

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA ROSELA (*Hibiscus sabdariffa L*)
TERHADAP KEKEBALAN TUBUH LOBSTER AIR TAWAR (*Cherax
quadricarinatus*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
BUDIDAYA PERAIRAN**

Oleh:

METHA SATIVA RAMADHANI

NIM. 0410850052 - 85



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2009**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUNGA ROSELA (*Hibiscus sabdariffa L*)
TERHADAP KEKEBALAN TUBUH LOBSTER AIR TAWAR (*Cherax
quadricarinatus*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

*Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan pada
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang*

**OLEH:
METHA SATIVA R.
NIM. 0410850052-85**

MENYETUJUI,

DOSEN PENGUJI I

Prof. Ir. MARSOEDI, Ph. D
Tanggal :

DOSEN PENGUJI II

ATING YUNIARTI Spi M.aqua
Tanggal :

DOSEN PEMBIMBING I

Dr. Ir. MAFTUCH, MSi.
Tanggal :

DOSEN PEMBIMBING II

Ir. M.RASYID FADHOLI, MSi.
Tanggal :

**MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP**

Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS.
Tanggal :

RINGKASAN

METHA SATIVA R. Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Kekebalan Tubuh Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* (di Bawah Bimbingan Dr. Ir. MAFTUCH, M.Si dan Ir. M. RASYID FADHOLI, MSi.)

Lobster air tawar merupakan salah satu genus dari kelompok udang (crustacea) yang hidupnya hanya di air tawar, banyak terdapat di danau, rawa, dan sungai (Bachtiar, 2006). Beberapa jenis lobster air tawar yang berhasil dikembangkan dan dibudidayakan di Indonesia diantaranya yaitu *Cherax destructor*, *Cherax quadricarinatus*, *Procambarus clarkii* dan beberapa spesies local asal Irian dari genus *Cherax*. *Cherax quadricarinatus* merupakan jenis lobster air tawar yang paling banyak dibudidayakan karena dapat dipelihara pada aquarium dan kolam dengan lahan seminimal mungkin. Selain itu, lobster ini tidak hanya sekedar udang konsumsi, tetapi juga bisa dijadikan hiasan dalam akuarium karena memiliki warna tubuh yang bagus.

Dewasa ini telah banyak usaha yang dilakukan untuk menghindari serangan penyakit pada ikan budidaya terutama serangan dari bakteri pada ikan yang dapat menyebabkan terjadinya kematian masal. 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 yang bekerja dengan cara meningkatkan pertahanan tubuh non spesifik atau respon kekebalan spesifik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kekebalan tubuh lobster air tawar dan untuk mengetahui dosis optimal ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai immunostimulan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2008 – Februari 2009.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengambilan data secara observasi langsung. Data yang diperoleh kemudian dianalisa dengan menggunakan uji keragaman. Perlakuan yang digunakan adalah dosis ekstrak bunga rosela yang berbeda yaitu perlakuan K (dosis 0%); perlakuan A (dosis 1%); perlakuan B (dosis 3%); dan perlakuan C (dosis 5%), dengan 3 kali ulangan untuk masing-masing perlakuan dan dilakukan uji tantang dengan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian ekstrak bunga rosela dengan dosis berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap jumlah hemosit lobster air tawar yang dipelihara.

Ekstrak bunga rosela ternyata mampu menghambat (bakteriostatik) pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada dosis 1% dan mampu membunuh (bakteriosidal) pada dosis 3%.

Pemberian ekstrak bunga rosela memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap tingkat kelulushidupan lobster air tawar. Tingkat kelulushidupan (SR) yang diperoleh pada perlakuan A dengan dosis ekstrak bunga rosela sebesar 1% didapatkan hasilnya sebesar 73,33%, untuk perlakuan B (3%) didapat persentase sebesar 93,33%, dan pada perlakuan C (5%) didapatkan persentase rata-ratanya 100%.

Perlakuan dosis ekstrak bunga rosela memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap jumlah hemosit dalam tubuh lobster air tawar, hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 1% (10,92) dan F 5% (5,14). Perhitungan analisis sidik ragam yang didapatkan berupa sidik ragam yang berpola linier dengan persamaan $y = 6,48 + 0,0325x$ dengan $R^2 = 0,99$ dan $r = 0,99$ dengan hasil tertinggi sebesar $40,5 \times 10^5$ sel/ml diperoleh pada dosis 5%.

Pemberian ekstrak bunga rosela dengan dosis yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah diferensial hemosit (sel hyaline) lobster air tawar. Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel hyaline lobster air tawar berupa regresi linier dengan persamaan $y = 57,03 + 2,04x$ dengan $R^2 = 0,81$ dan $r = 0,90$ dengan jumlah sel hyaline tertinggi sebesar 85,33 pada dosis 5%.

Pemberian ekstrak bunga rosela dengan dosis yang berbeda berpengaruh nyata terhadap jumlah diferensial hemosit (sel semi granular) lobster air tawar. Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel semi granular lobster air tawar berupa regresi linier dengan persamaan $y = 29,67 - 1,72x$ dengan $R^2 = 0,74$ dan $r = 0,86$ dengan jumlah sel semi granular terendah sebesar 12,67% pada dosis 5%.

Pemberian ekstrak bunga rosela dengan dosis yang berbeda berpengaruh nyata terhadap jumlah diferensial hemosit (sel granular) lobster air tawar. Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel granular lobster air tawar berupa regresi linier dengan persamaan $y = 13,19 - 1,013x$ dengan $R^2 = 0,67$ dan $r = 0,82$ dengan jumlah sel granular terendah sebesar 2% pada dosis 5%.

Kualitas air media pemeliharaan selama pengamatan berlangsung yaitu: suhu air berkisar antara $23-24^{\circ}\text{C}$, DO (*dissolved oxygen*) berkisar antara 5-7mg/l, sedangkan untuk pH air berkisar antara 6-7. Hasil pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, DO (oksigen terlarut), dan pH selama penelitian menunjukkan nilai yang tidak berbeda Hal ini bahwa nilai kualitas air selama perlakuan adalah homogen.

Untuk mendapatkan sistem imun dalam tubuh lobster air tawar dalam melawan bakteri khususnya *Aeromonas hydrophila* sebaiknya digunakan dosis ekstrak bunga rosela sebesar 5%.



KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas Rahmat dan Karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) Terhadap Kekebalan Tubuh Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*". Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan dan Ilmu Kelautan di Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.

Dengan selesainya skripsi ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua dan saudaraku yang telah memberikan dukungan baik material maupun spiritual.
2. Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan Bapak. Ir. M.Rasyid Fadholi, MSi. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan saran dan bimbingan hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan dan bantuan sehingga dapat tersusunnya skripsi ini

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan laporan ini sehingga kritik dan saran untuk penyempurnaan laporan ini, sangat kami hargai. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi bagi semua pihak yang membutuhkannya.

Malang, Mei 2009

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Kegunaan Penelitian	6
1.5 Hipotesis.....	6
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Biologi Lobster Air Tawar (<i>Cherax quadricarinatus</i>).....	7
2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi	7
2.1.2. Sifat dan Tingkah Laku	9
2.1.3. Habitat dan Penyebaran.....	11
2.1.4. Kualitas Air	11
2.2. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
2.2.1. Klasifikasi dan Morfologi	13
2.2.2. Habitat dan Penyebaran.....	14
2.2.3. Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	15
2.2.4. Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan	15
2.3. Bunga Rosela (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	16
2.3.1. Klasifikasi dan Morfologi	16
2.3.2. Syarat Hidup Rosela.....	18
2.3.3. Kandungan Kimia Rosela.....	19
2.3.4. Manfaat Rosela.....	20
2.4. Sistem Kekebalan	22
2.5. Hemosit Lobster Air Tawar.....	23

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Materi Penelitian	26
3.1.1 Bahan-bahan Penelitian	26
3.1.2 Alat-alat Penelitian	26
3.2 Metode Penelitian.....	27
3.3 Rancangan Penelitian.....	27
3.4 Prosedur Penelitian.....	29
3.4.1 Persiapan Alat	29
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian.....	34
3.5. Parameter Uji	36
3.4.1. Parameter Utama.....	36
3.4.2. Parameter Penunjang.....	37
3.6. Analisa Data.....	37
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1. Uji Daya Hambat	39
4.2. Penentuan Waktu Optimal Pemberian Imunostimulan.....	42
4.3. Penentuan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang.....	43
4.4. Kelulushidupan atau Survival Rate.....	44
4.5. Sel Darah Lobster Air Tawar.....	47
4.5.1 Jumlah Total Hemosit	47
4.5.2 Diferensial Hemosit	51
4.6. Kualitas Air	59
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
5.1 Kesimpulan	61
5.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan Kelopak Bunga Rosela	19
2. Uji Anti Mikroba Ekstrak Bunga Rosela	39
3. Pengaruh Daya Hambat Ekstrak Bunga Rosela	41
4. Jumlah Hemosit Lobster Air Tawar	42
5. Hasil Kelulushidupan Lobster Air Tawar	44
6. Hasil sidik Ragam Kelulushidupan	45
7. Uji BNT Kelulushidupan	45
8. Data Total Hemosit Masing-masing Perlakuan	47
9. Jumlah Total Hemosit Setelah Uji Tantang	49
10. Tabel sidik Ragam Jumlah Hemosit	49
11. Hasil Uji BNT Jumlah Hemosit	50
12. Rata-rata Diferensial Hemosit	52
13. Rata-rata Persentase Hyaline	53
14. Hasil Sidik Ragam Persentase Hyaline	53
15. Hasil Uji BNT Persentase Hyaline	54
16. Rata-rata Persentase Semi Granular	55
17. Hasil Sidik Ragam Persentase Semi Granular	55
18. Hasil Uji BNT Persentase Semi Granular	56
19. Rata-rata Persentase Granular	58
20. Tabel Sidik Ragam Persentase Granular	58
21. Hasil Uji BNT Persentase Granular	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagian Tubuh Lobster Air Tawar.....	8
2. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
3. Bunga Rosela.....	17
4. Sel Darah Udang Windu.....	24
5. Denah Percobaan.....	28
6. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Rosela Dengan Kelulushidupan.....	46
7. Grafik Jumlah Hemosit Perlakuan Yang Berbeda.....	48
8. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Rosela Dengan Jumlah Hemosit.....	50
9. Grafik Persentase Diferensial Hemosit.....	52
10. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Rosela Dengan Hyaline.....	54
11. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Rosela Dengan Semi Granular.....	57
12. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Rosela Dengan Granular.....	59



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Rosela Kering dan Ekstrak Rosela	66
2. Gambar Kultur Bakteri dan Hasil MIC.....	67
3. Gambar Hasil Uji Cakram	68
4. Gambar Alat Yang Digunakan	69
5. Gambar Bak Perlakuan	70
6. Perhitungan Dosis Ekstrak Rosela	71
7. Perhitungan Analisa Data Kelulushidupan	72
8. Perhitungan Analisa Data Jumlah Hemosit	76
9. Perhitungan Analisa Data Persentase Hyaline.....	80
10. Perhitungan Analisa Data Persentase Semi Granular	84
11. Perhitungan Analisa Data Persentase Granular	88
12. Data Oksigen Terlarut	92
13. Data pH	93
14. Data Suhu	94
15. Gambar Sel Darah Pada Lobster.....	95



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lobster air tawar sejak tujuh tahun lalu mulai mempunyai daya tarik yang sangat kuat. Lobster air tawar lebih mudah dibudidayakan, tidak seperti jenis udang galah atau jenis udang air tawar lainnya. Harga jual lobster juga mahal, oleh karena itu semakin banyak orang yang berminat untuk mengembangkan komoditas ini (Bachtiar, 2006).

Lobster air tawar merupakan salah satu genus dari kelompok udang (crustacea) yang hidupnya hanya di air tawar. Lobster air tawar banyak terdapat di danau, rawa, dan sungai (Bachtiar, 2006). Beberapa jenis lobster air tawar yang berhasil dikembangkan dan dibudidayakan di Indonesia diantaranya yaitu *Cherax destructor*, *Cherax quadricarinatus*, *Procambarus clarkii* dan beberapa spesies local asal Irian dari genus *Cherax*. *Cherax quadricarinatus* merupakan jenis lobster air tawar yang paling banyak dibudidayakan karena dapat dipelihara pada akuarium dan kolam dengan lahan seminimal mungkin. Selain itu, lobster ini tidak hanya sekedar udang konsumsi, tetapi juga bisa dijadikan hiasan dalam akuarium karena memiliki warna tubuh yang bagus (Iskandar, 2003).

Permasalahan yang sering timbul dalam kegiatan budidaya adalah lingkungan yang kurang baik bagi lobster dan timbulnya penyakit. Penyakit ekor melepuh termasuk salah satu penyakit yang dapat menimbulkan kerugian secara ekonomi. Serangan pada lobster baru diketahui diakhir tahun 2005. Kejadian ini diduga bermula dari Jawa Timur, lalu satu tahun kemudian merebak ke Jawa Barat dan Jakarta. Lobster yang terserang selalu menunjukkan gejala ekor melepuh (Anonymous, 2006).

Menurut Kordi (2004), penyakit adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan, maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan interaksi yang tidak seimbang antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Sehingga dapat menyebabkan stress pada ikan, kemudian mekanisme pertahanan tubuh ikan menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit.

Salah satu gangguan penyakit yang sering dihadapi oleh petani ikan maupun udang adalah terjadinya serangan bakteri pada benih sehingga produksi pada saat panen rendah. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang paling ganas menyerang organisme budidaya air tawar (Afrianto dan Liviawati (1992).

Indikator keberhasilan dalam usaha budidaya ikan adalah kondisi kesehatan ikan. Oleh karena itu masalah penyakit merupakan masalah yang sangat penting untuk ditangani secara serius. Pada dasarnya penyebab penyakit dibagi menjadi dua kelompok yaitu penyebab dari dalam ikan ataupun udang itu sendiri (internal) dan dari luar (eksternal). Penyakit yang disebabkan dari dalam biasanya berhubungan dengan faktor genetik ikan itu sendiri. Sedangkan penyakit yang berasal dari luar terbagi menjadi dua yaitu, non parasiter dan parasiter (Sutjiati,1990).

