilakukan penyiponan tiap pagi dan sore hari serta pergantian air sebanyak 25% tiap 2 hari sekali.

3.3.3 Sterilisasi Alat

Sebelum digunakan, alat-alat disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi alat menurut Dwijoseputro (1987), adalah sebagai berikut:

- Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dengan sabun dan dikeringkan sampai benar-benar kering kemudian dibungkus dengan kertas koran dan diikat dengan benang agar kertas pembungkus tidak terlepas selama proses sterilisasi berlangsung.

- Air dituang secukupnya ke dalam autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam autoclave dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.
- Kompor pemanas dinyalakan kemudian beberapa saat manometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga manometer menunjukkan angka 1 kembali.
- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai 121 °C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit.
- Kompor dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan, tunggu beberapa saat sampai thermometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoclave dengan zig-zag.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil dan disimpan dalam inkubator.

3.3.4 Pembuatan Tepung Cacing Tanah

Tepung cacing tanah dibuat dengan cara sebagai berikut (Anonymous, 2006) :

- Pencucian pertama. Cacing tanah dicuci bersih dengan menggunakan air bersih, dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran, sisa-sisa tanah yang melekat di tubuh dan lendir yang merupakan salah satu penyebab utama bau amis.
- Perebusan. Cacing tanah bersih direbus dalam air mendidih selama 30 detik, dengan tujuan selain untuk menghilangkan lendir juga agar protein, lemak, dan karbohidrat menjadi lebih mudah dicerna. Penggunaan air yang berlebihan dapat melarutkan mineral dan vitamin dalam cacing Tanah.

- Pemotongan. Cacing hasil rebusan ditiriskan, kemudian dipotong menjadi ukuran 1 cm dengan tujuan untuk memperluas permukaan sehingga waktu pengeringan lebih singkat.
- Pencucian kedua. Bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih tersisa dari tahap pemotongan.
- Pengeringan. Dilakukan dengan pengering mekanis/oven pada suhu 50 °C selama 4 jam. Pada tahap ini suhu alat pengering harus diperhatikan jangan sampai melebihi 50 °C. Suhu pengering yang terlalu tinggi akan menyebabkan “case hardening” yaitu suatu keadaan dimana bagian luar bahan sudah kering, namun bagian dalamnya masih basah. Hal ini akan mempengaruhi mutu tepung cacing yang dihasilkan.
- Penggilingan. Cacing yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan alat penepung/penghancur mekanis sehingga diperoleh tepung cacing.

3.3.5 Pencampuran Pakan Dengan Tepung Cacing Tanah

Tepung cacing Tanah diberikan pada ikan uji melalui pakan yaitu dengan cara, pakan terlebih dahulu ditimbang sesuai dengan kebutuhan, kemudian dicampurkan dengan tepung cacing Tanah sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Pencampuran ini dibantu dengan putih telur sebagai perekat tepung cacing Tanah pada butiran pellet (pakan buatan). Pakan campuran ini kemudian dikering anginkan terlebih dahulu sebelum diberikan pada ikan uji.

Pakan buatan yang digunakan adalah pellet FF 999 produksi PT. Charoenpokphand Indonesia dengan kandungan gizi seperti pada tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Kandungan Gizi Pellet FF 999

Bahan	Komposisi (%)
Protein	38
Lemak Kasar	4
Serat Kasar	6
Kadar Abu	16
Kadar air	12

Sumber : Tertera pada kemasan

3.3.6 Penentuan Dosis Tepung Cacing Tanah

Dosis tepung cacing tanah yang digunakan, ditentukan dengan cara terlebih dahulu melakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk mengetahui dosis penggunaan tepung cacing tanah yang dapat meningkatkan jumlah sel darah putih pada darah ikan Mas. Dosis tepung cacing tanah yang digunakan adalah sebanyak 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, dan 10 % /Kg pakan.

Ikan dipelihara dalam bak plastik kapasitas 5 liter, diisi air sebanyak 3 liter dan 3 ekor ikan. Ikan dipelihara selama 1 minggu (7 hari), diberi pakan dengan campuran pellet dan tepung cacing 3 kali sehari yaitu pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00 WIB, sebanyak 4 % dari bobot biomasa ikan. Pada hari ke-8, ikan diambil darahnya untuk dilakukan pemeriksaan pada diferensial leukositnya. Selama pemeliharaan tetap dilakukan kontrol terhadap kualitas air dengan menyipon pada pagi dan sore hari, dilakukan juga pergantian air tiap 3 hari sekali, serta dilakukan pengamatan terhadap suhu, pH, dan kandungan oksigen terlarut.

3.3.7 Pembuatan Suspensi Bakteri

A Pembuatan Media

a TSA (*Tryptic Soya Agar*)

- Melarutkan 20 gram TSA dalam 500 ml aquades steril dalam erlenmeyer steril, diaduk rata kemudian dididihkan di atas hot plate sambil terus diaduk sampai berwarna bening.
- Larutan yang telah mendidih, ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- Kemudian larutan dituang ke dalam petridisc steril setinggi 3 mm. Penuangan dilakukan di dekat bunsen, agar tidak terkontaminasi organisme lain. Tepi petridisc di panaskan dengan bunsen setelah dituang larutan.
- Media dibiarkan mengeras kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 30 °C, dan dapat digunakan setelah 24 jam. Media yang tidak langsung digunakan, dapat disimpan di dalam kulkas/lemari pendingin, dibungkus satu-satu dengan kertas koran dan diletakkan dengan posisi tutup petridisc berada dibagian bawah untuk menghindari tetesan air kondensasi pada media.
- Media yang telah disimpan, jika akan digunakan, terlebih dahulu di letakkan dalam inkubator agar suhu media sama dengan suhu lingkungan.

b NB (*Nutrient Broth*)

- Melarutkan 6,5 gram NB dengan aquades steril dalam erlenmeyer, dan diaduk hingga larut sempurna dan berwarna bening.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian media disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

- Media dibiarkan mendingin hingga bersuhu 30 °C.
- Inokulasi bakteri dilakukan dilakukan pada media yang dingin, karena bakteri akan mati jika terkena suhu yang panas.
- Media yang tidak langsung di pakai, dapat disimpan dalam kulkas/lemari pendingin agar bertahan lama.

B Pemiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

- Pada media TSA. Bakteri dari biakan murni diambil dengan jarum ose yang sebelumnya dipijarkan dengan bunsen. Kemudian diinokulasikan pada media dengan metode goresan secara zig-zag.
- Media yang telah diinokulasikan bakteri, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam
- Pada media NB. Media dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 4 mm. Kemudian ditanamkan bakteri dari biakan murni sebanyak 5 ose dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.

3.3.8 Penentuan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang

Untuk menentukan konsentrasi bakteri yang akan digunakan pada uji tantang, dilakukan penelitian pendahuluan dengan cara melakukan infeksi pada ikan uji dengan konsentrasi bakteri yang berbeda. Ikan diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan kepadatan 10^4 , 10^5 , dan 10^6 sel/ml dengan metode perendaman dalam 2,5 liter air dengan ikan uji sebanyak 4 ekor per perlakuan. Selanjutnya dilakukan pengamatan selama 5 hari. Konsentrasi bakteri yang digunakan untuk uji tantang adalah konsentrasi bakteri dengan kematian 50 % pada ikan uji. Hasil yang diperoleh digunakan untuk penginfeksi ikan saat uji tantang.

3.3.9 Pelaksanaan Penelitian

Tepung cacing tanah dicampur dengan pakan buatan (pellet) dengan dosis yang telah ditentukan. Pakan tersebut kemudian diberikan dua kali sehari yaitu pada pagi (pukul 08.00 WIB), dan sore hari (pukul 16.00 WIB) sebanyak 4% dari bobot biomassa. Pakan diberikan selama 14 hari dan tetap dilakukan penyiponan pada pagi dan sore hari serta pergantian air sebanyak 25% tiap hari untuk menjaga kualitas airnya. Pada 7 hari pertama, dilakukan pengambilan darah untuk melihat gambaran darahnya dengan membuat preparat ulas darah. Kemudian pada hari ke-15, dilakukan uji tantangan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan konsentrasi kepadatan bakteri yang telah ditentukan, yaitu 10^6 sel/ml.

Penginfeksian dilakukan dengan metode perendaman. Diinfeksi selama ± 24 jam, kemudian dilakukan pemeliharaan selama 7 hari dengan tetap diberi pakan pellet yang dicampur dengan tepung cacing tanah sebanyak 4 % dari bobot tubuh. Pemberian pakan pellet dilakukan dua kali sehari yaitu pada pukul 08.00 WIB dan pukul 16.00 WIB. Penginfeksian dengan 10^6 sel/ml bakteri *Aeromonas hydrophila* dirasa kurang memperlihatkan tanda-tanda infeksi pada ikan uji. Terbukti dengan pengamatan SR yang memberikan nilai rata-rata 100 %. Kemudian dilakukan infeksi kembali pada ikan uji dengan meningkatkan konsentrasi bakteri menjadi 10^7 sel/ml selama 24 jam. Dua hari kemudian mulai terlihat tanda-tanda infeksi pada ikan uji dan mulai terjadi kematian dengan SR rata-rata 66,6 – 93,3 %. Kemudian dilakukan pengujian darah yaitu pada jumlah total leukosit dan differensial leukosit.

Selama perlakuan dilakukan pengamatan terhadap kualitas air yaitu suhu, pH, dan kandungan oksigen terlarut dalam masing-masing wadah pemeliharaan.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

A Pengujian Darah

a Pengambilan Darah Ikan

Dilakukan uji darah pada 7 hari pertama perlakuan dan 7 hari kemudian setelah dilakukan ujiantang bakteri. Darah diambil dari pembuluh darah bagian caudal. Ikan disuntik dari bagian tengah tubuh dibelakang sirip anal sampai jarum menyentuh tulang belakang. Darah dihisap perlahan sejumlah yang dibutuhkan. Jarum syringe dilepas dan darah dipindahkan ke dalam tube (Bijanti, 2005).

b Penghitungan Sel Darah Putih (Leukosit)

Jumlah leukosit dihitung dengan cara menghisap sampel darah menggunakan pipet berskala sampai 0,5, dilanjutkan dengan menghisap larutan Turk's sampai skala 11, goyangkan pipet agar bercampur homogen (pengenceran 1:20). Tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam Haemositometer dan ditutup dengan kaca penutup. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak besar Haemositometer dan jumlahnya dihitung dengan rumus (Svobodova, 1991) :

$$SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Dimana : SDP = Jumlah leukosit

A = Jumlah sel leukosit terhitung

N = Jumlah kotak Haemositometer yang diamati

V = Volume kotak Haemositometer yang diamati

Fp = Faktor pengenceran

c **Pembuatan Preparat Ulas Darah**

Jenis leukosit dihitung dengan cara membuat sediaan ulas darah, kemudian dikeringudarkan dan difiksasi dengan metanol. Sediaan tersebut selanjutnya dibilas dengan akuades, dikeringkan, dan diwarnai dengan pewarna giemsa. Kelebihan pewarna dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan (Gandasoebrata, 1967)

B **Kelulushidupan (*Survival Rate/SR*)**

Setelah dilakukan ujiantang bakteri pada ikan uji, kemudian dilakukan pengukuran kelulushidupan ikan Mas dengan cara perhitungan berdasarkan rumus Effendi (1979) adalah sebagai berikut :

$$SR = \frac{\sum \text{benih yang hidup pada akhir penelitian}}{\sum \text{benih pada awal percobaan}} \times 100 \%$$

3.4.2 **Parameter Penunjang**

Selama perlakuan, setiap hari dilakukan juga pengukuran kualitas air yang digunakan sebagai media pemeliharaan benih ikan Mas yang meliputi suhu, pH (derajat keasaman), dan DO (*Disolved oxygen* / kandungan oksigen dalam air).

3.5 **Analisa Data**

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur dilakukan Analisis Sidik Ragam (Uji F). Apabila nilai uji F berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik pada taraf kepercayaan 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil, digunakan analisis regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dari fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Penentuan Dosis Tepung Cacing Tanah

Dosis tepung cacing tanah yang digunakan ditentukan melalui penelitian pendahuluan menggunakan 5 dosis. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, diperoleh dosis tepung cacing tanah yang digunakan yaitu sebesar 4 %, 6 % dan 8 % tepung cacing tanah dalam 1 Kg pakan ikan. Hasil perhitungan diferensial leukosit pada penelitian pendahuluan disajikan pada tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Data Persentase Diferensial Leukosit Ikan Mas Setelah Pemberian Tepung Cacing Tanah Dengan Dosis Yang Berbeda Selama 1 Minggu.

Perlakuan	Persentase (%)			
	M	L	T	N
K (0%)	Tidak terlihat			
A (2%)	25	35	40	0
B (4%)	35	42	23	0
C (6%)	40	46	14	0
D (8%)	44	48	7	1
E (10%)	36	28	36	0

Keterangan : M = Monosit
 L = Limfosit
 T = Trombosit
 N = Neutrofil

4.1.2 Penentuan Konsentrasi Bakteri untuk Uji Tantang

Konsentrasi bakteri yang digunakan untuk uji tantang ditentukan dengan melakukan penelitian pendahuluan. Dari hasil penelitian pendahuluan, diperoleh konsentrasi bakteri yang digunakan untuk uji tantang yaitu 10^7 sel/ml. Hal ini

berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan selama 5 hari, sehingga diperoleh pada konsentrasi bakteri sebesar 10^7 sel/ml, terjadi kematian pada ikan uji sebesar 50 %.

4.1.3 Kelulushidupan atau *Survival Rate* (SR)

Kelulushidupan atau *Survival Rate* (SR) pada ikan Mas yang diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dinyatakan dalam persentase (%) menunjukkan seberapa besar ketahanan tubuh ikan terhadap serangan bakteri tersebut setelah diberi perlakuan pakan buatan yang dicampur dengan tepung cacing Tanah. Nilai persentase SR disajikan pada tabel 4 berikut. Hasil sidik ragam pada tabel 5 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata yang berarti bahwa pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan tidak berpengaruh terhadap SR, yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 . Data selengkapnya disajikan pada lampiran 7.

Tabel 4. Data Kelulushidupan (SR) Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

perlakuan	ulangan			jumlah	rerata
	1	2	3		
A (4 %)	60	60	80	200	66,66667
B (6 %)	100	60	60	220	73,33333
C (8 %)	80	100	100	280	93,33333
				700	
K+ (0 %)	60	40	40	140	46,66667
K- (0 %)	60	80	60	200	66,66667

Tabel 5. Tabel Sidik Ragam Kelulushidupan (SR) Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Sumber Keragaman	db	JK	KT=JK/db	Fhit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1062,191	531,0955	1,986417 ^{ns}	5,14	10,9
2. Acak	6	1604,181	267,3635			
3. Total	8	2666,372				

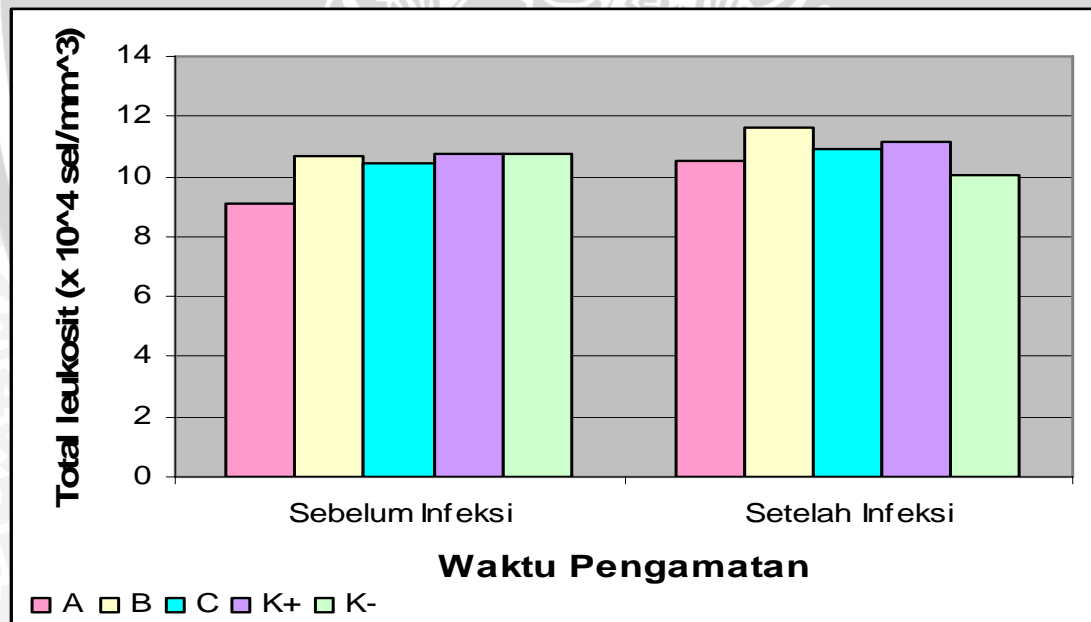
Keterangan : ns = tidak berbeda

4.1.4 Jumlah Total Leukosit

Rata-rata jumlah Leukosit ($\times 10^4$ sel/ml) ikan Mas pada beberapa perlakuan disajikan dalam Tabel 6 dan Gambar 11 berikut ini.

Tabel 6. Data Total Leukosit Rata-rata Ikan Mas Sebelum Dan Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Jumlah Total Leukosit Rata-rata ($\times 10^4$ sel/mm ³)	
	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
A (4 %)	9,073	10,523
B (6 %)	10,676	11,616
C (8 %)	10,436	10,946
K+ (0 %)	10,766	11,136
K- (0 %)	10,750	10,033



Gambar 11. Grafik Rata-rata Jumlah Leukosit Ikan Mas Pada Perlakuan Yang Berbeda.

