

PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN PADA IKAN MAS

(*Cyprinus carpio L.*) PASCA UJI TANTANG TERHADAP

DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas salmonicida*

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh :

RAHMAT DHIEN MARUNDURI

NIM. 0810852012



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011

PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN PADA IKAN MAS

(*Cyprinus carpio L.*) PASCA UJI TANTANG TERHADAP

DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas salmonicida*

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Universitas Brawijaya

Oleh :

RAHMAT DHIEN MARUNDURI

NIM. 0810852012



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN PADA IKAN MAS  
*(Cyprinus carpio L.)* PASCA UJI TANTANG TERHADAP DAYA HAMBAT  
BAKTERI *Aeromonas salmonicida*

Oleh :

RAHMAT DHIEN MARUNDURI

0810852012

Menyetujui,

Dosen Pengudi

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Maftuch, M.Si)

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Ir. M. Rasyid Fadholi, M.Si)

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.)

Tanggal :

## RINGKASAN

**RAHMAT DHIEN MARUNDURI.** Pengaruh Pemberian Vaksin *Crude Protein* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*) Pasca Uji Tantang terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas salmonicida* (Di bawah bimbingan **Dr. Ir Maftuch, M. Si** dan **Ir. M. Rasyid Fadholi, M. Si**).

---

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta di Laboratorium Parasit dan Penyakit Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada 28 Desember 2010–11 Januari 2011.

Tujuan penelitian ini adalah Mengetahui pengaruh vaksin *crude protein* terhadap respon imun ikan dan kemampuan vaksin menghambat infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) dan mengetahui dosis vaksin *crude protein* yang dapat meningkatkan respon imun dan menghambat serangan bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*).

Metode penelitian yang digunakan adalah menggunakan metode eksperimen, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan A (pemberian *crude protein* dengan konsentrasi 2 mg/1 gram pakan), perlakuan B (pemberian *crude protein* dengan konsentrasi 4 mg/1 gram pakan), perlakuan C (pemberian *crude protein* dengan konsentrasi 6 mg/1 gram pakan), perlakuan K- (perlakuan tanpa pemberian *crude protein* dan tanpa infeksi bakteri) dan perlakuan K+ (perlakuan tanpa pemberian *crude protein* dan dilakukan infeksi bakteri).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan pengaruh pemberian vaksin *crude protein* pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) pasca uji tantang terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas salmonicida* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata (*highly significant*). Nilai rata-rata jumlah eritrosit pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 1.333.333,333 sel/ mm<sup>3</sup> sampai 2.000.000 sel/mm<sup>3</sup> dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan menjadi 1.090.000 sel/mm<sup>3</sup> sampai 2.000.000 sel/mm<sup>3</sup>. Nilai rata-rata jumlah hematokrit pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 22,3% sampai 28,3% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan menjadi 20% sampai 28,3%. Nilai rata-rata jumlah leukosit pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 125.000 sel/mm<sup>3</sup> sampai 131.000 sel/ mm<sup>3</sup> dan setelah dilakukan infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* mengalami peningkatan jumlah leukosit menjadi 125.000 sel/mm<sup>3</sup> sampai 145.000 sel/ mm<sup>3</sup>. Nilai rata-rata jumlah limfosit pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 71,67% sampai 75% dan setelah dilakukan infeksi mengalami peningkatan jumlah limfosit menjadi 72% sampai 77,3%. Nilai rata-rata jumlah monosit pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 13% sampai 14% dan setelah dilakukan infeksi mengalami peningkatan jumlah monosit menjadi 13,3% sampai 17%. Nilai rata-rata jumlah neutrofil pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 4% sampai 8,3% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan jumlah neutrofil menjadi 3,3% sampai 8,3%. Nilai rata-rata jumlah eosinofil pada ikan mas (*C. carpio*) sebelum infeksi berkisar antara 6,67% sampai 7,67% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan jumlah eosinofil menjadi 4% sampai 6,67 %.

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu berdasarkan pengamatan hematologi dan analisis regresi menunjukkan bahwa *crude protein* *A. salmonicida* merupakan bahan yang potensial untuk digunakan sebagai vaksin



pada ikan mas (*C. carpio*) karena terbukti dapat meningkatkan sel darah putih serta diferensial leukosit yang sangat berperan dalam respon imun, adapun perlakuan terbaik yang di dapat dari penelitian ini adalah pada perlakuan C (6 mg/gr pakan) karena pada leukosit dan diferensial leukosit yaitu limfosit, perlakuan C menunjukkan peningkatan yang tinggi pada saat pemberian vaksin, pada hasil pengukuran suhu, pH dan DO di dapatkan nilai suhu berkisar antara 25,5-26,5°C, nilai pH 7 dan DO bekisar antara 6,4,3-6,8 mg/l, kondisi parameter abiotik yang diukur pada wadah pemeliharaan masih dalam kisaran normal untuk pertumbuhan ikan mas dan perubahan total hematokrit, eritrosit, leukosit dan diferensial leukosit lebih besar disebabkan karena adanya pemberian vaksin dan infeksi bakteri.



## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan judul " Pengaruh Pemberian Vaksin Crude Protein pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*) Pasca Uji Tantang terhadap Daya Dambat Bakteri *Aeromonas salmonicida*". Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata-1 (S-1) pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari, skripsi ini belum sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk kepentingan bersama. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca umumnya.

Malang, Oktober 2011

Rahmat Dhien Marunduri

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis mengucapkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan Judul "Pengaruh Pemberian Vaksin Crude Protein pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*) Pasca Uji Tantang Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas salmonicida*".

Ucapan terima kasih kepada Ayahanda Bapak M. Yusuf Marunduri dan Ibunda tercinta Ahimsa Daeli selaku orang tua yang tidak hentinya memberi doa, nasehat, motivasi dan dukungan baik secara moral maupun material sampai menyelesaikan skripsi ini "Tanpa kalian berdua aku bukan siapa-siapa". Kemudian buat adik-adikku tersayang Fitriani Marunduri dan Desy Rahmayanti Marunduri serta keluarga besar di Gunung Sitoli (Nias) dan di Medan yang selalu memberi doa, dukungan dan motivasinya.

Kepada Bapak Dr. Ir. Maftuch, M. Si selaku dosen pembimbing I dan Bapak Ir. M. Rasyid Fadholi, M. Si selaku Dosen Pembimbing II yang tidak bosan-bosannya memberikan bimbingan, nasehat dan motivasinya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Kepada Ibu Ir. Ellana, MP selaku Dosen Pengudi, saya mengucapkan banyak terima kasih atas waktunya dan telah memberikan saran serta perbaikan sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Kepada Mba Titin selaku Laboran di Laboratorium Parasit dan Penyakit Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Selanjutnya kepada Mas Slamet selaku Laboran di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan kepada Mas Ali selaku Laboran di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, saya ucapkan terima kasih atas bantuan dan bimbingannya selama berada di laboratorium sehingga skripsi ini bisa sukses.



Spesial kepada SayNelq (Nelda Linda Aceh) beserta keluarga, SayRa ucapan terima kasih atas doa,motivasi,pengertian dan kasih sayangnya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan "Moga skripsi ini sebagai bukti awal untuk hubungan kita lebih baik lagi".Amin.

Kepada Keluarga Besar Aljers (Alih Jenjang dan Transfer's), saya ucapan terima kasih banyak atas motivasi dan dukungannya selama dalam kuliah sampai dengan selesai "Jalin terus persaudaraan dan komunikasi kita sampai nanti".

Kepada Keluarga Besar Perikanan Brawijaya, saya ucapan terima kasih atas dukungan dan ilmu yang saya dapatkan di kampus ini "ayo majukan terus perikanan Indonesia".

Kepada teman seperjuangan Agung, Bima, Sofa, Leka, Hemin, Torik,Aji,Amal,Viki, Inul,Asep, Fadli dan teman-teman yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu,saya ucapan terima kasih atas dukungan dan motivasinya. Susah senang kuliah, ngerjain laporan sampai sering kumpul bareng pun telah kita lalui.Maju terus kawan!

Kepada teman sepermainan Anak-anak Blok F243 (Boby,Rency,Dedek,Mas Aris, Rayan,Ugik,Gilang, bg Adit dan Mpu Kumal), teman2 dan Bpk2 di Masjid Abu Dzar Al- Ghifari, teman-teman Inbis Fitnes Center dan teman-teman Futsal, saya ucapan terima kasih atas dukungan dan motivasinya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan "susah-senang,tawa-tangis,senyum-amarah telah kita lewati bersama,ayo kita raih mimpi kita".

**"Ayo Kayuh Terus Hidup ini Dengan Semangatmu,  
Agar Kau Dapat Berlabuh di Mimpimu"**

**Rahmat Dhien Marunduri**



## DAFTAR ISI

Halaman

|  |      |
|--|------|
| RINGKASAN .....  | i    |
| KATA PENGANTAR .....   | iii  |
| UCAPAN TERIMA KASIH .....  | iv   |
| DAFTAR ISI .....   | vi   |
| DAFTAR TABEL .....   | viii |
| DAFTAR GAMBAR .....  | x    |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xiii |
| <br>   |      |
| 1. PENDAHULUAN .....   | 1    |
| 1.1 Latar Belakang .....   | 1    |
| 1.2 Rumusan Masalah .....  | 4    |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....  | 4    |
| 1.4 Kegunaan Penelitian .....                                      | 5    |
| 1.5 Hipotesis .....  | 5    |
| 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian .....                              | 5    |
| <br>   |      |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA .....  | 7    |
| 2.1 Biologi Ikan Mas .....   | 7    |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Mas .....                     | 7    |
| 2.1.2 Habitat dan Penyebaran .....                                 | 7    |
| 2.2 Biologi <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                     | 8    |
| 2.2.1 Klasifikasi dan morfologi <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 8    |
| 2.2.2 Aktifitas dan Pertumbuhan .....                              | 8    |
| 2.2.3 Daerah Penyebaran <i>Aeromonas salmonicida</i> .....         | 9    |
| 2.2.4 Patogenesis <i>Aeromonas salmonicida</i> .....               | 9    |
| 2.2.5 Faktor Virulensi Bakteri Gram Negatif .....                  | 10   |
| 2.2.6 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangannya .....                 | 10   |
| 2.3 Sistem Imunitas Ikan .....                                     | 11   |
| 2.4 Vaksin .....   | 13   |
| 2.5 Crude Protein .....  | 13   |
| 2.6 Haematologi Ikan .....   | 14   |
| 2.6.1 Sel Darah Merah .....  | 14   |
| 2.6.2 Total Leukosit .....   | 16   |
| 2.6.3 Diferensial Leukosit .....                                   | 16   |
| <br>   |      |
| 3. MATERI DAN METODELOGI PENELITIAN .....                          | 19   |
| 3.1 Materi Penelitian .....  | 19   |
| 3.1.1 Bahan-bahan Penelitian .....                                 | 19   |
| 3.1.2 Alat-Alat Penelitian .....                                   | 19   |
| 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian .....                          | 19   |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Prosedur Penelitian .....  | 21        |
| 3.3.1 Persiapan Penelitian .....   | 21        |
| 3.3.1.1 Sterilisasi alat dan bahan .....   | 21        |
| 3.3.1.2 Pembuatan Media.....   | 22        |
| 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian .....   | 23        |
| 3.3.2.1 Pembuatan Biakan Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 23        |
| 3.3.2.2 Pewarnaan Gram.....  | 23        |
| 3.3.2.3 Pemotongan Pili .....  | 24        |
| 3.3.2.4 Persiapan Wadah dan Hewan Uji .....  | 25        |
| 3.4 Parameter Uji .....  | 25        |
| 3.4.1 Parameter Utama .....  | 25        |
| 3.4.1.1 Sel Darah Merah .....  | 25        |
| 3.4.1.1.1 Eritrosit .....  | 26        |
| 3.4.1.1.2 Hematokrit.....  | 27        |
| 3.4.1.2 Total Leukosit .....   | 28        |
| 3.4.1.3 Deferensial Leukosit .....   | 29        |
| 3.4.2 Parameter Penunjang .....  | 29        |
| 3.4.2.1 Suhu .....   | 29        |
| 3.4.2.2 Derajat Keasaman (pH) .....  | 30        |
| 3.4.2.3 Kandungan Oksigen Terlarut (DO).....   | 31        |
| 3.5 Analisa Data .....   | 32        |
| <b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>   | <b>33</b> |
| 4.1 Penentuan Kepadatan Bakteri untuk Uji tantang .....  | 33        |
| 4.2 Hasil isolasi Crude Protein .....  | 33        |
| 4.3 Penentuan Dosis Vaksin Crude Protein untuk Uji Tantang .....   | 34        |
| 4.4 Mortalitas Ikan pada Perlakuan .....   | 35        |
| 4.5 Sel Darah Merah .....  | 35        |
| 4.5.1 Jumlah Total Eritrosit Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 35        |
| 4.5.2 Jumlah Total Hematokrit Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum<br>dan Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 40        |
| 4.6 Jumlah Total Leukosit Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....     | 44        |
| 4.7 Deferensial Leukosit.....  | 49        |
| 4.7.1 Jumlah Total Limfosit Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....   | 49        |
| 4.7.2 Jumlah Total Monosit Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....    | 53        |
| 4.7.3 Jumlah Total Neutrofil Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 57        |
| 4.7.4 Jumlah Total Eusinofil Ikan Mas ( <i>C. carpio L.</i> ) Sebelum dan<br>Sesudah Uji Tantang Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 61        |
| 4.8 Pengamatan Kualitas air .....  | 64        |
| <b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>   | <b>66</b> |
| 5.1 Kesimpulan .....   | 66        |
| 5.2 Saran .....  | 66        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>LAMPIRAN .....</b>  | <b>73</b> |

## DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Pengaruh kisaran pH terhadap ikan .....  | 31      |
| 2. Analisa sidik ragam total eritrosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                      | 37      |
| 3. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total eritrosit pada ikan mas (( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> ).....          | 38      |
| 4. Analisa sidik ragam total hematokrit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                     | 42      |
| 5. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total hematokrit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> (dalam %) ..... | 43      |
| 6. Analisa sidik ragam total leukosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                       | 46      |
| 7. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total leukosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....             | 47      |
| 8. Analisa sidik ragam total limfosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                       | 51      |
| 9. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total limfosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> (dalam %) .....   | 52      |
| 10. Analisa sidik ragam total monosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                       | 55      |
| 11. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total monosit pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> (dalam %) .....   | 55      |
| 12. Analisa sidik ragam total neutrofil pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                     | 59      |
| 13. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total neutrofil pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> (dalam %) ..... | 59      |
| 14. Analisa sidik ragam total eosinofil pada ikan mas ( <i>C. carpio L.</i> ) pasca uji tantang bakteri <i>A. salmonicida</i> .....                     | 62      |

15. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total eosinofill pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %) .....