Salah satu penyakit yang menyerang lobster air tawar adalah ekor melepuh, (*Haemorrhagic septicaemia*) yang disebabkan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini masuk melalui ekor yang sering menyentuh dasar kolam. Selanjutnya mikroorganisme ini menembus sistem kekebalan tubuh dan membuat darah keluar melalui pori-pori. Meski tubuh udang secara alami segera membuat antibodi dengan mengirimkan leukosit,

tapi jumlah sel darah putih itu kalah jauh dibandingkan dengan populasi aeromonasnya. Akibatnya, ekor lobster dipenuhi bisul berisi nanah (Anonymous, 2006).

Menurut Arsyad (2007), penyakit tersebut dapat menimbulkan kerugian yang tidak sedikit. Tipe serangan bakteri ini *septicaemia* atau terdapat diseluruh bagian tubuh sampai ke cairan dalam organ seperti jantung, hati, ginjal, limpa dan bagian tubuh luar (eksternal).

Pada saat terjadinya serangan pathogen, yang pertama kali berperan dalam sistem pertahanan tubuh udang adalah kutikula yang memiliki kemampuan antimikroba melalui lendir yang dihasilkan. Pertahanan selanjutnya adalah hemosit yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan internal udang (Supamattaya, Chittiwan and Boonyaratpalin, 2000; Van de Braak, 2002).

Hemosit adalah sel darah udang yang memiliki fungsi sama seperti sel darah putih (leukosit) pada hewan vertebrata. Hemosit pada udang dapat dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu sel hyaline, semi granular, granular (Effendi, 2004). Ketiga tipe hemosit ini memiliki peranan penting dalam sistem imun udang yaitu melalui proses fagositosis, enkapsulasi, cytotoxicity, dan melanisasi (Johansson, 2000)

Penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan yang biasanya dilakukan dengan menggunakan bahan kimia dan sejenisnya. Penggunaan bahan kimia menyebabkan dampak yang kurang baik karena dapat mencemari lingkungan, apalagi jika digunakan dalam waktu lama akan menyebabkan meningkatnya residu bahan kimia di air dan harganya relatif mahal (Anonymous, 2005).

Menurut Prajitno (2004), bahwa telah diketahui beberapa polisakarida mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan sistem pertahanan tubuh non spesifik, seperti macrophage, sel-sel natural killer (membunuh). 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.

Pencegahan menggunakan bahan alami merupakan salah satu alternatif yang lebih ramah lingkungan. Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) merupakan tumbuhan yang mempunyai banyak manfaat. Kandungan protein rosela kering adalah 7,9% serta memiliki 18 jenis asam amino yang lengkap. Selain itu rosela juga memiliki kandungan vitamin C yang tinggi yaitu 244,4 mg, sehingga mampu meningkatkan daya tahan tubuh terhadap berbagai macam penyakit (Kristiana, 2005). Bunga rosela juga mengandung asam organik, polisakarida, dan flavonoid yang telah teruji secara *in vitro* mampu menghambat bahkan membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Menurut penelitian yang dilakukan Odigie (2003), pemberian ekstrak rosela dengan dosis 250 mg/hari/kg berat badan tikus yang dibuat bertekanan darah tinggi, menunjukkan adanya penurunan tekanan darah. Senyawa tersebut yang akan di uji kembali apakah juga dapat meningkatkan kekebalan tubuh lobster air tawar sehingga selanjutnya dapat digunakan sebagai immunostimulan. Immunostimulan merupakan tindakan pencegahan yang aman untuk meningkatkan respon kekebalan pada lobster air tawar sehingga ketahanan lobster air tawar terhadap infeksi alamiah juga meningkat.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang sering timbul pada kegiatan budidaya air tawar terutama lobster air tawar adalah adanya penyakit yang selalu menyerang lobster air tawar yang dibudidayakan terutama infeksi oleh bakteri. Hal ini dapat menurunkan produktifitas lobster air tawar karena dapat menyebabkan kematian. Tingginya infeksi oleh bakteri terhadap budidaya khususnya lobster air tawar dikarenakan rendahnya kualitas media

budidaya maupun kurangnya kekebalan tubuh lobster air tawar dalam melawan serangan infeksi oleh bakteri.

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

Pemberian ekstrak bunga rosela dengan kandungan vitamin C dan flavonoid dapat meningkatkan kekebalan tubuh pada lobster air tawar. Hal ini dapat diketahui dengan pengujian hemosit lobster air tawar serta perlakuan ujiantang dengan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, permasalahan yang dihadapi adalah:

1. Apakah pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) memberikan pengaruh terhadap kekebalan tubuh lobster air tawar setelah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*?
2. Berapa dosis yang optimal penggunaan ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai dosis immunostimulan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kekebalan tubuh lobster air tawar setelah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

2. Mengetahui dosis optimal penggunaan ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai imunostimulan.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi sumber informasi bahan alternatif untuk pencegahan penyakit khususnya *Aeromonas hydrophila* pada lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dengan menggunakan ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) yang ramah lingkungan.

1.5 Hipotesis Penelitian

H_0 : Diduga pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) tidak berpengaruh terhadap peningkatan sistem kekebalan tubuh lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*).

H_1 : Diduga pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) berpengaruh terhadap peningkatan sistem kekebalan tubuh lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*).

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada Bulan Desember 2008 - Februari 2009.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*)

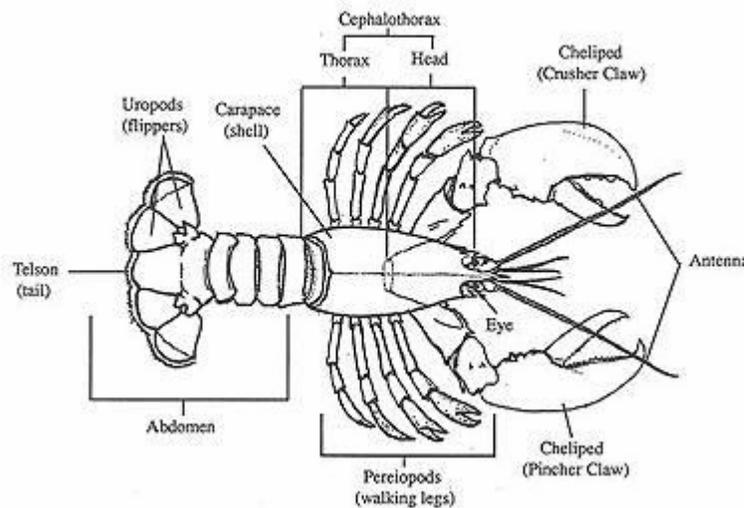
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi Lobster air tawar menurut Patasik (2004) dalam Agustiono (2008) adalah:

Filum	: Arthropoda
Subfilum	: Mandibulata
Kelas	: Crustacea
Sub kelas	: Malacostraca
Seri	: Eumalacostraca
Super ordo	: Eucarida
Ordo	: Decapoda
Sub ordo	: Reptantia
Family	: Parastacidae
Genus	: Cherax
Species	: <i>Cherax quadricarinatus</i>

Tubuh lobster air tawar (Gambar 1) terbungkus oleh cangkang yang berfungsi menjaga organ-organ yang ada di dalamnya dari hewan pemangsa atau kelompoknya sendiri. Dengan adanya cangkang ini pergerakan lobster air tawar menjadi mudah. Tubuh lobster air tawar dibagi menjadi 2 yaitu *cepalothorax* yang terdiri dari kepala yang berfusi dengan *thorax* serta sebuah abdomen dengan appendages masing-masing. *Cepalothorax* secara keseluruhan dilingkupi oleh cangkang yang disebut karapas (Lukito dan Surip, 2007).

Lobster tidak mempunyai tulang dalam (*internal skeleton*) dan seluruh tubuhnya ditutupi oleh cangkang yang terbuat dari zat tanduk. Bagian kepala ditutupi cangkang yang berfungsi melindungi otak, insang, hati dan lambung. Bagian perut yang terdiri dari enam ruas ini akan berkembang setiap kali mengalami pergantian kulit atau molting. Bagian perut dihubungkan dengan bagian yang bernama *subcephalotorax* (Bachtiar, 2006). Cangkang tersebut terbuat dari bahan zat tanduk atau kitin yang tebal dan merupakan nitrogen polisakarida ($C_6H_{13}O_5N$) yang disekresikan oleh kulit epidermis yang akan mengeras dan mengelupas saat terjadi pergantian cangkang tubuh (*moulting*). Lobster air tawar merupakan species yang tidak memiliki tulang dalam (*internal skeleton*) tetapi seluruh permukaan tubuh dan organ luarnya terbungkus cangkang (*external skeleton*). Proses pembentukan cangkang membutuhkan bahan berupa kalsium dan terjadi setelah proses pergantian semua cangkang berlangsung secara sempurna (Iskandar, 2003).



Gambar 1. Bagian Tubuh Lobster Air Tawar (Agustino, 2008)

Menurut Sukmajaya (2003), lobster air tawar memiliki beberapa alat pelengkap sebagai berikut :

1. Sepasang antena yang berperan sebagai perasa dan peraba terhadap pakan dan kondisi lingkungan
2. Sepasang antanela untuk mencium pakan, 1 mulut, dan sepasang capit (celiped) yang lebar dengan ukuran lebih panjang dibandingkan dengan ruas dasar capitnya.
3. Enam ruas badan (abdomen) agak memipih dengan lebar badan dan rata-rata hampir sama dengan lebar kepala.
4. Ekor. Satu ekor tengah (telson) memipih, sedikit lebar, dan dilengkapi duri-duri halus yang terletak disemua bagian tepi ekor, serta dua pasang ekor samping (uropod) yang memipih.
5. Enam pasang kaki renang (pleopod) yang berperan dalam melakukan gerakan renang. Disamping sebagai alat untuk berenang, kaki renang pada induk betina yang sedang bertelur memiliki karakteristik memberikan gerakan dengan tujuan meningkatkan kandungan oksigen terlarut disekitarnya sehingga kebutuhan oksigen telur dan larva dapat terpenuhi. Kaki renang juga digunakan untuk membersihkan telur atau larva dari tumpukan kotoran yang terendap
6. Empat pasang kaki untuk berjalan (walking legs).

2.1.2 Sifat dan Tingkah Laku

Dalam siklus hidup lobster, pertumbuhan hanya terjadi di bagian tubuhnya, tidak termasuk cangkangnya. Lobster perlu membuang cangkangnya dan menggantinya dengan cangkang baru. Proses pergantian kulit tersebut dikenal dengan istilah *moulting*.

Pada masa pertumbuhannya, lobster air tawar mengalami pergantian cangkang berulang-ulang dan akan semakin berkurang frekuensinya seiring dengan bertambahnya umur. Semakin baik pertumbuhannya, semakin sering lobster air tawar berganti cangkang. Karena itu, pergantian cangkang tersebut juga dipengaruhi oleh pakan yang diberikan. Semakin banyak dan bergizi pakan yang dikonsumsi oleh lobster air tawar, pertumbuhannya akan semakin pesat dan diikuti dengan pergantian cangkang yang semakin sering (Iskandar, 2003).

Lobster tidak begitu senang dengan panas matahari sehingga hidupnya banyak dihabiskan di dalam lubang-lubang persembunyian. Lobster air tawar bergerak sangat lamban pada siang hari, tetapi akan berubah agresif pada malam hari. Hal itu karena lobster termasuk hewan *nocturnal* yaitu hewan yang aktif mencari makan pada malam hari (Bachtiar, 2006).

Saat terjadinya pergantian kulit adalah saat yang rawan bagi lobster. Beberapa jam sebelum moulting, lobster akan diam karena kondisinya sangat lemah. Ketika kulitnya telah terlepas, tubuh yang ada didalamnya tidak memiliki pelindung lagi. Saat ini kemungkinan lobster dimakan temannya sangat besar, mengingat lobster termasuk binatang kanibal. Karena itu, dalam pemeliharaannya perlu disediakan tempat berlindung. Lobster biasanya akan berlindung sebelum melakukan moulting. Pada tahap awal moulting, kulit kepalanya akan mengelupas dan disusul dengan mengelupasnya kulit bagian tubuh lainnya. Kulit baru akan tumbuh mengganti kulit yang mengelupas tersebut. Namun kulit tersebut masih sangat lunak dan baru akan mengeras setelah 24 jam (Iskandar, 2003).

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Menurut Setiawan (2006), habitat umum lobster air tawar mempunyai ciri-ciri khusus, seperti sungai yang tepinya dangkal dan bagian dasarnya terdiri atas campuran lumpur, pasir, dan batuan. Lobster air tawar juga mudah ditemukan di sungai atau danau yang banyak ditumbuhi tanaman air atau tumbuhan darat yang akar atau batangnya terendam air, sedangkan daunnya berada di atas permukaan air.

Habitat alam lobster air tawar adalah danau, rawa, atau sungai yang berlokasi di daerah pegunungan. Disamping itu, diketahui pula bahwa lobster air tawar bersifat endemic karena terdapat spesifikasi pada spesies lobster air tawar yang ditemukan di habitat alam tertentu (Sukmajaya, 2003).

2.1.4 Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor penting dalam pembudidayaan lobster. Jika kualitas air yang dipakai jelek, hasil yang dicapai tidak akan maksimal, bahkan bisa menyebabkan kematian bagi lobster. Berikut ini komponen-komponen air yang berpengaruh pada kelangsungan budidaya lobster air tawar:

a. Derajat Keasaman (pH)

Lobster air tawar cocok dibudidayakan dalam air dengan tingkat keasaman (pH) 6-8. Apabila pH kurang dari 6 maka dapat ditambahkan kalsium karbonat (CaCO_3) atau garam maupun soda kue sedikit demi sedikit hingga mencapai kisaran pH yang diinginkan. Sementara itu, jika pH lebih dari 8 bisa diturunkan dengan memasukkan daun ketapang kering (*Terminalia cattapa L.*) hingga air berwarna kecoklatan yang menandakan pH telah stabil, pH air juga dapat diturunkan dengan menggunakan fosfor (Bachtiar, 2006).