Grafik pada Gambar 9 menunjukkan jumlah total leukosit pada ikan Mas yaitu pada saat sebelum dilakukan ujiantang (infeksi bakteri) dan setelah dilakukan ujiantang (infeksi bakteri), terjadi peningkatan jumlah total leukosit pada ikan Mas. Nilai rata-rata selengkapnya disajikan pada Lampiran 8.

Berdasarkan hasil sidik ragam jumlah total leukosit ikan Mas setelah dilakukan ujiantang dengan 10^7 sel/ml bakteri *Aeromonas hydrophila* (Tabel 7), diperoleh nilai F hitung sebesar 2378,9941 (Tabel 8). Nilai tersebut berada di atas nilai F tabel 1 % (10,9), sehingga dapat dikatakan perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata atau pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah total leukosit ikan Mas yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 9.

Tabel 7. Data Jumlah Total Leukosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	105000	105300	105400	315700	105233,33
B (6%)	116000	116400	116100	348500	116166,67
C (8%)	109500	109300	109600	328400	109466,67
				992600	

Tabel 8. Tabel Sidik Ragam Jumlah Total Leukosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	0,002802	0,001401			
2. Acak	6	0,0000035	0,00000058	2381,303**	5,14	10,9
3. Total	8	0,0028054				

Ket : ** = Berbeda sangat nyata

Selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf 5 % (derajat kepercayaan 95 %) dan taraf 1 % (derajat kepercayaan 99 %) untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap jumlah total leukosit ikan Mas. Hasil uji BNT seperti pada tabel 9 di bawah ini (perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 9).

Tabel 9. Hasil Uji BNT Pemberian Tepung Cacing Tanah Terhadap Jumlah Total Leukosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Total Leukosit (x 10 ⁴ sel/mm ³)	Notasi
A (4%)	10,5233	a
C (8%)	10,9466	b
B (6%)	11,6166	c

Keterangan : Tanda (**) menunjukkan berbeda sangat nyata.

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan B (6 %) memberikan pengaruh terbaik terhadap jumlah total leukosit ikan Mas yang ditunjukkan dengan nilai rata-rata jumlah total leukosit tertinggi yaitu 11,6166 x 10⁴ sel/mm³ diikuti oleh perlakuan C (8 %) sebesar 10,9466 x 10⁴ sel/mm³ dan terendah perlakuan A (4 %) sebesar 10,5233 x 10⁴ sel/mm³.

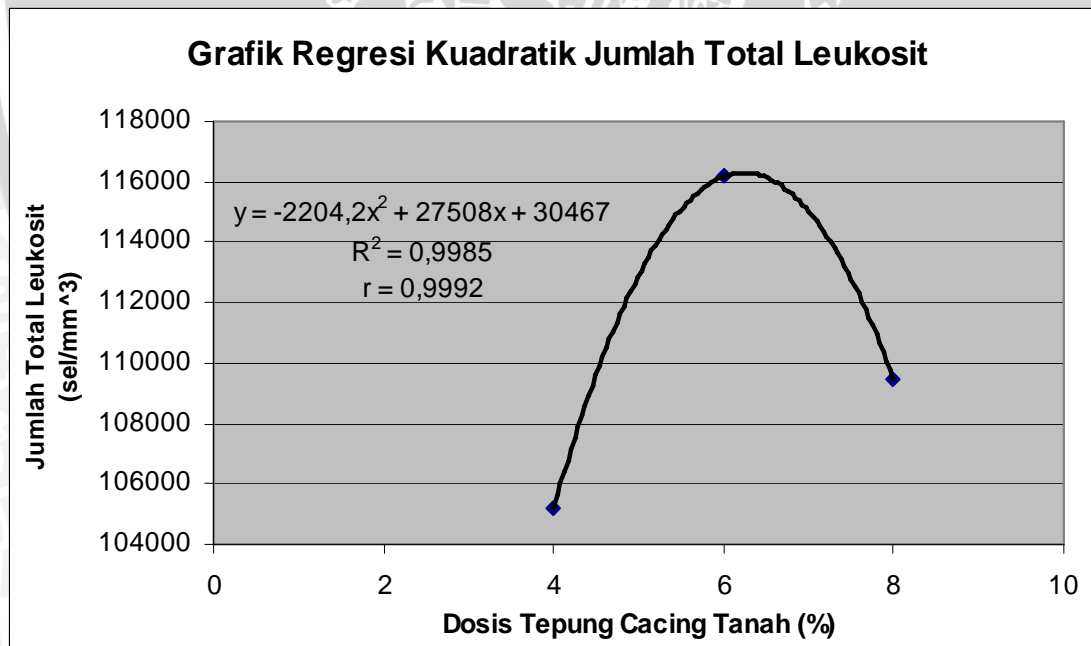
Selanjutnya untuk mengetahui pola hubungan antara dosis pemberian tepung cacing Tanah dengan jumlah total leukosit ikan Mas dilakukan uji polynomial orthogonal pada Lampiran 9. Hasil perhitungan sidik ragam regresi seperti yang disajikan pada Tabel 10 dibawah ini.

Tabel 10. Tabel Sidik Ragam Regresi Jumlah Total Leukosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	0,002802	0,001401		5,99	13,7
Linier	1	0,000442	0,000442	751,2748**		
Kuadratik	1	0,0023598	0,0023598	4010,992**		
2. Acak	6	0,00000533	0,0000005883			
Total	8	0,0028054	0,0003507			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil sidik ragam regresi maka persamaan yang digunakan adalah regresi kuadratik dengan persamaan regresi $Y = 30466,63 + 27508,35X - 2204,168X^2$ dengan $R^2 = 0,9985$ dan $r = 0,9992$, yang menghasilkan jumlah total leukosit tertinggi sebesar $116239,7 \text{ sel/mm}^3$ pada dosis tepung cacing Tanah sebesar 6,2 %. Grafik hubungan antara dosis pemberian tepung cacing Tanah dengan jumlah total leukosit ikan mas disajikan pada Gambar 12 berikut ini.



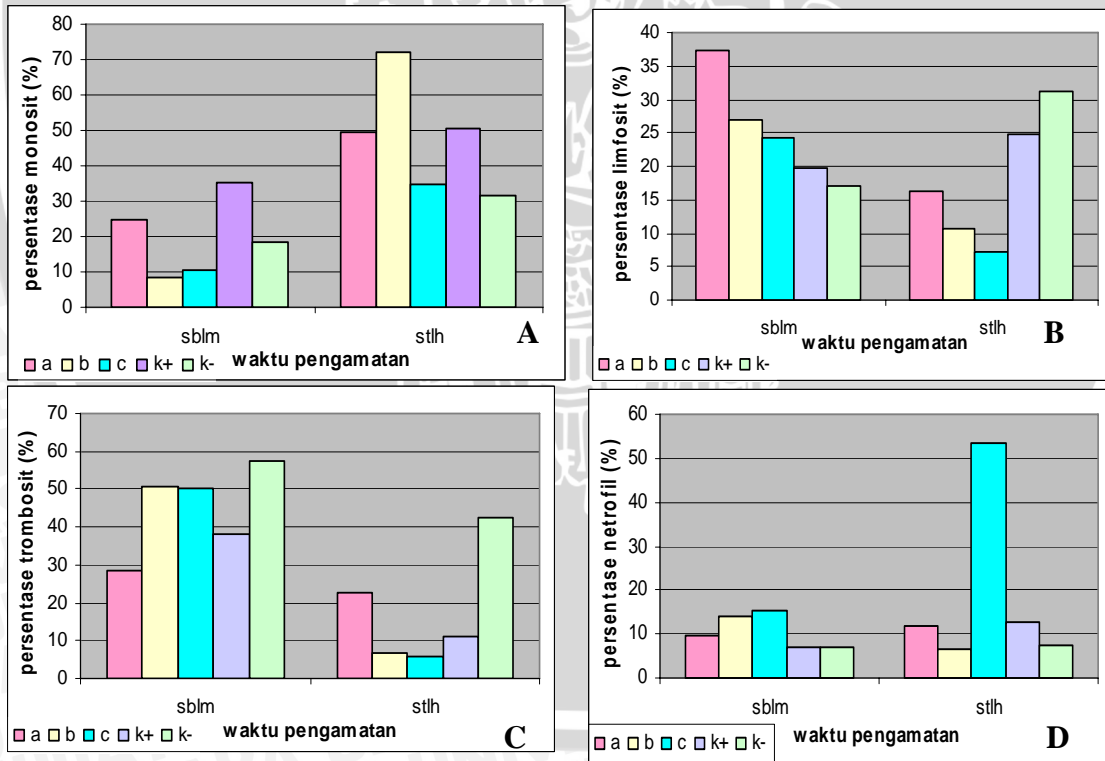
Gambar 12. Grafik Regresi Kuadratik Hubungan Antara Dosis Pemberian Tepung Cacing Tanah Dengan Jumlah Total Leukosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

4.1.5 Diferensial Leukosit

Analisis secara mikroskopis menunjukkan jenis-jenis leukosit yang terdapat pada ikan mas terdiri dari monosit, limfosit, trombosit dan neutrofil. Rata-rata persentase limfosit, monosit, trombosit, dan netrofil, disajikan pada Tabel 11 dan grafik pada Gambar 13 berikut.

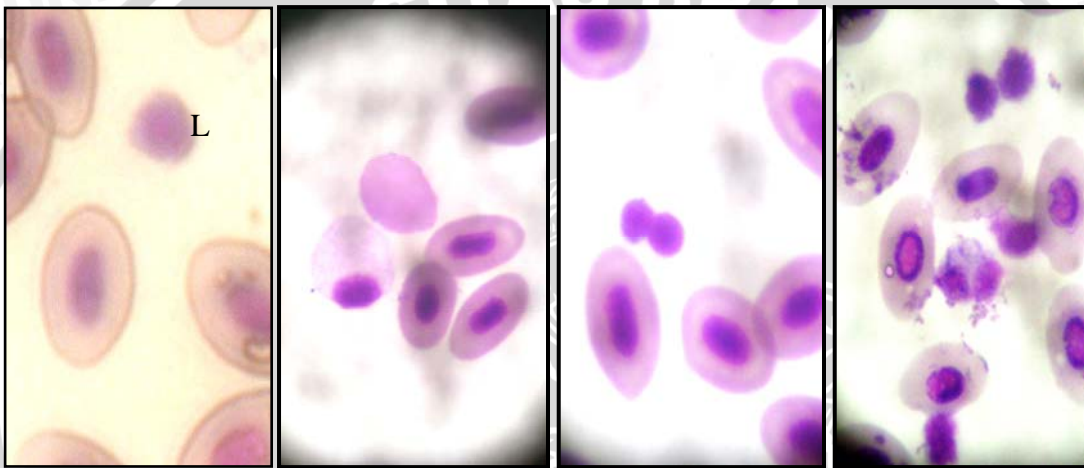
Tabel 11. Persentase rata-rata diferensial leukosit pada ikan mas.

No	Perlakuan	Diferensial Leukosit (%)							
		Sebelum Infeksi				Setelah Infeksi			
		M	L	T	N	M	L	T	N
1.	A (4 %)	24,6	37,3	28,3	9,6	49,3	16,3	22,6	11,6
2.	B (6 %)	8,3	27	50,6	14	72,3	10,6	10,3	6,6
3.	C (8 %)	10,3	24,3	50,3	15,3	35	7,3	6	53,3
4.	K+ (0 %)	36	19,6	38	7	50,6	24,6	11,3	12,6
5.	K- (0 %)	18,6	17	57,3	8	19	31,3	42,3	7,3



Gambar 13. Grafik persentase Monosit (A), Limfosit (B), Neutrofil (C), dan Trombosit (D) ikan Mas pada perlakuan yang berbeda.

Dari grafik di atas, terlihat bahwa kisaran rata-rata monosit selama perlakuan adalah 8,3 – 72,3 %, limfosit berkisar antara 7,3 – 37,3 %, neutrofil berkisar antara 6,6 – 53,3 % dan trombosit berkisar antara 6 – 57,3 % dari populasi total leukosit. Proporsi monosit dan neutrofil cenderung meningkat setelah dilakukan ujiantang pada ikan uji, sedangkan proporsi limfosit dan trombosit, cenderung menurun. Hal ini terjadi pada hampir tiap-tiap perlakuan (perhitungan selengkapnya disajikan pada Lampiran 10).



Gambar 14. Gambar Eritrosit (E), Limfosit (L), Monosit (M), Trombosit (T), dan Neutrofil (N) ikan mas.

Perbedaan morfologi sel-sel leukosit ikan Mas ditunjukkan pada gambar 14. Pada gambar tersebut terlihat perbedaan pada eritrosit, limfosit, monosit, trombosit dan neutrofil. Monosit berwarna lebih terang dengan ukuran sel yang lebih besar. Eritrosit berbentuk lonjong dengan inti berwarna gelap di tengahnya. Limfosit lebih kecil dari monosit, berwarna agak gelap. Neutrofil dengan inti berada di pinggir dan bergranula. Trombosit berukuran lebih kecil dari limfosit dan berwarna lebih gelap.

a Monosit

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan dosis yang diberikan dengan persentase monosit setelah ujiantang, dilakukan analisa data dengan hasil yang disajikan pada tabel 12 dan 13 berikut ini.

Tabel 12. Data Rata-rata Persentase Monosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	50	52	46	148	49,33333
B (6%)	70	75	72	217	72,33333
C (8%)	37	35	33	105	35,00000
Jumlah Total				470	

Tabel 13. Hasil Sidik Ragam Persentase Monosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	740,996	370,498	155,6453**	5,14	10,9
2. Acak	6	14,2824	2,3804			
3. Total	8	755,2784				

Keterangan : ** = menunjukkan berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa nilai F hitung yaitu 155,6453 berada di atas nilai F tabel 1 % (10,9). Hal ini berarti, pemberian tepung cacing tanah sebagai immunostimulan pada ikan Mas dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap persentase monosit ikan Mas setelah dilakukan ujiantang dengan bakteri *A. Hydrophila* yang berarti menerima H1 dan menolak H0.

Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap persentase monosit ikan Mas. Hasil uji BNT disajikan pada tabel 14 berikut ini.

Tabel 14. Hasil Uji BNT Persentase Monosit Ikan Mas

Perlakuan	Rata-rata Persentase Monosit (%)	Notasi
C (8 %)	35	a
A (4 %)	44,61	b
B (6 %)	58,27	c

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan B dengan dosis pemberian 6 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan ikan merupakan dosis terbaik yang dapat menghasilkan persentase monosit tertinggi ikan Mas setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui pola hubungan antara dosis pemberian tepung cacing tanah dengan persentase monosit ikan Mas. Pada tabel 15 di bawah ini disajikan hasil perhitungan sidik ragam regresi dan grafik regresi disajikan pada gambar 15 berikut ini. Perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 11.

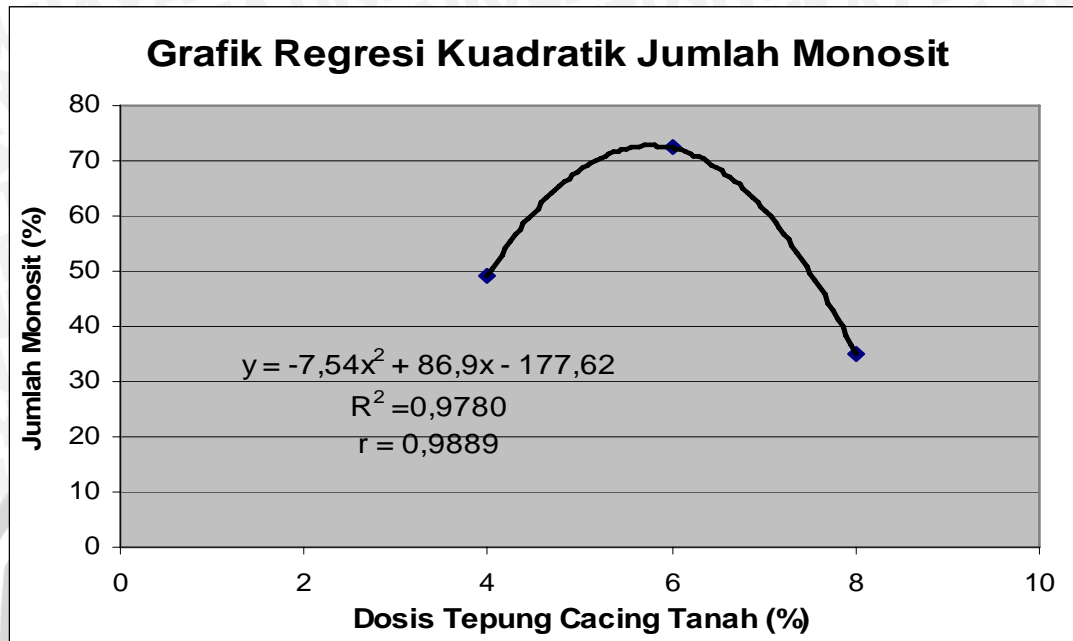
Tabel 15. Hasil Sidik Ragam Regresi Persentase Monosit Ikan Mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	740,996	370,498			
Linier	1	104,5838	104,5838	43,93539**		
Kuadratik	1	636,4123	636,4123	267,3552**	5,99	13,7
2. Acak	6	14,3	2,3804			
Total	8	755,2784	94,4098			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Perhitungan hasil sidik ragam menunjukkan persamaan yang digunakan adalah persamaan regresi kuadratik dengan rumus $Y = -7,540X^2 + 86,89X - 177,618$ dengan nilai $R^2 = 0,9780$ dan $r = 0,9889$ yang menghasilkan persentase monosit

tertinggi sebesar 72,76 pada dosis tepung cacing Tanah sebesar 5,7 %. Gambar 15 menunjukkan grafik kuadratik dengan titik puncak yang berada pada dosis 5,7%.



Gambar 15. Grafik Regresi Kuadratik Hubungan Antara Dosis Pemberian Tepung Cacing Tanah Dengan Persentase Monosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

b Limfosit

Hasil perhitungan sidik ragam untuk data persentase limfosit disajikan pada tabel 16 dan 17 berikut ini.