63



## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Ikan Mas .....   | 7       |
| 2. <i>Aeromonas salmonicida</i> .....   | 8       |
| 3. Ikan mas ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) yang terserang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 11      |
| 4. Sistem imun .....  | 12      |
| 5. Eritrosit .....  | 15      |
| 6. Limfosit .....   | 17      |
| 7. Monosit .....  | 17      |
| 8. Neutrofil .....  | 18      |
| 9. Eosinofil .....  | 18      |
| 10. Denah penelitian .....  | 21      |
| 11. Alat menghitung eritrosit .....   | 26      |
| 12. Alat menghitung hematokrit .....  | 28      |
| 13. Alat menghitung leukosit .....  | 29      |
| 14. Hasil vaksin <i>crude protein</i> .....   | 34      |
| 15. Eritrosit ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x) .....  | 36      |
| 16. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude protein</i> terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 36      |
| 17. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude protein</i> terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                       | 39      |
| 18. Hasil hematokrit saat penelitian .....  | 40      |
| 19. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude protein</i> terhadap jumlah total hematokrit pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 41      |

|  |    |
|--|----|
| 20. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total hematokrit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                     | 44 |
| 21. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total leukosit pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 45 |
| 22. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total leukosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                       | 48 |
| 23. Limfosit ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x) .....  | 49 |
| 24. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total limfosit pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 50 |
| 25. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total limfosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                       | 52 |
| 26. Monosit ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x) .....   | 53 |
| 27. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total monosit pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....   | 54 |
| 28. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total monosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                        | 56 |
| 29. Neutrofil ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x) .....   | 57 |
| 30. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total neutrofil pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 58 |
| 31. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total neutrofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....                      | 60 |
| 32. Eosinofil ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x) .....   | 61 |
| 33. Pengaruh pemberian vaksin <i>crude</i> protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan mas ( <i>C. carpio</i> L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 61 |

34. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida* .....

64



**DAFTAR LAMPIRAN**

Halaman

|  |     |
|--|-----|
| 1. Jumlah total pemberian vaksin <i>crude protein</i> pada ikan mas ( <i>Cyprinus carpio L.</i> ) .....                        | 73  |
| 2. Mortalitas ikan mas pasca uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....  | 75  |
| 3. Prosedur penelitian .....   | 76  |
| 4. Jumlah total diferensial leukosit .....   | 82  |
| 5. Perhitungan jumlah total sel darah pada ikan mas sebelum dan sesudah uji tantang bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> ..... | 83  |
| 5. Data Parameter Penunjang .....  | 133 |



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyediaan ikan untuk konsumsi domestik meningkat sebesar 8,74% per tahun yakni dari 4,9 juta ton pada tahun 2004 menjadi 6,85 juta ton pada tahun 2008. Konsumsi ikan per kapita meningkat menjadi 7,35% per tahun yakni dari 22,58 kg/kapita menjadi 29,98 kg/kapita pada tahun 2008. Sampai dengan tahun 2009 diperkirakan konsumsi ikan dapat mencapai 30,17 kg/kapita (Muhammad, 2010).

Untuk mencapai target produksi sesuai dengan yang diharapkan, berbagai permasalahan menghambat upaya peningkatan produksi tersebut, antara lain kegagalan produksi akibat serangan wabah penyakit ikan yang bersifat patogenik baik dari golongan parasit, jamur, bakteri maupun virus. Permasalahan lainnya adalah degradasi mutu lingkungan budidaya yang semakin memburuk, yang disebabkan oleh kegiatan budidaya itu sendiri maupun dari luar lingkungan budidaya (Sugianti, 2005).

Penyakit merupakan salah satu faktor penyebab ketidakberhasilan budidaya ikan karena dapat menyebabkan kematian dalam jumlah besar. Penyakit dapat muncul di suatu perairan akibat tidak seimbangnya antara lingkungan, ikan dan jasad patogen. Penanganan dalam budidaya yang kurang baik dapat menyebabkan ikan mengalami stres sehingga daya tahan tubuhnya menurun dan mudah terserang penyakit (Syawal dkk, 2008).

Penyakit adalah terganggunya kesehatan pada ikan yang dapat mematikan. Secara garis besar penyakit yang menyerang ikan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi (penyakit menular) dan non infeksi (penyakit tidak menular). Penyakit menular adalah penyakit yang timbul disebabkan oleh masuknya makhluk lain ke dalam tubuh ikan, baik pada bagian

tubuh dalam maupun bagian tubuh luar. Makhluk tersebut antara lain adalah virus, bakteri, jamur dan parasit. Penyakit tidak menular adalah penyakit yang disebabkan oleh keracunan makanan, kekurangan makanan atau kelebihan makanan dan mutu air yang buruk (Gusrina, 2007).

Beberapa kasus serangan wabah penyakit ikan yang terjadi pada masa lalu telah menimbulkan kerugian yang tidak kecil. Pada tahun 1932 masuknya parasit *Ich* melalui ikan Guppies yang selanjutnya menyebar dan menyerang berbagai jenis ikan air tawar lainnya. Disusul pada tahun 1970 terjadi serangan parasit *Lernaea*, serangan parasit *Myxobolus* pada tahun 1978 dan pada tahun 1979 terjadi serangan parasit *Myxosoma* yang semuanya terjadi pada ikan air tawar. Selanjutnya, pada tahun 1980 terjadi serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan mas di Indonesia. Pada tahun 2001 terjadi wabah penyakit pada ikan mas dan koi, yang mengakibatkan kematian masal di sentra-sentra budidaya ikan mas dan koi. Penyebab kematian tersebut adalah agen patogenik dari golongan virus yang dikenal sebagai *Koi Herpes Virus* (KHV). Serangan KHV masih sering dilaporkan terjadi di sentra-sentra budidaya ikan mas dan koi sampai dengan saat ini dan menimbulkan kerugian yang tidak kecil (Sugianti, 2005).

Patogenitas bakteri *Aeromonas salmonicida* pada setiap inang memiliki tingkat keganasan berbeda berdasarkan virulensi terhadap inang. Semakin tinggi kepadatan bakteri semakin tinggi daya serang terhadap inangnya. Namun demikian, sampai timbulnya penyakit dipengaruhi oleh jenis ikan dan kemampuan ketahanan tubuh inang untuk melawan patogen (Leminem, 2007).

*Aeromonas salmonicida* merupakan salah satu jenis penyakit tertua yang menginfeksi pada ikan *Brown trout* yang berasal dari *hatchery* di Jerman yang mula-mula dikenal penyakit “*Bacillus*”. Kemudian berkembang di Amerika Serikat,

Jepang dan Inggris pada tahun 1990-an. *Furunculosis* ditemukan di berbagai Negara Eropa yang menginfeksi ikan *Brown trout* (*Salmon trutta*) yang diimpor dari Nort America (Mc Carthy, 1975 dalam Leminem, 2007). *A. salmonicida* juga menginfeksi ikan non Salmonidae yaitu ikan air tawar. Di Australia dikenal dengan *Gold Fish Ulcer Disease* (Bullock, 2001 dalam Leminem, 2007). Di Indonesia *A. salmonicida* sudah ada di Jawa dan aceh yang termasuk bakteri Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK) sehingga harus dicegah penyebarannya (Leminem, 2007).

Vaksin berorientasi kepada pencegahan dan perlindungan dari berbagai serangan penyakit yang berasal dari lingkungan manusia. Vaksin adalah suatu bahan yang berasal dari kuman atau virus yang menyebabkan penyakit bersangkutan, telah dilemahkan atau dimatikan, atau diambil sebagian, atau mungkin tiruan dari kuman penyebab penyakitnya yang sengaja dimasukkan ke dalam tubuh seseorang atau kelompok orang yang bertujuan merangsang timbulnya zat anti penyakit tertentu pada orang-orang tersebut. Sebagai akibatnya, orang yang diberi vaksin akan memiliki kekebalan terhadap penyakit bersangkutan (Anonymous<sup>a</sup>, 2006).

Ellis (1988) dalam Maftuch (2006) menyatakan penggunaan vaksin bakteri yang diproduksi dari organisme hidup membuktikan keberhasilan yang cukup menggembirakan dalam bidang biologi molekuler. Lebih lanjut dalam seleksi alam dapat muncul strain antigen baru dari bakteri. Vaksin yang efektif dapat menimbulkan tanggap kebal waktu lama dari sel T. Oleh karena itu diperlukan suatu penelitian secara *in vivo* laboratorium yang dapat membuktikan peningkatan respon imun pasca vaksinasi dan membuktikan seberapa jauh vaksin tersebut memberikan perlindungan pada ikan pasca infeksi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Penyakit adalah terganggunya kesehatan ikan yang diakibatkan oleh berbagai sebab yang dapat mematikan ikan. Secara garis besar penyakit yang menyerang ikan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi (penyakit menular) dan non infeksi (penyakit tidak menular). Penyakit menular adalah penyakit yang timbul disebabkan oleh masuknya makhluk lain kedalam tubuh ikan, baik pada bagian tubuh dalam maupun bagian tubuh luar. Makhluk tersebut antara lain adalah virus, bakteri, jamur dan parasit. Penyakit tidak menular adalah penyakit yang disebabkan oleh keracunan makanan, kekurangan makanan atau kelebihan makanan dan mutu air yang buruk (Gusrina, 2007).

Beberapa jenis penyebab penyakit ikan golongan bakteri yang sering menimbulkan kerugian dalam usaha budidaya ikan antara lain meliputi *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Yersinia ruckeri*, dan *Streptomyces* (Sugianti, 2005).

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan beberapa permasalahanya, sebagai berikut :

- a. Apakah pemberian vaksin *crude protein* dapat meningkatkan respon imun pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) dan menghambat serangan bakteri *Aeromonas salmonicida* yang menginfeksi ikan mas?
- b. Berapa dosis vaksin *crude protein* yang dapat meningkatkan respon imun dan menghambat serangan bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini sebagai berikut :

- a. Mengetahui pengaruh vaksin *crude* protein terhadap respon imun ikan dan kemampuan vaksin menghambat infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*).
- b. Mengetahui dosis vaksin *crude* protein yang dapat meningkatkan respon imun dan menghambat serangan bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*).

#### **1.4 Kegunaan Penelitian**

Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang deskripsi pengaruh pemberian vaksin *crude* protein kepada pengguna selanjutnya sebagai salah satu bahan pembuatan vaksin dalam penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas salmonicida*.

#### **1.5 Hipotesis**

$H_0$  : Diduga vaksin *Crude* protein tidak mampu meningkatkan respon imun dan menghambat serangan *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas secara *in vivo*.

$H_1$  : Diduga vaksin *Crude* protein mampu meningkatkan respon imun dan menghambat serangan *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas secara *in vivo*.

#### **1.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 28 Desember 2010–11 Januari 2011 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium Parasit



dan Penyakit, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya  
Malang.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Mas

Klasifikasi ikan mas (Gambar 1) menurut Saanin (1984) dalam Shahrani (2003) adalah sebagai berikut:

Filum : Chordata

Kelas : Pisces

Sub kelas : Teleostei

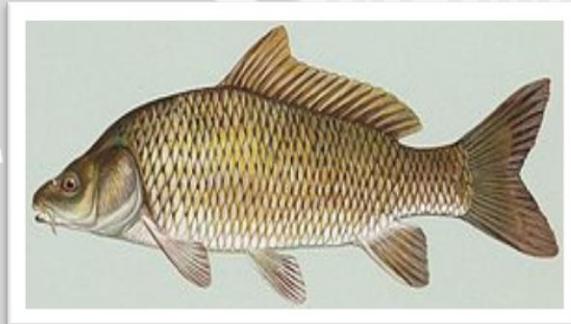
Ordo : Ostariophysi

Sub Ordo : Cyprinoidea

Famili : Cyprinidae

Genus : *Cyprinus*

Spesies : *Cyprinus carpio* L.



Gambar 1. Ikan mas

Menurut Cahyono (2004), Ciri-ciri fisik ikan mas sebagai berikut, pada mulut terdapat dua pasang sungut peraba, sirip punggung memiliki 4 jari-jari lunak, sirip dubur memiliki 3 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak, sirip perut memiliki 2 jari-jari keras dan 8 jari-jari lunak, sirip dada memiliki 1 jari-jari keras dan 13-16 jari-jari lunak dan sisik gurat sisi jumlahnya 33-37 keping.

Berdasarkan fungsinya, ras-ras ikan karper yang ada di Indonesia dapat digolongkan menjadi dua kelompok. Kelompok pertama merupakan ras-ras ikan konsumsi dan kelompok kedua adalah ras-ras ikan hias (Suseno, 2000).

#### 2.1.2 Habitat dan Penyebarannya

Ikan mas hidup di perairan air tawar di dataran rendah sampai tinggi. Suhu air optimum bagi hidupnya berkisar antara 26-28°C, sedangkan pH air antara 6-8 dan membutuhkan kadar oksigen 4-5 ppm. Ikan ini hidup di air tawar,

walaupun dapat juga hidup di lingkungan payau berkadar garam rendah kurang dari 5 ppt (Cholik, Jagatraya, Purnomo dan Jauzi, 2005).

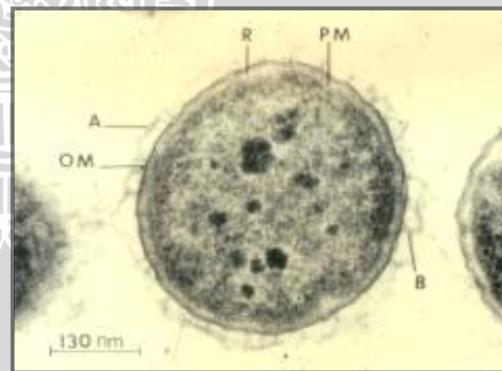
Ikan mas sering ditemui dipinggiran sungai,danau atau perairan tawar lainnya yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras. Ikan mas berasal dari Cina dan Rusia. Kemudian menyebar ke daerah Eropa, Asia Timur dan Asia Selatan dan sekitar abad pertengahan. Didaerah baru ini, perkembangan ikan mas semakin pesat, terutama dalam teknik pemeliharaan dan perkembangbiakannya. Keadaan seperti itu juga terjadi di Indonesia sejak pertengahan abad ke-19. Akibat perkembangannya yang pesat menjadikan ikan ini semakin popular dan memiliki banyak varietas (Susanto dan Rochdianto, 2002).

## 2.2 Biologi *Aeromonas salmonicida*

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Aeromonas salmonicida*

Klasifikasi *Aeromonas salmonicida* (Gambar 2) menurut Lehmann and Neumann (1896); Griffin et al. (1953) dalam Putra (2010) adalah :

|         |                                |
|---------|--------------------------------|
| Domain  | : <u>Bacteria</u>              |
| Kingdom | : <u>Proteobacteria</u>        |
| Phylum  | : <u>Gammaproteobacteria</u>   |
| Class   | : <u>Aeromonadales</u>         |
| Genus   | : <u>Aeromonas</u>             |
| Species | : <i>Aeromonas salmonicida</i> |



Gambar 2. *Aeromonas salmonicida*  
[www.wordpress.com](http://www.wordpress.com)

### 2.2.2 Aktifitas dan Pertumbuhan

Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari atau beberapa minggu tetapi tidak dapat berbiak, dan bersifat obligat.

*Aeromonas salmonicida* dapat bertahan dalam air pada periode waktu yang lama. Lamanya waktu tergantung pada kandungan mineral, pH dan suhu di perairan. Dengan meningkatnya suhu, virulensnya juga bertambah tinggi (Inglis *et al.*, 1993; Nitimulyo *et al.*, 1993 *dalam* Sugianti 2005).