Menurut Lukito dan Surip (2007), derajat keasaman (pH) air yang baik untuk pertumbuhan lobster air tawar berkisar 6,5-9. Jika angka pH kurang dari lima, akan berpengaruh sangat buruk bagi pertumbuhan lobster air tawar karena dapat menyebabkan kematian. Sementara pH di atas 9 bisa menurunkan nafsu makan pada lobster air tawar sehingga pertumbuhannya menjadi lambat.

b. Temperatur Air

Temperatur air yang ideal dalam pemeliharaan lobster air tawar adalah 24-31⁰C. Temperatur dibawah atau diatas angka tersebut sangat membahayakan kehidupan lobster air tawar. Temperatur yang terlalu rendah menyebabkan aktivitas lobster jauh berkurang atau tidak banyak bergerak sehingga nafsu makannya juga tidak terlalu besar. Sehingga mengakibatkan pertumbuhan lobster lambat (Setiawan, 2006).

c. Kadar Oksigen Terlarut dalam Air (DO)

Menurut Lukito dan Surip (2007), lobster air tawar dapat hidup pada selang parameter air yang lebar. Lobster air tawar diketahui toleran terhadap kandungan oksigen terlarut sangat rendah. Akan tetapi, untuk tumbuh dan berkembang dengan baik, tentu tidak akan dapat dilakukan pada kondisi demikian. Lobster air tawar memerlukan kadar oksigen terlarut lebih dari 4 ppm.

d. Amonia

Amonia merupakan senyawa racun yang berasal dari sisa metabolisme lobster. Kadar ammonia yang bisa ditoleransi oleh lobster hanya sekitar 1,2 ppm. Untuk mengatasi ammonia yang berlebihan bisa digunakan garam dapur atau dengan cara menyedot air dibagian bawah. Air yang dikuras harus diganti dengan air baru yang jumlahnya sesuai (Bachtiar, 2006).

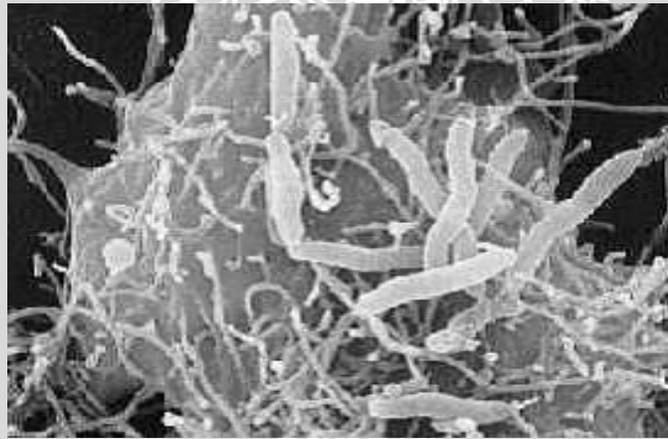
2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Buchanan dan Gibbons (1974), klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila*

(Gambar 2) adalah:

- Divisio : Protophyta
- Class : Schyzomycetes
- Ordo : Pseudomonadeles
- Sub ordo : Pseudomonadinea
- Family : Vibrionaceae
- Genus : *Aeromonas*
- Species : *Aeromonas hydrophila*



Gambar 2. Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Menurut Dwijoseputro (1989) bakteri berasal dari kata “bakterion” (bahasa Yunani) yang berarti tongkat atau batang. Pengertian bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal, berkembang biak dengan pembelahan diri dan mempunyai ukuran sangat kecil sehingga hanya dapat dilihat dengan mikroskop. Sel bakteri terbagi menjadi 3 bagian yaitu dinding luar, sitoplasma, dan bagian inti.

Sedangkan dinding luar terdiri atas tiga lapis yaitu lapisan lendir, dinding sel, dan membran sitoplasma.

Berdasarkan bentuk selnya, bakteri dapat dibagi menjadi 3 yaitu berbentuk bola (kokus), silindris (batang), dan spiral (heliks) yang masing-masing sangat penting dalam mencirikan morfologi suatu species bakteri. Semua bakteri mempunyai bentuk yang sangat kecil (sekitar 0,1-100 μm) dan merupakan organisme uniseluler. Beberapa jenis bakteri tidak bergerak tetapi beberapa jenis lainnya dapat bergerak menggunakan flagel (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri *Aeromonas spp* terdiri dari tiga spesies utama yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas liquefaciens* yang bersifat pathogen (Afrianto dan Liviawati, 1992).

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Prajitno (2007), genus *Aeromonas* mempunyai habitat dilingkungan perairan tawar. Keberadaan *Aeromonas* disuatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik diperairan atau sedimen dasar. 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 15-30⁰C serta tingkat pH 5,5-9 menjadi tempat yang ideal bagi perkembangan dan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* (Afrianto dan Liviawati, 1992).

Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* ini banyak menyerang ikan di daerah tropis dan subtropis. 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 oksigen (Kabata,1985). Bakteri akan tumbuh tersebar diseluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Dwijoseputro, 1989). Pertumbuhan maksimal bakteri pada kisaran suhu 28-41⁰C sedang pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0⁰C-5⁰C. Bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5-9,0 (Prajitno, 2007).

Perkembangbiakan bakteri ini secara aseksual, yaitu berkembangbiak dengan memanjangkan sel yang diikuti dengan pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang dibutuhkan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel kurang lebih 10 menit (Volk dan Wheller, 1998).

2.2.4 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat oportunistis yaitu mampu berkembang biak menjadi ganas pada keadaan optimum (Sutjiati,1990). Penularan bakteri *Aeromonas* dapat berlangsung melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang telah tercemar atau karena pemindahan ikan yang telah terserang *Aeromonas* dari satu tempat ke tempat lain. Menurut Afrianto dan Liviawati (1992), ikan yang terserang bakteri *Aeromonas* biasanya akan memperlihatkan gejala-gejala sebagai berikut:

- Warna tubuhnya berubah menjadi agak gelap
- Kulitnya menjadi kasar dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*hemorrhage*)

- Kemampuan berenanginya menurun dan sering megap-megap dipermukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernafas
- Sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limpa. Sering pula terlihat perutnya agak kembung (dropsi)
- Seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan
- Mata rusak dan agak menonjol (exophthalmia)

Penularan penyakit ini dapat melalui kontak langsung dengan ikan yang sakit, melalui alat, penanganan, bagian sisa tubuh ikan, hewan atau tumbuhan air, serta aliran air deras ikan yang terserang penyakit (Prajitno, 2007).

Menurut Kabata (1985) *Aeromonas hydrophila* pada umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh lobster disertai dengan pendarahan pada organ tubuh lobster. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat jika padat penebaran tinggi yang bisa mengakibatkan kematian benih sampai 90%. Penyakit pada ikan dapat timbul karena adanya interaksi inang, patogen dan kondisi lingkungan. Apabila interaksi antara ketiganya tidak seimbang maka dapat menyebabkan penyakit pada lobster. *Aeromonas hydrophila* merupakan penyebab paling umum pada penyakit bakterial *haemorrhagic septicaemia* yang terjadi dalam tiga fase yaitu:

Fase I : terjadi abdomina dropsy yaitu bagian badan mengembung karena berisi cairan

Fase II : terjadi ulceratif yang ditandai dengan timbulnya luka pada bagian kulit daging

Fase III: terjadi haemorrhagic septicaemia

2.3 Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Fitriani (2008), klasifikasi rosela (Gambar 3) adalah :

- Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Malvales
Suku : Malvaceae
Marga : Hibiscus
Jenis : *Hibiscus sabdariffa* L



Gambar 3. Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L)

Rosela merupakan herba tahunan yang bisa mencapai ketinggian 0,5-3 meter. Pohon rosela adalah sejenis perdu yang mudah ditanam. Batangnya bulat, tegak, berkayu, dan berwarna merah. Bunga rosela yang keluar dari ketiak daun merupakan bunga tunggal, artinya pada setiap tangkai hanya terdapat satu bunga. Bunga ini mempunyai 8-11 helai kelopak yang berbulu, panjangnya 1 cm, pangkalnya saling berlekatan, dan berwarna merah. Kelopak ini sering dianggap sebagai bunga oleh masyarakat (Kristiana dan Herti, 2005).

Tanaman ini sudah ada sejak dulu di Indonesia, meskipun tanaman ini berasal dari India dan Afrika. Pada zaman dulu orang mengenal rosela dengan nama *frambozen*. Sering dipakai untuk sirup dengan warna kemerahan yang cantik dan aroma yang agak manis asam. Hampir di seluruh pelosok Indonesia mengenal tanaman ini (Fitriani, 2008).

2.3.2 Syarat Hidup Rosela

Tumbuhan rosela ada yang mengatakan berasal dari India tetapi ada juga pendapat yang mengatakan rosela berasal dari Afrika Barat. Tumbuhan rosela semula diperkenalkan di Malaysia sejak lebih dari tiga abad yang lampau. Pohon rosela adalah sejenis perdu yang mudah ditanam. Cara penanamannya dengan menggunakan biji yang kering kemudian disebar (Fitriani, 2008).

Tanaman ini seringkali ditanam bukan sebagai tanaman utama, tetapi hanya sebagai tanaman tambahan. Rosela bisa ditumpangsarikan dengan tanaman apa saja, yang penting tetap mendapatkan sinar matahari cukup. Namun bila ditanam sebagai tanaman utama, sebaiknya ditanam sendiri, karena tanaman ini membutuhkan sinar matahari langsung. Rosela juga mudah tumbuh di tanah yang mendapat pengairan cukup. Meskipun kondisi tanah kurang subur, asal airnya cukup, rosela tetap bisa tumbuh (Kristiana dan Herti, 2005).

Rosela dapat tumbuh baik di daerah beriklim tropis dan subtropis. Tanaman ini mempunyai habitat asli di daerah yang terbentang dari India hingga Malaysia. Namun, sekarang tanaman ini telah tersebar luas di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia (Kristiana, 2005).

Menurut Fitriani (2008), tanaman rosela dapat diusahakan di segala macam tanah, tetapi paling cocok pada tanah yang subur dan gembur. Selama pertumbuhan, rosela tidak tahan terhadap genangan air. Curah hujan yang dibutuhkan untuk lahan tegal 800-1670 mm/5 bulan atau 180 mm/bulan.

Rosela sangat peka terhadap temperatur dingin. Daerah terbaik untuk menanam rosela adalah daerah tropis dan subtropis yang hangat dengan ketinggian 0-900 meter dpl (di atas permukaan laut) (Kristiana dan Herti, 2005).

2.3.3 Kandungan Kimia Rosela

Selain mengandung vitamin C, kelopak bunga rosela juga mengandung vitamin A dan 18 jenis asam amino yang diperlukan tubuh, salah satunya adalah arginin yang berperan dalam proses peremajaan sel tubuh. Disamping itu, rosela juga mengandung protein, kalsium, dan unsur-unsur lain yang berguna bagi tubuh. Kandungan kimia dalam rosela dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Kelopak Bunga Rosela Segar Dalam 100 gram

Komponen :	100 gr Kelopak bunga Rosela
Kalori	44 kal
Air	86,2 %
Protein	1,6 gr
Lemak	0,1 gr
Karbohidrat	11,1 gr
Serat	2,5 gr
Abu	1,0 gr
Kalsium	160 mg
Fosfor	60 mg
Besi	3,8 gr
Betakaroten	285 µg
Vitamin C	244,4 mg
Tiamin	0,04 mg
Riboflavin	0,6 mg
Niasin	0,5 mg
Protein	6,7 gr

Sumber : Kristiana (2005).

Dalam 100 gram rosela kering mengandung sejumlah asam amino dan mineral yang diperlukan tubuh. Seperti protein 1,145 gr, lemak 2,61 gr, serat 12,0 gr, kalsium 1.263 mg, fosfor 273,2 mg, besi 8,98 mg, karoten 0,029 mg, tiamin 0,117 mg, riboflavin 0,277 mg, dan niasin 3,765 mg. Sedangkan asam lemaknya ada 18, seperti asam askorbat 6,7 mg, arginin 3,6 mg, sistein 1,3 mg, histidin 1,5 mg, isoleusin 3,0 mg, leusin 5,0 mg, lisin 3,9 mg metionin 1,0 mg, fenilalanin 3,2 mg, threonine 3,0 mg, tryptophan 2,2 mg, valine 3,8 mg, asam aspartat 16,3 mg, asam glutamat 7,2 mg, alanin 3,7 mg, glisin 3,8 mg, proline 5,6 mg, dan serin 3,5 mg (Fitriani, 2008).

Kandungan vitamin C yang terdapat dalam bunga rosela lebih banyak dibandingkan dengan buah-buahan lainnya. Sebagai contoh, setiap 100 gram bunga rosela mengandung 244,4 mg vitamin C, dengan berat yang sama, jeruk hanya mengandung 48 mg, belimbing hanya 2,5 mg sedangkan papaya mengandung 71 mg. Selain itu bahan penting yang terkandung dalam bunga rosela adalah grossypeptin, anthocyanin, dan gluside hibiscin. Kelopak bunga rosela merah juga mengandung asam organik, polisakarida dan flavonoid. Rosela mengandung 51 % antosianin dan 24 % antioksidan lain (Agrina, 2008).

Antosianin merupakan pewarna yang paling penting dan paling tersebar luas dalam tumbuhan. Pigmen yang berwarna kuat dan larut dalam air ini adalah penyebab hampir semua warna merah jambu, merah marak, merah, ungu, dan biru dalam daun bunga, daun, dan buah pada tumbuhan tinggi (Harborne, 1987).

2.3.4 Manfaat Rosela

Di Indonesia, belum banyak masyarakat yang memanfaatkan rosela. Sementara di negara lain, rosela sudah banyak dimanfaatkan sejak lama. Sebenarnya seluruh bagian

tanaman, mulai buah, kelopak bunga, mahkota bunga dan daunnya dapat dimakan. Tanaman ini juga dimanfaatkan sebagai bahan salad, saus sup, minuman, sari buah, asinan, selai, pudding, sirup dan jeli (Kristiana dan Herti, 2005).

Di India, Afrika dan Meksiko, seluruh bagian tanaman rosela berfungsi sebagai obat tradisional. Daun atau kelopak bunga yang direbus dengan air diakui berkhasiat sebagai peluruh kencing batu dan merangsang keluarnya empedu dari hati (choleric). Selain itu juga dapat menurunkan tekanan darah (hypotensive), mengurangi kekentalan (viskositas) darah, dan meningkatkan peristaltik usus (Fitriani, 2008).

Ekstrak kuncup bunganya ternyata mampu berfungsi sebagai antipasmodik (penahan kekejangan), antihelmitik (mengobati cacingan), dan anti bakteri. Selain itu rosela ternyata mampu menurunkan kadar penyerapan alkohol. Daun tumbuhan herba ini juga bisa digunakan untuk merawat luka, penyakit kulit dan gigitan serangga (Agrina, 2008).

Menurut Kristiana dan herti (2005), khasiat lain tanaman rosela yang telah dikenal diantaranya sebagai antipasmodik, antihelmitik, dan sebagai antibakteri. Daun rosela juga bisa mengobati kaki pecah-pecah dan luka bakar ringan. Bijinyapun berkhasiat sebagai diuretik (peluruh kencing batu) dan tonikum.