Tabel 16. Data Rata-rata Persentase Limfosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	15	16	18	49	16,33333
B (6%)	13	8	11	32	10,66667
C (8%)	9	8	5	22	7,333333
Jumlah Total				103	

Tabel 17. Hasil Sidik Ragam Persentase Limfosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

sumber keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%
1. perlakuan	2	2,405478	1,202739	11,84169**	5,14	10,9
2. acak	6	0,609409	0,101568			
3. total	8	3,014888	0,376861			

Keterangan : ** = menunjukkan berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan nilai F hitung = 11,84169 lebih besar dari nilai F tabel 1 % (10,9). Hal ini berarti, pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap persentase limfosit ikan Mas setelah dilakukan uji tantang yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap persentase limfosit ikan Mas. Hasil uji BNT disajikan pada tabel 18 berikut ini.

Tabel 18. Hasil Uji BNT Persentase Limfosit Ikan Mas

Perlakuan	Rata-rata Persentase Limfosit (%)	Notasi
C (8 %)	16,33	a
B (6 %)	10,67	b
A (4 %)	16,33	c

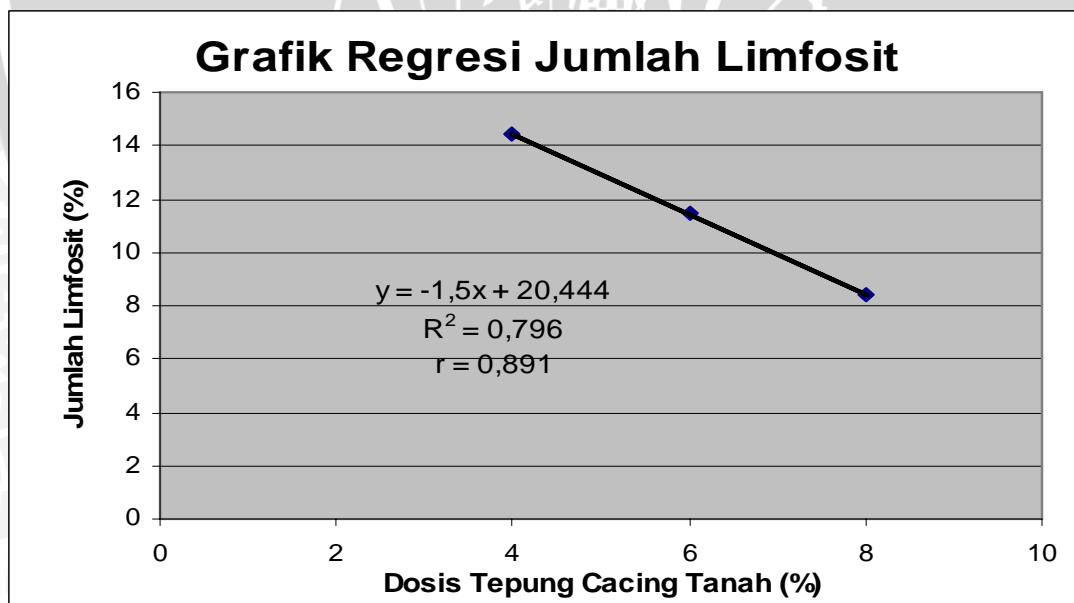
Selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui pola hubungan antara dosis pemberian tepung cacing tanah dengan persentase limfosit ikan Mas. Pada tabel 19 di bawah ini disajikan hasil perhitungan sidik ragam regresi dan grafik regresi disajikan pada gambar 16 berikut ini. Perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 12.

Tabel 19. Hasil Sidik Ragam Regresi Persentase Limfosit Ikan Mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	2,405478	1,5075			
Linier	1	2,3713	2,3713	23,36256**		
Kuadratik	1	0,0341	0,0341	0,335961ns	5,99	13,7
2. Acak	6	0,609	0,1015			
Total	8	3,014888	0,376861			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Nilai F hitung linier lebih besar dari pada nilai F hitung kuadratik. Maka persamaan yang digunakan adalah persamaan linier. Perhitungan sidik ragam regresi menghasilkan rumus regresi linier yaitu $Y = 20,44 - 1,5X$ dengan nilai $R^2 = 0,796$ dan $r = 0,891$. Hal ini berarti pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan memberikan pengaruh terhadap penurunan persentase limfosit ikan Mas atau persentase limfosit yang semakin menurun seiring dengan peningkatan dosis tepung cacing Tanah.



Gambar 16. Grafik Regresi Linier Hubungan Antara Dosis Tepung cacing Tanah Dengan Persentase Limfosit.

c Trombosit

Hasil perhitungan sidik ragam untuk data persentase trombosit ikan Mas setelah uji tantang disajikan pada tabel 20 dan 21 di bawah ini.

Tabel 20. Data Rata-rata Persentase Trombosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	25	20	23	68	22,66667
B (6%)	12	10	9	31	10,33333
C (8%)	4	3	11	18	6
Jumlah Total				117	

Tabel 21. Hasil Sidik Ragam Persentase Trombosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	8,33232	4,16616	17,64239**	5,14	10,9
2. Acak	6	1,416869	0,236145			
3. Total	8	9,74919				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan nilai F hitung = 17,64239 lebih besar dari nilai F tabel 1 % (10,9). Hal ini berarti, pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap persentase trombosit ikan Mas setelah dilakukan uji tantang yang berarti menerima H1 menolak H0. Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap persentase trombosit ikan Mas. Hasil uji BNT disajikan pada tabel 22 berikut ini. Perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 13.

Tabel 22. Hasil Uji BNT Persentase Trombosit Ikan Mas

Perlakuan	Rata-rata Persentase Limfosit (%)	Notasi
A (4 %)	22,67	a
B (6 %)	10,33	b
C (8 %)	6	c

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan C dengan dosis pemberian 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan ikan merupakan dosis terbaik yang dapat menghasilkan persentase trombosit terendah ikan Mas setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui pola hubungan antara dosis pemberian tepung cacing tanah dengan persentase monosit ikan Mas. Pada tabel 23 di bawah ini disajikan hasil perhitungan sidik ragam regresi dan grafik regresi disajikan pada gambar 17 berikut ini. Perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 13.

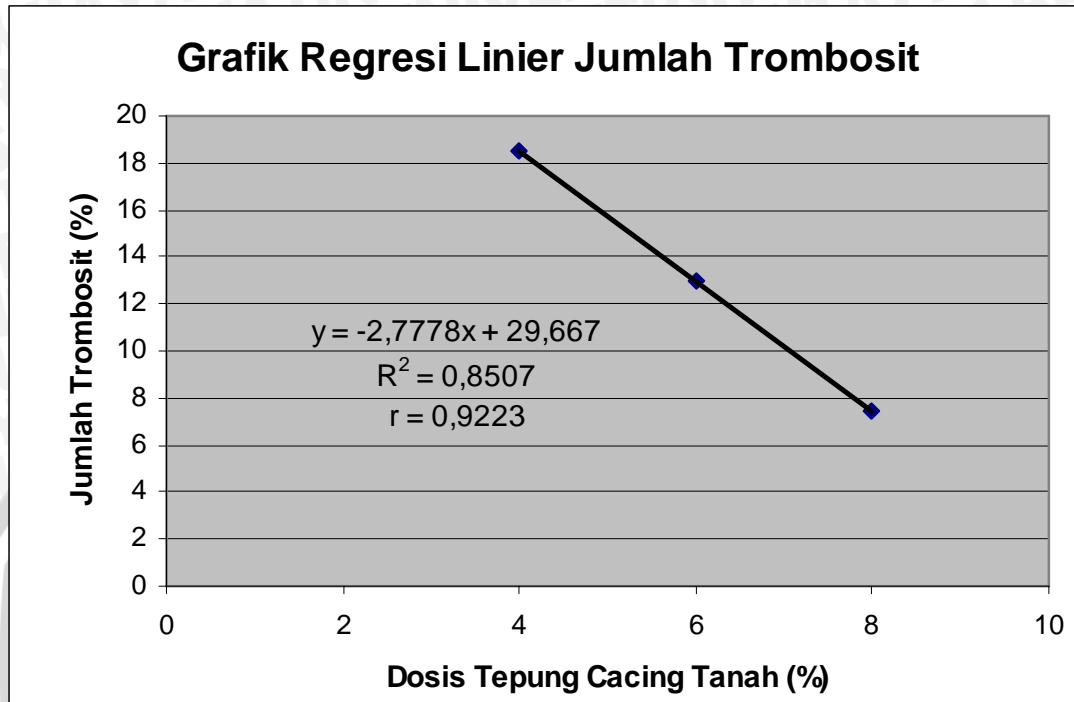
Tabel 23. Hasil Sidik Ragam Regresi Persentase Trombosit Ikan Mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	8,33232	4,16616		5,99	13,7
Linier	1	8,0736	8,0736	34,18919**		
Kuadratik	1	0,25872	0,25872	1,095599ns		
2. Acak	6	1,42	0,236145			
Total	8	9,74919	1,218649			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata ; ns = tidak berbeda

Perhitungan sidik ragam regresi menghasilkan rumus regresi linier yaitu $Y = 29,667 - 2,77X$ dengan nilai $R^2 = 0,8507$ dan $r = 0,9223$. Hal ini berarti pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan memberikan pengaruh terhadap

penurunan persentase trombosit ikan Mas atau persentase trombosit yang semakin menurun seiring dengan peningkatan dosis tepung cacing Tanah.



Gambar 17. Grafik Regresi Linier Hubungan Antara Dosis Tepung Cacing Tanah Dengan Persentase Trombosit.

d Neutrofil

Hasil perhitungan sidik ragam untuk data persentase neutrofil ikan Mas setelah uji tantangan disajikan pada tabel 24 dan 25 di bawah ini.

Tabel 24. Data Rata-rata Persentase Neutrofil Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	10	12	13	35	11,66667
B (6%)	5	7	8	20	6,666667
C (8%)	50	54	56	160	53,33333
Jumlah Total				215	

Tabel 25. Hasil Sidik Ragam Persentase Neutrofil Ikan Mas Setelah Uji Tantang.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1777,844	888,922	325,0562**	5,14	10,9
2. Acak	6	16,40803	2,734672			
3. Total	8	1794,252				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan nilai F hitung = 325,0562 lebih besar dari nilai F tabel 1 % (10,9) atau pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap persentase neutrofil ikan Mas setelah dilakukan ujiantang yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap persentase neutrofil ikan Mas. Hasil uji BNT disajikan pada tabel 26 berikut ini.

Tabel 26. Hasil Uji BNT Persentase Neutrofil Ikan Mas

Perlakuan	Rata-rata Persentase Neutrofil (%)	Notasi
B (6 %)	6,67	a
A (4 %)	11,67	b
C (8 %)	53,33	c

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan C dengan dosis pemberian 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan ikan merupakan dosis terbaik yang dapat menghasilkan persentase neutrofil tertinggi ikan Mas setelah ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui hubungan antara dosis tepung cacing tanah yang diberikan dengan persentase neutrofil ikan

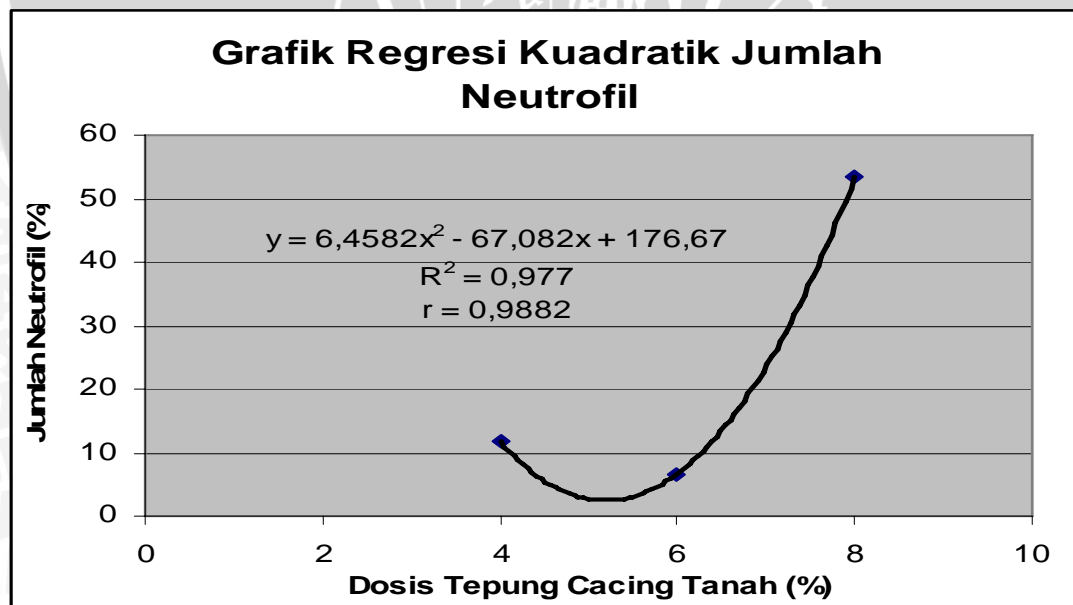
Mas. Hasil perhitungan sidik ragam regresi disajikan pada tabel 27 dan grafiknya pada gambar 18 di bawah ini.

Tabel 27. Analisis Sidik Ragam Regresi Persentase Neutrofil Ikan Mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1777,844	888,922			
Linier	1	1090,937	1090,937	398,928**	5,99	13,7
Kuadratik	1	686,9071	686,9071	251,1845**		
2. Acak	6	16,40803	2,734672			
Total	8	1794,252	224,2815			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Perhitungan sidik ragam regresi menghasilkan rumus regresi kuadratik yaitu $Y = 176,665 - 67,0825X + 6,45825X^2$ dengan nilai $R^2 = 0,977$ dan $r = 0,9882$ yang menghasilkan persentase monosit tertinggi sebesar 53,3 % pada dosis tepung cacing Tanah sebesar 8 %. Gambar 18 menunjukkan grafik kuadratik dengan titik puncak terendah yang berada pada dosis 5,2%.



Gambar 18. Grafik Regresi Linier Hubungan Antara Dosis Tepung Cacing Tanah Dengan Persentase Neutrofil.

4.1.6 Pengamatan Kualitas Air

Selama perlakuan, dilakukan pengamatan terhadap kualitas air pada wadah pemeliharaan. Rata-rata suhu media pemeliharaan selama perlakuan berkisar antara 23,20 – 23,36 °C, untuk DO (*Disolved Oxygen*) berkisar antara 6,87 – 8,61 mg/L, dan untuk nilai pH berkisar antara 7,28 – 7,40. Data hasil pengamatan terhadap kualitas air media pemeliharaan selama perlakuan disajikan pada lampiran 15.

4.2 Pembahasan

Imunostimulan banyak digunakan untuk mencegah terjadinya penyakit, karena imunostimulan dapat meningkatkan ketahanan non spesifik terhadap berbagai serangan penyakit baik oleh bakteri maupun oleh virus. Zat *Lumbricin-1* yang terdapat dalam cacing tanah yang merupakan senyawa peptida antimikroba dapat digunakan sebagai imunostimulan dan terbukti dapat meningkatkan ketahanan non spesifik pada ikan mas yang diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* 10^7 sel/ml dengan melihat hasil SR pada ikan uji dan pengamatan hematologinya.

4.2.1 Kelulushidupan (SR / *Survival Rate*)

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai SR pada ikan uji untuk perlakuan A = 54,98 %, B = 63,41 %, C = 80,28 %. Dari nilai tersebut sudah dapat dilihat bahwa perlakuan C dengan dosis sebesar 8 % tepung cacing tanah dalam 1 Kg pakan ikan, memberikan kelulushidupan yang tertinggi yaitu 80,28 %.

Hasil sidik ragam, menunjukkan nilai F hitung berada di bawah nilai F tabel 5 % untuk nilai kelulushidupan (SR) ikan Mas. Ini berarti, pemberian bahan dengan dosis-dosis tersebut tidak memberikan pengaruh terhadap kelulushidupan ikan uji. Hal ini kemungkinan terjadi karena di dalam tubuh ikan uji telah ada sistem

kekebalan tubuh terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Diduga di dalam darah ikan uji telah ada sistem imun spesifik yang telah terkordinasi dengan baik sehingga membuat ikan uji tahan terhadap infeksi bakteri sehingga dengan mudah dapat melawan serangan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang mematikan.

Imunitas ini menurut Guyton dan Hall (1997) merupakan imunitas didapat yang mampu membentuk imunitas spesifik yang sangat kuat untuk melawan agen penyerbu yang bersifat mematikan, seperti bakteri, virus, toksin, dan bahkan jaringan asing yang berasal dari binatang lain. Sistem imunitas ini diduga diperoleh ikan uji sejak saat masa pemeliharaan di daerah asalnya sebelum di pelihara pada media percobaan. Kemungkinan di lingkungannya terdahulu ikan uji sering mendapat serangan infeksi dari bakteri *Aeromonas hydrophila* sehingga dalam tubuh ikan telah ada mekanisme pertahanan terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1988) bahwa sistem imunitas dapatan diperoleh setelah mula-mula tubuh terkena suatu mikroorganisme patogenik dan dapat terjadi melalui infeksi alamiah sehingga mikroorganisme tersebut merangsang mekanisme resistensi inang (sistem kekebalan). Membutuhkan waktu yang lama, sampai berminggu-minggu untuk membentuk sistem imun ini (Guyton dan Hall, 1997). Diduga ikan uji memperoleh kekebalan ini setelah dipelihara dalam waktu yang lama di lingkungan budidayanya. Sehingga dapat dikatakan bahwa ikan Mas yang digunakan sebagai ikan uji pada percobaan ini telah resisten terhadap *Aeromonas hydrophila* dan menyebabkan pemberian tepung cacing tanah sebagai imunostimulan tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kekebalan tubuhnya walaupun dosis pemberian ditingkatkan.