### **2.2.3 Daerah Penyebaran *Aeromonas salmonicida***

*Aeromonas salmonicida* merupakan salah satu jenis penyakit tertua yang menginfeksi pada ikan *Brown trout* yang berasal dari *hatchery* di Jerman yang mula-mula dikenal penyakit “*Bacillus*”. Kemudian berkembang di Amerika Serikat, Jepang dan Inggris pada tahun 1990-an. *Furunculosis* ditemukan di berbagai Negara Eropa yang menginfeksi ikan *Brown trout* (*Salmon trutta*) yang diimpor dari Nort America (Mc Carthy, 1975 *dalam* Leminem, 2007). *Aeromonas salmonicida* juga menginfeksi ikan non *Salmonidae* yaitu ikan air tawar. Di Australia dikenal dengan *Gold Fish Ulcer Disease* (Bullock, 2001 *dalam* Leminem, 2007). Di Indonesia *Aeromonas salmonicida* sudah ada di Jawa dan aceh yang termasuk bakteri Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK) sehingga harus dicegah penyebarannya (Leminem, 2007).

### **2.2.4 Patogenesis *Aeromonas salmonicida***

Patogenitas infeksi bakteri mencakup inisiasi dari proses infeksi dan mekanisme yang menyebabkan pemunculan tanda-tanda dan simtom. Ciri khas bakteri patogen antara lain, adanya kemampuan transmisi, perlekatan pada inang ke sel dan jaringan inang, toksogenitas dan kemampuan untuk menghindari sistem imun (Jawetz, Melnick and Adelberg's 1991).

Patogenitas bakteri *Aeromonas salmonicida* pada setiap inang memiliki tingkat keganasan berbeda berdasarkan virulensi terhadap inang. Semakin tinggi kepadatan bakteri semakin tinggi daya serang terhadap inangnya. Namun

demikian, sampai timbulnya penyakit dipengaruhi oleh jenis ikan dan kemampuan ketahanan tubuh inang untuk melawan patogen (Leminem, 2007).

### **2.2.5 Faktor Virulensi Bakteri Gram Negatif**

Bakteri tersebar sangat luas di lingkungan, mulai dari manusia, mamalia dan vertebrata, termasuk yang menginfeksi berbagai organ ikan air tawar maupun laut. Pada ikan, infeksi paling banyak terdapat di saluran pencernaan, kulit dan insang (Anderson, 1974). Kemampuan bakteri yang menyebabkan infeksi dan penyakit (virulensi) bakteri melibatkan banyak komponen bakteri yang berperan dan didasarkan pada basis adhesi yang melibatkan pili dan *Outer membrane protein* (Omp), toksin, *Lipopolisacharida* (LPS), Enzim (protease, Hemosilin) dan *Ekstraseluler Produk* (ECP) (Murdjani, 2002).

Dasar-dasar faktor virulensi bakteri menurut Bellanti (1993) terdiri dari empat tahapan yaitu: (1) Perlekatan bakteri; (2) Penembusan dan invasi jaringan; (3) Produksi bahan-bahan toksik (toksin) dan (4) Kemampuan mengadakan perubahan genetik.

### **2.2.6 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangannya**

Menurut Nitimulyo et al., (1993) dalam Sugianti (2005), gejala klinis serangan *Aeromonas salmonicida* pada ikan adalah pembentukan ulkus-ulkus yang menyerupai bisul, pendarahan sirip, sirip putus atau patah, pendarahan pada insang, lendir berdarah pada rektum, petikiae pada otot dan pembentukan cairan berdarah. Usus bagian belakang lengket dan bersatu serta pembengkakan limpa dan nekrosis pada ginjal. Banyak jenis ikan air tawar yang dapat terserang penyakit ini. Penyakit *furunculosis* pada ikan yang disebabkan oleh 17 bakteri yang memiliki ciri-ciri luka yang khas yaitu nekrosis pada otot,

pembengkakan di bawah kulit dengan luka terbuka berisi nanah dan jaringan yang rusak di puncak luka tersebut seperti cekungan (Gambar 3).

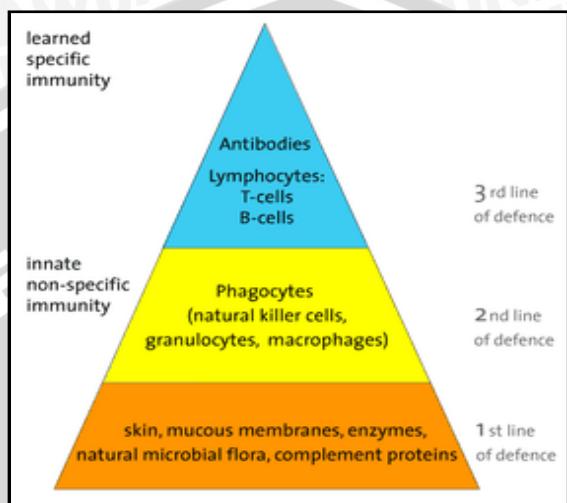


Gambar 3. Ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) yang terserang bakteri *Aeromonas salmonicida* ([www.wordpress.com](http://www.wordpress.com))

### 2.3 Sistem Imunitas Ikan

Menurut Anderson (1974) dalam Maftuch (2006), sistem kekebalan tubuh adalah kemampuan organisme dalam 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 penginvasi dan kekebalan seluler yaitu kekebalan yang dicapai melalui pembentukan limfosit dan makrofag dalam jumlah yang besar.

Ikan seperti hewan pada umumnya, memiliki mekanisme pertahanan diri terhadap patogen. Sistem pertahanan tersebut terdiri dari sistem pertahanan non-spesifik atau innate immunity dan sistem pertahanan spesifik atau adaptif immunity (Irianto, 2005). Sistim imun secara umum disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Sistem imun (faal/imun/ikun/2006)

Menurut Iwama dan Nakanishi (1996) dalam Setiawati (2004), ikan mempunyai kemampuan yang baik dalam sistem imun spesifik dan non-spesifik. Komponen non-spesifik merupakan sistem kekebalan tubuh ikan terhadap mekanisme fagosit yang berkaitan dengan makrofag dan granular leukosit, sebagai contoh neutrofil menyerang mikroorganisme yang masuk melalui jaringan kulit ikan atau mukus. Selain itu ada lysozym dan komplement lain yang merusak patogen. Komponen spesifik dalam sistem imun terdiri dari humoral dan respon sel terhadap memori imunologi walaupun memori imun pada ikan secara umum sangat kurang berkembang dibandingkan hewan tingkat tinggi lainnya. Tingkat induksi dan respon dipengaruhi suhu. Pada respon imun spesifik, makrofag bertindak sebagai sel antigen, sedangkan *B-lymphosyt* terlibat dalam produksi antibodi. *T-lymphosyt* juga terlibat dalam imunitas melalui

deferensiasi dan proliferasi dari *B-lymphosyt*. Suatu antibodi akan diproduksi terhadap phatogen spesifik, yang akan mengikat membran patogen dan merusak melalui aktivasi sistem komplemen dengan cara klasik.

## 2.4 Vaksin

Vaksinasi untuk menghindari penyakit yang disebabkan oleh virus sudah lama dikenal, akan tetapi vaksinasi untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri belum terisolasi dengan baik. Penggunaan vaksin untuk mencegah penyakit pada hewan dapat mengurangi jumlah peredaran anti bakteri pada ikan (Markedstat dan Grave, 1997 *dalam* Soeripto, 2002).

Sampai saat ini penggunaan vaksin anti bakteri yang diproduksi dari organisme hidup membuktikan keberhasilan yang cukup menggembirakan dalam bidang biologi molokuler. Lebih lanjut bahwa secara seleksi alam dapat muncul starin antigen baru dari bakteri. Yang efektif adalah vaksin yang dapat menimbulkan tanggap kebal waktu lama dari sel T (Ellis, 1988 *dalam* Maftuch, 2006).

## 2.5 Crude Protein

Menurut Winarno (2002) *dalam* Kusmaryani (2005), protein berasal dari bahasa Yunani *proteios*, yang berarti "barisan pertama". Kata yang diciptakan oleh Johns J.Berzelius pada tahun 1938 untuk menekankan pentingnya golongan ini (Stryer, Lubert, 2000 *dalam* Kusmaryani, 2005). Sebagai zat pembangun, protein merupakan bahan pembentuk jaringan-jaringan baru yang selalu terjadi dalam tubuh. Pada masa pertumbuhan proses pembentukan jaringan terjadi secara besar-besaran, pada masa kehamilan proteinlah yang membentuk jaringan janin dan pertumbuhan embrio. Protein juga mengganti jaringan tubuh yang rusak dan yang perlu dirombak. Fungsi utama protein bagi tubuh ialah untuk membentuk jaringan baru dan mempertahankan jaringan yang

telah ada. Kekurangan protein dalam waktu lama dapat mengganggu berbagai proses dalam tubuh dan menurunkan daya tahan tubuh terhadap penyakit.

Protein merupakan senyawa organik yang tersusun dari berbagai asam amino melalui ikatan peptida. Protein dapat diisolasi dengan menambahkan TCA (*Trichloro Acetic Acid*), yang mempunyai kemampuan mengendapkan protein. Senyawa tersebut digunakan untuk membantu pemutusan pili dari permukaan sel bakteri (Mustafa, 2002; Kurniawan, 2008 *dalam* Berek, 2010).

## 2.6 Haematologi Ikan

Haematologi merupakan disiplin ilmu yang mempelajari komponen sel darah serta kelainan fungsional dari sel tersebut. Selain itu juga mempelajari volume darah, sifat aliran darah dan hubungan fisik antara sel-sel darah dan plasma (Johny,Zafran; Des Roza; dan Mahardika, 2003).

Pemeriksaan darah utamanya pada fisiologis tertentu sangat diperlukan. Hasilnya bisa digunakan sebagai pelengkap diagnosis. Pemeriksaan sel-sel darah biasanya dilakukan melalui preparat ulas dan secara diagnostik perhitungan sel darah sangat berarti (Nabib dan Pasaribu, 1989).

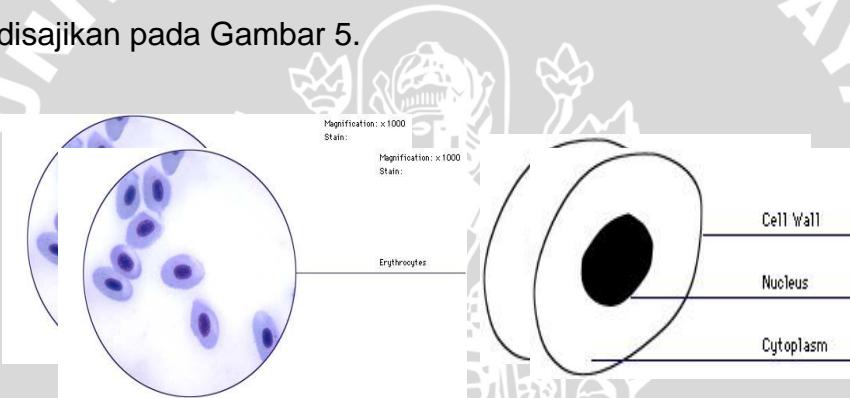
### 2.6.1 Sel Darah Merah

Ikan sebagaimana vertebrata lain, memiliki sel darah merah (eritrosit) berinti dengan bentuk dan ukuran bervariasi antara satu spesies dengan yang lainnya. Ada yang berbentuk lonjong, memiliki inti dengan rasio volume sel dan inti adalah 3,5-4,5. Jumlah sel darah merah pada masing-masing spesies juga berbeda, tergantung aktivitas dari ikan tersebut (Fujaya, 2004).

Menurut Fadhil, dkk (2009), darah berfungsi mengedarkan suplai makanan kepada sel-sel tubuh, membawa oksigen ke jaringan-jaringan tubuh,

membawa hormon dan enzim ke organ yang memerlukan. Pertukaran oksigen dari air dengan karbondioksida pada bagian *semipermeable* yaitu pembuluh darah yang terdapat di daerah insang. Selain itu, di daerah insang terjadi pengeluaran kotoran yang bernitrogen.

Eritrosit ikan mempunyai inti dan jumlahnya bervariasi bergantung spesies, kondisi stress dan suhu lingkungan. Akan tetapi umumnya berkisar  $1,05\text{--}3,0 \times 10^6$  sel per  $\text{mm}^3$ . Beberapa contoh jumlah eritrosit ikan antara lain : *Yellow perch (Percaflavescens)*  $1,1 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ , *Ictalurus punctatus*  $2,4 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$  dan *Cyprinus carpio*  $1,43 - 1,6 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$  (Irianto, 2005). Gambar eritrosit disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Eritrosit (Anonymous, 2005)

Hematokrit adalah persentase bagian volume sel darah merah (eritrosit) yang mengendapkan dengan volume seluruhnya. Nilai hematokrit pada setiap ikan bervariasi tergantung dari kondisi fisiologis dan kesehatan serta aktivitas dari ikan yang diambil sampel darahnya (Bijanti, 2005).

Menurut Wedemeyer dan Yasutake (1977) dalam Syawal (2008) yang menyatakan bahwa kadar hematokrit dapat berubah-ubah tergantung pada musim, suhu dan pemberian makanan yang sehat.

Menurut Houston dan Dewilde (1968) : Moyle dan Cech (1988) dalam Vonti (2008) menyebutkan bahwa nilai hematokrit pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) adalah 27,1 %.

### 2.6.2 Total Leukosit

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Fungsi leukosit dalam sistem tubuh sangat penting. Salah satu fungsi tersebut adalah sebagai detoxifikasi protein sebelum dapat menyebabkan kerusakan dalam tubuh (Effendi dan Zukesti, 2003).

Secara morfologi Leukosit dibagi dua yaitu leukosit granular dan agranular. Agranulosit terdiri atas limfosit, trombosit dan monosit sedangkan granulosit terdiri atas neutrofil, eosinofil dan basofil (Bijanti, 2005).

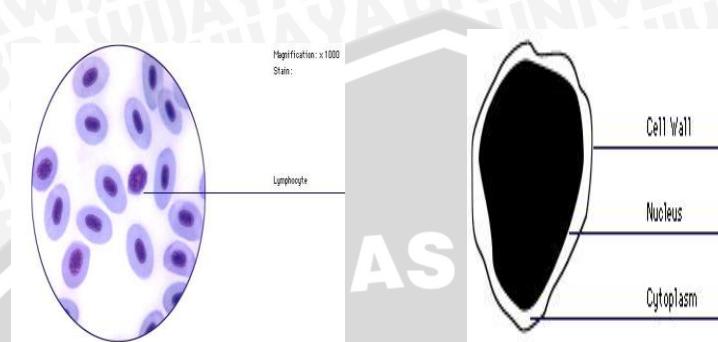
### 2.6.3 Diferensial Leukosit

Limfosit adalah leukosit berinti satu yang memiliki inti bulat atau oval dan dilindungi oleh pinggiran sitoplasma sempit berwarna biru yang mengandung sedikit granula (Gambar 6). Sitoplasma mengandung sedikit sekali organel, tetapi banyak mengandung ribosom. Ukuran limfosit berbeda-beda dari yang kecil (7 sampai 10  $\mu\text{m}$ ) sampai yang besar seukuran granulosit (Prince and wilson, 1984 dalam Maftuch, 2006).

Limfosit tidak bersifat fagositik tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit. Selain itu, suhu yang rendah dapat menurunkan kadar limfosit (Fujaya, 2004).