Ekstrak kelopak rosela mengurangi efek alkohol pada tubuh, mencegah pembentukan batu ginjal, dan memperlambat pertumbuhan jamur/bakteri/parasit penyebab demam tinggi. Kelopak bunga rosela juga diketahui membantu melancarkan peredaran darah dengan mengurangi derajat kekentalan darah. Ini terjadi karena asam organik, polysakarida, dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kelopak bunga rosela sebagai farmakologi. Kelopak bunga rosela mengandung vitamin C dalam kadar tinggi 244,4 mg yang berfungsi untuk meningkatkan daya tahan tubuh (Fitriani, 2008).

2.4 Sistem Kekebalan

Sistem kekebalan adalah kemampuan organisme untuk melawan semua jenis 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).

Sistem pertahanan tubuh lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) tidak mempunyai kemampuan mengingat antigen dan merupakan sistem kekebalan nonspesifik. Seperti halnya hewan-hewan avertebrata yang lain, udang tidak memiliki antibodi dan karena itu mekanisme pertahanan tubuhnya sangat mengandalkan sistem imunitas bawaan (innate imunity) dalam membasmi pathogen yang masuk kedalam tubuhnya (Sritunyalucksana, 2001).

Menurut Supamattaya *et al* (2000), eksoskeleton adalah pertahanan pertama tubuh udang dalam mencegah infeksi penyakit melalui lendir yang dihasilkan oleh sel-sel epitel terluar. Apabila eksoskeleton ini gagal menangkal masuknya pathogen kedalam tubuh maka selanjutnya mengandalkan pertahanan internal dalam merespon infeksi tersebut melalui respon seluler dan humoral.

2.5 Hemosit Lobster Air Tawar

Lobster seperti halnya Arthropoda yang lain, memiliki sistem sirkulasi darah terbuka dimana cairan darah dan sel darahnya masing dikenal dengan istilah *hemolimf* dan *hemocyte* (Van de Braak, 2002). Hemosit ini dihasilkan oleh jaringan hematopoietic yang terletak disekitar lambung. Sel darah pada Lobster air tawar dapat dilihat pada Gambar 4.

Hemosit adalah sel darah udang yang memilki fungsi sama seperti sel darah putih (leukosit) pada hewan vertebrate. Hemosit pada udang dapat dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu sel hyaline, semi granular dan granular. Ketiga tipe hemosit memiliki peranan penting dalam sistem imun udang yaitu melalui proses fagositosis, encapsulasi, cytotoxicity dan melanisasi (Toban, 2008).

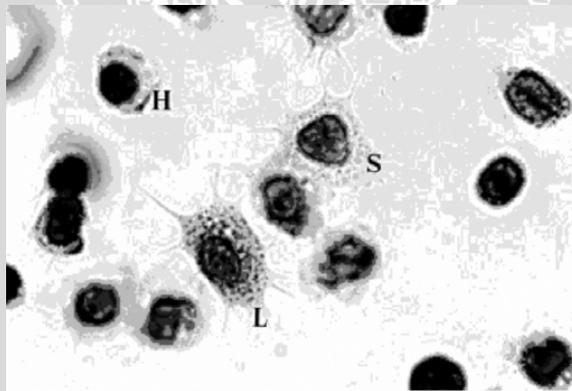
Pada udang sehat, total hemositnya antara $20-40 \times 10^6$ sel/ml. Konsentrasi oksigen yang rendah dan adanya infeksi penyakit akan menyebabkan total hemosit dalam darah berkurang (Supamattaya *et al*, 2000).

Sel-sel hemosit yang terdapat pada udang memiliki fungsi tersendiri. Sel hyaline berperan dalam proses fagositosis dan aktifitas seperti halnya makrofage pada ikan dan binatang berdarah panas lainnya. Sel ini memiliki sedikit sekali granula pada sitoplasmanya (Lio-Po, Celia, and Erlinda, 2001).

Fagositosis merupakan suatu upaya multifase yang memerlukan langkah-langkah sebagai berikut: pengenalan (*recognition*) dari benda yang akan dicerna, gerakan kearah objek (*kemotaksis*), perlekatan, penelanan (*ingestion*) dan selanjutnya pencernaan (*digestion*) intra seluler oleh mekanisme-mekanisme anti mikroba (Wahab dan Soeripto, 1993).

Sel semi granular dikarakteristikkan dengan terdapatnya granula pada sitoplasma. Sel ini mampu merespon polisakarida dari dinding sel bakteri atau β -glukan yang berasal dari jamur. Sel semi granular ini dapat melakukan proses enkapsulasi dan sedikit berperan dalam proses fagositosis (Johansson *et al*, 2000; Raa, 2000).

Sel granular dikarakteristikkan dengan terdapatnya granula (butiran) pada jumlah yang besar di sitoplasma. Sel ini berperan dalam menghasilkan, menyimpan dan mensekresi senyawa antimikroba. Sel granular tidak berperan dalam proses fagositosis dan sedikit berperan dalam proses enkapsulasi. Fungsi utamanya adalah menghasilkan enzim Phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan. Aktifasi enzim ini juga dapat dilakukan dengan menggunakan komponen mikroba seperti β -glukan, peptidoglycan dan lipopolisakarida melalui ikatan protein spesifik dengan permukaan hemocyte (Sritunyalucksana, 1999; Vetvicka dan Sima, 2004).



Gambar 4. Sel darah udang windu (*Penaeus monodon*. Fabr), H = hyaline hemocyte, S = semi-granular hemocyte, L = large granular hemocyte (Sritunyalucksana, 2001).

Haemosit disintesa mitosis oleh jaringan *hematopoietic* yang merupakan sepasang *epigastric nodule*. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis pasca introduksi imunostimulan. Jaringan tersebut terletak tepat dibagian dorsal pada

lambung bagian depan (*anterior stomach*), merupakan tempat sintesa hemocyanin (protein darah) (Efendi, Alexander dan Akbar, 2004).



III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan-Bahan Penelitian

- Lobster ukuran 5cm, berasal dari Tulung Agung sebanyak 90 ekor
- Ekstrak bunga rosela
- Tissue
- Pakan buatan (pelet) "Yabiyu FLF"
- Kapas
- Biakan murni bakteri *A. hydrophila*
- Na-citrat
- TSA (*Tryptic Soya Agar*)
- Aluminium foil
- NB (*Nutrient Broth*)
- Kertas label
- Aquades
- Kertas koran
- Metanol
- Spirtus
- Pewarna Giemsa
- Trypan blue
- Alkohol (70%)

3.1.2 Alat-Alat Penelitian

- Bak plastik 5 liter (15 buah)
- Haemositometer
- Beaker glass 1000ml
- Cover glass
- Pipa paralon
- Objek glass
- Kompor
- Syringe 1 ml
- Selang siphon
- DO meter
- Petridisk
- pH meter
- Tabung reaksi
- Gelas ukur
- Perangkat Aerator
- Erlenmeyer

- Pipet Volume
- Hot plate
- Pipet tetes
- Spatula
- Timbangan analitik
- Mikroskop
- Inkubator
- Bunsen
- Jarum ose
- Tube
- Hand taly counter

3.2 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 antar variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara varibel-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 pengambilan data dilakukan dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 2005).

3.3 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, 2000). Model umum dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

$$Y = \mu + T + \sum$$

Dimana : Y = nilai pengamatan

μ = nilai rata-rata harapan

T = pengaruh perlakuan

Σ = acak/kesalahan percobaan

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian adalah pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu: 1%, 3%, 5% serta dua kontrol yaitu K- dan K+ yang diulang sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan Latar belakang penentuan dosis berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro*. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian sebagai berikut (Gambar 5):

A1	C2	A3	B1	K-1
K+1	B2	A2	C1	K-2
C3	K+3	B3	K+2	K-3

Gambar 5. Denah Percobaan

Keterangan:

A, B, C = Perlakuan

K+ = Diinfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak rosela

K- = Tanpa infeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak rosela

1, 2, 3 = Ulangan

Sebelum penelitian inti, dilakukan Penelitian Pendahuluan untuk menentukan lama perendaman untuk mendapatkan jumlah hemosit lobster air tawar yang baik. Setelah itu lobster diinfeksi dengan bakteri. Dosis bakteri yang digunakan adalah kepadatan 10^8 sel/ml.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Alat

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Langkah-langkah sterilisasi alat menurut Dwijoseputro (1989), adalah sebagai berikut:

- ❖ Alat yang digunakan dicuci dengan sabun dan air bersih, lalu dikeringkan
- ❖ Alat ditutup dengan kapas, lalu alat disterilkan dibungkus dengan kertas koran, kemudian diikat dengan benang
- ❖ Bahan dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas, lalu bahan dibungkus dengan kertas koran dan diikat dengan benang
- ❖ Air dimasukkan ke dalam autoklave, kemudian alat dan bahan yang telah dibungkus dengan koran dimasukkan ke dalam autoklave
- ❖ Autoklave ditutup serta baut-bautnya dikencangkan sampai rapat
- ❖ Kompor dinyalakan sampai suhu autoklave naik
- ❖ Bila jarum telah menunjukkan suhu 121°C dan tekanan 1 atm dipertahankan selama 15 menit
- ❖ Kemudian api kompor dimatikan, lalu kran uap air dibuka sampai manometer menunjukkan angka 0
- ❖ Autoklave dibuka dengan membuka baut yang ada ditutup autoklave

- ❖ Alat dan bahan yang sudah steril diambil, alat disimpan dalam inkubator sedangkan bahan yang sudah steril dapat disimpan dilemari pendingin.
- ❖ Bila alat-alat sudah steril, kertas koran dapat dibuka tapi bila tidak digunakan langsung kertas koran jangan dibuka terlebih dahulu.

B. Pembuatan Media

1. TSA (*Tryptic Soya Agar*)

Langkah-langkah pembuatan TSA dari OXOID menurut Ruangpan dan Kitio (1992), adalah sebagai berikut:

- Melarutkan 40 gram TSA dalam 1000 ml aquades steril dalam erlenmeyer steril, diaduk rata kemudian dididihkan diatas 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 petri-disc steril setinggi 3 mm. Penuangan dilakukan di dekat bunsen, agar tidak terkontaminasi organisme lain. Tepi petri-disc 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 dalam kulkas/lemari pendingin, dengan posisi tutup petri disc berada di bagian 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.

2. NB (*Nutrient Broth*)

Langkah-langkah pembuatan NB dari OXOID menurut Ruangpan dan Kitio (1992) adalah sebagai berikut:

- Melarutkan 13 gram NB dengan aquades steril 1000 ml 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.

C. Pemiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Langkah-langkah pembiakan bakteri *A. hydrophila* menurut Dwijoseputro (1989), adalah sebagai berikut:

- 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.

D. Uji MIC (*Minimum Inhibitor Concentration*)

Uji MIC adalah penentuan konsentrasi terkecil hambatan dari suatu obat terhadap bakteri secara kuantitatif. Cara penentuan MIC menurut Ruangpan dan Kitio (1992) adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan tabung reaksi steril dan masing-masing diberi label sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan yaitu 1%;1,5%;2%;2,5%;3%; kontrol negatif (K-) dan kontrol positif (K+), kemudian pada masing-masing tabung diisi dengan 5 ml media cair (NB).
- Kemudian pada tabung pertama (50%) ditambahkan 5 ml ekstrak bunga rosela dan dihomogenkan, kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan cara mengambil 5 ml dari tabung pertama dan diletakkan pada kedua dan hal ini dilakukan terus menerus hingga pada tabung yang terakhir terdapat 10 ml larutan.
- Biakan murni *Aeromonas hydrophila* ditanam sebanyak 2 inokulum ke dalam masing-masing tabung sehingga pada tabung K+ hanya berisi NB dan bakteri saja dan pada tabung kontrol negatif (K-) hanya berisi ekstrak bunga rosela dan NB saja, kemudian tabung tersebut diinkubasi pada suhu 35⁰ C selama 24 jam. Setelah 24 jam masing-masing tabung dilihat kekeruhannya dengan menggunakan Auto DR-2000 dengan panjang gelombang 620 um.
- Apabila tidak terlihat perbedaan kekeruhan dalam media maka dilakukan uji MBC (*Minimum Bacterial Concentration*) yaitu mengambil 0,5 ml dari masing-masing tabung dan disebar pada media agar pada petridish diinkubasi selama 24 jam suhu 35⁰ C.

- Mengamati kekeruhan media dalam petridish dengan melihat kontrol positif dan negatif. Untuk uji MIC ini diambil konsentrasi yang mendekati kontrol negatif sebagai konsentrasi minimum.
- Konsentrasi hasil pengujian MIC ini dijadikan sebagai dasar konsentrasi terendah pada uji cakram.

E. Uji Cakram

Uji cakram merupakan pengujian untuk antibakterial dengan mengukur daerah hambat yang terjadi di sekitar kertas cakram yang mengandung bahan anti mikrobal sesuai dengan dosis perlakuan. (Peleczar dan Chan, 1986).

- Menyiapkan media dalam 6 buah petridish dan ditanam 2 inokulum bakteri pada masing-masing petridish kemudian diratakan dengan triangle.
- Media tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35⁰ C.
- Kertas cakram yang mengandung ekstrak bunga rosela disediakan untuk masing-masing perlakuan. Setelah 30 menit, kertas cakram yang mengandung ekstrak bunga rosela diletakkan pada permukaan lempeng agar. Jarak kertas cakram dari tepi plate minimum 15 mm, jarak antara kertas cakram minimum 24 mm dan sekali cakram ditempelkan tidak boleh dipindahkan tekan kertas cakram supaya ekstrak bunga rosela meresap ke dalam agar.
- Pembacaan hasil dilakukan setelah inkubasi pada suhu 35⁰ C selama 24 jam dengan cara mengukur daerah hambatan di sekitar kertas cakram dengan menggunakan mistar.
- Inkubasi dapat dilakukan sampai 48 jam untuk mengetahui sifat dari ekstrak bunga rosela. Jika daerah hambatan tetap bening selama 48 jam maka zat

tersebut bersifat bakteriosidal, jika daerah hambatan ditumbuhi bakteri maka zat tersebut bersifat bakterioastatik (Wattimena *et al*, 1991 dalam Jannah, 2005).