Walaupun hasil sidik ragam menunjukkan tidak berbeda pada tiap perlakuan, namun dari nilai SR tersebut sudah dapat terlihat bahwa perlakuan C adalah yang terbaik bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu sebesar 72,21 %. Hal ini sesuai dengan pendapat Anderson (1974) yang menyatakan bahwa penggunaan imunostimulan dapat memperbaiki mekanisme yang terlibat dalam proses pertahanan tubuh yang bersifat umum atau non spesifik.

4.2.2 Gejala Klinis Pada Ikan Uji Yang Terinfeksi

Ikan Mas yang terserang bakteri *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis yaitu kulit menjadi kasar, terjadi pendarahan (*haemorrhage*) pada kulit, sirip, dan tutup insang, mata masuk ke dalam, perut menggebung, dan sering megap-megap di permukaan air. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Afrianto dan Liviawati (1992) yang menyatakan bahwa ikan yang terserang *A. hydrophila* akan memperlihatkan gejala klinis berupa warna tubuhnya berubah agak gelap, kulitnya menjadi kasar dan timbul pendarahan pada kulit dan insang, sering megap-megap di permukaan air, seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi ke putih-putihan. Selain itu ikan uji yang terinfeksi nafsu makannya berkurang dan cara berenang yang tidak normal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ghufuran dan Kordi (2004) yang menyatakan bahwa beberapa tanda spesifik ikan yang terinfeksi dapat terlihat dari nafsu makan berkurang, bahkan pada ikan yang sangat lemah tidak ada nafsu makan sama sekali, dan sikap berenang ikan yang sakit umumnya berubah-ubah misalnya melemah atau bahkan beringas dan pada ikan yang lemah, ikan akan terlihat meliuk-liukkan tubuh pelan-pelan, sulit mempertahankan tubuhnya tegak, tubuh seringkali miring bahkan terbalik dengan perut di atas, berputar-putar disuatu tempat, bergerak terus menerus ke atas dan ke bawah dan cenderung berenang di permukaan air.

Untuk mengetahui efektif atau tidaknya bahan imunostimulan yang digunakan, dapat juga dengan cara pemeriksaan pada darah ikan. Susunan darah ikan merupakan faktor diagnostik penting pada keadaan patologis (Nabib dan Pasaribu, 1989). Menurut Svobodova (1991), pemeriksaan komponen darah dapat juga digunakan untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan, mengevaluasi pertahanan non spesifik pada spesies ikan yang berbeda, mengetahui pengaruh stres terhadap kesehatan ikan dan sebagainya. Hasil pemeriksaan parameter darah pada ikan umumnya berbeda dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal ikan sehingga tidak mudah untuk menentukan kisaran kondisi fisiologis pada ikan.

4.2.3 Jumlah Total Leukosit (Sel Darah Putih)

Hasil sidik ragam jumlah total leukosit menunjukkan berbeda sangat nyata yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Sehingga dikatakan bahwa pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata dengan jumlah total leukosit tertinggi sebesar 116166,67 sel/mm³ pada pemberian tepung cacing Tanah sebesar 6 % dalam 1 Kg pakan. Regresi yang digunakan adalah regresi kuadratik karena R^2 kuadratik lebih besar dari R^2 linier sehingga diperoleh persamaan yaitu $Y=30466,63 + 27508,35X - 2204,168X^2$ dengan titik puncak terletak pada dosis tepung cacing Tanah sebesar 6,24 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa dosis yang optimal penggunaan tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan adalah 6,24 %.

Hasil perhitungan jumlah total leukosit menunjukkan peningkatan setelah dilakukan ujiantang, dan terjadi pada masing-masing perlakuan. Peningkatan jumlah leukosit ini bahkan melebihi jumlah leukosit pada ikan sehat (tanpa perlakuan pakan

yang ditambahkan tepung cacing Tanah dan tanpa ujiantang) yaitu $10,03 \times 10^4$ sel/mm³.

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut terlihat bahwa leukosit yang merupakan sistem pertahanan seluler meningkat selama perlakuan. Anderson (1974) mengatakan bahwa terjadi peningkatan jumlah leukosit setelah pemberian imunostimulan. Tepung cacing Tanah dengan kandungan *Lumbricin-1* tersebut dianggap sebagai antigen yang masuk ke dalam tubuh ikan. Antigen masuk akan difagosit oleh makrofag kemudian dibawa ke limfosit-T dan limfosit-B secara bersamaan. Sel-T teraktivasi akan membantu mengaktifkan sel-B, yang kemudian akan membesar, berdiferensiasi membentuk plasmablas. Sitoplasmanya akan meluas dan *Retikulum Endoplasma* kasar akan berproliferasi dengan cepat kemudian akan membelah sehingga jumlahnya bertambah (Guyton & Hall, 1997).

Peningkatan jumlah leukosit terjadi setelah dilakukan ujiantang dengan bakteri. Leukosit merupakan salah satu jenis sel darah yang mempunyai peranan sangat penting dalam sistem tanggap kebal ikan, dan akan meningkat secara pesat apabila terjadi suatu infeksi (Tizard, 1998). Peningkatan jumlah leukosit dipicu oleh faktor perangsang koloni (CSF) yang akan terus meningkat jumlahnya setelah stimulasi oleh berbagai antigen dan mikroorganisme serta produk-produknya seperti endotoksin (Bondurant, Kourey, 1999 dalam Price & Wilson, 1984).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tepung cacing tanah dengan kandungan *Lumbricin-1* yang digunakan sebagai imunostimulan, terbukti dapat meningkatkan jumlah leukosit. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Kuswardani (2006) yang memberikan hasil bahwa total leukosit mengalami peningkatan setelah dilakukan ujiantang dan pemeliharaan selama 7 hari setelah pemberian resin lebah

sebagai imunostimulan. *Lumbricin-1* dalam tepung cacing tanah juga diduga dapat meningkatkan kemampuan sel-sel sistem pertahanan tubuh pada ikan uji untuk berdiferensiasi akibat adanya patogen sehingga dapat berperan sebagai imunostimulan. Zat ini bekerja dengan menstimulasi sistem imun dan membunuh organisme penyebab infeksi atau dengan menginefektifkan serangan organisme penyebab infeksi dengan cara meningkatkan aktivitas leukosit untuk melawan serangan patogen.

4.2.4 Diferensial Leukosit

Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pembagian tipe leukosit (Diferensial Leukosit), maka harus dihitung tipe leukosit pada bagian tertentu dari smear yang diamati dan angka yang diperoleh dinyatakan dalam %. Cara seperti ini disebut dengan nama teknik menghitung diferensiasi. Diferensial leukosit adalah jumlah dari masing-masing komponen leukosit yang dihitung dalam 100 sel leukosit dan dinyatakan dalam %, yang memberikan informasi untuk melengkapi perhitungan leukosit dan juga memberikan penilaian pada tipe-tipe sel leukosit yaitu monosit, limfosit, trombosit, dan neutrofil (Anonymous, 2007).

Penghitungan diferensial leukosit dilakukan dengan membuat ulasan tipis darah pada *slide* dengan teknik goresan dan masing-masing jenis sel darah dihitung jumlahnya dalam 100 sel leukosit (Clark, P. T., Henthorn, J. S & England, J.M, 1985).

Hasil perhitungan diferensial leukosit menunjukkan bahwa adanya kecenderungan peningkatan jumlah monosit dan neutrofil setelah dilakukan ujiantang. Peningkatan ini diikuti dengan penurunan jumlah limfosit. Ini berarti, *Lumbricin-1* dalam cacing tanah dapat meningkatkan jumlah monosit dan netrofil

yang berfungsi sebagai sel fagosit dalam darah. Neutrofil dianggap sebagai sistem pertahanan utama karena mampu bergerak lebih cepat ke arah benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan dan dapat menghancurkannya dengan segera, tetapi tidak dapat bertahan lama (Tizard, 1988). Apabila terjadi luka, jumlah netrofil akan mengalami penurunan karena neutrofil akan keluar dari pembuluh darah dan bergerak menuju jaringan tubuh yang terinfeksi. Akibat keluarnya neutrofil dari dalam pembuluh darah, monosit akan mengambil alih kerja yang dilakukan neutrofil dalam proses fagositosis (Secombess, 1996 dalam Johnny, Tridjoko dan Des Roza, 2003).

a Monosit

Hasil sidik ragam persentase monosit menunjukkan berbeda sangat nyata yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata dengan persentase monosit tertinggi sebesar 58,27 % pada pemberian tepung cacing sebanyak 6 % dalam 1 Kg pakan. Hasil perhitungan R^2 kuadratik lebih besar dari R^2 linier sehingga persamaan yang digunakan adalah regresi kuadratik yang menghasilkan persamaan $Y = -177,6189 + 86,89965X - 7,540X^2$ dengan titik puncak terletak pada nilai 5,76 %. Sehingga dapat dikatakan dosis terbaik yaitu 5,76 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan ikan.

Persentase monosit mengalami peningkatan setelah dilakukan uji tantang pada masing-masing perlakuan. Laporan besarnya persentase monosit pada ikan sebesar 0,1 – 3 % (Anderson, 1974). Pada masing-masing perlakuan tersebut, persentase monosit jauh dari standar, karena walaupun umumnya persentase monosit sangat rendah dalam populasi leukosit, akan tetapi dapat meningkat dalam waktu singkat bila terjadi infeksi.

Peningkatan persentase monosit yang terjadi setelah ujiantang diduga disebabkan dalam tubuh ikan yang terinfeksi mendorong monosit untuk menghancurkan benda asing yang masuk. Benda asing yang dimaksud disini adalah bakteri *A. hydrophila* yang masuk ke dalam tubuh ikan yang kemudian akan difagosit oleh monosit. Monosit diduga berfungsi sebagai makrofag dan memfagosit benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Fagosit oleh monosit merupakan proses yang sama seperti pada netrofil, akan tetapi monosit ini mampu memiliki aktivitas fagositik yang tahan lama (Tizard, 1988). Monosit yang telah berkembang menjadi makrofag dapat hidup sampai bertahun-tahun dan akan cepat menjadi tidak aktif dan musnah setelah melakukan fagosit terhadap bakteri (Guyton & Hall, 1997). Semakin banyak bakteri yang akan difagosit oleh monosit, akan mendorong monosit untuk membelah dan memperbanyak diri.

b Limfosit

Hasil sidik ragam persentase limfosit menunjukkan berbeda sangat nyata yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata dengan persentase limfosit. Hasil regresi menunjukkan grafik regresi linier negatif dengan rumus $Y=20,444 - 1,5X$ yang menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan, persentase limfosit semakin menurun. Selain itu, nilai persentase limfosit ikan Mas pada masing-masing perlakuan berada di bawah kisaran nilai persentase limfosit normal yaitu sebesar 60 – 80 % (Anderson, 1974).

Penurunan persentase limfosit ini diduga berhubungan dengan teknik penginfeksi dan waktu penginfeksi dengan bakteri *A. Hydrophila* pada saat ujiantang dan juga saat melakukan uji hematologi. Koleksi darah untuk uji hematologi

dilakukan beberapa hari setelah ujiantang dengan metode perendaman. Hal ini diduga menjadi penyebab menurunnya persentase limfosit ikan uji saat dilakukan penghitungan sel. Stoskopf (1992) menyatakan stres yang disebabkan karena perendaman selama 2 menit dapat mengakibatkan Lymphopenia atau jumlah limfosit menurun 1 jam setelah perendaman dan akan dilanjutkan dengan terjadinya leukositosis pada 4 jam kemudian setelah perendaman dan akan nampak pada penghitungan leukosit setelah 6 jam kemudian.

Peningkatan dan penurunan limfosit dapat dipengaruhi oleh adanya gen asing (infeksi *A. hydrophila*). Penurunan persentase limfosit pada masing-masing perlakuan tersebut diduga karena terjadinya infeksi oleh bakteri *A. hydrophila* pada saat ujiantang. Jumlah limfosit akan mengalami penurunan jika terjadi infeksi dan juga disebabkan karena kegiatannya dalam menyediakan zat kebal terganggu oleh masuknya infeksi. Infeksi juga dapat menyebabkan ikan menjadi stres sehingga menurunkan jumlah limfosit. Stoskopf (1992) menyatakan bahwa penyakit infeksi dan stres akan mengakibatkan Lymphopenia atau jumlah limfosit menurun. Menurut Bijanti (2005), penurunan jumlah limfosit dapat menurunkan antibodi dan menyebabkan penurunan pertahanan tubuh terhadap serangan penyakit.

Price & Lorcaine (1984) menyatakan bahwa beberapa limfosit mampu untuk mengeluarkan sekresi zat-zat yang dapat larut, yang disebut limfokin, yang memiliki pengaruh sangat penting pada sel-sel lain dalam tubuh. Perangsangan faktor-faktor dari tubuh yang secukupnya dapat mengubah struktur sitoplasmanya untuk sintesis protein menjadi penghasil antibodi. Namun perangsangan yang tidak semestinya akan menjadi penghambat bagi limfosit untuk berdiferensiasi menjadi penghasil antibodi sehingga dapat terjadi penurunan jumlah limfosit pada darah.

c Trombosit

Hasil sidik ragam persentase trombosit menunjukkan berbeda sangat nyata yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata dengan persentase trombosit. Hasil regresi menunjukkan grafik regresi linier negatif dengan rumus $Y=29,667 - 2,778X$.

Grafik regresi menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan, persentase trombosit semakin menurun. Hal ini berarti, pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas dapat meningkatkan kekebalan tubuh ikan sehingga ikan tahan terhadap infeksi dan tidak mudah stress yang ditunjukkan dengan semakin menurunnya persentase trombosit ikan Mas seiring dengan peningkatan dosis tepung cacing Tanah yang diberikan. Sehingga dapat dikatakan bahwa dosis yang terbaik adalah 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan.

Penurunan persentase trombosit pada masing-masing perlakuan diduga karena trombosit meninggalkan pembuluh darah menuju jaringan yang mengalami luka. Hal ini berkaitan dengan fungsi trombosit untuk melokalisasi serangan patogen sehingga tidak meluas serta menutup luka dan pembekuan darah. Pada saat terjadi infeksi umumnya persentase trombosit akan menurun. Fungsi utama dari trombosit adalah penutup luka, apabila pada ikan ditemukan persentase diferensial trombosit dalam jumlah yang tinggi, maka dapat diduga ikan tersebut tengah mengalami luka atau pendarahan (Manning dan Tatner, 1985 dalam Johnny *et al*, 2003).

d Neutrofil

Hasil sidik ragam persentase neutrofil menunjukkan berbeda sangat nyata yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Sehingga dapat dikatakan bahwa

pemberian tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan pada ikan Mas memberikan pengaruh yang sangat nyata dengan persentase neutrofil tertinggi sebesar 53,33 % pada pemberian tepung cacing sebanyak 8 % dalam 1 Kg pakan. Persamaan yang digunakan adalah regresi kuadratik yang menghasilkan persamaan $Y=176,665 - 67,0825X + 6,45825X^2$ dengan titik puncak terendah terletak pada nilai 5,2 % dan puncaknya pada 8 % sehingga dapat dikatakan bahwa dosis terbaik adalah 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan ikan.

Secara umum, jumlah neutrofil pada masing-masing perlakuan mengalami peningkatan setelah ujiantang. Jumlah ini berada di atas standar bila dibandingkan dengan jumlah normal neutrofil sebesar 6-8 % (Anderson, 1974). Hal ini terjadi diduga pada percobaan ini terjadi inflamasi akut. Dalam sistem pertahanan pada ikan, inflamasi diharapkan karena sistem ini berkaitan dengan respon imun non spesifik yang mengutamakan fagositosis.

Inflamasi merupakan mekanisme penting yang diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari berbagai infeksi yang mengganggu keseimbangan dan juga yang dapat memperbaiki kerusakan struktur serta gangguan fungsi jaringan yang ditimbulkan oleh infeksi tersebut. Dan inflamasi juga merupakan reaksi terhadap benda asing yang masuk tubuh, invasi mikroorganisme, trauma, bahan kimia yang berbahaya, faktor fisik dan alergi. Inflamasi ditandai oleh perpindahan cairan, protein plasma dan leukosit dari sirkulasi ke jaringan sebagai respon terhadap infeksi. Proses inflamasi akan berjalan sampai antigen dapat disingkirkan. Pada umumnya hal tersebut terjadi cepat dan berupa inflamasi akut yang berlangsung beberapa jam sampai beberapa hari (Secombes, 1996 dalam Johnny *et al*, 2003).

4.2.5 Pengamatan Kualitas Air.

Pemberian imunostimulan digunakan untuk mencegah terjadinya penyakit dan hal tersebut harus didukung dengan kualitas air yang layak untuk tumbuh dan bereproduksi secara normal. Hasil pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, DO (oksigen terlarut), dan pH selama penelitian menunjukkan nilai yang tidak berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan yang berbeda dengan beberapa kali ulangan tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kualitas air media. Sehingga dapat dikatakan bahwa nilai kualitas air selama perlakuan adalah homogen. Data kualitas air selengkapnya disajikan pada lampiran 32.

Pada akhir perlakuan, semua ikan uji yang mendapat perlakuan penambahan tepung cacing tanah pada pakannya, mengalami kesembuhan dari infeksi bakteri *A. hydrophila* maupun dari luka bekas pengambilan darah. Hal ini diduga karena adanya sistem pertahanan tubuh yang mempercepat proses penyembuhan luka dan juga mempercepat penyembuhan akibat infeksi oleh bakteri. Penyembuhan ini diduga akibat adanya zat *Lumbricin-1* yang bersifat sebagai senyawa peptida antimikroba yang dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit di dalam tubuh ikan. Hal ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Prayitno (2006) secara *in vitro* yang menyatakan bahwa *Lumbricin-1* yang terkandung dalam cacing tanah, bersifat bakterisidal terhadap *A. hydrophila* pada konsentrasi efektif sebesar 6 % ekstrak cacing tanah.