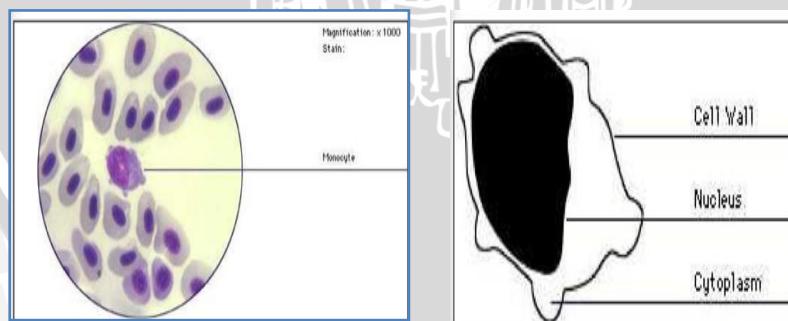
Limfosit mempunyai peranan dalam respon immunitas. Pada hewan vertebrata sel-sel ini bersirkulasi dalam darah dan cairan limpa dimana

jumlahnnya pada ikan lebih besar dibandingkan jumlahnya pada mamalia dengan kepadatan  $48.000 \text{ sel/mm}^3$  pada ikan dan pada manusia hanya  $2.000 \text{ sel/mm}^3$  (Nabib dan Pasaribu, 1989 dalam A'yunin, 2009).



Gambar 6. Limfosit (Anonymous, 2005)

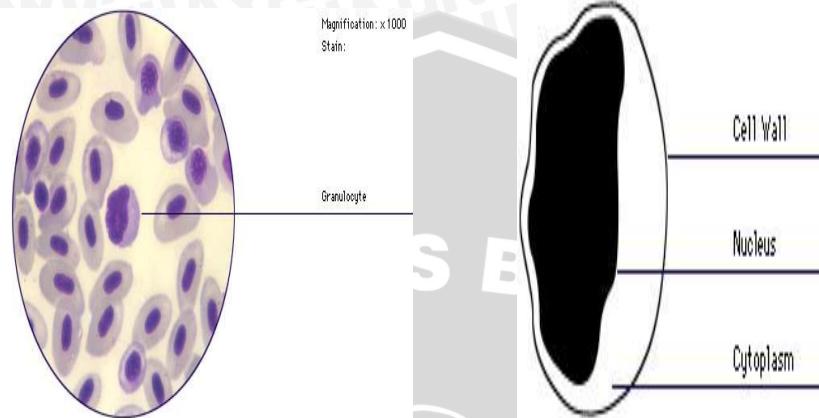
Monosit lebih kuat dibandingkan dengan neutrofil dalam memfagositosis bakteri bahkan dapat memfagositasi partikel yang lebih besar. Oleh karena itu, monosit matang disebut makrofag dan mampu memfagosit 100 bakteri (Fujaya, 2004). Monosit ikan berbentuk bulat oval, intinya terletak di tengah sel dengan sitoplasmanya tidak bergranula. Monosit meningkat karena adanya peradangan (Angka, Priosityanto Lay dan Harris, 2004). Gambar monosit disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Monosit (Anonymous, 2005)

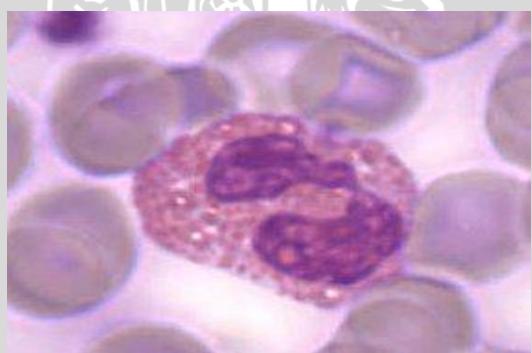
Neutrofil yaitu sel darah putih yang dapat meninggalkan pembuluh darah, mengandung *vacuola* yang berisi lisozim untuk menghancurkan organisme yang dimakannya. Fungsi utama neutrofil dalam respon imun pada mamalia adalah

fagositosis dan penghancuran benda asing (Chinabut *et al.*, 1991). Gambar monosit disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Neutrofil (Anonymous, 2005)

Eosinofil merupakan sel granular eosinofilik, secara normal berada pada berbagai macam jaringan pada ikan (Gambar 9). Sel ini berakumulasi ketika terjadi proses inflamasi, khususnya sebagai akibat infeksi parasit (Feldman *et al.*, 2000 dalam Vonti, 2008).



Gambar 9. Eusinofil (Anonymous, 2010)

### III. MATERI DAN METODELOGI PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) ukuran 9-12 cm dengan bobot 18-22 gram/ekor, bakteri *Aeromonas salmonicida*, putih telur, malem, larutan hayem, Na-Sitrat, larutan truks, metanol, aquades, larutan giemsa, kertas perkamen, TSA (*Triptic Soy Agar*), TSB (*Triptic Soy Broth*), PBS (*Phosfat Buffer Saline*) dan tisu.

##### 3.1.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah akuarium 60x30x30 cm<sup>3</sup> sebanyak 3 buah (masing-masing akuarium disekat menjadi dua bagian), ember (ukuran 15 liter) sebanyak 15 buah, aerator, petridish, tabung reaksi, jarum ose, erlenmeyer, timbangan analitik, *shaker bath*, sentrifus, vortex, *syringe*, ependorf, cover dan *objek glass*, DO meter, pH meter, thermometer, omnimixer, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, pipet tetes, pipet kapiler, kertas mikro hematokrit, pipet tahoma, *hand touly counter*, pipet leukosit, bunsen, *haemocytometer* dan mikroskop.

#### 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

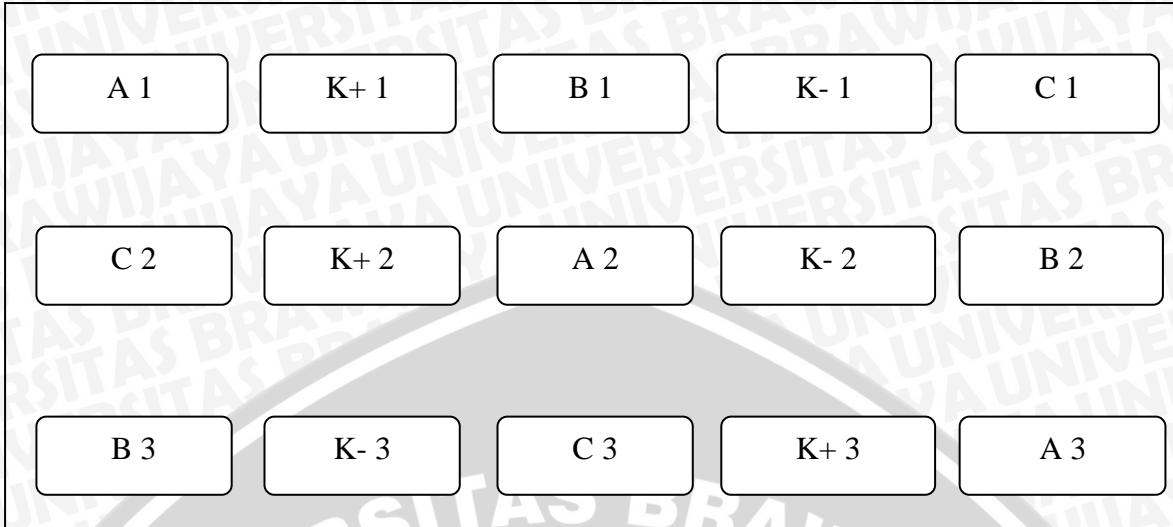
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen menurut Nazir (2005) adalah suatu bentuk kegiatan penelitian yang dilakukan oleh peneliti untuk mencari hubungan sebab-akibat (hubungan kausal) antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan mengeliminasi atau mengurangi faktor-faktor lain yang bisa mengganggu.

Eksperimen selalu dilakukan dengan maksud untuk melihat akibat dari suatu perlakuan. Metode eksperimen ini dilakukan untuk melihat bagaimana pengaruh vaksin *crude* protein pada ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) pasca uji tantang dengan bakteri *Aeromonas salmonicida*.

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Dalam penelitian ini, sebagai perlakuan adalah konsentrasi dari *crude* protein pada ikan mas pasca uji tantang dengan bakteri *Aeromonas salmonicida*. Perlakuan dalam penelitian tersebut yaitu :

- |                |   |  |
|----------------|---|--|
| Perlakuan A    | : | Pemberian <i>crude</i> protein dengan konsentrasi<br>2 mg/1 gram pakan       |
| Perlakuan B    | : | Pemberian <i>crude</i> protein dengan konsentrasi<br>4 mg/1 gram pakan       |
| Perlakuan C    | : | Pemberian <i>crude</i> protein dengan konsentrasi<br>6 mg/1 gram pakan       |
| Perlakuan (K-) | : | Perlakuan tanpa pemberian <i>crude</i> protein dan tanpa infeksi bakteri     |
| Perlakuan (K+) | : | Perlakuan tanpa pemberian <i>crude</i> protein dan dilakukan infeksi bakteri |

Dalam perlakuan ini, masing-masing perlakuan diberi ulangan sebanyak 3 kali yang ditempatkan secara acak. Denah percobaan dapat dilihat pada Gambar 10 berikut:



Gambar 10. Denah Penelitian

Keterangan :

A, B, C, K-, K+  
1, 2, 3 = Perlakuan  
= Ulangan

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Penelitian

##### 3.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses baik fisika, kimia dan mekanik yang membunuh semua makhluk hidup terutama mikroorganisme yang mengganggu atau merusak media dan proses yang sedang dikerjakan. Pemilihan cara sterilisasi tergantung pada macam bahan dan alat yang disterilkan, ketahanan terhadap panas dan bentuk bahan yang disterilkan dapat berupa padat, cair ataupun yang berbentuk gas (Waluyo, 2008).

Sterilisasi alat dan bahan dalam penelitian menggunakan autoklaf. Alat dan bahan yang akan digunakan dibungkus dengan kertas perkamen atau kertas koran kemudian diikat dengan benang. Kemudian air dituang secukupnya kedalam autoklaf, lalu alat dan bahan yang telah dibungkus dengan koran dimasukkan kedalam autoklaf. Selanjutnya autoklaf ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang. Lalu kompor dinyalakan, setelah beberapa

saat manometer akan menunjukkan 1 atm dan suhu 121°C, keadaan ini dipertahankan selama 15 menit. Untuk mengurangi tekanan, maka kompor dimatikan dan kran dibuka, ditunggu beberapa saat sampai manometer menunjukkan angka 0 (nol), lalu penutup autoklaf dibuka secara silang. Setelah itu, alat dan bahan yang sudah steril diambil, kemudian alat disimpan dalam inkubator sedangkan bahan dapat disimpan dalam lemari pendingin (Dwijoseputro, 2005).

### 3.3.1.2 Pembuatan Media

Pembuatan *Trypton Soy Agar* (TSA) menurut Ruangpan dan Kitio (1992) sebagai berikut :

1. 40 gram TSA dilarutkan dengan 1 liter aquades steril dalam erlenmeyer.
2. Erlenmeyer ditutup kapas dan kemudian didihkan hingga larut sempurna dan jernih. Larutan TSA kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
3. Media yang sudah disterilkan dituang kedalam cawan petri yang steril dalam keadaan panas sebanyak 10-12 ml. Penuangan dilakukan didekat api bunsen, selanjutnya setelah penuangan selesai, cawan petri dipanaskan lagi. Media dibiarkan dingin dan memadat.
4. Media dari lemari pendingin, apabila akan digunakan dimasukkan kembali kedalam inkubator, sehingga suhu media sama dengan suhu lingkungan dan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada media.

Pembuatan Media Cair *Tryptic Soy Borth* (TSB) menurut Ruangpan dan Kitio sebagai berikut :



1. 13 gram *Nutrien Borth* dilarutkan dengan 1 liter aquades steril dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup kapas dan kemudian didihkan hingga larut sempurna dan jernih.
2. Media cair NB dalam erlenmeyer disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Media NB yang akan dipakai, dibiarkan dingin terlebih dahulu agar bakteri yang akan diinokulasi tidak mati.
3. Media cair NB yang tidak langsung digunakan disimpan didalam lemari pendingin sehingga bertahan lama.

### **3.3.2 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.3.2.1 Pembuatan Biakan Bakteri *Aeromonas salmonicida***

Cawan petri yang berisi media TSA yang telah disterilkan disiapkan terlebih dahulu. Kemudian isolat bakteri yang diambil dari biakan *Aeromonas salmonicida* digoreskan pada masing-masing cawan petri menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipanaskan (hingga berpijar) di atas api bunsen. Setelah itu cawan petri ditutup rapat dan dipanaskan di atas bunsen pada bagian tepinya. Media yang telah terisi bakteri diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam (Maryanti, 2010).

#### **3.3.2.2 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi karena merupakan tahapan penting dalam identifikasi (Viramedika, 2008). Bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media padat. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Tahapan pewarnaan gram yaitu semprot kaca objek dengan alkohol, kemudian lap dengan tisu dan dibakar pada api bunsen untuk menghilangkan sisa alkohol. Jarum ose dibakar sampai berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin.

Biakan bakteri yang berasal dari cawan petri diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek. Selanjutnya dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api supaya tidak terlalu panas sehingga tidak merusak bentuk sel bakteri. Tambahkan setetes pewarnaan kristal violet dan diamkan selama 2 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tetesi kembali dengan lugol dan diamkan selama 1 menit. Bilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian baru dibilas dengan air mengalir. Warnai dengan safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir. Diamkan dan keringkan untuk selanjutnya dapat diamati pada mikroskop.

### 3.3.2.3 Pemotongan Pili

Hasil biakan pada media cair (BHI) ditambahkan TCA 3% (200 ml aquades+6 gr TCA) penimbangan pada cawan. Selanjutnya dirotasi selama satu jam dan setiap 10 menit dikocok. Kemudian dituang pada tabung minimixer dan diputar dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.

Untuk selanjutnya hasil endapan berupa pellet dicuci dengan PBS dan dihomogenkan. Kemudian disentrifugasi sebanyak dua kali dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit sampai supernatan bening. Selanjutnya supernatan dibuang dan didapatkan pellet. Kemudian pellet yang telah didapatkan ditambahkan larutan PBS sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam alat pemotong pili. Untuk proses selanjutnya dilakukan pemotongan pili dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 detik. Kemudian hasil cukuran tersebut disentrifugasi dingin dengan suhu 4° C dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit.

Hasil sentrifugasi berupa supernatan diambil dan dimasukkan dalam eppendorf sebagai pemotongan supernatan pili (SP) 1, lalu disimpan dalam

lemari es sedangkan hasil sentrifugasi berupa endapan ditambahkan PBS pH 7,4 dan dicukur lagi dengan omnimixer kemudian dilakukan sentrifugasi dingin. Hal ini dilakukan sampai 3 kali atau sampai supernatan kelihatan bening dan didapatkan *crude protein* murni (Berek, 2010).

### 3.3.2.4 Persiapan Wadah dan Hewan Uji

Ember digunakan untuk wadah ikan mas yang selanjutnya diberi vaksin *crude protein*. Sebelum digunakan ember dicuci menggunakan deterjen, kemudian dicuci kembali hingga bau deterjennya hilang. Kemudian wadah dijemur hingga kering. Setelah itu, dilanjutkan dengan pengisian air ke dalam wadah, bila air berasal dari PDAM maka perlu didiamkan selama 1 hari agar kaporit dalam air mengendap.