F. Pembuatan ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*)

Menurut Agrina (2008), pembuatan ekstrak rosela yaitu: Bunga rosela kering ditimbang 35 gram kemudian dimasukkan dalam bejana, ditambah 1 liter alkohol 96% ditutup rapat dan didiamkan semalam. Setelah itu disaring dan didapatkan ekstrak rosela dengan alkohol 96%. Kemudian ekstrak rosela dengan alkohol 96% dipekatkan di rotary evaporator pada suhu 50⁰C untuk menghilangkan alkohol yang ada pada ekstrak tersebut sampai didapatkan ekstrak kental rosela murni tanpa alkohol.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

A. 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 tawar sebanyak 2 liter dan dilengkapi dengan instalasi aerasi untuk menjaga ketersediaan oksigen.

B. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah lobster air tawar jenis red claw (*Cherax quadricarinatus*). Lobster yang sehat dipilih sebanyak 90 ekor ukuran 2 inchi, kemudian dilakukan aklimatisasi selama 7 hari pada akuarium penampung. Selama aklimatisasi lobster diberi pakan pelet sebanyak 3 % dari total berat tubuh dan diberikan 2 kali sehari yaitu pada pukul 09.00 dan 15.00 WIB, serta dilakukan penyiponan setiap hari.

C. Proses Pemberian Ekstrak Bunga Rosela

Disiapkan ekstrak rosela sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu 1%, 3%, 5%, kemudian lobster air tawar direndam dalam ekstrak rosela selama 3 jam dengan diberi aerasi. Setelah 3 jam perendaman dengan ekstrak rosela, lobster diambil darahnya dan dihitung Total Hemosit Count (THC) sebelum diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Castro *et al* (2004) dalam Toban (2008) yang mengatakan bahwa peningkatan maksimal aktivitas *respiratory burst* (lonjakan pernafasan) pada ikan setelah pasca pemberian ekstrak rumput laut ulfa rigida dan *chondrus crispus* terjadi setelah inkubasi 3 jam dan setelah itu akan menurun.

D. Penginfeksian Bakteri

Penginfeksian bakteri dilakukan dengan metode perendaman. Konsentrasi bakteri yang digunakan untuk ujiantang ditentukan dengan melakukan penelitian pendahuluan. Dari hasil penelitian pendahuluan, diperoleh konsentrasi bakteri yang digunakan untuk ujiantang yaitu 10^8 sel/ml. Hal ini berdasarkan pengamatan yang dilakukan selama 24 jam, dan diperoleh konsentrasi bakteri sebesar 10^8 sel/ml, terjadi kematian pada hewan uji sebesar 50 %.

E. Analisa Hematologi

Menurut Toban (2008), parameter Hematologi yang dianalisa adalah *Total Haemocyte Count* (THC) udang pada masing-masing perlakuan. *Haemolymph* sebanyak 50 μ l diambil menggunakan spet (1 mL # 26) di bagian ventral lobster pada abdomen kedua, kemudian dicampur anticoagulant (10 % sodium citrate, pH 7,2) dengan volume yang sama dan diberi pewarna *Trypan blue solution* sebanyak 100 μ l.

Total haemocyte count (THC) dihitung menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop cahaya sebagai berikut:

$$\text{THC} = \text{jumlah sel total} \times 5 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}/10 \text{ (cell/ml)}$$

F. Pembuatan Preparat Ulas Darah

Pembuatan preparat ulas darah menurut Gandasoebrata (1967):

1. Siapkan objek glass dan cover glass steril.
2. Teteskan darah pada bagian $\frac{1}{4}$ dari panjang objek 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 diamkan selama ± 2 menit atau sampai terlihat kering.
5. Beri pewarna giemsa di seluruh permukaan ulasan darah dan diamkan selama ± 2 menit atau sampai terlihat kering.
6. Bilas dengan aquades untuk membuang kelebihan pewarna dan kering udarakan.
7. Amati preparat ulas darah dibawah mikroskop.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah pengamatan total jumlah hemosit (THC), diferensial hemosit dan kelulushidupan atau *survival rate* dari lobster air tawar.

- ❖ Pengamatan total jumlah hemosit (THC) lobster air tawar

Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui perubahan jumlah total haemosit lobster air tawar dan perbandingan haemositnya.

❖ Diferensial hemosit lobster air tawar

Untuk mengetahui lebih lanjut pembagian tipe hemosit, maka harus dihitung tipe hemosit pada bagian tertentu dari smear yang diamati dan angka yang diperoleh dinyatakan dalam % yang memberikan penilaian pada tipe-tipe hemosit yaitu hyaline, semi granular, dan granular (Anonymous, 2008).

❖ Pengamatan kelulushidupan (SR) menurut Effendi (1979), adalah:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100 \%$$

SR : Survival Rate atau kelulushidupan

N_t : Jumlah ikan akhir pemeliharaan (ekor)

N_o : Jumlah ikan awal pemeliharaan (ekor)

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah pengukuran kualitas air yang meliputi :

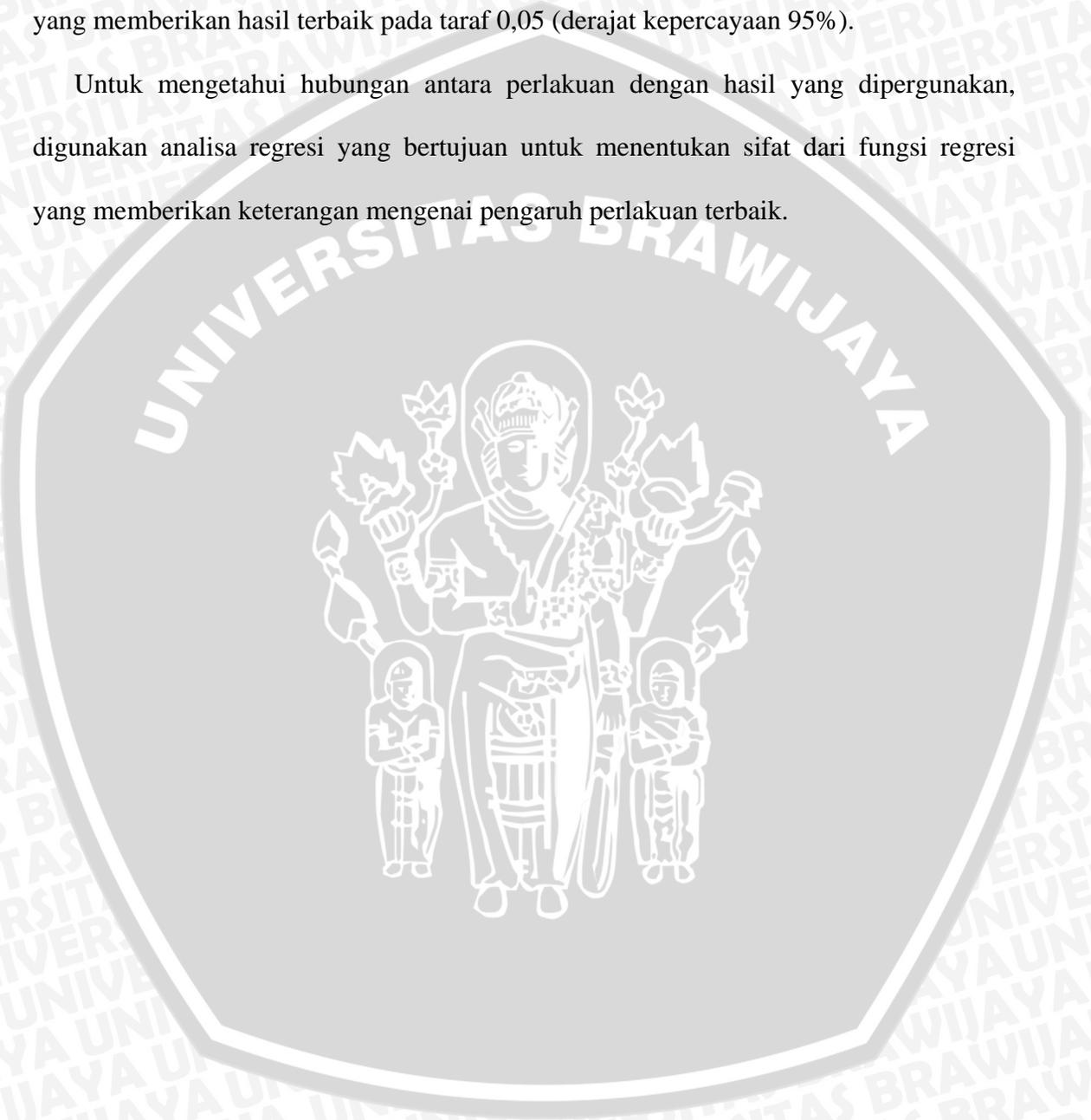
- ❖ Suhu yang diukur dengan Termometer
- ❖ pH air yang diukur dengan pH meter
- ❖ Oksigen terlarut yang diukur dengan DO meter

3.6 Analisa Data

Dari data yang diperoleh kemudian dilakukan analisa secara statistik dengan menggunakan menganalisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ini dilakukan untuk

mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur sidik ragam (uji F). Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).

Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipergunakan, digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dari fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Daya Hambat Bakteri

A. Uji Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Ekstrak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Hasil uji MIC dengan metode tube dilution dari ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) yang digunakan untuk menghambat *Aeromonas hydrophila* pada media *Nutrient Broth* (NB) ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji Anti Mikroba Ekstrak Bunga Rosela Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Metode Tube Dilution.

Perlakuan/Dosis Rosela	Rata-rata	CFU Plate	Keterangan
0 %	281,7687	$2,8 \times 10^4$	+
1 %	250,6667	$2,5 \times 10^2$	+
1,5 %	134,6667	$1,3 \times 10^2$	+
2 %	68,33333	$6,8 \times 10^1$	+
2,5 %	17,66667	$1,7 \times 10^1$	+
3 %	0	0	-

Keterangan: + : masih ditumbuhi bakteri
- : tidak ditumbuhi bakteri

Melalui penelitian ini diketahui bahwa ekstrak bunga rosela bersifat bakteriostatik pada dosis 1% dan bersifat bakteriosidal pada dosis 3 % terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Dosis minimum untuk menghambat bakteri berdasarkan uji MIC selain untuk efektivitas bahan juga merupakan tujuan dari pemberian kadar obat pada nilai MIC yaitu untuk menghambat pertumbuhan bakteri, pada umumnya dosis yang bersifat membunuh (bakteriosidal) terlalu tinggi, sehingga dapat berpengaruh pada hewan budidaya itu

sendiri. Agar agen kemoterapeutik dapat berguna terhadap penyakit yang menginfeksi ada beberapa kriteria harus dipenuhi:

- obat itu harus rendah dalam toksisitas bagi sel inang dan memusnahkan atau menghambat agen penyakit
- inang harus tidak menjadi alergi (sangat peka) terhadapnya
- organisme tidak boleh dengan mudah menjadi resisten terhadap obat itu
- obat itu harus mencapai tempat infeksi (Volk dan Wheller, 1992).

Menurut Benson (1990), antibakteri dikategorikan sebagai bakteristatik jika pada konsentrasi tersebut bakteri tidak mengalami kematian, namun juga tidak tumbuh. Antibakteri dikategorikan sebagai bakteriosidal jika pada konsentrasi tersebut bakteri mengalami kematian. Edberg (1983), menjelaskan bahwa senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) dan mati (bakteriosidal). Selain itu, senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

B. Uji Cakram Ekstrak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa*)

Menurut Tumar (2007), untuk membandingkan kekuatan desinfektan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat digunakan uji cakram. Kertas cakram yang telah berisi berbagai dosis ekstrak bunga rosela diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penghambatan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* terlihat sebagai wilayah jernih di sekitar pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Data daerah hambatan diperoleh setelah inkubasi bakteri dengan meletakkan kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah mengandung ekstrak bunga rosela dengan suhu 35⁰C selama 24 jam. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh data diameter daerah hambatan (daerah yang tidak ditumbuhi bakteri/daerah bening) yang bervariasi pada masing-masing perlakuan dan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak bunga rosela mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Berbeda dengan obat-obatan maupun senyawa-senyawa antibakteri seperti antibiotik, obat-obatan yang berasal dari alam seperti bunga rosela ini belum memiliki standar daya hambat yang telah dibakukan. Namun dari hasil penelitian ini dapat memberi informasi bahwa dosis ekstrak bunga rosela yang berbeda mempengaruhi diameter daerah hambatan yang terbentuk dari beberapa dosis ekstrak bunga rosela terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Tabel 3, sedangkan gambar hasil uji cakram dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 3. Pengaruh Daya Hambat (mm) Ekstrak Bunga Rosela Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

KONSENTRASI EKTRAK ROSELA	DAYA HAMBAT (mm)			RERATA
	I	II	III	
0%	0	0	0	0
0,56%	0,2	0,2	0,3	0,23
1,5%	0,4	0,3	0,4	0,36
3,12%	0,5	0,6	0,5	0,53
6,25%	1,6	1,5	1,5	1,53
12,5%	4,2	4,1	4,2	4,16
25%	5,8	5,8	5,9	5,83
50%	9,2	9	9,2	9,13
100%	13	12,8	13	12,93

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui rata-rata diameter daerah hambatan untuk masing-masing perlakuan yaitu K (0%) yang merupakan kontrol (hanya direndam dalam

aquadest, tanpa larutan obat) menghasilkan diameter daerah hambatan dengan rata-rata 0 mm; dosis 0,56% dengan rata-rata 0,23 mm; dosis 1,5% dengan nilai rata-rata 0,36 mm; dosis 3,12% dengan rata-rata 0,53 mm; dosis 6,25% dengan nilai rata-rata 1,53 mm; dosis 12,5% dengan nilai rata-rata 4,16 mm; dosis 25% dengan nilai rata-rata 5,83 mm; dosis 50% dengan nilai rata-rata 9,13 mm dan dosis 100% dengan nilai rata-rata 12,93 mm. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak bunga rosela yang diberikan, maka daerah hambatan juga akan semakin besar. Hal ini dipengaruhi oleh semakin banyaknya konsentrasi bahan aktif bunga rosela untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Agrina (2008), ekstrak dari bunga rosela ini mampu berfungsi sebagai anti bakteri karena kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak bunga rosela.