Pemanfaatan imunostimulan sebagai sarana pengendalian penyakit pada usaha budidaya dapat meningkatkan ketahanan tubuh ikan sehingga produk yang dihasilkan juga meningkat. Anderson *et al* (1995) dalam Alifudin (2003) menambahkan bahwa imunostimulan dapat meningkatkan produksi radikal oksidatif, aktifitas fagositosis,

imunoglobulin plasma dan aman bagi ikan. Aspek keamanan dalam penggunaan imunostimulan ini merupakan hal utama yang harus diperhatikan sehingga tidak menimbulkan stress pada ikan yang dapat memicu terjadinya penyakit pada ikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian tepung cacing Tanah tidak menimbulkan dampak negatif sehingga aman digunakan sebagai immunostimulan.



V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

- Pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan melalui pakan tidak berpengaruh terhadap kelulushidupan (SR) ikan Mas.
- Pemberian tepung cacing Tanah sebagai immunostimulan berpengaruh sangat nyata terhadap uji hematologi yaitu adanya peningkatan jumlah total leukosit, persentase monosit dan neutrofil serta penurunan persentase trombosit dan limfosit.
- Dosis terbaik penggunaan tepung cacing Tanah sebagai imunostimulan adalah sebanyak 5,7 – 8 % tepung cacing Tanah dalam 1 Kg pakan.

5.2 Saran

Demikian hasil penelitian ini sehingga dapat disarankan :

- Untuk dapat meningkatkan kekebalan tubuh ikan Mas terhadap penyakit infeksi dapat digunakan tepung cacing Tanah dengan dosis 5,7 – 8 % dalam 1 Kg pakan ikan.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemberian tepung cacing Tanah selama lebih dari 2 minggu sebelum ujiantang untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kekebalan tubuh ikan dan uji aktivasi makrofag.

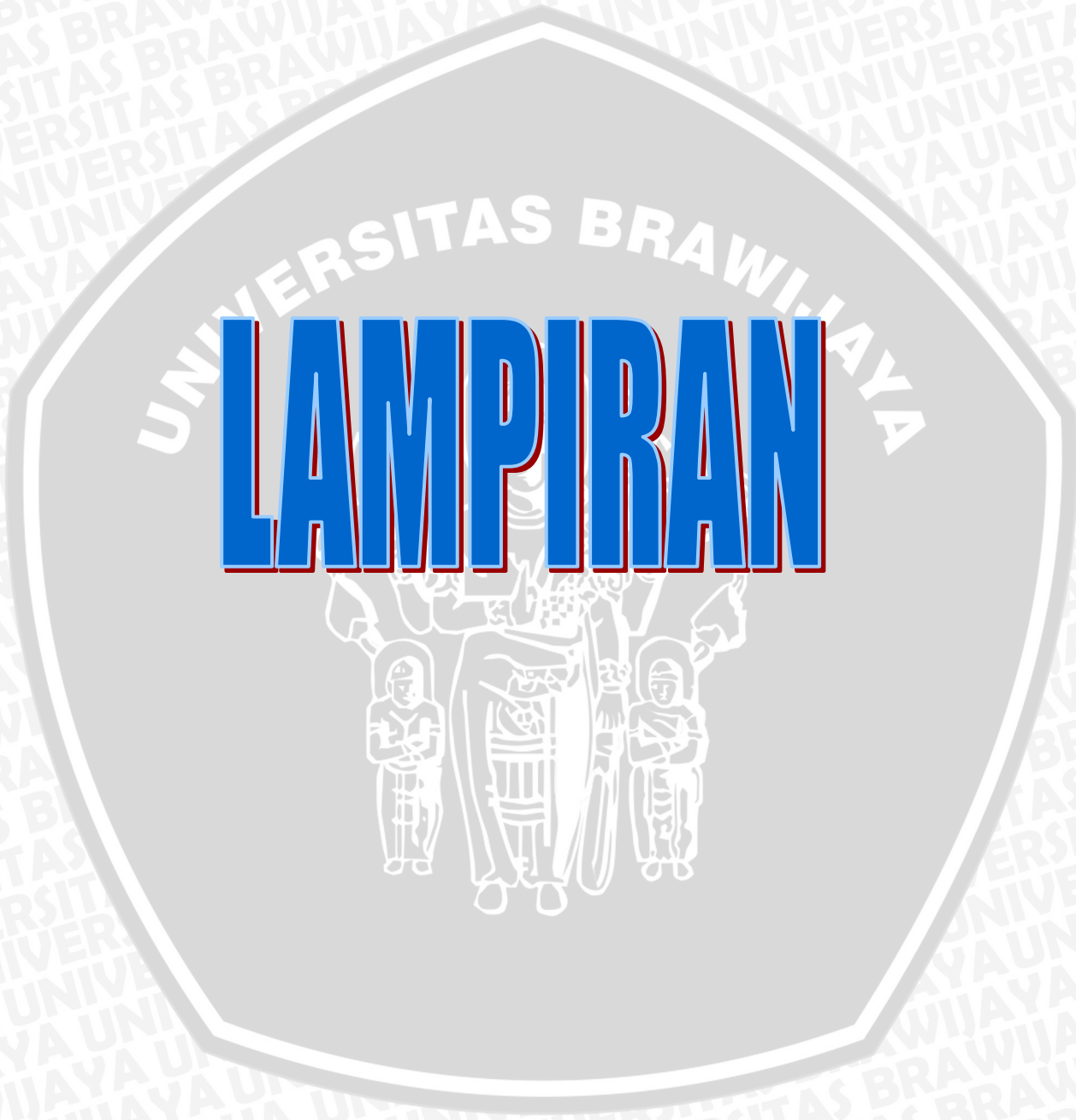
DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2004. **Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri**
<http://www.dkp.go.id>. [21 Juli 2006].
- _____. 2006. **Penawaran Teknologi, Hasil Riset Unggulan Terpadu :
Tepung Cacing Tanah**. <http://www.pdii.lipi.go.id> [21 Juli 2006]
- _____. 2005. **Basic Technique In Fish Haematology**.
http://www.equalex.org/elearning/fish_haematology/english. [2 Pebruari
2007]
- _____. 2007^a. **Cyprinus carpio**. <http://www.mancing.info/biologi.htm#top>
[2 Pebruari 2007]
- _____. 2007^b. **Health Library. Full Blood Count**. <http://www.alexshop.com.sg>
(29 November 2007)
- Afrianto, E dan E. Liviawati. 1998. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**.
Kanisius. Yogyakarta.
- Alifuddin, M. 2003. **Pencegahan Dan Pengobatan Penyakit Ikan**. Jurusan
Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Anderson, D. 1974. **Fish Immunologi**. TFH Publications USA.
- Angka S. L., BP. Priosoeryanto, BW. Lay dan E. Harris. 2004. **Penyakit Motile
Aeromonad Septicaemia Pada Ikan Lele Dumbo**. Forum Pascasarjana Vol.
27. Hal : 339-350
- Bijanti, R. 2005. **Hematologi Ikan : Teknik Pengambilan Darah dan
Pemeriksaan Hematologi Ikan**. Bagian Ilmu Kedokteran Hewan Veteriner.
Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Clark, P.T., Henthorn, J.S., and England, J.M. 1985). **Differential White Cell
Counting on The Coulter Counter**. Clinical and Laboratory Haematology.
- Dwidjoseputro, D. 1987. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan.
Malang. 215 hal.
- Effendi. 1979. **Biologi Perikanan**. UGM Press. Yogyakarta.

- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknik Perikanan.** Rineka Cipta. Jakarta.
- Gandasoebrata, R. 1967. **Penuntun Laboratorium Klinik.** Dian Rakyat. Jakarta.
- Gennaro, R. 2002. **Pro-rich Antimicrobial Peptides from Animals: Structure, Biological, Functions and Mechanism of Action.** [http://www. content.nhiondemand.com](http://www.content.nhiondemand.com) [21 Juli 2006].
- Guyton Dan Hall. 1997. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.** Edisi 7. Bagian 1. Alih Bahasa ; K. A. Tengadi dan kawan-kawan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Ghufron, H. M. Dan Kordi K. 2004. **Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan.** Penerbit Rineka Cipta dan Bina Adiaksara. Jakarta.
- Hanafiah, K. A. 1991. **Rancangan Percobaan, Teori dan Aplikasi.** Edisi Ke-3. Divisi Buku Perguruan Tinggi PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hoffmester. 1843. ***Lumbricus rubellus* (Hoffmester, 1843) sebagai Alternatif Pakan Ikan.** <http://www.o-fish.com/pakanikan/Lumbricus.php> [2 Februari 2007]
- Irianto, A. 2004. **Patologi Ikan Teleostei.** Gajah Mada University Press.
- Johnny, F., Zafran, D. Rona, dan K. Mahardika. 2003. Hematologi Beberapa Spesies Ikan Laut Budidaya. *dalam* Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Edisi Aquakultur. Badan Riset Kelautan Perikanan dan Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Johnny, F., Tridjoko dan Des Roza. 2003. Studi Pendahuluan Pengaruh Hormon Steroid Terhadap Keragaan Hematologi Induk Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis*. Jurnal Veteriner-Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Udaya. <http://www.jvetunud.com/?P=66>. [2 Februari 2007]
- Kabata, Z. 1985. **Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics.** Taylor and Frandhis Ltd. London. 318p.
- Kamiso, H. N. 2004. Status Penyakit Ikan Dan Pengendaliannya Di Indonesia. Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan Dan Udang Berbasis Imunisasi Dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan Dan Udang IV Purwokerto 18-19 Mei.
- Kuswardani, Y. 2006. Pengaruh Pemberian Resin Lebah Terhadap Gambaran Darah Ikan Mas Koki (*Carasius auratus*). *Skripsi.* Departemen Budidaya Perairan. FPIK. IPB. Bogor.

- Linnaeus. 1758. *Lumbricus rubellus*. FreeEncyclopedia.
http://en.wikipedia.org/wiki/Lumbricus_rubellus. [2 Pebruari 2007]
- Lingga, P. 1994. **Ikan Mas Kolam Air Deras**. Penebar Swadaya. Jakarta. 62 hal.
- Nabib, R. dan F. H. Pasaribu. 1989. **Patologi dan Penyakit Ikan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 158 hal.
- Nazir. 1988. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta Timur. 622 hal.
- Pacyna, S. 2003 **Introduced Species Summary Project, European Eartworm (*Lumbricus rubellus*)**. http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoff-burg/invasion=bio/inv-spp-summ/lumbricus_rubellus.html.
- Palungkun, R. 1999. **Sukses Beternak Cacing Tanah *Lumbricus rubellus***. Penebar Swadaya. Jakarta. 88 hal.
- Pelczar, M. J. Dan E. C. S. Chan. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta.
- Prajitno, A. 2004. **Teknologi Immunostimulant (Levamisol) Terhadap Kelulushidupan Udang Windu (*Penaeus monodon*) di Mini Backyard**. Bahan Kuliah Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 3-4 hal.
- Prayitno, S. E. 2006. Pengaruh Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Dengan Konsentrasi Yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. *Skripsi*. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perikanan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Price, S., A., dan Lorcaine, M. W. 1984. **Patofisiologi Konsep Klinik Proses-proses Penyakit ;** Alih bahasa : A. Dharma. Edisi 2, Bag I. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Santoso, B. 1993. **Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas**. Kanisius. Yogyakarta. 83 hal.
- Susanto, H dan A. Rochdianto. 2000. **Kiat Budidaya Ikan Mas di Lahan Kritis**. Penebar Swadaya. Jakarta. 132 hal.
- Sutjiati, M. 1990. **Diktat Kuliah Penyakit Ikan**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 183 hal.
- Simandjuntak, A.K. 1992. **Cacing Tanah, Budidaya dan Pemanfaatannya**. Penebar Swadaya. Jakarta. 42 hal.

- Spector, W. G. 1993. **Pengantar Patologi Umum**. Edisi Ketiga. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Stoskopf, M. 1992. **Fish Medicine**. W. B. Saunders Compeny Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia. 131 hal.
- Svobodova, Z. Dan B. Vykusova. 1991. **Diagnostic, Prevention and Therapy of Fish Disease and Intoxycation. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology**. Vodňany, Czechoslovakia.
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC160E/AC160E00.htm#TOC>.
- Tizard. 1988. **Pengantar Immunologi Veteriner**. Airlangga University Press.
- Volk, W. A. And M. F. Wheeler. 1988. **Mikrobiologi Dasar**. Alih Bahasa : Markham. Edisi V. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Waluyo, J. 2005. **Purifikasi dan Karakterisasi Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah**. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
<http://adln.lib.unair.ac.id/90.php> [2 Pebruari 2007]
- Wikipedia. 2007. **Sel Darah Putih**. Ensiklopedia Bebas Berbahasa Indonesia.
http://id.wikipedia.org/wiki/sel_darah_putih [2 Pebruari 2007]
- _____. **Darah**. Ensiklopedia Bebas Berbahasa Indonesia.
<http://id.wikipedia.org/wiki/darah> [2 Pebruari 2007]
- Webb, J. E. 1981. **Guide To Living Fisher**. The Mac Millan Press. Ltd London.
- White, R. 2006. **Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Infection in Fish**.
<http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1991/aeromonas.shtml>.
Diakses 1 Agustus 2006.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Bahan-bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian.



Gambar Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Sebagai Ikan Uji Pakan Buatan Pellet FF 999



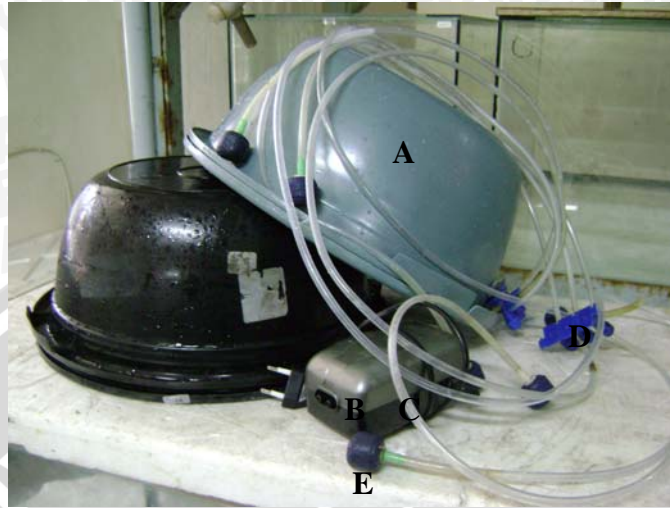
Gambar Cacing Tanah Basah Dan Tepung Cacing Tanah

Lampiran 1. (Lanjutan)



Gambar Akuades (A), Alkohol 70% (B), Larutan Turk's (C), Pewarna Giemsa (D), TSA (E), NB (F), Aluminium foil (G), Na Sitrat (H), Metanol (I), Kaporit (J), Minyak Imerisi (K), Kertas label (L), Kapas (M), pH paper (N), Tissue (O), dan Tissue lensa (P).

Lampiran 2. Alat-alat Yang Digunakan Dalam Penelitian.



Gambar Bak plastik kapasitas 5 L (A), Aerator (B), Selang aerasi (C), Pengatur aerasi (D), dan Batu aerasi (E).



Gambar Autoclave (A), Panci (B), Kompor (C), Hot Plate (D), Fortex (E), dan Timbangan digital (F).



Gambar Blender

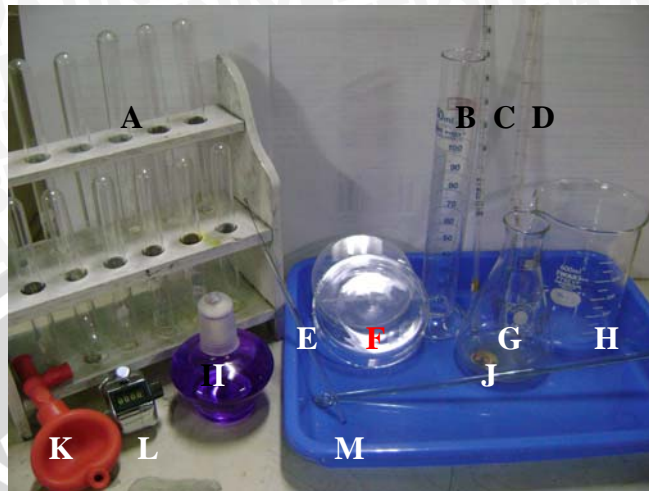


Gambar DO Meter dan Thermoneter



Gambar Mikroskop

Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar Rak dan Tabung Reaksi (A), Gelas ukur (B), Pipet volum 1 mL (C) dan 10 mL (D), Jarum ose (E), Cawan petri (F), Erlenmeyer (G), Becker glass (H), Bunsen (I), Spatula (J), Bola hisap (K), Counter (L), dan Nampan (M).



Gambar Kulkas



Gambar In Case



Gambar Oven



Gambar Haemositometer (A), Tube (B), Pipet Thoma Leukosit (C), Pipet Tetes (D), Syringe/Spuit (E), Objek Glass (F), dan Cover Glass (G).

Lampiran 3. Gambar Denah Penelitian



Lampiran 4. Gambar Proses Koleksi Darah Ikan



Membersihkan Tangan Dengan Alkohol 70 %

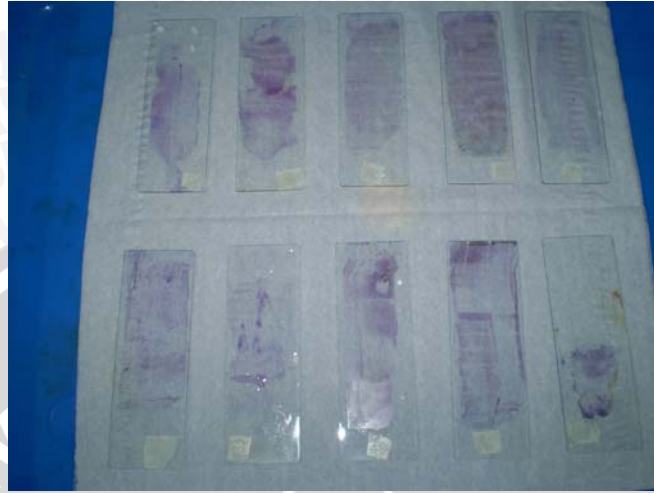


Mengambil Darah Ikan Menggunakan Spuit Dengan Metode Puncti Aorta Dorsal



Menyimpan Darah Di Dalam Tube Sebelum Diamati

Lampiran 5. Gambar Preparat Ulas Darah Untuk Penghitungan Diferensial Leukosit.