Ikan yang digunakan adalah ikan yang sehat, aktif bergerak, bentuk tubuh normal dan tidak cacat. Ikan yang didapat diaklimatisasi terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam wadah, kemudian ikan dikondisikan selama 1-2 hari agar ikan tidak stres.

## 3.4 Parameter Uji

### 3.4.1 Parameter Utama

Parameter uji yang utama dalam penelitian ini yaitu untuk melihat vaksin *crude protein Aeromonas salmonicida* ini berpengaruh dalam darah ikan mas (*Cyprinus carpio L.*). Adapun sel darah yang di uji berkaitan dengan kandungan sel darah merah, total leukosit dan diferensial leukosit.

#### 3.4.1.1 Sel Darah Merah

Sel darah merah yang akan diamati pada penelitian ini yaitu eritrosit dan hematokrit.

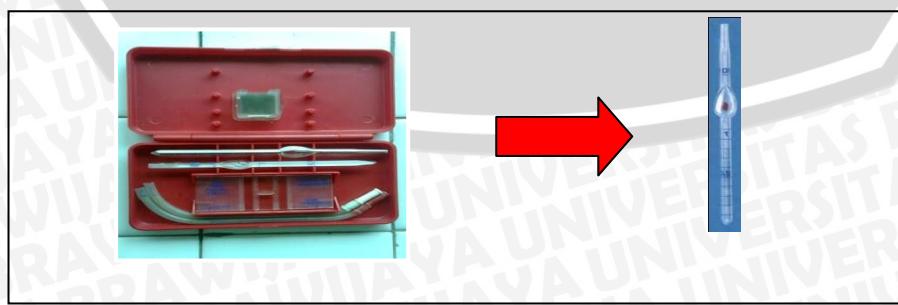


### 3.4.1.1.1 Eritrosit

Pemeriksaan total eritrosit bertujuan untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan dengan cara menghitung total eritrosit dalam darah terganggu. Anderson dan Siwicki (1993) dalam Syawal dkk (2008) menyatakan bahwa status sel darah merah dapat memberikan informasi penting menyangkut kondisi fisiologis dan menunjukkan status kesehatan ikan. Selanjutnya Wedemeyer (1997) dalam Syawal, dkk (2008) menambahkan bahwa total eritrosit yang rendah mengindikasikan bahwa ikan mengalami anemia, sedangkan total eritrosit yang terlalu tinggi mengindikasikan ikan dalam keadaan stres.

Menurut Bijanti (2005), darah yang sudah bercampur dengan anti koagulan diambil menggunakan pipet thoma eritrosit sebanyak 0,5 ml. Kemudian diencerkan dengan larutan hayem hingga mencapai 101 ml (diencerkan 200 x) dan diaduk secara perlahan. Sebelum dihitung, darah dibuang terlebih dahulu 4 tetesan pertama pada pipet dan disiapkan kamar hitung yang sudah difokuskan. Selanjutnya darah diamati dan dihitung menggunakan kamar hitung atau *haemocytometer* dan diamati pada 5 kotak yang kecil dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x dan dihitung dengan menggunakan *hand toully counter*. Alat menghitung eritrosit disajikan pada Gambar 11. Sesudah didapatkan hasil kemudian jumlah eritrosit dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah Eritrosit} = Nx \frac{1}{5 \text{ area} \times 1/250(\text{volume})} \times \text{faktorpengenceran}$$



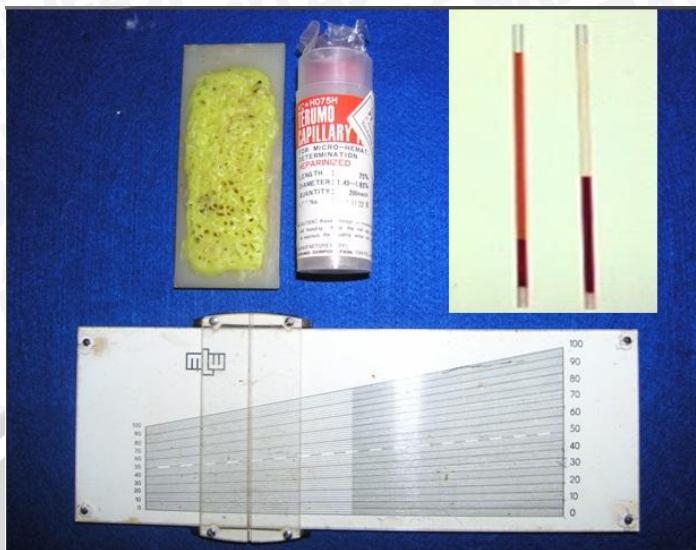
Gambar 11. Alat menghitung eritrosit ([www.sodiycxacun.web.id](http://www.sodiycxacun.web.id))

### 3.4.1.1.2 Hematokrit

Hematokrit didefinisikan sebagai perbandingan antara sel darah merah dengan seluruh volume darah. Persentase kadar hematokrit berhubungan dengan jumlah sel darah merah (Menurut Randall, 1970 *dalam* Shahrani, 2003).

Menurut Wedemeyer dan Yasutake (1977) *dalam* Syawal, dkk (2008) yang menyatakan bahwa kadar hematokrit dapat berubah-ubah tergantung pada musim, suhu dan pemberian makanan yang sehat.

Dalam Penelitian ini ikan mas diambil dari wadahnya kemudian ikan dianastesi dengan memberikan minyak cengkeh sebanyak 2-3 tetes. Setelah ikan berhasil dianastesi, langkah selanjutnya ikan diambil dan disuntikkan pada bagian punggung (*intra muscular*). Kemudian darah diambil menggunakan *syringe* sebanyak 1 ml. Kemudian darah ikan dimasukkan kedalam eppendorf dan darah diambil menggunakan pipa kapiler sampai pipa terisi  $\frac{3}{4}$  bagian. Selanjutnya darah yang ada pada pipa kapiler dihomogenkan dengan cara menggoyangkan pipa kapiler ke kiri dan ke kanan secara horizontal sambil diputar-putar. Salah satu ujung tabung ditutup dengan malem (lilin) dan pipa kapiler selanjutnya dimasukkan kedalam sentrifuge khusus yang dapat mencapai kecepatan besar yaitu lebih dari 16000 rpm (sentrifuge mikrohematokrit) sekitar 4-5 menit. Setelah dilakukan pemusingan, hasil hematokrit dapat diperoleh disesuaikan dengan diagram hematokrit. Alat menghitung hematokrit disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Alat menghitung hematokrit ([www.sodiycxacun.web.id](http://www.sodiycxacun.web.id))

### 3.4.1.2 Total Leukosit

Perhitungan jumlah leukosit dilakukan menurut metode Blaxhall dan Daislaey (1973) dalam Muhammad (2001). Untuk menghitung jumlah leukosit, digunakan pipet pencampur berskala yang berisi bulir putih sebagai pengaduk. Sampel darah dihisap hingga skala 0,5 ml kemudian diencerkan dengan larutan *Turk's* hingga skala 11 ml pada pipet. Kemudian pipet digoyangkan membentuk angka 8 selama 5 menit. Setelah darah bercampur homogen, tetesan pertama pada pipet dibuang dan tetesan berikutnya diteteskan pada *haemocytometer* yang telah ditutup dengan kaca penutup. Kemudian diamati dibawah mikroskop. Alat menhitung leukosit disajikan pada Gambar 13.

Perhitungan dilakukan pada 5 kotak kecil *haemocytometer* dengan rumus:

$$\text{Jumlah Eritrosit} = Nx \frac{1}{4 \text{ area} \times 0.1(\text{volume})} \times \text{faktorpengenceran}$$



Gambar 13. Alat menghitung leukosit ([www.sodiycxacun.web.id](http://www.sodiycxacun.web.id))

#### 3.4.1.3 Deferensial Leukosit

Satu tetes darah yang telah diberi anti koagulan heparin diambil dan diletakkan pada slide yang kering dan bersih. Dibuat hapusan darah tipis, kemudian hapusan darah tersebut dikeringkan lalu fiksasi hapusan darah dengan menggunakan metanol 95% selama 1-2 menit. Lakukan pengecatan pada hapusan darah yang telah difiksasi dengan pengecatan giemsa, ditunggu selama ± 15 menit setelah itu bilas *slide* dengan menggunakan air mengalir dan keringkan. Periksa hapusan darah di bawah mikroskop (Bijanti, 2005).

Setelah preparat hematologi dibuat, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk menentukan persentase jenis leukosit yaitu limfosit, monosit, neutrofil dan eusinofil. Perhitungan diferensial leukosit optimalnya adalah setiap 100 sel.

#### 3.4.2 Parameter Penunjang

##### 3.4.2.1 Suhu

Suhu air berubah-ubah setiap harinya dan tergantung musim. Rata-rata proses kimia bergantung suhu. Pada kondisi alami, ikan dapat tumbuh dengan

baik pada suhu berkisar  $20\text{-}28^{\circ}\text{C}$ , namun masih bisa tumbuh pada suhu mendekati  $0^{\circ}\text{C}$  (Boyd, 1982).

Pada pengukuran suhu ini, alat yang digunakan adalah thermometer. Thermometer dimasukkan kedalam media sekitar 10 cm, dimana ujung thermometer di ikat dengan tali dijadikan pegangan agar suhu thermometer tidak terkontaminasi oleh suhu tubuh. Tunggu beberapa saat sampai air raksa atau alkohol tidak bergerak lagi. Suhu dapat di baca dalam satuan  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.2.2 Derajat Keasaman (pH)

Tebbut (1992) dalam Effendie (2000) mengemukakan bahwa pH menggambarkan konsentrasi hidrogen. Toksisitas dari suatu senyawa kimia juga dipengaruhi oleh pH.

Menurut Beran (1996) dalam Tahir (2008), instrumen pH meter adalah peralatan laboratorium yang digunakan untuk menentukan pH atau tingkat keasaman dari suatu sistem larutan. Suatu zat ditentukan berdasarkan keberadaan jumlah ion hidrogen dalam larutan dan dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Pengukuran sifat keasaman dapat dilakukan menggunakan kertas laksus. Kertas laksus terdapat dua jenis, yaitu kertas laksus merah dan kertas laksus biru. Penggunaan kertas laksus hanya sekali pakai. Nilai pH yang terukur hanya bersifat pendekatan, jika suatu senyawa merubah warna kertas laksus merah menjadi biru, maka dia bersifat basa sedangkan jika suatu senyawa merubah warna kertas laksus biru menjadi merah, maka ia bersifat asam. Pengukuran hanya bersifat kualitatif, hasil yang diperoleh relatif tidak begitu akurat. Kertas laksus dengan kombinasi beberapa indikator ada yang

dapat digunakan yakni dengan pencocokan skala, kertas laksus jenis ini mengkombinasikan 4 indikator yang berbeda warna. Kombinasi warna yang berbeda diberi skala 1-14 sesuai dengan pH sistem yang diukur.

Menurut Boyd (1982) pengaruh kisaran pH terhadap ikan (Tabel 1) berikut:

Tabel 1. Pengaruh kisaran pH terhadap ikan

| Kisaran Nilai pH | Pengaruh terhadap Ikan           |
|------------------|----------------------------------|
| <4               | Titik kematian pada kondisi asam |
| 4-5              | Tidak bereproduksi               |
| 5-6,5            | Pertumbuhan lambat               |
| 6,5-9            | Sesuai untuk produksi            |
| >11              | Titik kematian pada kondisi basa |

### 3.4.2.3 Kandungan Oksigen Terlarut (DO)

Kebutuhan ikan dalam respirasi berbeda-beda, sesuai dengan tahapan hidupnya. Kandungan oksigen terlarut untuk budidaya harus lebih besar dari 2 mg/l, level 2 mg/l sebaiknya tidak terjadi untuk waktu lebih dari 8 jam (Boyd, 1982)

Pengukuran kandungan oksigen terlarut dilakukan dengan menggunakan alat DO meter. DO meter ini mula-mula di kalibrasi dengan aquades sampai menunjukkan nilai 0. Setelah itu, ujung dari DO meter dimasukkan ke dalam media hidup ikan mas, dan ditunggu beberapa saat sampai nilai DO tidak berubah lagi. Setelah itu, angka yang muncul pada DO meter sudah dapat dicatat dengan satuan mg/l.

### 3.5 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penentuan Kepadatan Bakteri untuk Uji Tantang

Penentuan kepadatan bakteri *Aeromonas salmonicida* yang digunakan untuk uji tantang ditentukan dari penelitian pendahuluan yang dilakukan selama 2 hari dengan kepadatan bakteri sebanyak  $10^6$  sel/mm<sup>3</sup>,  $10^7$  sel/mm<sup>3</sup> dan  $10^8$  sel/mm<sup>3</sup>. Pada uji tantang ini, setiap akuarium berisi 4 ekor ikan mas. Pada kepadatan  $10^6$  sel/mm<sup>3</sup> ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) tidak mengalami kematian sampai 48 jam, sedangkan pada kepadatan bakteri kepadatan  $10^7$  sel/mm<sup>3</sup> terjadi kematian ikan mas sebesar 50% pada 48 jam dan pada kepadatan bakteri  $10^8$  sel/mm<sup>3</sup> 4 ekor ikan mas mengalami kematian setelah 14 jam pengujian. Dari hasil penelitian pendahuluan ini maka diperoleh kepadatan bakteri yang akan digunakan sebesar  $10^7$  sel/ml.

### 4.2 Hasil Isolasi Crude Protein

Pada hasil biakan media cair (BHI) ditambahkan larutan TCA 3% (200 ml + 6 gr TCA). Selanjutnya dirotasi selama satu jam dan setiap 10 menit dikocok. Kemudian dituang pada tabung minimixer dan diputar dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.

Untuk selanjutnya hasil endapan berupa pellet dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dan dihomogenkan. Kemudian disentrifugasi sebanyak dua kali dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit sampai supernatan bewarna bening. Selanjutnya supernatan dibuang dan didapatkan pellet. Kemudian pellet yang telah didapatkan ditambahkan larutan PBS sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam alat pemotong pili. Untuk proses selanjutnya dilakukan pemotongan pili dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 detik. Kemudian hasil

cukuran tersebut disentrifugasi dingin dengan suhu 4°C dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit.

Hasil sentrifugasi berupa supernatan diambil dan dimasukkan dalam tabung eppendorf Supernatan Pili (SP) 1, lalu disimpan dalam lemari es sedangkan hasil sentrifugasi berupa endapan ditambahkan PBS pH 7,4 dan dicukur lagi dengan omnimixer kemudian dilakukan sentrifugasi dingin. Hal ini dilakukan sampai 3 kali atau sampai supernatan kelihatan bening dan didapatkan *crude protein* murni (Berek, 2010). Hasil vaksin *crude protein* dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Hasil vaksin *crude protein*

#### 4.3 Penentuan Dosis Vaksin *Crude Protein* untuk Uji Tantang

Penentuan konsentrasi *crude protein* yang digunakan untuk uji tantang didapatkan dari penelitian pendahuluan.