4.2 Penentuan Waktu Optimal Pemberian Imunostimulan

Data penelitian pendahuluan untuk mengetahui waktu optimal pemberian imunostimulan ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) pada lobster air tawar (*Cherax qudricarinatus*) sebagaimana terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Jumlah Hemocyte Lobster Air Tawar Pada Penelitian Pendahuluan

Lama Perendaman (Dosis 3 %)	Jumlah Hemosit Setelah Perendaman	Jumlah Hemosit Setelah Uji Tantang
Kontrol	2.550.000	1.800.000
2 Jam	2.700.000	2.250.000
3 Jam	3.750.000	3.600.000
4 Jam	3.450.000	3.150.000

Berdasarkan data tersebut di atas, dapat dilihat bahwa waktu optimal pemberian ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) adalah perendaman ekstrak selama 3 jam. Hal ini sesuai dengan penelitian Yeh *et al* (2006) yang menunjukkan bahwa udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang direndam ekstrak alga coklat (*Sargassum duplicatum*)

selama 3 jam dengan konsentrasi 500 mg/l memberikan peningkatan yang signifikan pada jumlah hemosit dan aktivitas *respiratory burst* (lonjakan pernafasan). Menurut Toban (2008), bahwa udang windu (*Penaeus monodon*) yang direndam dengan *Gracilaria verucosa* menunjukkan bahwa perlakuan perendaman selama 3 jam memberikan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan yang 1 jam dan 4 jam.

Dari hasil kedua penelitian tersebut sejalan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian pendahuluan ini. Bahwa lobster air tawar yang direndam dengan ekstrak bunga rosela selama 3 jam menunjukkan nilai yang tinggi dibanding dengan perendaman yang 2 jam dan 4 jam.

4.3 Penentuan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang

Konsentrasi bakteri yang digunakan untuk ujiantang ditentukan dengan melakukan penelitian pendahuluan dengan menggunakan konsentrasi 1×10^7 sel/ml, 1×10^8 sel/ml, 1×10^9 sel/ml. Penginfeksiandilakukan dengan cara perendaman selama 24 jam dan didapatkan hasil, pada kepadatan 1×10^7 sel/ml lobster air tawar tidak mengalami kematian, sedangkan penginfeksiandilakukan dengan cara perendaman selama 24 jam dan didapatkan hasil, pada kepadatan 1×10^8 sel/ml menyebabkan kematian lobster air tawar sebesar 50% dan pada penginfeksiandilakukan dengan cara perendaman selama 24 jam dan didapatkan hasil, pada kepadatan 1×10^9 sel/ml menyebabkan kematian lobster air tawar 100%. Berdasarkan hasil pengamatan selama 24 jam, sehingga diperoleh pada konsentrasi bakteri dengan kepadatan 1×10^8 sel/ml.

Aeromonas hydrophila mampu menginfeksi lobster air tawar karena dapat mengenali dan berikatan dengan reseptor pada sel-sel tertentu, selanjutnya bakteri tersebut mengurai sel inang yang digunakan sebagai nutrient untuk pertumbuhannya. Berkembangnya populasi bakteri pathogen menimbulkan inflamasi atau peradangan

disekitar tempat infeksi dan menyebabkan luka yang semakin meluas menjadi borok (*Haemorrhagic*) (Pratiwi, 2008).

Pemecahan sel-sel tubuh lobster di daerah yang meradang merusak pembuluh darah, kemudian bakteri pathogen masuk dan ikut dalam peredaran darah menyebar ke seluruh tubuh. Apabila borok ini menyerang organ-organ penting seperti organ respirasi, hepatopankreas, saluran pencernaan, ginjal dan hati akan mengakibatkan kematian. Kemampuan *A. hydrophila* menginfeksi lobster dikaitkan dengan struktur permukaan sel yang bersifat hidrofobik dan zat pengumpul darah (Po-haemolisis) serta kemampuannya memproduksi bermacam-macam enzim ekstraseluler (amylase, chitinase, elastase, lechitinase, nuclease, phospholipase, dan protease). Bakteri ini juga memproduksi sederet protein permukaan paling luar sel sebagai sebuah bentuk seperti kristal (S-Layer) yang berfungsi untuk melindungi sel dari aksi lisis oleh protein-protein serum (Irianto, et al, 2004).

4.4 Kelulushidupan atau Survival Rate (SR)

Kelulushidupan atau survival rate (SR) pada lobster air tawar yang diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dinyatakan dalam persentase (%) menunjukkan seberapa besar ketahanan tubuh lobster air tawar terhadap serangan bakteri tersebut. Nilai persentase SR disajikan pada Tabel 5 berikut:

Tabel 5. Hasil Kelulushidupan Lobster Air Tawar pada beberapa perlakuan (%) Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A	60	80	80	220	73,33
B	80	100	100	280	93,33
C	100	100	100	300	100
				800	

K +	60	40	40	140	46,67
K -	100	80	100	280	93,33

Kemudian dilakukan Analisis Sidik Ragam (Lampiran 7) didapatkan hasil seperti pada Tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Hasil Analisis Sidik Ragam Kelulushidupan (SR) Lobster Air Tawar

Sumber	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Keragaman						
Perlakuan	2	1.507,89	753,94	7,83*	5,14	10,92
Acak	6	577,66	96,28			
Total	8	2.085,550				

Keterangan = 7,83 (*) = berbeda nyata (significant)

Dari hasil sidik ragam didapatkan bahwa pemberian ekstrak bunga rosela dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap kelulushidupan lobster air tawar yang diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*, ini berarti menolak H_0 dan menerima H_1 . Hal ini berarti bahwa kandungan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak bunga rosela mampu menghambat pertumbuhan bahkan mematikan bakteri (Agrina, 2008).

Untuk mengetahui perbedaan masing-masing dosis imunostimulan, maka dilanjutkan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf 5% (derajat kepercayaan 95%) dan taraf 1% (derajat kepercayaan 99%). Perhitungan BNT (Lampiran 7) didapatkan hasil uji BNT seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji BNT Kelulushidupan Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*)

Perlakuan	Rata-Rata Kelulushidupan	Notasi
A (1%)	59,21	a
B (3%)	81,14	b
C (5%)	90,00	c

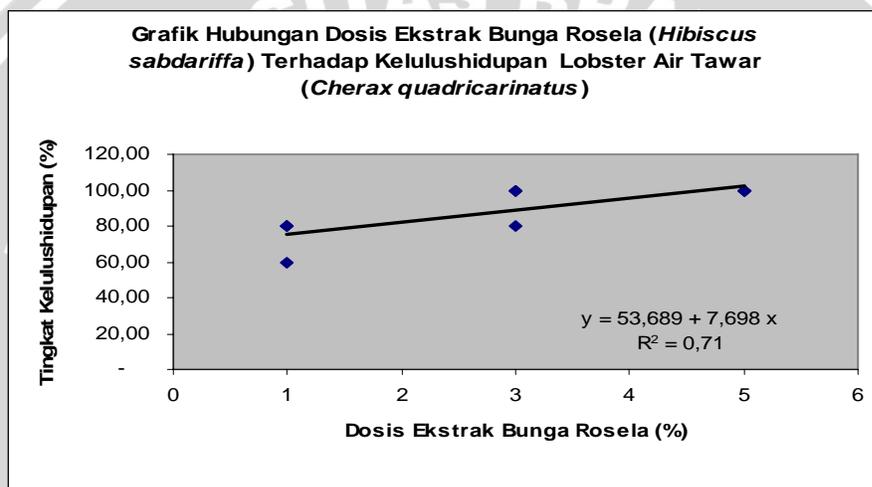
Ketentuan:

Selisih < BNT 5% = ns

BNT 5% < selisih < BNT 1% = * (berbeda nyata)

Selisih > BNT 1% = ** (berbeda sangat nyata)

Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan kelulushidupan lobster air tawar diperoleh berdasarkan analisis regresi, dijelaskan pada Lampiran 7 berbentuk linier yaitu $y = 53,69 + 7,698 x$ dengan $R^2 = 0,71$ dan $r = 0,84$. Grafik hubungan antara dosis ekstrak rosela dengan kelulushidupan lobster air tawar disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik Hubungan Antara Dosis Ekstrak Bunga Rosela Dengan Kelulushidupan (SR) Lobster Air Tawar Yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan Gambar 6 diatas, dosis 5% memberikan hasil yang maksimal terhadap kelulushidupan (SR) pada lobster air tawar yaitu sebesar 100%, sedangkan pada dosis 1% dan 3% kelulushidupan lobster air tawar lebih rendah dibandingkan dosis 5%. Semakin tinggi dosis immunostimulan maka tingkat kelulushidupan juga semakin meningkat.

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. Hal ini sesuai dengan pendapat Andersen (1974) yang menyatakan bahwa penggunaan imunostimulan dapat memperbaiki mekanisme yang terlibat dalam proses pertahanan tubuh yang bersifat umum atau non spesifik.

4.5 Sel Darah Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*)

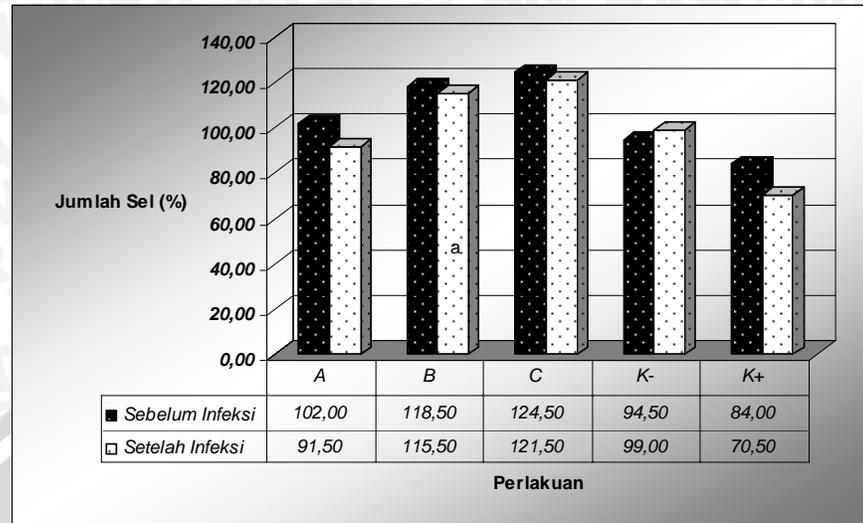
4.5.1 Jumlah Total Hemosit (THC)

Jumlah hemosit ($\times 10^5$ sel/ml) lobster air tawar pada beberapa perlakuan disajikan dalam Tabel 8 dan Gambar 7 berikut ini:

Tabel 8. Data Total Hemosit Rata-Rata Lobster Air Tawar Sebelum dan Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Jumlah THC Sebelum Uji Tantang	Jumlah THC Setelah Uji Tantang
A	102	91,5
B	118,5	115,5
C	124,5	121,5
	345	328,5
K -	94,5	99
K +	84	70,5

Setelah pemberian imunostimulan terjadi peningkatan dibandingkan dengan kontrol, namun setelah di uji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* terjadi penurunan jumlah hemosit hal ini dikarenakan karena saat terjadinya serangan pathogen, sel hemosit akan melakukan proses degranulasi, cytotoxicity dan lisis terhadap material tersebut. Dengan demikian jumlah sel hemosit yang beredar dalam *haemolimf* akan terlihat menurun (Effendy *et al*, 2004).



Gambar 7. Grafik Jumlah Hemosit Lobster Air Tawar Pada Perlakuan Yang Berbeda

Grafik pada Gambar 7, menunjukkan bahwa jumlah hemosit yaitu pada saat sebelum dilakukan ujiantang (infeksi bakteri) dan setelah dilakukan ujiantang (infeksi bakteri), terjadi penurunan jumlah hemosit pada lobster air tawar. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Citarasu *et al* (2006), untuk mengetahui pengaruh pemberian imunostimulan dari beberapa herbal pada udang windu menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah hemosit pasca infeksi virus white spot dan jumlahnya kembali meningkat setelah 6 hari pasca infeksi.

Jumlah hemosit udang sehat berkisar antara $20-40 \times 10^6$ sel/ml. jumlah ini dapat menurun apabila kondisi lingkungan memburuk, misalnya rendahnya kandungan oksigen terlarut, suhu, dan salinitas, atau terdapatnya serangan pathogen (Supamattaya *et al*, 2000).

Berdasarkan hasil sidik ragam jumlah hemosit lobster air tawar setelah dilakukan ujiantang dengan 10^8 sel/ml bakteri *A. hydrophila* (Tabel 9) diperoleh nilai F hit sebesar 46,67 (Tabel 10). Nilai tersebut berada diatas nilai F tabel 1% (10,92), sehingga dapat

dikatakan perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata atau pemberian ekstrak bunga rosela sebagai imunostimulan memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap total hemosit lobster air tawar berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Perhitungan selengkapnya disajikan pada Lampiran 8.

Tabel 9. Jumlah Total Hemosit Lobster Air Tawar (10^5) Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A	27	30	34,5	91,5	30,5
B	36	39	40,5	115,5	38,5
C	42	39	40,5	121,5	40,5
				328,5	

Tabel 10. Tabel Sidik Ragam Jumlah Hemosit Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Sumber	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Keragaman						
Perlakuan	2	0,028	0,14	46,67**	5,14	10,92
Acak	6	0,002	0,0003			
Total	8	0,03				

Keterangan = 46,67 (**)= berbeda sangat nyata

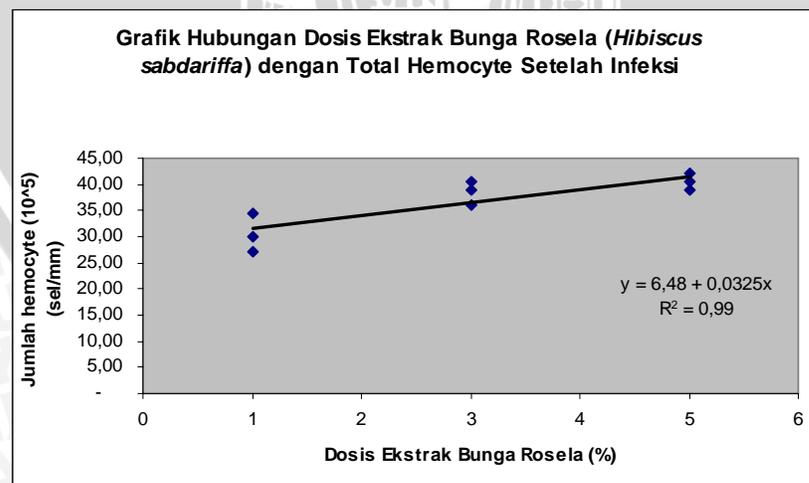
Selanjutnya dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf 5% (derajat kepercayaan 95%) dan taraf 1% (derajat kepercayaan 99%) untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap jumlah hemosit lobster air tawar. Hasil uji BNT seperti pada Tabel 11 dibawah ini (perhitungan selengkapnya pada Lampiran 8).