Gambar Proses Pengeringan Setelah Pewarnaan.



Gambar Penyimpanan Preparat Ulas Darah dalam Kotak Kayu Sebelum Dilakukan Penghitungan

Lampiran 6. Penghitungan Jumlah Pakan Yang Diberikan Dan Jumlah Tepung Cacing Tanah Yang Dicampurkan Ke dalam Pakan Ikan.

1. Perhitungan Jumlah Pakan Yang Diberikan.

- ✿ Berat Ikan Mas Uji 11,6 gram / ekor
- ✿ Berat biomasa ikan dalam 1 wadah pemeliharaan = 11,6 gram x 5 ekor = 58 gram.
- ✿ Pakan untuk 1 hari = 4 % dari bobot biomasa ikan
= 4 % x 58 gram = 2,32 gram.

2. Perhitungan Jumlah Tepung Cacing Tanah Yang Diberikan.

- ✿ Dosis 4 % = 40 gram Tepung Cacing Tanah dalam 1 Kg Pakan Ikan
Kebutuhan Tepung Cacing Tanah Untuk 1 Hari :
= $\frac{2,32 \text{ gram} \times 40 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} = 0,0928 \text{ gram}$
- ✿ Dosis 6 % = 60 gram Teung Cacing Tanah dalam 1 Kg Pakan Ikan
Kebutuhan Tepung Cacing Tanah Untuk 1 Hari :
= $\frac{2,32 \text{ gram} \times 60 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} = 0,1392 \text{ gram}$
- ✿ Dosis 8 % = 80 gram Tepung Cacing Tanah dalam 1 Kg Pakan Ikan
Kebutuhan Tepung Cacing Tanah Untuk 1 Hari :
= $\frac{2,32 \text{ gram} \times 80 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} = 0,1856 \text{ gram}$

Lampiran 7. Hasil Perhitungan Analisa Data Kelulus hidupan (SR) Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/ml Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tabel Data Persentase SR (%) Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/ml Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

perlakuan	ulangan			jumlah	rerata
	1	2	3		
A (4 %)	60	60	80	200	66,66667
B (6 %)	100	60	60	220	73,33333
C (8 %)	80	100	100	280	93,33333
				700	
K+ (0 %)	60	40	40	140	46,66667
K- (0 %)	60	80	60	200	66,66667

Tabel Data Persentase SR Dalam Transformasi Arc Sin

perlakuan	ulangan			jumlah	rerata
	1	2	3		
A (4 %)	50,76	50,76	63,43	164,95	54,98333
B (6 %)	90,00	50,76	50,76	191,52	63,84
C (8 %)	63,43	90,00	90,00	243,43	81,14333
				599,9	
K+ (0 %)	50,76	39,23	39,23	129,22	43,07333
K- (0 %)	50,76	63,43	50,76	164,95	54,98333

Perhitungan.

1. FK = G^2/rxn
= 39472,4
2. JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 2666,372
3. JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 1062,191
4. JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= 1604,181

Lampiran 7. (Lanjutan)

Tabel Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT=JK/db	Fhit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1062,191	531,0955	1,986417 ^{ns}	5,14	10,9
2. Acak	6	1604,181	267,3635			
3. Total	8	2666,372				

Keterangan : ns = menunjukkan tidak berbeda sehingga analisis tidak perlu dilanjutkan.



Lampiran 9. Hasil Perhitungan Analisa Data Total Leukosit Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/ml Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tabel Data Jumlah Total Leukosit (sel/mm³)

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	105000	105300	105400	315700	105233,33
B (6%)	116000	116400	116100	348500	116166,67
C (8%)	109500	109300	109600	328400	109466,67
				992600	

Tabel Data jumlah Total Leukosit Dalam Transformasi Logaritmik (Dilakukan Transformasi, karena data tersebut menyebar tidak normal)

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	5,0211	5,0224	5,0228	15,0663	5,0221
B (6%)	5,0644	5,0659	5,0648	15,1951	5,0650333
C (8%)	5,0394	5,0386	5,0398	15,1178	5,0392667
				45,3792	

Perhitungan.

1. FK = G^2/rxn
= 228,80798
2. JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 0,0028054
3. JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 0,002802
4. JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= $3,533 \times 10^{-6}$

Lampiran 9. (Lanjutan)

Tabel Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	0,002802	0,001401	2381,303**	5,14	10,9
2. Acak	6	3,53E-06	5,883E-07			
3. Total	8	0,0028054				

Ket : ** = Berbeda sangat nyata

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \frac{\sqrt{2KT_{acak}}}{Ulangan} = 0,0003616$$

$$BNT \ 5\% = t \ 5\% \times SED = 2,447 \times 0,0003616 = 0,0008848$$

$$BNT \ 1\% = t \ 1\% \times SED = 3,707 \times 0,0003616 = 0,0013404$$

Tabel Uji BNT

Rerata	A = 5,0221	C = 5,039267	B = 5,065033	Notasi
A = 5,0221	0	0	0	a
C = 5,039267	0,017167**	0	0	b
B = 5,065033	0,042933**	0,025766**	0	c

Keterangan : Tanda (**) menunjukkan berbeda sangat nyata.

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A = 4 %	15,0663	-1	1
B = 6 %	15,1951	0	-2
C = 8 %	15,1178	1	1
Q = Σ (Ci Ti)		0,0515	-0,2061
Kr = (ΣCi ²) r		6	18
JK= Q2 / Kr		0,000442	0,00235984

Lampiran 9. (Lanjutan)

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	0,002802	0,001401		5,99	13,7
Linier	1	0,000442	0,000442	751,2748**		
Kuadratik	1	0,0023598	0,0023598	4010,992**		
2. Acak	6	3,53E-06	5,883E-07			
Total	8	0,0028054	0,0003507			

Koefisien determinan (R²)

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ Kuadratik}}{JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Acak}} = 0,9985$$

$$r = 0,9992$$

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} = 0,9920$$

$$r = 0,9960$$

Keterangan : R² Kuadratik lebih besar dari R² Linier, maka persamaan yang digunakan adalah persamaan kuadratik.

Persamaan Kuadratik

$$Y = b_0 + b_1X_j + b_2X_j^2$$

Tabel Persamaan Garis Kuadratik

Perlakuan	A	B	C	Total
X _j	4	6	8	18
U _j	-1	0	1	0
U _j ²	1	0	1	2
U _j ⁴	1	0	1	2
Y _{ij}	315700	348500	328400	992600
U _j .Y _{ij}	-315700	0	328400	12700
U _j ² .Y _{ij}	315700	0	328400	644100

Perhitungan

Rata-rata Perlakuan : $= (4 + 6 + 8) / 3 = 6$

$$U_j = \frac{X - \bar{X}}{d} = (X - 6)/2 \quad d = \text{range atau rentang antar dosis perlakuan}$$

Lampiran 9. (Lanjutan)

Transformasi Uj : X = 4 maka, Uj = -1
 X = 6 maka, Uj = 0
 X = 8 maka, Uj = 1

1. Mencari nilai b1

$$\sum U_j \cdot Y_{ij} = b1 \cdot r \cdot \sum (U_j^2)$$

$$12700 = b1 \cdot 3 \cdot 2$$

$$b1 = 2116,6667$$

2. Menentukan persamaan (1)

$$\sum Y_{ij} = b0 \cdot n + b2 \cdot r \cdot \sum (U_j^2)$$

$$992600 = b0 \cdot 9 + b2 \cdot 3 \cdot 2$$

$$992600 = 9b0 + 6b2 \dots\dots\dots (1)$$

3. Menentukan persamaan (2)

$$\sum (U_j^2) \cdot Y_{ij} = b0 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) + b2 \cdot r \cdot \sum (U_j^4)$$

$$644100 = b0 \cdot 3 \cdot 2 + b2 \cdot 3 \cdot 2$$

$$644100 = 6b0 + 6b2 \dots\dots\dots (2)$$

4. Substitusi persamaan (1) dan (2)

$$992600 = 9b0 + 6b2$$

$$\underline{644100 = 6b0 + 6b2 \quad (-)}$$

$$384500 = 3b0$$

$$b0 = 116166,7$$

5. Distribusi nilai b2

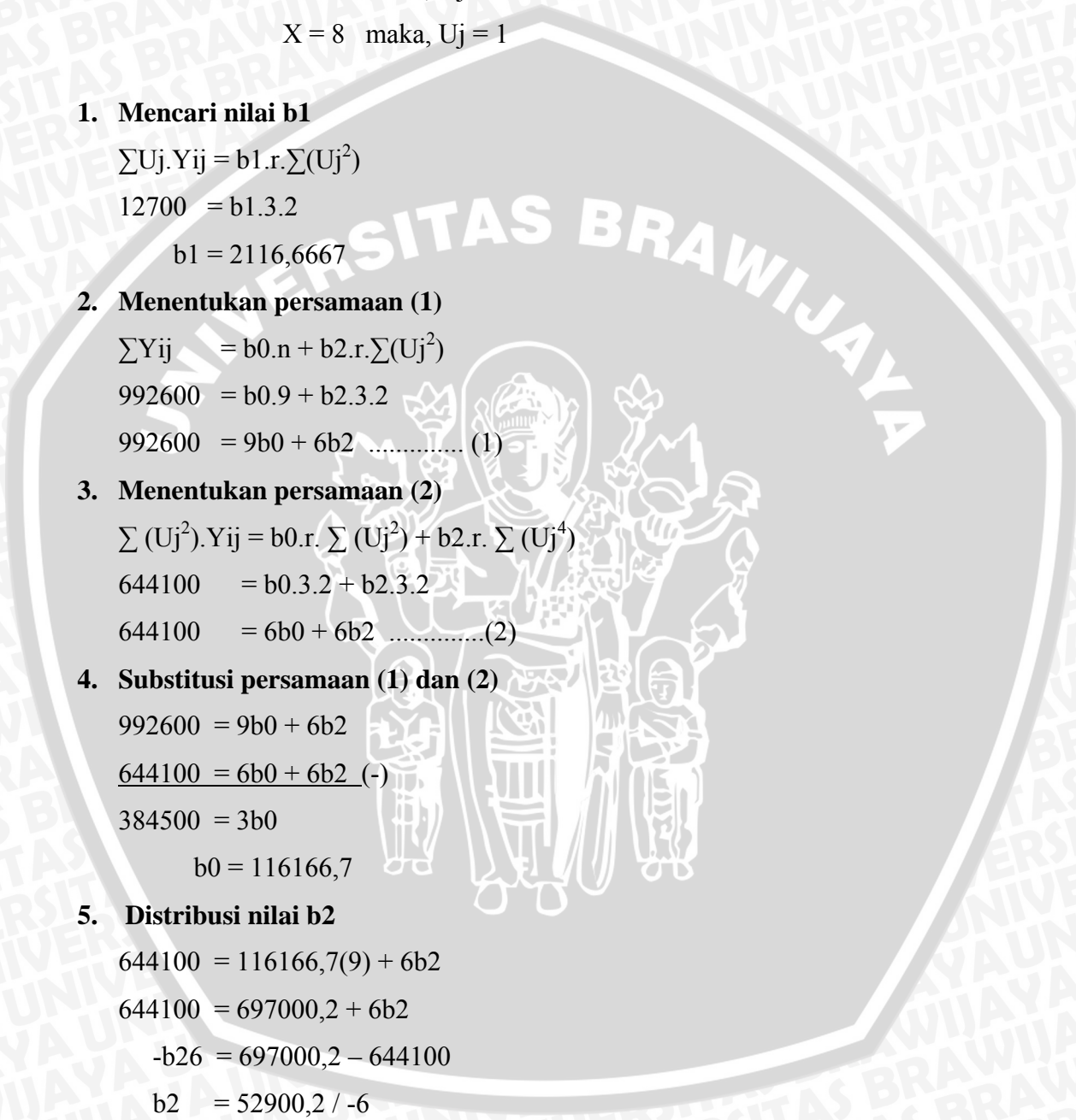
$$644100 = 116166,7(9) + 6b2$$

$$644100 = 697000,2 + 6b2$$

$$-b26 = 697000,2 - 644100$$

$$b2 = 52900,2 / -6$$

$$b2 = -8816,7$$



Lampiran 9. (Lanjutan)

Nilai b_0 , b_1 , dan b_2 dimasukkan ke dalam rumus umum :

$$Y = b_0 + b_1X_j + b_2X_j^2$$

$$Y = b_0 + b_1.U_j + b_2.(U_j)^2$$

$$Y = 116166,7 + 2116,67 \frac{(X-6)}{2} - 8816,67 \frac{(X^2 - 12X + 36)}{4}$$

$$Y = 116166,7 + 1058,335X - 6350,01 - 2204,168X^2 + 26450,01X - 79350,03$$

Menghasilkan persamaan :

$$Y = 30466,63 + 27508,35X - 2204,168X^2$$

Sehingga untuk : $X = 4$ $Y = 105233,34$

$X = 6$ $Y = 116166,68$

$X = 8$ $Y = 109466,68$

Mencari titik puncak persamaan

Turunan pertama dari persamaan $Y = 0$ atau $Y^1 = 0$

$$Y = 30466,63 + 27508,35X - 2204,168X^2$$

$$Y^1 = 27508,35 - 2(2204,168)X$$

$$X = \frac{27508,35}{4408,336}$$

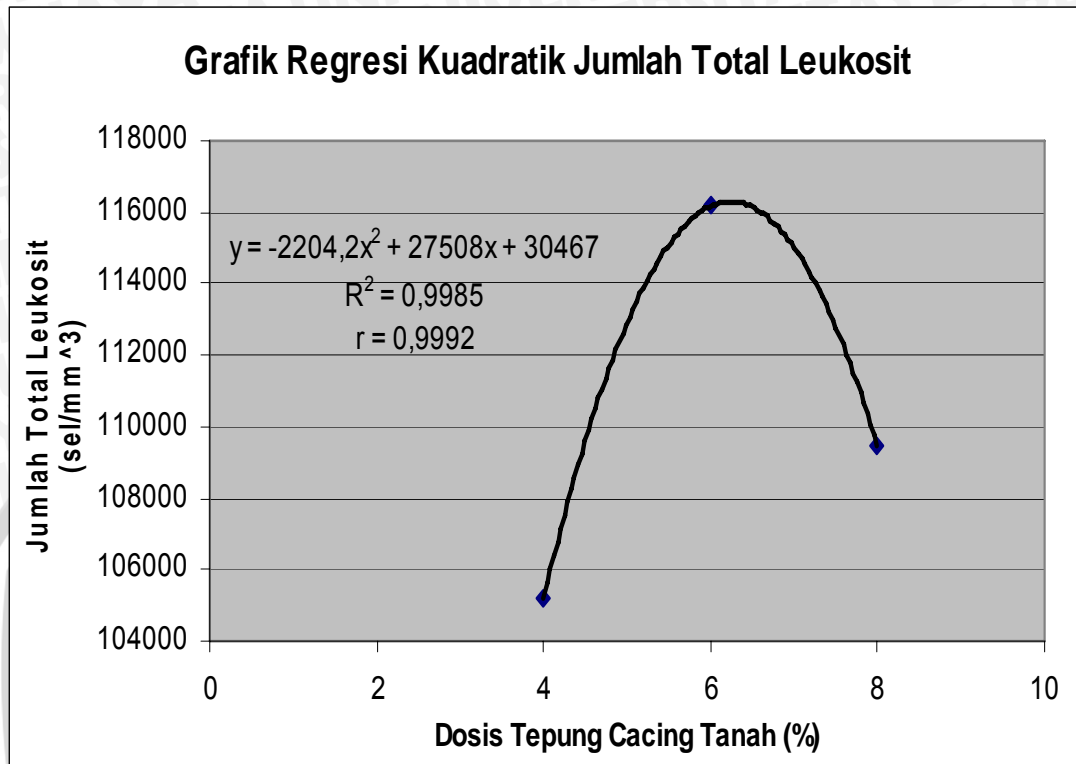
$$X = 6,24004$$

Maka : $Y = 30466,63 + 27508,35(6,24004) - 2204,168(6,24004)^2$

$$Y = 116239,7221$$

Diperoleh titik puncak : $(X,Y) = [(6,24004) ; (116239,7221)]$

GAMBAR GRAFIK REGRESI UNTUK JUMLAH TOTAL LEUKOSIT



Lampiran 10. Hasil Penghitungan Diferensial Leukosit Ikan Mas

A. Monosit

Perlakuan	Ulangan	Jumlah (%)		Rata-rata (%)	
		Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	setelah Infeksi
A	1	23	50	24,66666667	49,33333333
	2	25	52		
	3	26	46		
B	1	8	70	8,333333333	72,33333333
	2	7	75		
	3	10	72		
C	1	9	37	10,33333333	35
	2	10	35		
	3	12	33		
K+	1	37	50	36	50,66666667
	2	36	45		
	3	35	57		
K-	1	17	18	18,66666667	19
	2	19	20		
	3	20	19		

B. Limfosit

Perlakuan	Ulangan	Jumlah (%)		Rata-rata (%)	
		Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	setelah Infeksi
A	1	39	15	37,33333333	16,33333333
	2	37	16		
	3	36	18		
B	1	26	13	27	10,66666667
	2	27	8		
	3	28	11		
C	1	23	9	24,33333333	7,33333333
	2	26	8		
	3	24	5		
K+	1	18	25	19,66666667	24,66666667
	2	22	32		
	3	19	17		
K-	1	17	30	17	31,33333333
	2	16	31		
	3	18	33		

Lampiran 10. (Lanjutan)

C. Trombosit

Perlakuan	Ulangan	Jumlah (%)		Rata-rata (%)	
		Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	setelah Infeksi
A	1	30	25	28,33333333	22,66666667
	2	28	20		
	3	27	23		
B	1	53	12	50,66666667	10,33333333
	2	49	10		
	3	50	9		
C	1	49	4	50	6
	2	50	3		
	3	51	11		
K+	1	39	15	38	11,33333333
	2	37	10		
	3	38	9		
K-	1	59	45	57,33333333	42,33333333
	2	57	40		
	3	56	42		

D. Netrofil

Perlakuan	Ulangan	Jumlah (%)		Rata-rata (%)	
		Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	setelah Infeksi
A	1	8	10	9,66666667	11,66666667
	2	10	12		
	3	11	13		
B	1	13	5	14	6,66666667
	2	17	7		
	3	12	8		
C	1	19	50	15,33333333	53,33333333
	2	14	54		
	3	13	56		
K+	1	6	10	7	12,66666667
	2	7	13		
	3	8	15		
K-	1	7	7	8	7,33333333
	2	8	9		
	3	9	6		

Lampiran 11. Hasil Perhitungan Analisa Data Persentase Monosit Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/mm³ Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tabel Jumlah Monosit Ikan Mas (%)

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	50	52	46	148	49,33333
B (6%)	70	75	72	217	72,33333
C (8%)	37	35	33	105	35
Jumlah Total				470	

Tabel Jumlah Monosit Setelah Transformasi Arc Sin

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	45	46,14	42,7	133,84	44,61333
B (6%)	56,78	60,0	58,05	174,83	58,27667
C (8%)	37,46	36,27	35,06	108,79	36,26333
Jumlah Total				417,46	

Perhitungan.