Pada dosis 2 mg/gram pakan memberikan perubahan sangat kecil terhadap sel darah ikan sedangkan pada dosis 6 mg/gram pakan menunjukkan peningkatan sel darah yang cukup besar. Oleh karena itu, pada penelitian ini dosis *crude protein* yang digunakan yaitu 2 mg/gram pakan, 4 mg/gram pakan

dan 6 mg/gram pakan. Jumlah total pemberian vaksin *crude* protein dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 4.4 Mortalitas Ikan Mas pada Perlakuan

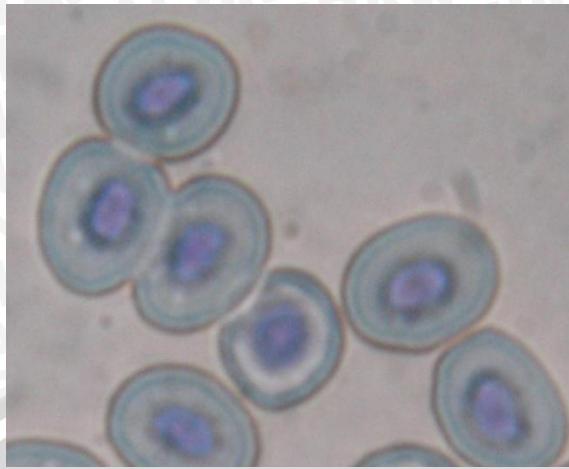
Total mortalitas ikan mas pada perlakuan setelah infeksi adalah 8 ekor yaitu pada perlakuan K(+) sebanyak 5 ekor dan A sebanyak 3 ekor. Total mortalitas tersebut merupakan akibat dari pengaruh pemberian infeksi pada tiap perlakuan. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 2.

#### 4.5 Sel Darah Merah

##### 4.5.1 Jumlah Total Eritrosit Ikan Mas (*C. carpio* L.) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida*

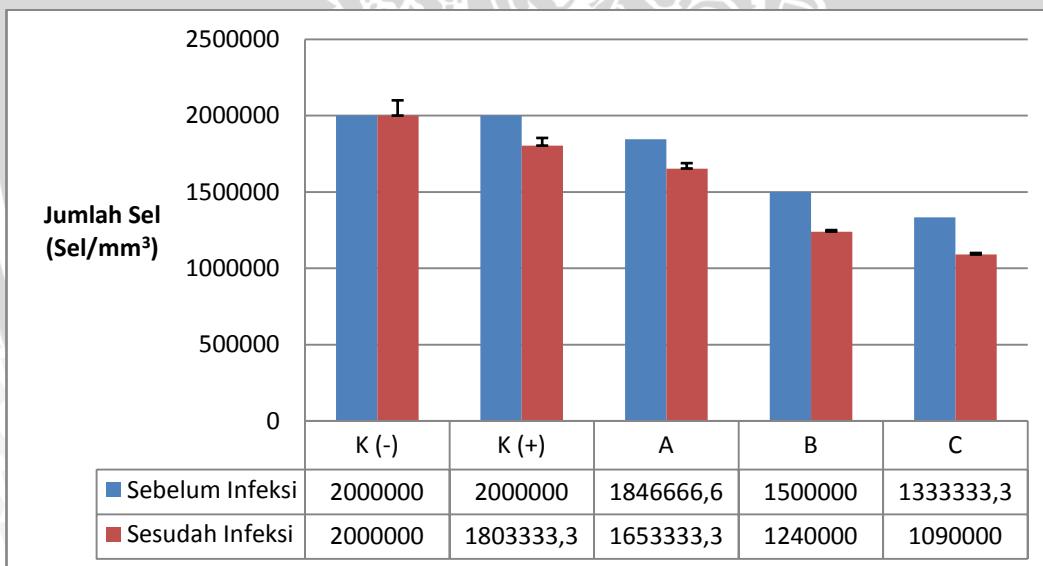
Ikan sebagaimana vertebrata lain, memiliki sel darah merah (eritrosit) berinti dengan bentuk dan ukuran bervariasi antara satu spesies dengan lainnya. Ada yang berbentuk lonjong, memiliki inti dengan ratio volume sel dan inti adalah 3,5-4,5. Jumlah sel darah merah pada masing-masing spesies juga berbeda, tergantung dari aktivitas ikan tersebut (Fujaya, 2004). Eritrosit pada ikan merupakan sel yang terbanyak jumlahnya. Bentuknya hampir sama untuk segala jenis ikan, memiliki inti seperti burung dan reptil. Eritrosit muda disebut dengan polikromatosit, ditemukan sekitar 1% dari jumlah total eritrosit, bentuknya lebih bulat dan lebih biru dengan pewarna giemsa (Gambar 15). Jumlah eritrosit tergantung spesies, status kesehatan atau suhu lingkungan, umumnya berkisar antara  $(1,0-3,0) \times 10^6/\text{mm}^3$ . Eritrosit dewasa berbentuk bulat dengan inti bulat telur dan sitoplasma merah muda (Anonymous<sup>b</sup>, 2007).





Gambar 15. Eritrosit ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x)

Rata-rata jumlah total eritrosit ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan disajikan pada beberapa perlakuan di sajikan pada Gambar 16 .



Gambar 16. Pengaruh pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 1.333.333,333 sel/ mm<sup>3</sup> sampai 2.000.000 sel/mm<sup>3</sup> dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan menjadi 1.090.000 sel/mm<sup>3</sup> sampai

2.000.000 sel/mm<sup>3</sup>. Berdasarkan data pada Gambar 16 terjadi penurunan total eritrosit. Hal ini disebabkan karena adanya perlakuan yang diberikan sehingga ikan mengalami anemia. Faktor yang mempengaruhi produksi sel darah merah adalah kebutuhan oksigen yang bervariasi pada ikan dan kondisi lingkungan. Pada ikan yang terinfeksi jumlah eritrositnya menurun disebabkan karena adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuhnya sehingga jumlah eritrositnya berkurang karena tubuh harus berusaha melawan benda asing tersebut dan sel darah yang lebih banyak diproduksi adalah sel darah putih. Menurut Prasetyo dkk (2008), kondisi perubahan perbandingan sel darah merah (eritrosit) dengan sel darah putih (leukosit) dapat diidentifikasi bahwa ikan mengalami stres dan mudah terserang penyakit. Kondisi penyimpangan tersebut dapat diketahui melalui adanya gejala terjadinya penurunan jumlah sel darah merah yang diiringi dengan terjadinya peningkatan sel darah putih. Pada ikan teleost jumlah normal eritrosit adalah  $1,05 \times 10^6$ – $3 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> (Menurut Chinabut et al., 1991; Mulyani, 2006 dalam fadhil dkk, 2009).

Berdasarkan analisa sidik ragam total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) setelah uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*, menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Analisa sidik ragam total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK                    | KT                    | Fhit      | F5%  | F1%  |
|-------------|----|-----------------------|-----------------------|-----------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | $1.754 \cdot 10^{12}$ | $4.386 \cdot 10^{11}$ | 157.013** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 27933333333           | 2793333333            |           |      |      |
| Total       | 14 | $1.782 \cdot 10^{12}$ |                       |           |      |      |

\*\* berbeda sangat nyata (*highly significant*).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude protein A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude protein A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah eritrosit ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 3.

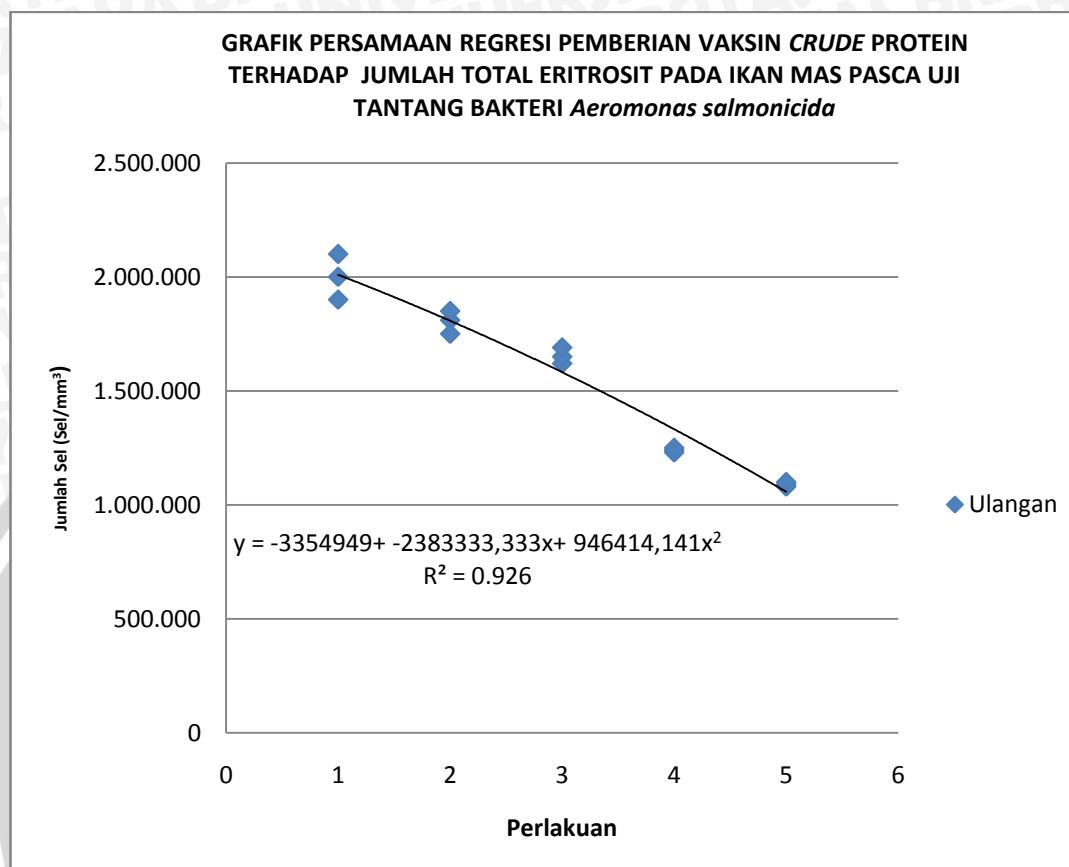
Tabel 3. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Rata-rata Perlakuan |             | C (6 mg)   | B (4 mg)   | A (2 mg)   | K (+)      | K (-)   | Notasi |
|---------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|---------|--------|
|                     |             | 1160000    | 1240000    | 1653333.33 | 1803333.33 | 2000000 |        |
| C (6 mg)            | 1160000     | 0          |            |            |            |         | a      |
| B (4 mg)            | 1240000     | 80000      | 0          |            |            |         | ab     |
| A (2 mg)            | 1653333.333 | 493333.333 | 413333.333 | 0          |            |         | b      |
| K (+)               | 1803333.333 | 643333.333 | 563333.333 | 150000     | 0          |         | c      |
| K (-)               | 2000000     | 840000     | 760000     | 346666.667 | 196666.667 | 0       | d      |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis yang terbaik yaitu pada dosis C (6 mg vaksin/gr pakan) dengan jumlah eritrosit sebesar 1.160.000 sel/mm<sup>3</sup> dan masih dalam batas normal. Menurunnya jumlah eritrosit dalam darah disebabkan karena peningkatan sel darah putih untuk melawan benda asing yang masuk.

Untuk mengetahui hubungan total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang dapat dilihat pada Gambar 17. Berikut ini adalah

gambar hubungan regresi jumlah total eritrosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.

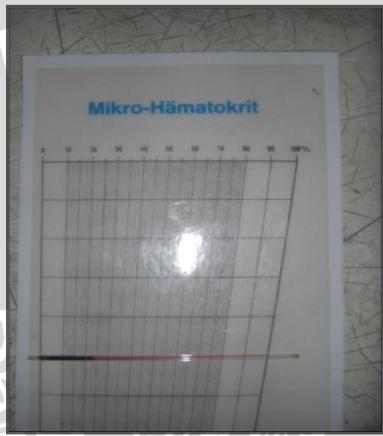


Gambar 17. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -3354949 + -2383333,333x + 946414,141x^2$  dengan nilai determinasi ( $R^2$ )= 0,926 dan korelasi ( $r$ )= 0,962. Hal ini menunjukkan bahwa 92,6% jumlah total eritrosit ditentukan variabel dalam setiap perlakuan, sedangkan 7,4% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin *crude protein* yang diberikan dengan jumlah total eritrosit pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

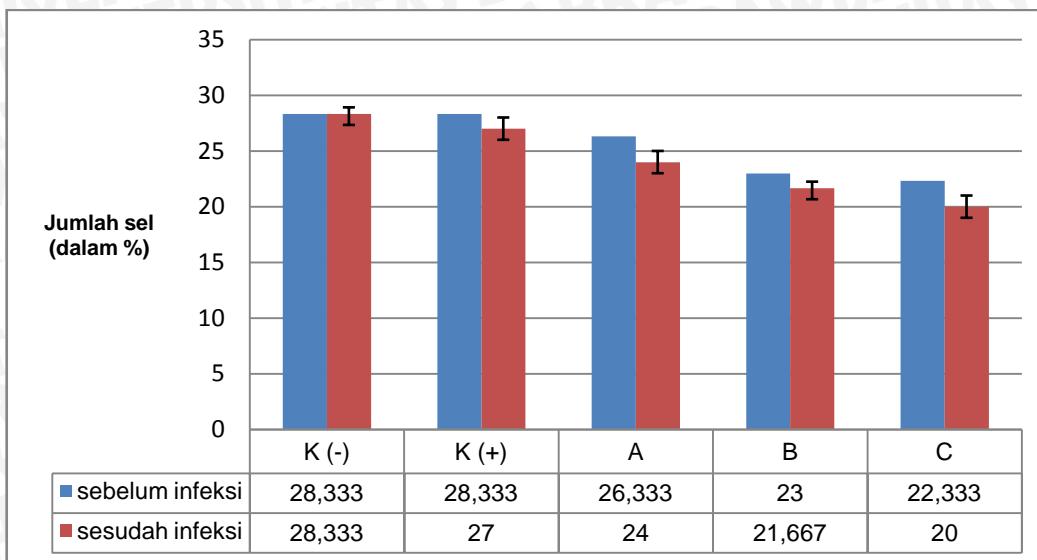
#### **4.5.2 Jumlah Total Hematokrit Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida***

Hematokrit adalah persentase bagian volume sel darah merah (eritrosit) yang mengendapkan dengan volume seluruhnya. Nilai hematokrit pada setiap ikan bervariasi tergantung dari kondisi fisiologi dan kesehatan serta aktivitas dari ikan yang diambil sampel darahnya (Bijanti, 2005). Hasil hematokrit pada saat penelitian disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Hasil hematokrit saat penelitian

Rata-rata nilai hematokrit ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Pengaruh pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio* L.) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah hematokrit pada ikan mas (*C. carpio* L.) sebelum infeksi berkisar antara 22,3% sampai 28,3% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan menjadi 20% sampai 28,3%. Adanya penurunan kadar hematokrit pada ikan uji dari setiap kali pengukuran diduga karena adanya gangguan fisiologis di dalam tubuh ikan akibat adanya perlakuan pemberian vaksin dan terinfeksi bakteri *A. salmonicida*, namun penurunannya masih dalam batas normal. Menurut Klontz (1994) dalam Johni et al., (2003), hematokrit menggambarkan proporsi besarnya jumlah sel eritrosit dalam darah ikan dan jika dikaitkan dengan jumlah sel eritrosit maka nilai hematokrit juga dapat menggambarkan kondisi sel eritrosit. Nilai hematokrit ikan *teleostei* berkisar antara 20- 30% dan untuk beberapa spesies laut bernilai sekitar 42%. Nilai hematokrit dapat menggambarkan naik dan turunnya eritrosit dan hemoglobin dalam darah. Menurunnya kadar hematokrit dapat dijadikan indikator rendahnya kandungan protein pakan, defisiensi vitamin atau ikan mendapat infeksi sedangkan meningkatnya kadar hematokrit dan eritrosit menunjukkan bahwa

ikan dalam keadaan stres. Hal ini didukung dari literatur lain yang menyebutkan bahwa nilai hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) adalah 27,1 % (Houston dan Dewilde, 1968 ; Moyle dan Cech, 1988 ; dalam Vonti, 2008).