Tabel 11. Hasil Uji BNT Pemberian Ekstrak Bunga Rosela Terhadap Jumlah Total Hemosit Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang.

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Total Hemosit ($\times 10^5$)	Notasi
A (1 %)	30,5	a
B (3 %)	38,5	b
C (5 %)	40,5	bc

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan C (5%) memberikan pengaruh terbaik terhadap rata-rata total hemosit pada lobster air tawar yang ditunjukkan dengan nilai rata-rata jumlah hemosit tertinggi yaitu $40,5 \times 10^5$ sel/ml diikuti oleh perlakuan B (3%) sebesar $38,5 \times 10^5$ sel/ml dan terendah perlakuan A (1%) sebesar $30,5 \times 10^5$ sel/ml. Hubungan antara dosis ekstrak rosela dengan jumlah hemosit lobster air tawar diperoleh berdasarkan analisis regresinya pada Lampiran 8.

Persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linear yaitu $y = 6,48 + 0,0325x$ dengan $R^2 = 0,99$ dan $r = 0,99$ (Lampiran 8). Grafik hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah hemosit lobster air tawar disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik Hubungan Antara Dosis Pemberian Ekstrak Bunga Rosela Dengan Jumlah Hemosit Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang.

Berdasarkan Gambar 8 diatas, dosis 1% dan 3% memberikan hasil lebih rendah dibandingkan dengan dosis 5% yang memiliki jumlah sel hemosit sebesar $40,5 \times 10^5$ sel/ml. Pada konsentrasi dibawah 5% dapat berakibat fatal (kematian) apabila jumlah sel darah lebih sedikit daripada jumlah bakterinya.

Hasil perhitungan tersebut terlihat bahwa hemosit yang merupakan sistem pertahanan seluler meningkat selama perlakuan. Ekstrak bunga rosela dengan kandungan flavonoid tersebut dianggap sebagai antigen yang masuk kedalam tubuh lobster.

Hemosit adalah sel darah udang yang memiliki fungsi sama seperti sel darah putih (leukosit) pada hewan vertebrata. Hemosit memegang peranan penting dalam respon seluler pertahanan tubuh udang yang meliputi fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, cytotoksisitas dan komunikasi antar sel (Toban, 2008).

4.5.2 Diferensial Hemosit

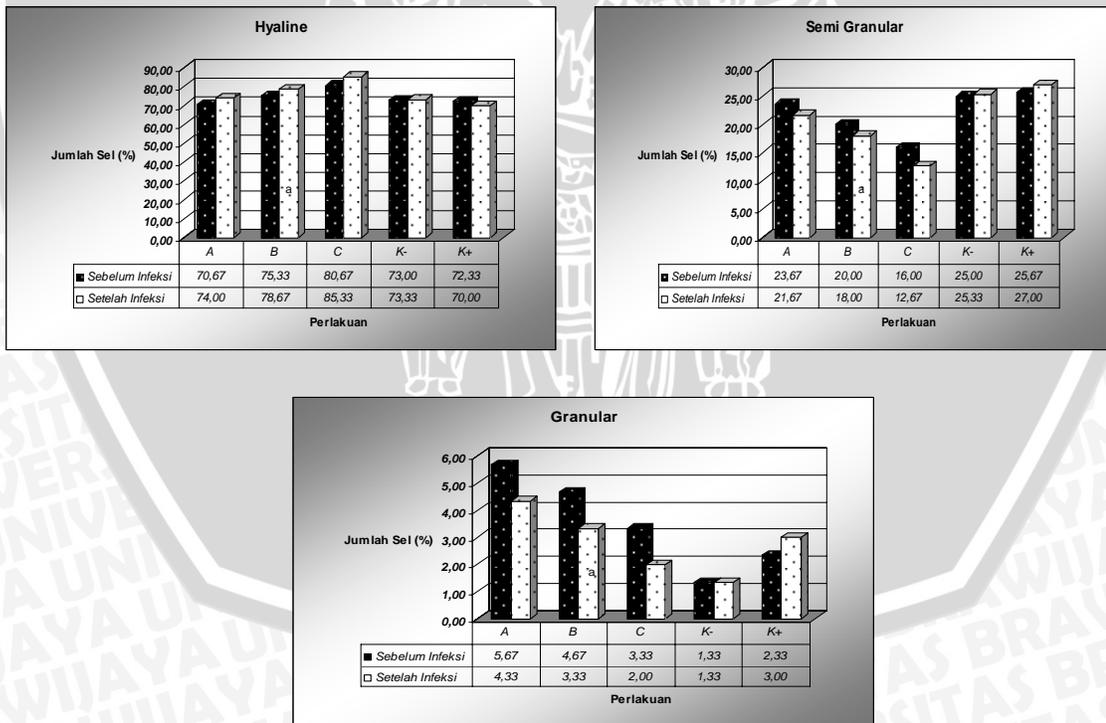
Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pembagian tipe hemosit (diferensial hemosit), maka harus dihitung tipe hemosit pada bagian tertentu dari smear yang diamati dan angka yang diperoleh dinyatakan dalam %. Cara seperti ini disebut dengan nama teknik menghitung diferensiasi. Perbandingan hemosit adalah jmlah dari masing-masing komponen hemosit yang dihitung dalam 100 sel hemosit yang dinyatakan dalam %, yang memberikan informasi untuk melengkapi perhitungan hemosit dan juga memberikan penilaian pada tipe-tipe sel hemosit yaitu hyaline, semi granular, dan granular (Anonymous, 2008).

Perhitungan 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, 1985).

Analisis secara mikroskopis menunjukkan jenis-jenis hemosit yang terdapat pada lobster air tawar dari hyaline, semi granular dan granular. Rata-rata persentase hyaline, semi granular dan granular disajikan pada Tabel 12 dan grafik pada Gambar 9 berikut.

Tabel 12. Persentase Rata-Rata Diferensial Hemosit Pada Lobster Air Tawar

No	Perlakuan	Sebelum Infeksi			Setelah Infeksi		
		H	SG	G	H	SG	G
1	A (1 %)	70,67	23,67	5,67	74,00	21,67	4,33
2	B (3 %)	75,33	20,00	4,67	78,67	18,00	3,33
3	C (5 %)	80,67	16,00	3,33	85,33	12,67	2,00
4	K- (0 %)	73,00	25,00	2,00	73,33	25,33	1,33
5	K+ (0 %)	72,33	25,67	2,00	70,00	27,00	3



Gambar 9. Grafik persentase Hyaline, Semi granular, Granular Lobster Air Tawar Pada Perlakuan Yang Berbeda

a. Hyaline

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan dosis yang diberikan dengan persentase hyaline setelah ujiantang, dilakukan analisa data dengan hasil yang disajikan pada Tabel 13 dan 14 berikut ini.

Tabel 13. Data Rata-Rata Persentase Hyaline Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A	75	77	70	222	74,00
B	80	80	76	236	78,67
C	84	84	88	256	85,33
				714	

Tabel 14. Hasil Sidik Ragam Persentase Hyaline Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Sumber	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Keragaman						
Perlakuan	2	101,32	50,66	13,04**	5,14	10,92
Acak	6	23,32	3,89			
Total	8	124,64				

Keterangan = 13,04 (**)= berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa nilai F hitung yaitu 13,04 berada diatas nilai F tabel 1% (10,92). Hal ini berarti, pemberian ekstrak rosela sebagai imunostimulan pada lobster air tawar dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap persentase hyaline setelah dilakukan ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila* yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 .

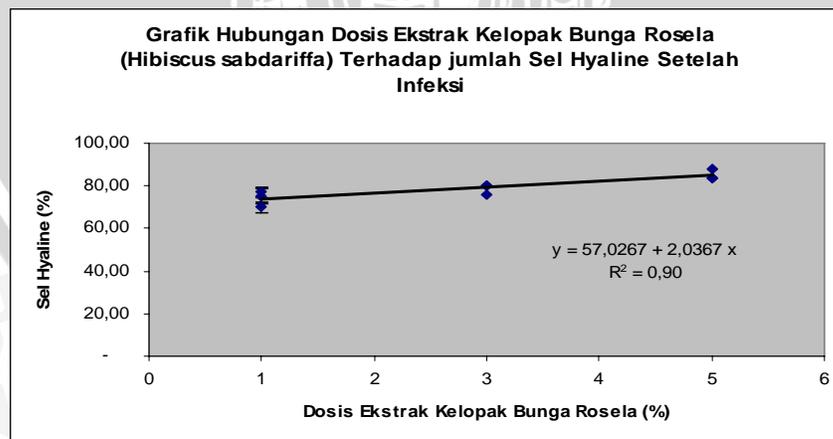
Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan terhadap persentase hyaline lobster air tawar. Hasil uji BNT disajikan pada Tabel 15 berikut ini.

Tabel 15. Hasil Uji BNT Persentase Hyaline Lobster Air Tawar

Perlakuan	Rata-rata Persentase Hyaline (%)	Notasi
A (1%)	74,00	a
B (3%)	78,67	b
C (5%)	85,33	c

Hasil perbandingan hemosit ditemukan adanya peningkatan jumlah hyaline (Lampiran 9). Perlakuan A (1%) jumlah hyaline sebesar 74,00% lebih kecil bila dibandingkan dengan perlakuan C (5%) dengan jumlah hyaline 85,33%. Sel ini paling banyak bila dibandingkan dengan sel semi granular dan granular karena lebih mudah dibentuk oleh tubuh dan mudah berkembang.

Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel hyaline setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* pada lobster air tawar diperoleh berdasarkan analisis regresi, yang dijelaskan pada Lampiran 9. Persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 57,03 + 2,04x$ dengan $R^2 = 0,81$ dan $r = 0,90$ (Lampiran 9). Grafik hubungan antara dosis ekstrak rosela dengan jumlah sel hyaline setelah uji tantang pada lobster air tawar disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Grafik Hubungan Antara Dosis Pemberian Ekstrak Bunga Rosela Dengan Persentase Hyaline Lobster Air Tawar setelah Uji Tantang.

Berdasarkan Gambar 10 pemberian ekstrak bunga rosela memberikan peningkatan yang sesuai dengan semakin tinggi dosis maka jumlah sel hyaline juga meningkat. Perlakuan A (1%) sebesar 74,00%, perlakuan B (3%) sebesar 78,67% dan pada perlakuan C (5%) sebesar 88,46%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak bunga rosela yang digunakan akan memproduksi hyaline lebih banyak dan disalurkan pada daerah yang terinfeksi dalam proses fagositosis antigen yang masuk dalam tubuh lobster. Menurut Lio-po et al (2001), sel hyaline merupakan fagosit primitive yang berperan dalam proses fagositosis dan aktifitas seperti halnya makrofage pada ikan dan binatang berdarah panas lainnya. Sel ini memiliki sedikit sekali granula pada sitoplasmanya. Sel hyaline berperan dalam proses fagositosis mikroba yang masuk ke dalam tubuh saat terjadinya infeksi penyakit (Neves et al, 2002).

b. Semi Granular

Hasil perhitungan sidik ragam untuk data persentase semi granular disajikan pada Tabel 16 dan 17 berikut.

Tabel 16. Data Rata-Rata Persentase Semi Granular Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A	20	19	26	65	21,67
B	17	16	21	54	18
C	13	14	11	38	12,67
				157	

Tabel 17. Hasil Sidik Ragam Persentase Semi Granular Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Sumber	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Keragaman						
Perlakuan	2	72,04	36,02	8,79*	5,14	10,92
Acak	6	24,60	4,10			
Total	8	96,64				

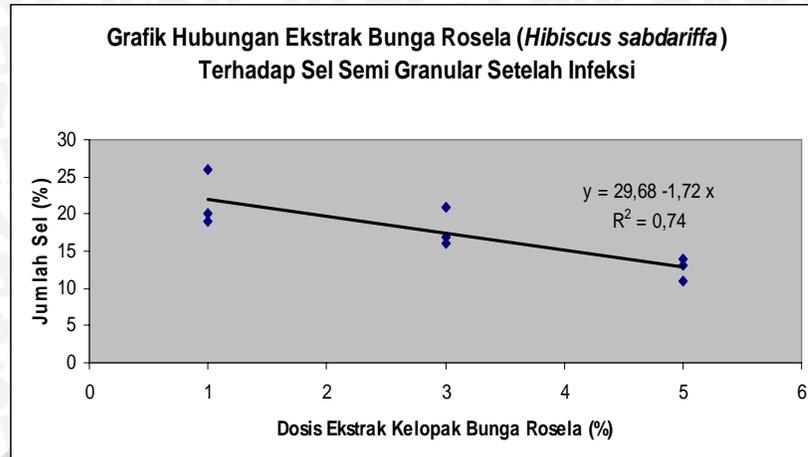
Keterangan: 8,79 = berbeda nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan nilai F hitung adalah 8,786 kurang dari F tabel 1% (10,92). Hal ini berarti pemberian ekstrak bunga rosela sebagai imunostimulan pada lobster air tawar memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap persentase semi granular lobster air tawar setelah ujiantang 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 semi granular lobster air tawar. Hasil uji BNT disajikan pada Tabel 18 sebagai berikut

Tabel 18. Hasil Uji BNT Persentase Semi Granular Lobster Air Tawar

Perlakuan	Rata-rata Persentase Semi Granular	Notasi
C (5%)	21,67	a
B (3%)	18,00	b
A (1%)	12,67	c

Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel semi granular lobster air tawar setelah diujiantang diperoleh berdasarkan analisis regresi, yang dijelaskan pada Lampiran 10. Persamaan hubungan antara 2 variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 29,67 - 1,72x$ dengan $R^2 = 0,74$ dan $r = 0,86$ (Lampiran 10). Grafik hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel semi granular disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11. Grafik Hubungan Antara Dosis Ekstrak Bunga Rosela Dengan Persentase Semi Granular Setelah Uji Tantang

Hasil perbandingan hemosit pada sel semi granular terjadi penurunan. Semi granular tertinggi didapatkan pada perlakuan A (1%) sebesar 21,67% dibandingkan perlakuan B (3%) sebesar 18,00% dan perlakuan C (5%) sebesar 12,67%. Hal ini disebabkan fungsi dari sel semi granular lebih pada proses menghasilkan enzim phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan (Pratiwi, 2008).

Sel semi granula dikarakteristikan dengan terdapatnya granula pada sitoplasma. Sel ini mampu merespon polisakarida dari dinding sel bakteri atau β -glukan yang berasal dari jamur. Sel semi granula ini dapat melakukan proses enkapsulasi dan sedikit berperan dalam proses fagositosis (Johansson, 2000).

c. Granular

Hasil perhitungan sidik ragam untuk data persentase granular lobster air tawar setelah uji tantang disajikan pada Tabel 19 dan 20 dibawah ini.