- FK = G^2/rxn
= 19363,65
- JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 755,2784
- JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 740,996
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= 14,2824

Tabel Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	740,996	370,498	155,6453**	5,14	10,9
2. Acak	6	14,2824	2,3804			
3. Total	8	755,2784				

Keterangan : ** = menunjukkan berbeda sangat nyata

Lampiran 11. (Lanjutan)

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \frac{\sqrt{2KT_{acak}}}{Ulangan}$$

$$= 0,7273$$

$$BNT \ 5\% = t \ 5\% \times SED$$

$$= 2,447 \times 0,7273$$

$$= 1,7797$$

$$BNT \ 1\% = t \ 1\% \times SED$$

$$= 3,707 \times 0,7273$$

$$= 2,6961$$

Tabel Uji BNT

Rerata	C = 36,263	A = 44,613	B = 58,276	Notasi
C = 36,263	0	0	0	a
A = 44,613	8,35**	0	0	b
B = 58,276	22,013**	13,663**	0	c

Keterangan : Tanda (**) menunjukkan berbeda sangat nyata

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A = 4 %	133,84	-1	1
B = 6 %	174,83	0	-2
C = 8 %	108,79	1	1
Q = Σ (Ci Ti)		-25,05	-107,03
Kr = (ΣCi ²) r		6	18
JK= Q2 / Kr		104,5838	636,41227

Tabel sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	740,996	370,498			
Linier	1	104,5838	104,5838	43,93539**		
Kuadratik	1	636,4123	636,4123	267,3552**	5,99	13,7
2. Acak	6	1,43E+01	2,3804			
Total	8	755,2784	94,4098			

Ket : ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 11. (Lanjutan)

Koefisien determinan (R²)

$$R^2 \text{ Kuadrat} = \frac{JK \text{ Kuadrat}}{JK \text{ Kuadrat} + JK \text{ Acak}} = 0,9780$$

$$r = 0,9889$$

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} = 0,8794$$

$$r = 0,938$$

Keterangan : Karena R² Kuadrat lebih besar dari R² Linier, maka persamaan yang digunakan adalah persamaan Kuadrat.

Persamaan Kuadrat

$$Y = b_0 + b_1X_j + b_2X_j^2$$

Perhitungan

Rata-rata Perlakuan : $= (4 + 6 + 8) / 3 = 6$

$$U_j = \frac{X - \bar{X}}{d} = (X - 6)/2 \quad d = \text{range atau rentang antar dosis perlakuan}$$

- Transformasi U_j :
- X = 4 maka, U_j = -1
 - X = 6 maka, U_j = 0
 - X = 8 maka, U_j = 1

Tabel Persamaan Garis Kuadrat

Perlakuan	A	B	C	Total
X _j	4	6	8	18
U _j	-1	0	1	0
U _j ²	1	0	1	2
U _j ⁴	1	0	1	2
Y _{ij}	148	217	105	470
U _j .Y _{ij}	-148	0	105	-43
U _j ² .Y _{ij}	148	0	105	253

Lampiran 11. (Lanjutan)

1. Mencari nilai b1

$$\begin{aligned} \sum U_j \cdot Y_{ij} &= b_1 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) \\ (-43) &= b_1 \cdot 3 \cdot 2 \\ b_1 &= -7,1667 \end{aligned}$$

2. Menentukan persamaan (1)

$$\begin{aligned} \sum Y_{ij} &= b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) \\ 470 &= b_0 \cdot 9 + b_2 \cdot 3 \cdot 2 \\ 470 &= 9b_0 + 6b_2 \dots\dots\dots (1) \end{aligned}$$

3. Menentukan persamaan (2)

$$\begin{aligned} \sum (U_j^2) \cdot Y_{ij} &= b_0 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^4) \\ 253 &= b_0 \cdot 3 \cdot 2 + b_2 \cdot 3 \cdot 2 \\ 253 &= 6b_0 + 6b_2 \dots\dots\dots (2) \end{aligned}$$

4. Substitusi persamaan (1) dan (2)

$$\begin{aligned} 470 &= 9b_0 + 6b_2 \\ \underline{253} &= \underline{9b_0 + 6b_2} \quad (-) \\ 217 &= 3b_0 \\ b_0 &= 72,33 \end{aligned}$$

5. Distribusi nilai b2

$$\begin{aligned} 470 &= 9b_0 + 6b_2 \\ 470 &= (72,33) (9) + 6b_2 \\ 470 &= 650,97 + 6b_2 \\ b_2 &= \frac{180,97}{-6} \\ b_2 &= -30,161 \end{aligned}$$

Nilai b0, b1, dan b2 dimasukkan ke dalam rumus umum :

$$\begin{aligned} Y &= b_0 + b_1 X_j + b_2 X_j^2 \\ Y &= b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot (U_j)^2 \\ Y &= 72,33 - 7,1667 \frac{(X-6)}{2} - 30,161 \frac{(X^2 - 12X + 36)}{4} \end{aligned}$$

Lampiran 11. (Lanjutan)

Menghasilkan persamaan :

$$Y = -177,6189 + 86,89965X - 7,540X^2$$

Sehingga untuk : X = 4 Y = 49,3397

 X = 6 Y = 72,339

 X = 8 Y = 35,0183

Mencari titik puncak persamaan

$$Y = -177,6189 + 86,89965X - 7,540X^2$$

Turunan pertama dari persamaan $Y = 0$ atau $Y^1 = 0$

$$Y^1 = 86,8996 - 2(7,540)X$$

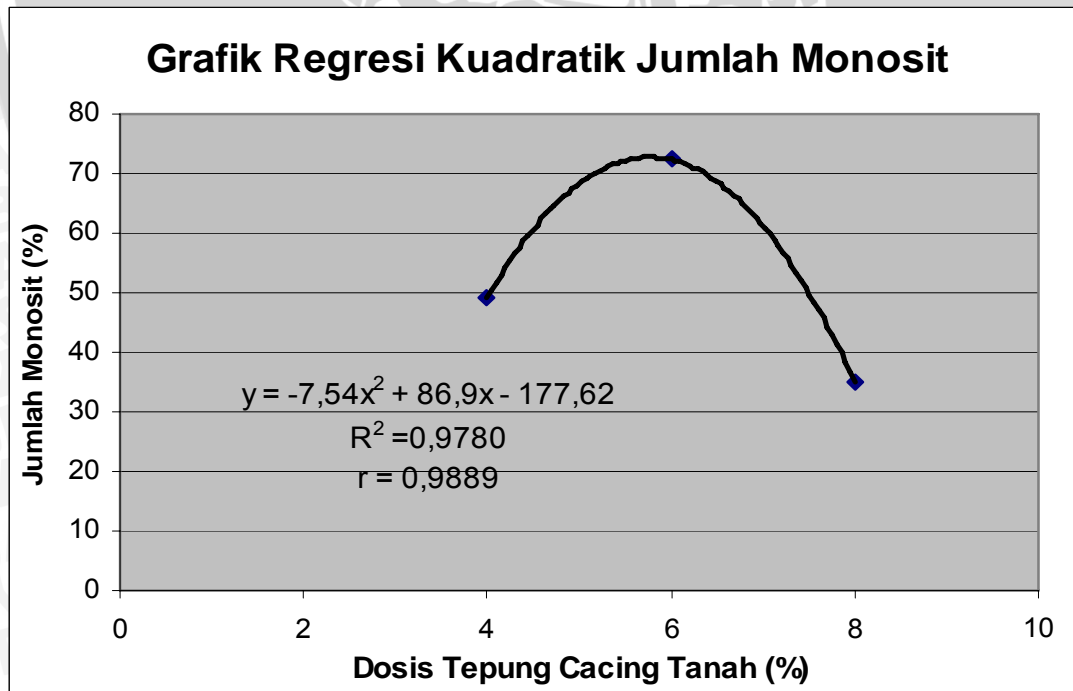
$$X = \frac{86,89965}{15,028} = 5,7625$$

Maka : $Y = -177,6189 + 86,89965(5,7625) - 7,540(5,7625)^2$

$Y = 72,76403$

Diperoleh titik puncak : $(X,Y) = [5,7625 ; 72,76403]$

GAMBAR GRAFIK REGRESI



Lampiran 12. Hasil Perhitungan Analisa Data Persentase Limfosit Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/mm³ Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tabel Persentase Limfosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	15	16	18	49	16,33333
B (6%)	13	8	11	32	10,66667
C (8%)	9	8	5	22	7,333333
Jumlah Total				103	

Tabel Persentase Limfosit Ikan Mas Dalam Transformasi Akar Kuadrat

perlakuan	ulangan			jumlah	rerata
	1	2	3		
A (4 %)	3,872	4	4,242	12,114	4,038
B (6%)	3,605	2,915	3,316	9,836	3,278667
C (8%)	3,082	2,915	2,345	8,342	2,780667
Jumlah Total				30,292	

Keterangan : Menggunakan transformasi akar kuadrat karena data menyebar antara 0 – 30 % (Sastrosupadi, 2000).

Perhitungan.

1. FK = G^2/rxn
= 101,9561
2. JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 3,014888
3. JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 2,405476
4. JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= 0,609409

Tabel Sidik Ragam

sumber keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%
1. perlakuan	2	2,405478	1,202739	11,84169**		
2. acak	6	0,609409	0,101568			
3. total	8	3,014888	0,376861		5,14	10,9

Keterangan : ** = menunjukkan berbeda sangat nyata

Lampiran 12. (Lanjutan)

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \frac{\sqrt{2KTacak}}{Ulangan} = 0,1502$$

$$BNT 5\% = t 5\% \times SED = 2,447 \times 0,1502 = 0,367$$

$$BNT 1\% = t 1\% \times SED = 3,707 \times 0,1502 = 0,556$$

Tabel Uji BNT

Rerata	C = 2,780	B = 3,278	A = 4,038	Notasi
C = 2,780	0	0	0	a
B = 3,278	0,498**	0	0	b
A = 4,038	1,258**	0,76**	0	c

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A = 4 %	12,114	-1	1
B = 6 %	9,836	0	-2
C = 8 %	8,342	1	1
Q = Σ (Ci Ti)		-3,772	0,784
Kr = (ΣCi ²) r		6	18
JK= Q2 / Kr		2,3713	0,0341

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	2,405478	1,5075			
Linier	1	2,3713	2,3713	23,36256**		
Kuadratik	1	0,0341	0,0341	0,335961ns	5,99	13,7
2. Acak	6	6,09E-01	0,1015			
Total	8	3,014888	0,376861			

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata ; ns = tidak berbeda

Lampiran 12. (Lanjutan)

Koefisien Determinan (R²) :

$$R^2 \text{ Kuadrat} = \frac{JK \text{ Kuadrat}}{JK \text{ Kuadrat} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,0529$$

$$r = 0,2301$$

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,796$$

$$r = 0,891$$

Keterangan : Karena R² Linier lebih besar dari R² Kuadrat, maka persamaan yang digunakan adalah persamaan Linier.

Persamaan Linier :

$$Y = b_0 + b_1X$$

Tabel Persamaan Garis Linier

Perlakuan	X	Y	X.Y	X ²
A	4	16,333	65,332	16
B	6	10,667	64,002	36
C	8	7,333	58,664	68
Total	18	34,333	187,998	120

Perhitungan :

$$b_1 = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$= -1,5$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

$$= 20,444$$

Diperoleh persamaan linier :

$$Y = b_0 + b_1X$$

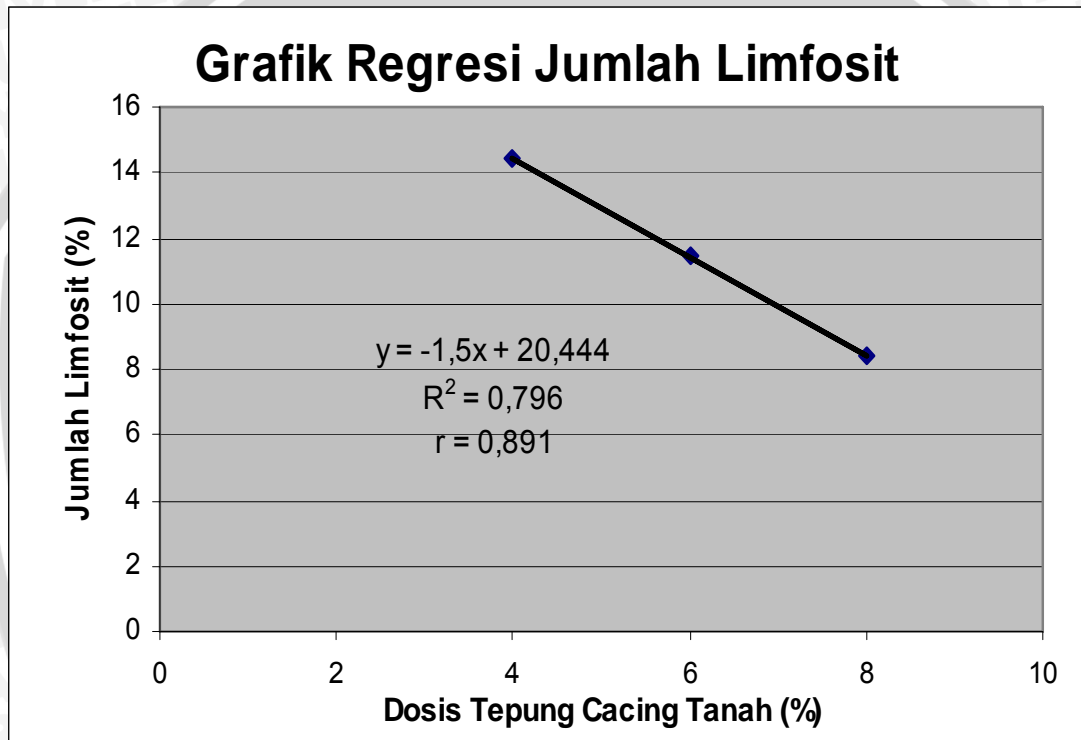
$$Y = 20,444 - 1,5X$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

Sehingga :

Untuk	X = 4	Y = 14,44433
	X = 6	Y = 11,44433
	X = 8	Y = 8,444333

Gambar Grafik Regresi



Lampiran 13. Hasil Perhitungan Analisa Data Persentase Trombosit Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/mm³ Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tabel Persentase Trombosit Ikan Mas Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	25	20	23	68	22,66667
B (6%)	12	10	9	31	10,33333
C (8%)	4	3	11	18	6,00000
Jumlah Total				117	

Tabel Persentase Trombosit Setelah Transformasi Akar Kuadrat

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	5	4,472	4,795	14,267	4,755667
B (6%)	3,464	3,162	3,082	9,708	3,236
C (8%)	2,121	1,87	3,316	7,307	2,435667
Jumlah Total				31,282	

Keterangan : Menggunakan transformasi akar kuadrat karena data menyebar antara 0 – 30 % (Sastrosupadi, 2000).

Perhitungan.

1. FK = G^2/rxn
= 108,7293
2. JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 9,74919
3. JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 8,33232
4. JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= 1,416869

Tabel Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	8,33232	4,16616	17,64239**	5,14	10,9
2. Acak	6	1,416869	0,236145			
3. Total	8	9,74919				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 13. (Lanjutan)

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \frac{\sqrt{2KT_{acak}}}{Ulangan} = 0,229078$$

$$BNT\ 5\% = t\ 5\% \times SED = 2,447 \times 0,229078 = 0,5605$$

$$BNT\ 1\% = t\ 1\% \times SED = 3,707 \times 0,229078 = 0,849191$$

Tabel Uji BNT

Rerata	C = 2,435	B = 3,236	A = 4,755	Notasi
C = 2,435	0	0	0	a
B = 3,236	0,801*	0	0	b
A = 4,755	2,32**	1,519**	0	c

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A = 4 %	14,267	-1	1
B = 6 %	9,708	0	-2
C = 8 %	7,307	1	1
Q = Σ (Ci Ti)		-6,96	2,158
Kr = (ΣCi ²) r		6	18
JK= Q2 / Kr		8,0736	0,2587202

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	8,33232	4,16616			
Linier	1	8,0736	8,0736	34,18919**		
Kuadratik	1	0,25872	0,25872	1,09559ns	5,99	13,7
2. Acak	6	1,42E+00	0,236145			
Total	8	9,74919	1,218649			

Ket : ** = berbeda sangat nyata ; ns = tidak berbeda

Lampiran 13. (Lanjutan)

Koefisien Determinan (R²) :

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ Kuadratik}}{JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,1544$$

$$r = 0,3929$$

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,8507$$

$$r = 0,9223$$

Keterangan : Karena R² Linier lebih besar dari R² Kuadratik, maka persamaan yang digunakan adalah persamaan Linier.