Berdasarkan analisa sidik ragam total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*, menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Analisa sidik ragam total hematokrit pada ikan Mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK      | KT     | Fhit     | F5%  | F1%  |
|-------------|----|---------|--------|----------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 147.067 | 36.767 | 50.136** | 3.38 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 7.333   | 0.733  |          |      |      |
| Total       | 14 | 154.4   |        |          |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude protein A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude protein A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah hematokrit ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 5 .

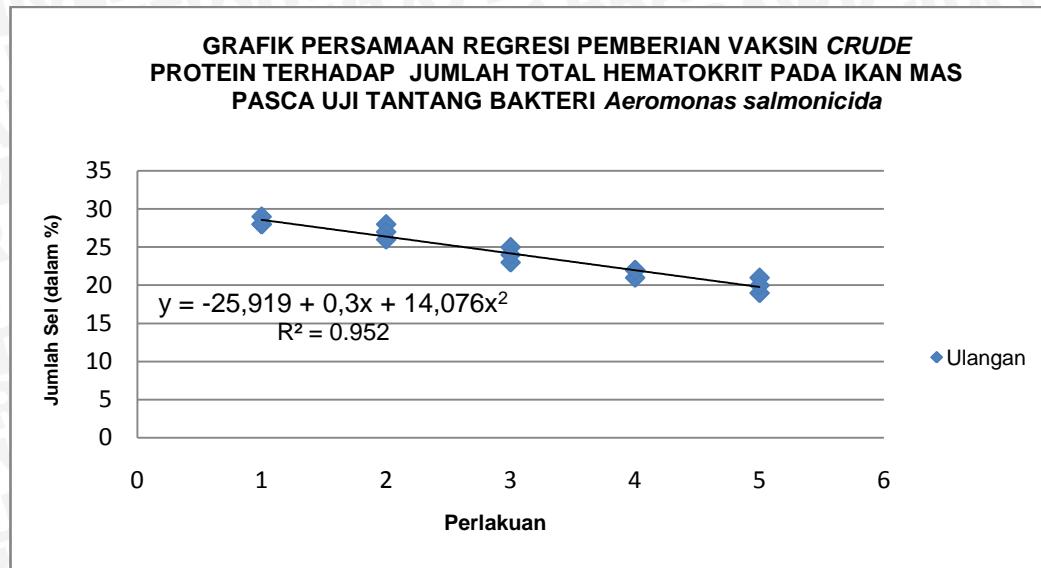


Tabel 5. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %)

| Rata-rata Perlakuan |        | C (6 mg) | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-)  | Notasi |
|---------------------|--------|----------|----------|----------|-------|--------|--------|
|                     |        | 20       | 21.667   | 24       | 27    | 28.333 |        |
| C (6 mg)            | 20     | 0        |          |          |       |        | a      |
| B (4 mg)            | 21.667 | 1.667    | 0        |          |       |        | b      |
| A (2 mg)            | 24     | 4        | 2.333    | 0        |       |        | c      |
| K (+)               | 27     | 7        | 5.333    | 3        | 0     |        | d      |
| K (-)               | 28.333 | 8.333    | 6.667    | 4.333    | 1.333 | 0      | d      |

Berdasarkan hasil uji BNT, perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan C (6mg /gr pakan) pada perlakuan C sebesar 20%. Menurunnya jumlah hematokrit diikuti dengan penurunan eritrosit dalam darah ikan karena peningkatan sel darah putih untuk melawan benda asing yang masuk. Kondisi hematokrit yang mengalami penurunan setelah uji tantang menunjukkan adanya pengaruh infeksi *A. salmonicida* terhadap kondisi menurunnya jumlah hematokrit. Wedemenyer dan Yasutake (1977) dalam Endarti (2009), menyatakan menurunnya kadar hematokrit dapat dijadikan petunjuk mengenai rendahnya kandungan protein, defisiensi vitamin atau ikan mendapatkan infeksi.

Untuk mengetahui hubungan total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 20. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total hematokrit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.



Gambar 20. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total hematokrit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -25,919 + 0,3x + 14,076x^2$  dengan nilai determinasi ( $R^2$ )= 0.952 dan Korelasi ( $r$ )= 0,976. Hal ini menunjukkan bahwa 95,2% jumlah total hematokrit ditentukan variabel dalam setiap perlakuan sedangkan 4,8% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin *crude* protein yang diberikan dengan jumlah total hematokrit pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

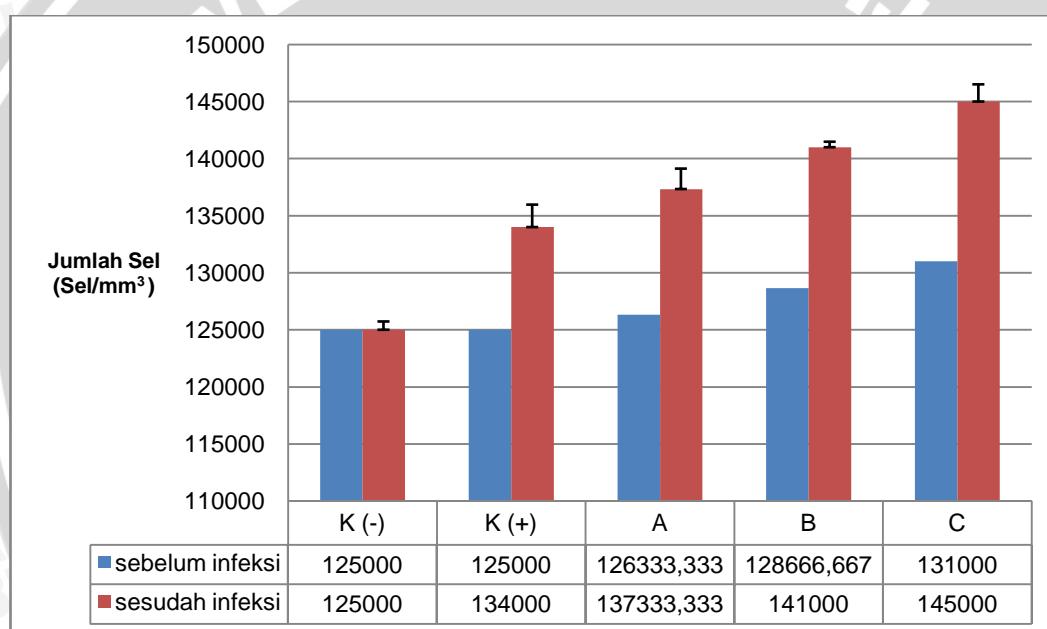
#### 4.6 Jumlah Total Leukosit Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida*

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti atau disebut juga sel darah putih. Fungsi leukosit dalam sistem tubuh sangat penting. Salah satu fungsi tersebut adalah sebagai detoxifikasi protein sebelum dapat menyebabkan kerusakan dalam tubuh (Effendi dan Zukesti, 2003).

Leukosit merupakan salah satu jenis sel darah yang mempunyai peranan sangat penting dalam sistem tanggap kebal ikan dan akan meningkat pesat apabila terjadi suatu infeksi (Tizard, 1988 dalam Endarti, 2009).

Secara morfologi leukosit dibagi dua yaitu leukosit granular dan agranular. Agranulosit terdiri atas limfosit, trombosit dan monosit sedangkan granulosit terdiri atas neutrofil, eosinofil dan basofil (Bijanti, 2005).

Rata-rata nilai leukosit ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Pengaruh pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total leukosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah leukosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 125.000 sel/mm<sup>3</sup> sampai 131.000 sel/ mm<sup>3</sup> dan setelah dilakukan infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* mengalami peningkatan jumlah leukosit menjadi 125.000 sel/ mm<sup>3</sup> sampai 145.000 sel/ mm<sup>3</sup>. Peningkatan jumlah leukosit ini dapat diindikasikan peningkatan pertahanan tubuh ikan dari serangan bakteri, virus, parasit, stres dan kualitas air yang buruk atau

pencemaran perairan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Arry (2007), bahwa peningkatan jumlah leukosit total terjadi akibat adanya respon dari tubuh ikan terhadap kondisi lingkungan pemeliharaan yang buruk, faktor stres dan infeksi penyakit.

Diagram diatas menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan C (6 mg vaksin/gram pakan), dimana perlakuan C dapat meningkatkan jumlah leukosit didalam darah ikan mas (*C. carpio*) sehingga ikan dapat menghasilkan antibodi untuk melawan serangan infeksi dari bakteri *A. salmonicida*. Leukosit berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh yang akan dikirim secara khusus ke daerah yang terinfeksi dan mengalami peradangan yang serius. Jumlah total leukosit tiap mm<sup>3</sup> darah ikan teleostei berkisar antara 20.000-150.000 butir (Moyle dan Chech, 2004).

Berdasarkan analisa sidik ragam total leukosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) setelah uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*, menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisa sidik ragam total leukosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK          | KT         | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|-------------|------------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 695066666.7 | 173766667  | 200.5** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 8666666.667 | 866666.667 |         |      |      |
| Total       | 14 | 703733333.3 |            |         |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude* protein *A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total leukosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri



*A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%.

Dengan demikian pemberian vaksin *crude* protein *A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio* L.) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah leukosit ikan mas (*C. carpio* L.) pasca uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 7.

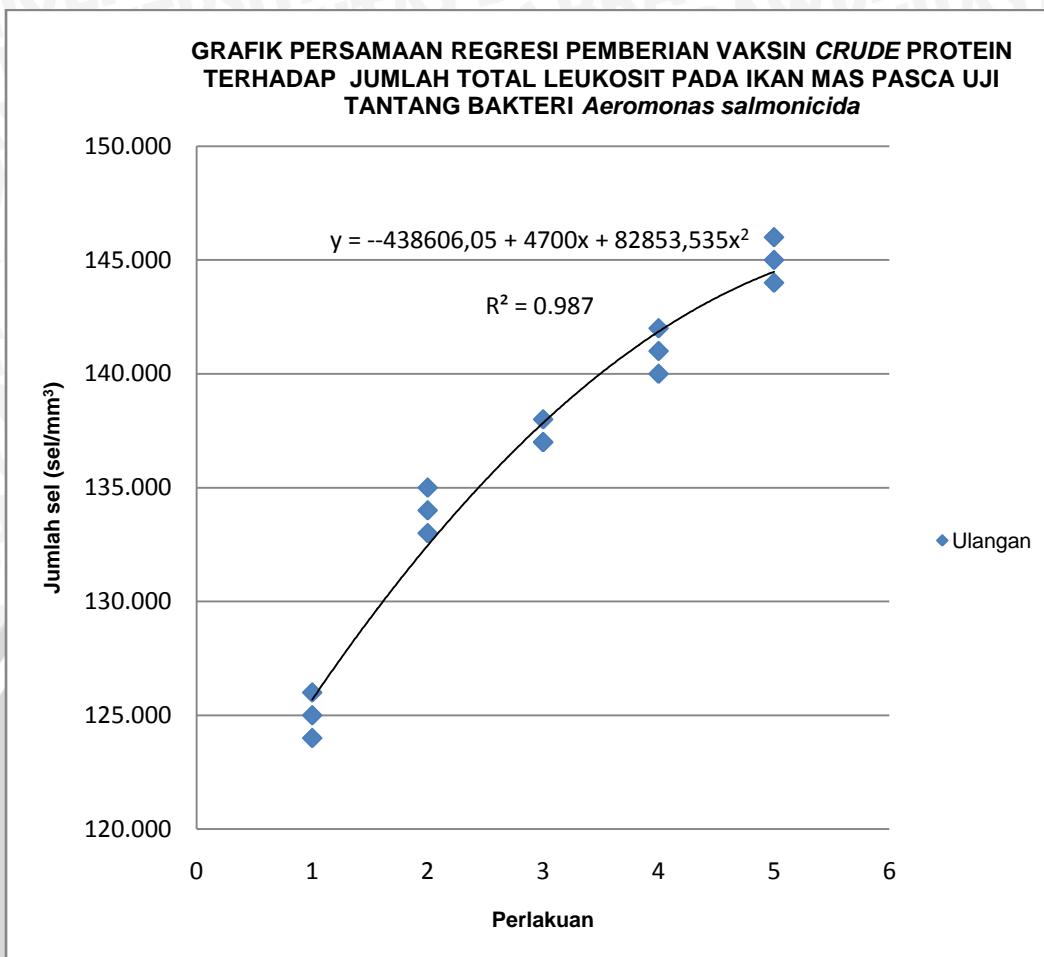
Tabel 7. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total leukosit pada ikan mas (*C. carpio* L.) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Rata-rata Perlakuan |            | K (-)     | K (+)    | A (2 mg)   | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|------------|-----------|----------|------------|----------|----------|--------|
|                     |            | 125000    | 134000   | 137333.333 | 141000   | 145000   |        |
| K (-)               | 125000     | 0         |          |            |          |          | a      |
| K (+)               | 134000     | 9000      | 0        |            |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 137333.333 | 12333.333 | 3333.333 | 0          |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 141000     | 16000     | 7000     | 3666.667   | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 145000     | 20000     | 11000    | 7666.667   | 4000     | 0        | e      |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis yang terbaik yaitu pada dosis C (6 mg vaksin/gr pakan) dengan jumlah leukosit sebesar 145.000 sel/mm<sup>3</sup> karena dapat meningkatkan jumlah leukosit dalam darah. Menurut Arry (2007), bahwa peningkatan jumlah leukosit total terjadi akibat adanya respon dari tubuh ikan terhadap kondisi lingkungan pemeliharaan yang buruk, faktor stres dan infeksi penyakit.

Untuk mengetahui hubungan total leukosit pada ikan mas (*C. carpio* L.) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 22. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total leukosit pada ikan mas (*C. carpio* L.) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.





Gambar 22. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total leukosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -438606,05 + 4700x + 82853,535x^2$  dengan nilai determinasi ( $R^2$ )= 0,987 dan korelasi ( $r$ )= 0,993. Hal ini menunjukkan bahwa 98,7% jumlah total leukosit ditentukan variabel dalam setiap perlakuan, sedangkan 1,3% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin crude protein yang diberikan dengan jumlah total leukosit pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

#### 4.7 Deferensial Leukosit

##### 4.7.1 Jumlah Total Limfosit Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *A. salmonicida*

Limfosit adalah leukosit berinti satu yang memiliki inti bulat atau oval dan dilindungi oleh pinggiran sitoplasma sempit berwarna biru yang mengandung sedikit granula (Gambar 23). Sitoplasma mengandung sedikit sekali organel, tetapi banyak mengandung ribosom. Ukuran limfosit berbeda-beda dari yang kecil (7 sampai 10  $\mu\text{m}$ ) sampai yang besar seukuran granulosit (Prince and wilson, 1984 dalam Maftuch, 2006).