Tabel 19. Data Rata-Rata Persentase Granular Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
A	5	4	4	13	4,33
B	3	4	3	10	3,33
C	3	2	1	6	2
				29	

Tabel 20. Hasil Sidik Ragam Persentase Granular Lobster Air Tawar Setelah Uji Tantang

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	2	25,19	12,59	6,34*	5,14	10,92
Acak	6	11,91	1,98			
Total	8	37,09				

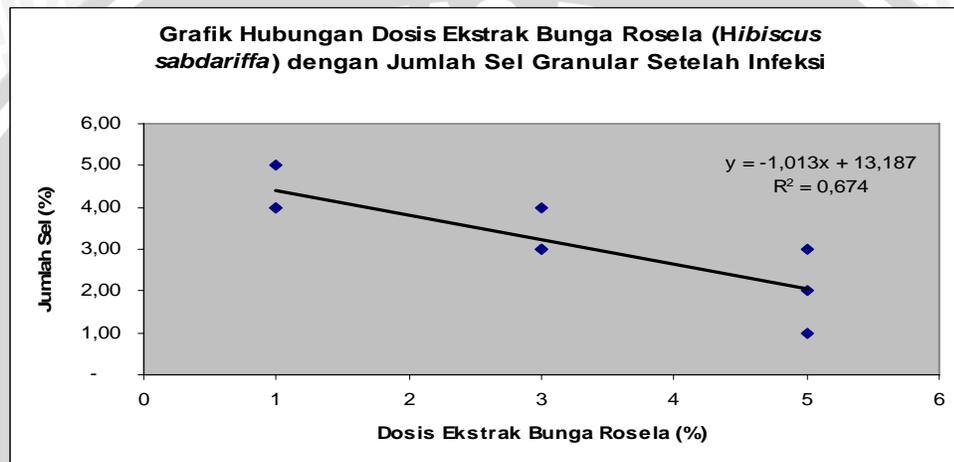
Keterangan = 6,34 (*) = berbeda nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan nilai F hitung 6,34 yaitu kurang dari F tabel 1% (10,92). Hal ini berarti pemberian ekstrak bunga rosela sebagai imunostimulan pada lobster air tawar memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap persentase granular lobster air tawar 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 granular lobster air tawar. Hasil uji BNT disajikan pada Tabel 21 berikut ini. Perhitungan selanjutnya disajikan pada Lampiran 11.

Tabel 21. Hasil Uji BNT Persentase Granular Lobster Air Tawar

Perlakuan	Rata-rata Persentase Granular (%)	Notasi
C (5%)	4,33	a
B (3%)	3,33	ab
A (1%)	2	b

Hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel granular lobster air tawar diperoleh berdasarkan analisis regresi, yang dijelaskan pada Lampiran 11. Persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 13,19 - 1,01x$ dengan $R^2 = 0,67$ dan $r = 0,82$ (Lampiran 11). Grafik hubungan antara dosis ekstrak bunga rosela dengan jumlah sel granular lobster air tawar disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Grafik Hubungan Antara Dosis Ekstrak Bunga Rosela Dengan Persentase Granular Setelah Uji Tantang

Hasil perbandingan hemosit pada sel granular terjadi penurunan yaitu pada perlakuan A (1%) sebesar 4,33, kemudian perlakuan B sebesar 3,33% dan perlakuan C sebesar 2,00%. Hasil ini disebabkan sel granula tidak berperan dalam aktifitas fagositosis dan sedikit berperan dalam proses enkapsulasi dengan berperan dalam menghasilkan, menyimpan dan mensekresi senyawa antimikroba (Pratiwi, 2008).

4.6 Kualitas Air

Hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) selama penelitian berkisar antara 5-7 ppm. Hasil perhitungan sidik ragamnya diperoleh hasil bahwa perlakuan tidak berpengaruh terhadap kandungan oksigen terlarut, yang berarti oksigen terlarut pada setiap perlakuan

relatif sama (homogen). Menurut Lukito dan Surip (2007), lobster air tawar memerlukan kadar oksigen lebih dari 4 ppm, data DO dan perhitungan selengkapnya tersaji pada Lampiran 12.

Hasil pengukuran pH selama penelitian dengan menggunakan pH meter menghasilkan nilai pH rata-rata berkisar antara 6-7. Hasil perhitungan sidik ragam didapatkan hasil bahwa perlakuan tidak berpengaruh terhadap pH yang berarti perubahan pH pada setiap perlakuan relatif sama (homogen). Menurut Bachtiar (2006), kadar keasaman yang sesuai untuk lobster air tawar yaitu kisaran 6-8. Data pH dan perhitungan selengkapnya tersaji pada Lampiran 13.

Hasil pengukuran suhu pada media pemeliharaan lobster air tawar selama penelitian berkisar antara 23-24⁰C. Hasil perhitungan sidik ragamnya diperoleh hasil bahwa perlakuan tidak berpengaruh terhadap suhu yang berarti suhu pada setiap perlakuan relatif sama (homogen). Menurut Setiawan (2006), temperatur air yang ideal dalam pemeliharaan lobster air tawar adalah 24-31⁰C. data suhu dan perhitungan selengkapnya tersaji pada Lampiran 14.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

- ❖ Semakin tinggi dosis ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) menyebabkan meningkatnya kelulushidupan (SR) lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dengan kelulushidupan tertinggi sebesar 100% pada dosis 5%.
- ❖ Semakin tinggi dosis ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) menyebabkan jumlah THC (jumlah total hemosit) meningkat dengan jumlah hemosit rata-rata tertinggi sebesar $40,5 \times 10^5$ sel/ml diperoleh pada dosis 5%. Pada Diferensial hemosit dengan dosis ekstrak bunga rosela yaitu semakin tinggi dosis ekstrak bunga rosela menyebabkan meningkatnya jumlah sel hyaline dan menurunnya perbandingan sel semi granular dan granular. Untuk mendapatkan sistem imun dalam tubuh lobster air tawar dalam melawan bakteri khususnya *Aeromonas hydrophila* sebaiknya digunakan dosis ekstrak bunga rosela sebesar 5%.

5.2 Saran

- ❖ Untuk mendapatkan hasil yang terbaik untuk dosis imunostimulan sebaiknya menggunakan dosis ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebesar 5%.
- ❖ Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai imunostimulan dengan dosis ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) yang lebih tinggi agar diperoleh informasi lengkap mengenai dosis ekstrak bunga rosela secara optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2005. **Different Organ of the fish.** http://www.mi.mum.ca/L_net/enviro/organ.
- , 2006. **Karena Setitik Aeromonas Melepuh Seluruh Ekor.** http://www.trubus-online.co.id/mod.php?mod=publisher&op=vie_warticle&eid=s&artid=271. Diakses tanggal 5 Januari 2009.
- , 2008. **Health Library. Full Blood Count.** <http://www.Alexshop.com.sg>
- Afrianto dan Liviawati. 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan.** Kanisius. Yogyakarta.
- Agrina, D. 2008. **Sehat Dengan Sirup Rosela Merah.** <http://www.agrina-online.com/show-article.php?rid=12&aid=417>. Diakses tanggal 19 Desember 2008.
- Agustiono, A. 2008. **Klasifikasi dan Morfologi Lobster Air Tawar.** http://www.agustiono_aquarium.blogspot.com/2008/08/Klasifikasi-dan-morfologi-lobster-air. Diakses tanggal 5 Januari 2009.
- Arsyad, Z. 2007. **Identifikasi dan Uji Invitro Bakteri Penyebab Ekor Melepuh Pada Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*) Menggunakan Ekstrak Kasar Bawang Putih (*Allium sativum*).** Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Asfanti, M.I. 2007. **Pengaruh Pemberian Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Kekebalan Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*).** Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Bachtiar, Y. 2006. **Usaha Budidaya Lobster Air Tawar Di Rumah.** Agromedia Pustaka. Jakarta. 60 hal.
- Buchanan, R.E., dan N.E. Gibbons. 1974. **Gram negative Facultatively Anaerobic Rods. In: Shewan, J.M., and M. Veron. Bergey's Manual Determinative Bacteriology.** William and Wilkins Baltimore. USA. Page 290-350.
- Citarasu T.V.S, Grasian I, Namita R and Vadivel M. 2006. **Influence of Selected Indian Immunostimulant Herbs Againsts White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* With Reference to Haematological, Biochemical and Immunological Changes.** *Fish&Shellfish Immunology* **21**: 372-384.

- Clark, P.T., J.S. Henthorn, and J.M. England. 1985. **Differential White Cell Counting on The Coulter Counter**. Clinical and Laboratory Haematology.
- Dwijoseputro, D. 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Djambatan. Malang 214 hal.
- Effendi, S; R. Alexander, dan T. Akbar, . 2004. **Peningkatan Hemosit Benur Udang Windu (*Penaeus monodon Fabricus*) Pasca Perendaman Ekstrak Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) Pada Konsentrasi Yang Berbeda**. Jurnal Sains dan Teknologi, Agustus 2004, Vol 14 No.2: 46-53.
- Fitriani, V. 2008. **Bunga Rosela**. <http://www.trubus.com>. Diakses tanggal 1 September 2008
- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknik Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta
- Gandasoebrata, R. 1967. **Penuntun Laboratorium Klinik**. Dian Rakyat. Jakarta
- Hanafiah, K.A.2000. **Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi**. PT Raja Grafindo Persada. 238 hal
- Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern menganalisis tumbuhan**. ITB. Bandung.354 hal.
- Irianto, A.P.Sukardi, T.P.Budhi, Sukanto, Rochmani dan S. Santoso. 2004. **Prosiding, Pengendalian Penyakit Pada Ikan Dan Udang Berbasis Imunisasi Dan Biosecurity**. Seminar Nasional Penyakit Ikan Udang IV Purwokerto, 18-19 Mei 2004.
- Iskandar. 2003. **Budidaya Lobster Air Tawar**. Agromedia. Jakarta. 76 hal.
- Johansson, M.W, P. Keyser, K. Sritunyalucksana and K. Söderhäll. 2000. **Crustacean Haemocytes and Haematopoiesis**. *Aquaculture* 191:45–52.
- Kabata, Z. 1985. **Parasites and Disease of fish Cultured in the Tropics**. Taylor and Frandhis Ltd. London. 318p.
- Kordi, K.M.G. 2004. **Penanggulangan Hama dan Penyakit IKan**. Bina Adiaksara. Jakarta.
- Kristiana, L dan Herti, M. 2005. **Khasiat dan Manfaat Rosela**. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Lio-Po, G.D, R.L. Celia, and R.C.L. Erlinda. 2001. **Health Management in Aquaculture**. Aquaculture Department. Southeast Asian Fisheries Development Center. Philippines.

- Lukito, A dan Surip, P. 2007. **Lobster Air Tawar**. Penebar Swadaya. Jakarta. 278 hal.
- Nazir. 2005. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Bogor.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi I**. Alih Bahasa: R. S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 997 hal.
- Prajitno, A. 2004. **Diktat Kuliah dan Penyakit Ikan**. Universitas Brawijaya. Malang
- , 2007. **Penyakit Ikan-Udang Bakteri**. UM Press. Malang 115 hal.
- Pratiwi, D. 2008. **Pengaruh Penggunaan Filtrat Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Ekor Melepuh Pada Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*) Yang Disebabkan Bakteri *Aeromonas hydrophila***. Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Raa, Jan. 2000. **The Use of Immune-Stimulants in Fish and Shellfish Feeds**. Avances en Nutricion Acuicola V. memoras del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 19-22 Nopember 2000. Merida, Yucatan. Mexico.
- Ruangpan dan Kitio. 1992. **Laboratory Manual of Standardized Methods for Antimicrobial Sensitivity Test for Bacteria Isolated from aquatic Animals and Environment**. SEAFDEC Aquaculture Department. 55p
- Setiawan, C. 2006. **Teknik Pembenuhan dan Cara Cepat Pembesaran Lobster Air Tawar**. Agromedia Pustaka. Jakarta. 88 hal
- Sritunyalucksana, K, P. Sithisarn, B. Withayachumnarnkul and T. W. Flegel. 1999. **Activation of Prophenoloxidase, Agglutinin and Antibacterial Activity in Haemolymph of The Black Tiger prawn, *Penaes monodon*, by Immunostimulants**. *Fish & Shellfish Immunology* 9 (1999): 21–30
- Sritunyalucksana, K. 2001. **Characteristic of Some Immune Genes in the Black Tiger Shrimp, *Penaes monodon***. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from The Faculty of Science and Technology. Uppsala University.Sweden. ISBN 91-554-5087-3. www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-1409-1_fulltext.pdf. 12 April 2007.
- Sukmajaya, Y dan I. Suharjo. 2003. **Lobster Air Tawar Komoditas Perikanan Prospektif**. Agromedia Pustaka. Jakarta. 55 hal
- Supamattaya, K; N Chittiwan and M Boonyaratpalin. 2000. **Immunological Factors in Black Tiger Shrimp, *Penaes monodon*. Fabricus**. <http://aquafeed.com/docs/ns/Supamattayaetal.pdf>. 12 April 2007.
- Sutjiati, M. 1990. **Penyakit Ikan**. Universitas Brawijaya Malang Press. Malang

- Toban, M.H. 2008. **Perubahan Jumlah Hemosit, Kandungan Superoksida dan Aktivitas Enzim Protease Udang Windu (*Penaeus monodon fab.*) Pasca Pemberian Imunostimulan *Gracilaria Verrucosa*.** Tesis. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Tumar. 2007. **Efektivitas Penggunaan Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Petumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara INVITRO.** Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Van de Braak, K. 2002. **Haemocytic Defence in Balck Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*).** PhD Thesis, Wageningen University. Netherland.
- Vetvicka, V and P Sima. 2004. **β -Glucan in Invertebrates.** *ISJ* 1 : 60-65.
- Volk, W.A. dan M.F. Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar.** Editor : Soenartono Adisoemarto. Erlangga. Jakarta. 396 hal.
- Wahab, S dan Noerhajati .S. 1993. **Imunologi III.** Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Yeh, S.T, Chiu S. Lee and Jiann C. C. 2006. **Administration of Hot-Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum duplicatum* Via Immersion and Injection Enhances The Immune Resistance of White Shrimp *Litopenaeus vannamei*.** *Fish & Shellfish Immunology* 20 (2006) : 332-345.