Persamaan Linier :

$$Y = b_0 + b_1X$$

Tabel Persamaan Garis Linier

Perlakuan	X	Y	X.Y	X ²
A	4	22,66667	90,66668	16
B	6	10,33333	61,99998	36
C	8	6,0000	48	68
Total	18	39	200,6667	120

Perhitungan :

$$b_1 = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$= -2,77778$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

$$= 29,66667$$

Diperoleh persamaan linier :

$$Y = b_0 + b_1X$$

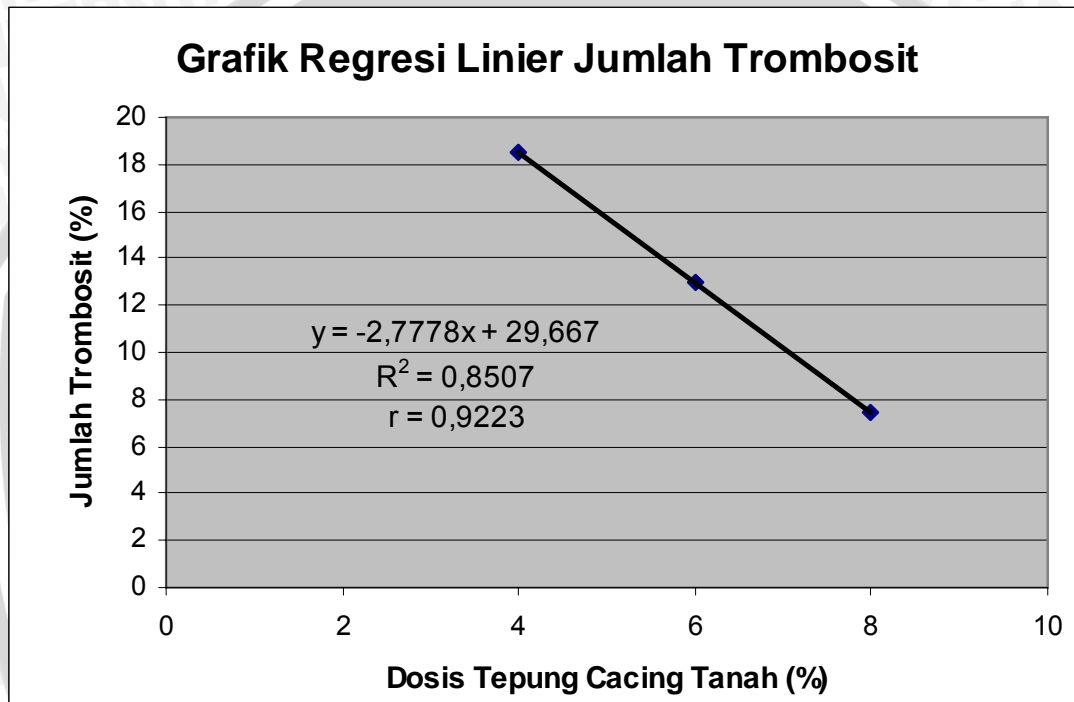
$$Y = 29,667 - 2,778X$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

Sehingga :

Untuk	X = 4	Y = 18,556
	X = 6	Y = 13,000
	X = 8	Y = 7,443

Gambar Grafik Regresi



Lampiran 14. Hasil Perhitungan Analisa Data Persentase Neutrofil Ikan Mas Setelah Dilakukan Uji Tantang Dengan 10^7 sel/mm³ Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Tabel Persentase Neutrofil Ikan Mas Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	10	12	13	35	11,66667
B (6%)	5	7	8	20	6,666667
C (8%)	50	54	56	160	53,33333
Jumlah Total				215	

Tabel Persentase Neutrofil Ikan Mas Setelah Transformasi Arc Sin

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A (4%)	18,434	20,267	21,134	59,835	19,945
B (6%)	12,92	15,341	16,429	44,69	14,89667
C (8%)	45	47,294	48,446	140,74	46,91333
Jumlah Total				245,265	

Perhitungan.

- FK = G^2/rxn
= 6683,88
- JK Total = $A1^2 + A2^2 + \dots + C3^2 - FK$
= 1794,252
- JK Perlakuan = $(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 / \text{ulangan}) - FK$
= 1777,844
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
= 16,40803

Tabel Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1777,844	888,922	325,0562**	5,14	10,9
2. Acak	6	16,40803	2,734672			
3. Total	8	1794,252				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 14. (Lanjutan)

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \frac{\sqrt{2KT_{\text{acak}}}}{\text{Ulangan}} \\ &= 0,779554 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t_{5\%} \times \text{SED} \\ &= 2,447 \times 0,779554 \\ &= 1,907569 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t_{1\%} \times \text{SED} \\ &= 3,707 \times 0,779554 \\ &= 2,889808 \end{aligned}$$

Tabel Uji BNT

Rerata	B = 14,896	A = 19,945	C = 46,913	Notasi
B = 14,896	0	0	0	a
A = 19,945	5,049**	0	0	b
C = 46,913	32,017**	26,968**	0	c

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A = 4 %	59,835	-1	1
B = 6 %	44,69	0	-2
C = 8 %	140,74	1	1
Q = $\sum (Ci Ti)$		80,905	111,195
Kr = $(\sum Ci^2) r$		6	18
JK = Q2 / Kr		1090,937	686,9071

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	2	1777,844	888,922		5,99	13,7
Linier	1	1090,937	1090,937	398,928**		
Kuadratik	1	686,9071	686,9071	251,1845**		
2. Acak	6	16,40803	2,734672			
Total	8	1794,252	224,2815			

Ket : ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 14. (Lanjutan)

Koefisien Determinan (R²) :

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ Kuadratik}}{JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,977$$

$$r = 0,9882$$

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}}$$

$$= 0,9851$$

$$r = 0,9925$$

Keterangan : Karena perbedaan nilai R² Linier dan nilai R² Kuadratik tidak terlalu jauh, dan berdasarkan jumlah persentase neutrofil seperti terlihat pada tabel, maka digunakan regresi kuadratik.

Persamaan Kuadratik

$$Y = b_0 + b_1X_j + b_2X_j^2$$

Perhitungan

Rata-rata Perlakuan : $= (4 + 6 + 8) / 3 = 6$

$$U_j = \frac{X - \bar{X}}{d} = (X - 6)/2 \quad d = \text{range atau rentang antar dosis perlakuan}$$

Transformasi U_j : X = 4 maka, U_j = -1

X = 6 maka, U_j = 0

X = 8 maka, U_j = 1

Tabel Persamaan Garis Kuadratik

Perlakuan	A	B	C	Total
X _j	4	6	8	18
U _j	-1	0	1	0
U _j ²	1	0	1	2
U _j ⁴	1	0	1	2
Y _{ij}	35	20	160	215
U _j .Y _{ij}	-35	0	160	125
U _j ² .Y _{ij}	35	0	160	195

Lampiran 14. (Lanjutan)

6. Mencari nilai b1

$$\begin{aligned} \sum U_j \cdot Y_{ij} &= b_1 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) \\ 125 &= b_1 \cdot 3 \cdot 2 \\ b_1 &= 20,833 \end{aligned}$$

7. Menentukan persamaan (1)

$$\begin{aligned} \sum Y_{ij} &= b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) \\ 215 &= b_0 \cdot 9 + b_2 \cdot 3 \cdot 2 \\ 215 &= 9b_0 + 6b_2 \dots\dots\dots (1) \end{aligned}$$

8. Menentukan persamaan (2)

$$\begin{aligned} \sum (U_j^2) \cdot Y_{ij} &= b_0 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^4) \\ 195 &= b_0 \cdot 3 \cdot 2 + b_2 \cdot 3 \cdot 2 \\ 195 &= 6b_0 + 6b_2 \dots\dots\dots (2) \end{aligned}$$

9. Substitusi persamaan (1) dan (2)

$$\begin{aligned} 215 &= 9b_0 + 6b_2 \\ \underline{195} &= \underline{9b_0 + 6b_2} \quad (-) \\ 20 &= 3b_0 \\ b_0 &= 6,667 \end{aligned}$$

10. Distribusi nilai b2

$$\begin{aligned} 195 &= 6b_0 + 6b_2 \\ 195 &= (72,33) (6) + 6b_2 \\ 195 &= 40,0002 + 6b_2 \\ b_2 &= \frac{-154,9998}{-6} \\ b_2 &= 25,833 \end{aligned}$$

Nilai b0, b1, dan b2 dimasukkan ke dalam rumus umum :

$$\begin{aligned} Y &= b_0 + b_1 X_j + b_2 X_j^2 \\ Y &= b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot (U_j)^2 \\ Y &= 6,667 + 20,833 \frac{(X-6)}{2} + 25,833 \frac{(X^2 - 12X + 36)}{4} \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)**Menghasilkan persamaan :**

$$Y = 176,665 - 67,0825X + 6,45825X^2$$

$$\text{Sehingga untuk : } \quad X = 4 \quad Y = 11,667$$

$$\quad \quad \quad X = 6 \quad Y = 6,667$$

$$\quad \quad \quad X = 8 \quad Y = 53,333$$

Mencari titik puncak persamaan

$$Y = 176,665 - 67,0825X + 6,45825X^2$$

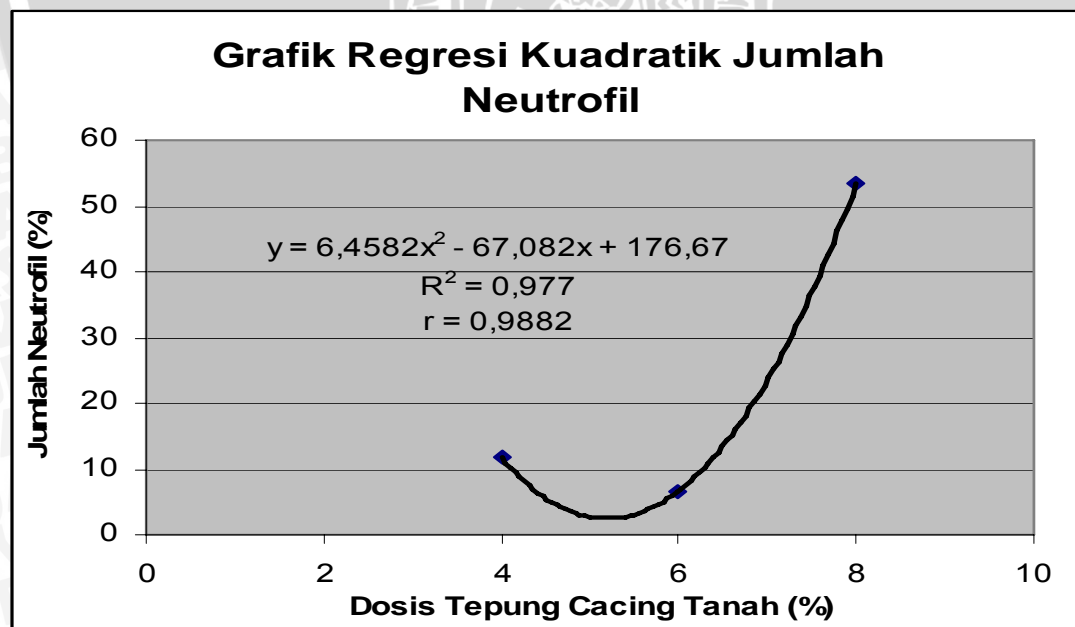
Turunan pertama dari persamaan $Y = 0$ atau $Y' = 0$

$$Y' = -67,0825 + 2(6,45825)X$$

$$X = \frac{67,0825}{12,9165} = 5,19355$$

$$\text{Maka : } \quad Y = 176,665 - 67,0825(5,19355) + 6,45825(5,19355)^2$$

$$Y = 2,466811$$

Diperoleh titik puncak : $(X,Y) = [5,19355 ; 2,466811]$ **GAMBAR GRAFIK REGRESI**

Lampiran 15. Hasil Pengamatan Kualitas Air Media Pemeliharaan Selama Perlakuan

Tabel Hasil Pengamatan Kualitas Air

Perlakuan	Parameter Uji				Rata-rata		
	Ulangan	Suhu (0C)	DO (mg/L)	pH	Suhu	DO	pH
A	1	23,2	7,71	7,32	23,2333	8,6167	7,3867
	2	23,2	7,64	7,41			
	3	23,3	10,5	7,43			
B	1	23,3	7,44	7,43	23,3667	7,3633	7,4033
	2	23,4	7,36	7,39			
	3	23,4	7,29	7,39			
C	1	23,3	7,1	7,36	23,3	6,87	7,3533
	2	23,3	6,69	7,34			
	3	23,3	6,82	7,36			
K+	1	23,3	7,64	7,39	23,2667	7,5933	7,3867
	2	23,3	7,59	7,41			
	3	23,2	7,55	7,36			
K-	1	23,1	7,67	7,3	23,2	7,5433	7,28
	2	23,3	7,56	7,27			
	3	23,2	7,4	7,27			

Rata-rata nilai kualitas air media pemeliharaan selama perlakuan

Suhu : 23,27 °C

DO : 7,59 mg/L

pH : 7,36



Lampiran 16. Penghitungan Total Leukosit (Sel Darah Putih) (Svobodova, 1991).

1. Hisap darah dari tube menggunakan Pipet Thoma Leukosit sampai skala 0,5
2. Hisap larutan Turk's sampai skala 11
3. Goyangkan pipet secara perlahan-lahan sampai larutan menjadi homogen selama 3 menit dengan hati-hati jangan sampai larutan terbuang.
4. Siapkan haemositometer dan beri cover glass. Sentuhkan ujung pipety di tepi cover glass dan biarkan larutan dengan sendirinya mengisi ruang di antara haemositometer dan cover glass.
5. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaan 200 – 400 kali.
6. Hitung jumlah sel darah putih pada 5 lapang pandang.
7. Hitung total sel darah puih dengan menggunakan rumus :

$$SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Dimana : SDP = Jumlah leukosit

A = Jumlah sel leukosit terhitung

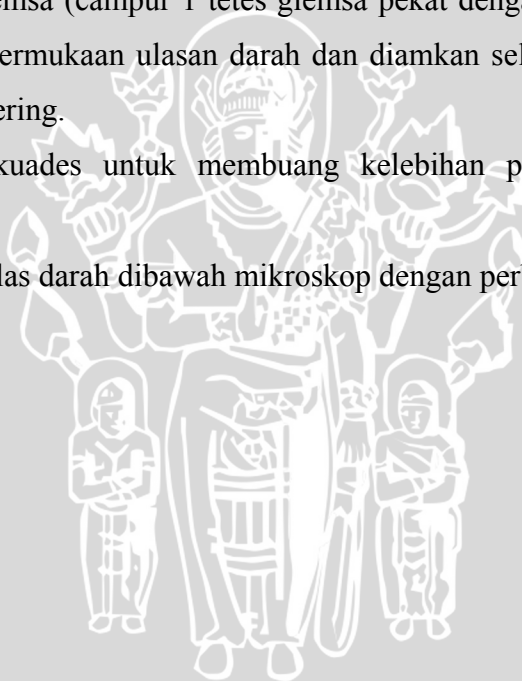
N = Jumlah kotak Haemositometer yang diamati

V = Volume kotak Haemositometer yang diamati

Fp = Faktor pengenceran

Lampiran 17. Pembuatan Preparat Ulas Darah (Gandasoebrata, 1987)

1. Siapkan obyek glass dan cover glass steril.
2. Teteskan darah pada bagian $\frac{1}{4}$ dari panjang obyek glass.
3. Goreskan dengan menggunakan cover glass sampai membentuk goresan tipis dengan cara menyentuhkan cover glass pada tepi tetesan darah, kemudian tarik cover glass ke arah yang berlawanan hingga terbentuk ulasan darah yang tipis.
4. Kering udarakan ulasan darah selama $\pm 1 - 2$ menit kemudian fiksasi dengan metanol dan didamkan selama ± 2 menit atau sampai terlihat kering.
5. Beri pewarna giemsa (campur 1 tetes giemsa pekat dengan 1 ml akuades pH 6,4) di seluruh permukaan ulasan darah dan diamkan selama ± 2 menit atau sampai terlihat kering.
6. Bilas dengan akuades untuk membuang kelebihan pewarna dan kering udarakan.
7. Amati preparat ulas darah dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.



Lampiran 8. Hasil Penghitungan Total Leukosit Ikan Mas.

Tabel Hasil Penghitungan Total Leukosit Ikan Mas

Perlakuan	Ulangan	Total Leukosit (sel/mm ³)		Jumlah (sel/mm ³)		Rata-rata (sel/mm ³)	
		Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
A	1	90900	105000	272200	315700	90733,33333	105233,3333
	2	90800	105300				
	3	90500	105400				
B	1	106800	116000	320300	348500	106766,6667	116166,6667
	2	106600	116400				
	3	106900	116100				
C	1	104200	109500	313100	328400	104366,6667	109466,6667
	2	104500	109300				
	3	104400	109600				
K+	1	107700	111500	323000	334100	107666,6667	111366,6667
	2	107900	111400				
	3	107400	111200				
K-	1	107500	100500	322500	301000	107500	100333,3333
	2	107400	100400				
	3	107600	100100				

Keterangan :

A : Perlakuan Dosis 4 %

B : Perlakuan Dosis 6 %

C : Perlakuan Dosis 8 %

K+ : Kontrol Positif (Tanpa Perlakuan Dengan Uji Tantang)

K- : Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan Tanpa Uji Tantang)