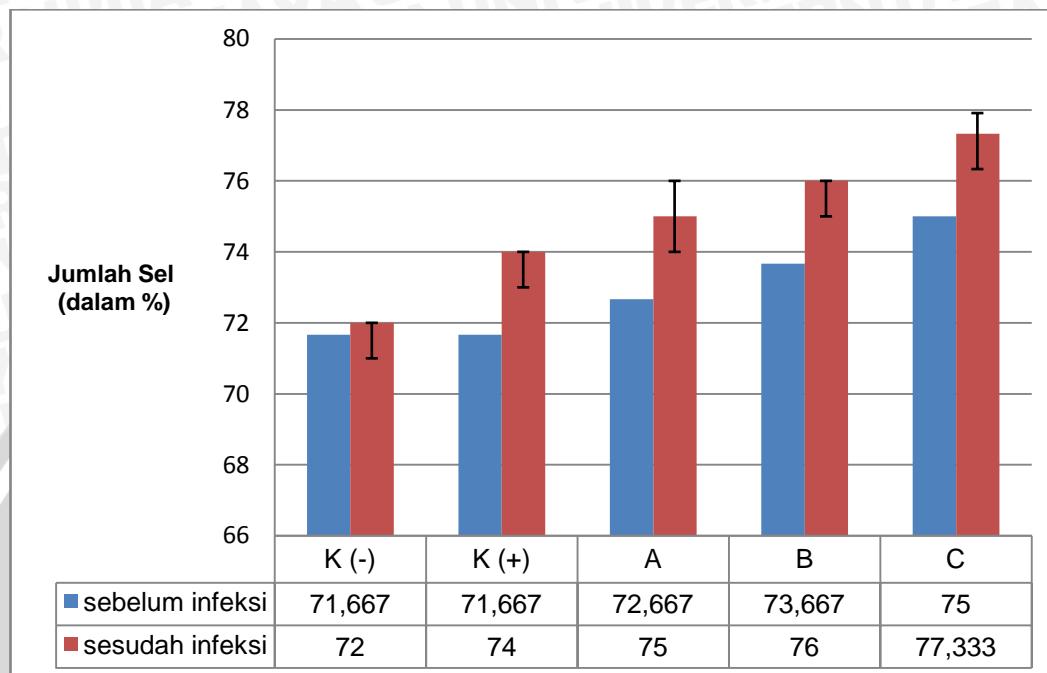
Limfosit tidak bersifat fagositik tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit. Selain itu, suhu yang rendah dapat menurunkan kadar limfosit (Fujaya, 2004).

Limfosit mempunyai peranan dalam respon immunitas. Sel-sel ini bersirkulasi dalam darah dan cairan limfa pada hewan vertebrata dimana jumlahnya pada ikan lebih besar daripada jumlahnya pada mamalia dengan kepadatan 48.000 sel/ $\text{mm}^3$  pada ikan dan pada manusia hanya 2.000 sel/ $\text{mm}^3$  (Nabib dan Pasaribu, 1989 dalam A'yunin, 2009).



Gambar 23. Limfosit ikan Mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x)

Rata-rata jumlah total limfosit ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan di sajikan pada beberapa perlakuan di sajikan pada gambar 24.



Gambar 24. Pengaruh pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 71,67% sampai 75% dan setelah dilakukan infeksi mengalami peningkatan jumlah limfosit menjadi 72% sampai 77,3%. Peningkatan limfosit terjadi karena adanya rangsangan antigen yang menyebabkan timbulnya respon imun karena limfosit berfungsi sebagai penghasil antibodi yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh terhadap penyakit (Moyle dan Cech, 2004). Limfosit mempunyai peranan dalam respon immunitas. Sel-sel ini bersirkulasi dalam darah dan cairan limfa pada hewan vertebrata dimana jumlahnya pada ikan lebih besar daripada jumlahnya pada mamalia dengan kepadatan 48.000 sel/mm<sup>3</sup> pada ikan dan pada manusia hanya 2.000 sel/mm<sup>3</sup> (Nabib dan Pasaribu, 1989 dalam A'yunin, 2009).

Diagram diatas menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan C (6 mg vaksin/gram pakan), dimana perlakuan C dapat meningkatkan jumlah limfosit dalam darah ikan mas (*C. carpio*). Persentase normal limfosit pada ikan teleostei berkisar antara 71,12-82,88% (Affandi dan Tang 2002).

Berdasarkan analisa sidik ragam, total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Analisa sidik ragam total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit | F5%  | F1%  |
|-------------|----|--------|--------|------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 49.067 | 12.267 | 46** | 5.99 | 3.48 |
| Galat       | 10 | 2.667  | 0.267  |      |      |      |
| Total       | 14 | 51.733 |        |      |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude* protein *A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude* protein *A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah limfosit ikan mas (*C. carpio L.*) setelah dilakukan uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 9.

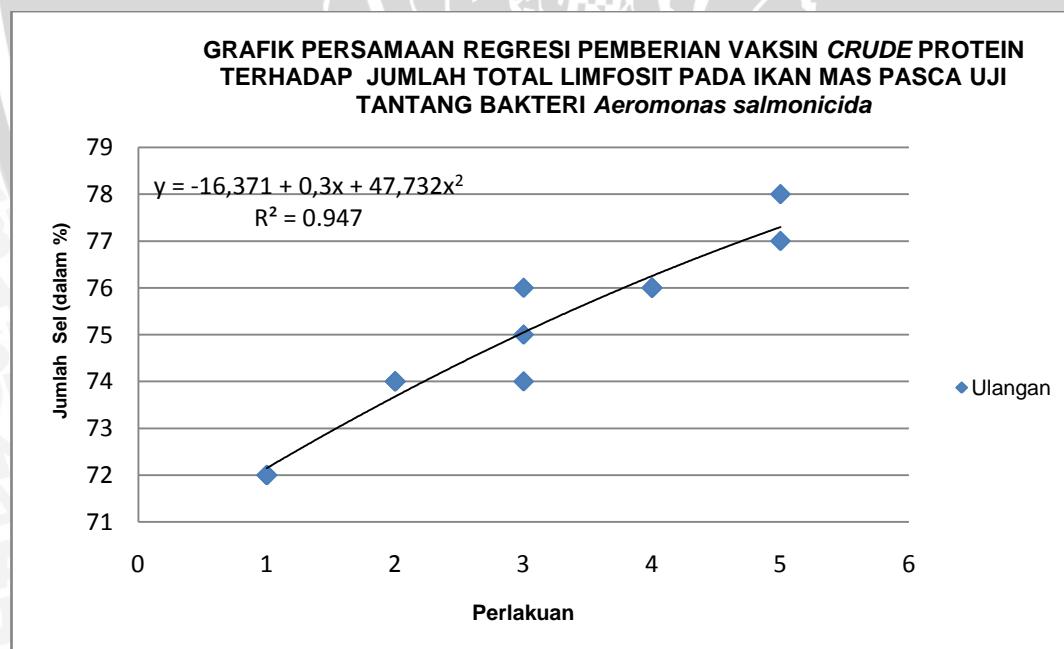


Tabel 9. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |        | K (-) | K (+) | A (2 mg) | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|--------|-------|-------|----------|----------|----------|--------|
|                     |        | 72    | 74    | 75       | 76       | 77.333   |        |
| K (-)               | 72     | 0     |       |          |          |          | a      |
| K (+)               | 77.333 | 5.333 | 0     |          |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 75     | 3     | 1     | 0        |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 76     | 4     | 2     | 1        | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 77.333 | 5.333 | 3.333 | 2.333    | 1.333    | 0        | e      |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis yang terbaik yaitu pada dosis C (6 mg vaksin/gr pakan) dengan jumlah limfosit sebesar 77,3% karena dapat meningkatkan jumlah limfosit dalam darah.

Untuk mengetahui hubungan total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 25. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total limfosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.

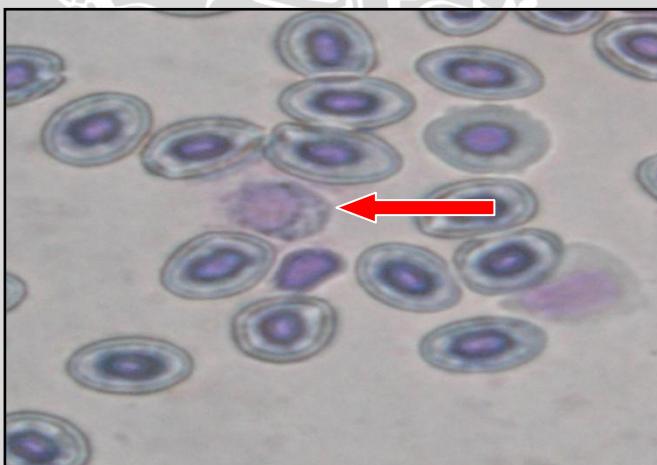


Gambar 25. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total limfosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -16,371 + 0,3x + 47,732x^2$  dengan nilai  $(R^2) = 0,947$  dan korelasi ( $r$ ) = 0,974. Hal ini menunjukkan bahwa 94,7% jumlah total limfosit ditentukan variabel dalam setiap perlakuan sedangkan 5,3% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin *crude protein* yang diberikan dengan jumlah total limfosit pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

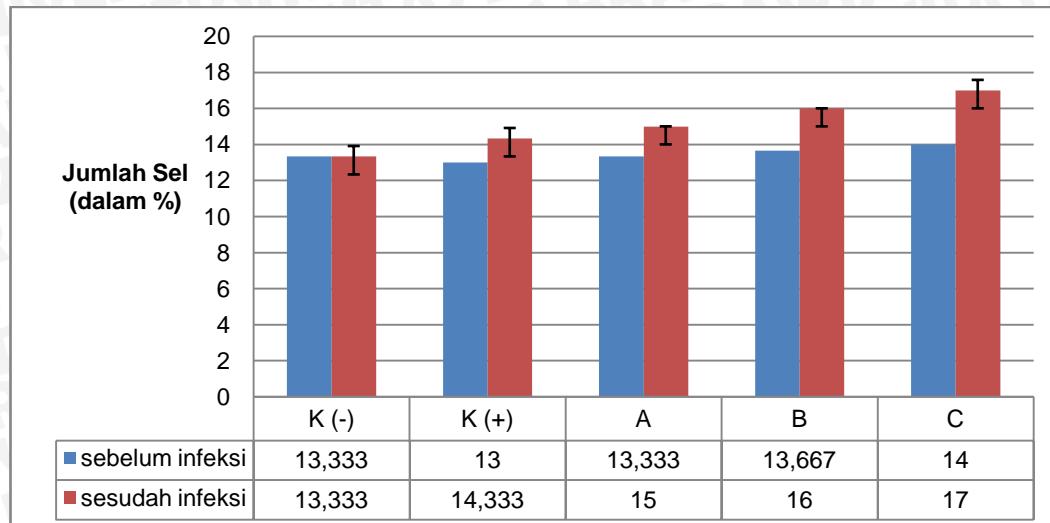
#### 4.7.2 Jumlah Total Monosit Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida*

Monosit lebih kuat dibandingkan dengan neutrofil dalam memfagositosis bakteri bahkan dapat memfagositasi partikel yang lebih besar. Karena itu, monosit matang disebut makrofag dan mampu memfagosit 100 bakteri (Fujaya, 2004). Monosit ikan berbentuk bulat oval, intinya terletak di tengah sel dengan sitoplasmanya tidak bergranula dan meningkatnya monosit karena terjadi radang. (Angka, Prioseryanto Lay dan Harris, 2004).



Gambar 26. Monosit ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x)

Rata-rata jumlah total monosit ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan di sajikan pada beberapa perlakuan di sajikan pada Gambar 27.



Gambar 27. Pengaruh pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 13% sampai 14% dan setelah dilakukan infeksi mengalami peningkatan jumlah monosit menjadi 13,3% sampai 17%. Diagram diatas menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan C (6 mg vaksin/gram pakan), dimana perlakuan C dapat meningkatkan jumlah monosit dalam darah ikan mas (*C. carpio L.*). Peningkatakan persentase monosit yang terjadi setelah uji tantang diduga disebabkan dalam tubuh ikan yang terinfeksi mendorong monosit untuk menghancurkan benda asing yang masuk. Benda asing yang dimaksud di sini adalah bakteri *A. salmonicida* yang masuk ke dalam tubuh ikan yang kemudian akan difagosit oleh monosit. Monosit diduga berfungsi sebagai makrofag dan memfagosit benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Fagosit oleh monosit merupakan proses yang sama seperti neutrofil, akan tetapi monosit ini mampu memiliki aktifitas fagositik yang tahan lama (Tizard, 1988). Persentase monosit normal yang beredar dalam darah ikan dalam penelitian yang dilakukan Salsalia (2001) adalah 13.33%.

Berdasarkan analisa sidik ragam total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) setelah uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*, menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Analisa sidik ragam total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik Keragaman | db | JK | KT  | Fhit   | F5%  | F1%  |
|-----------------|----|----|-----|--------|------|------|
| Perlakuan       | 4  | 18 | 4.5 | 22.5** | 5.99 | 3.48 |
| Galat           | 10 | 2  | 0.2 |        |      |      |
| Total           | 14 | 20 |     |        |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

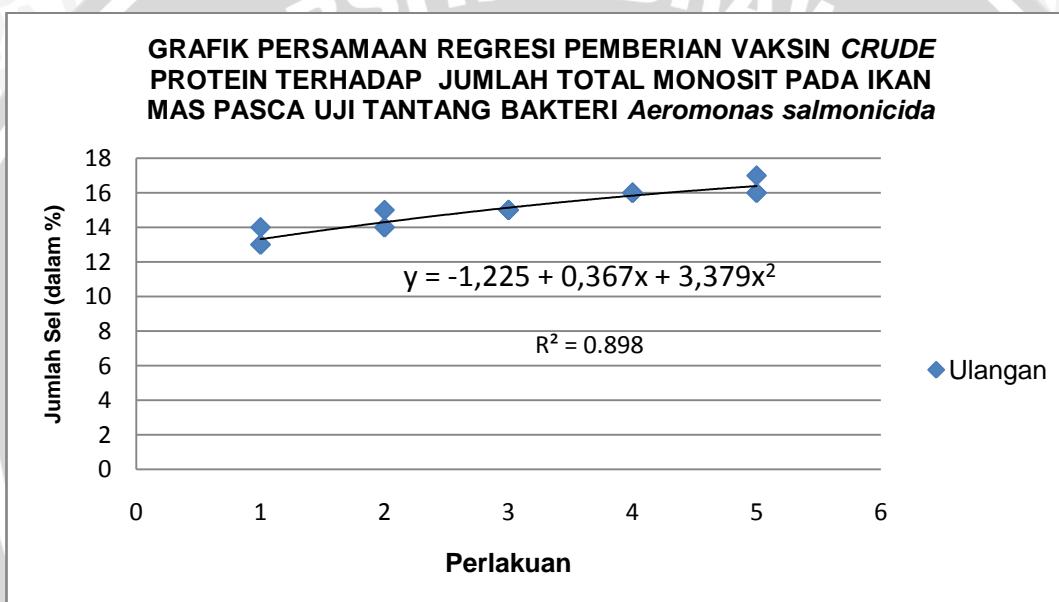
Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude protein A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude protein A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah monosit ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 11.

Tabel 11. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |        | K (-)  | K (+)  | A (2 mg) | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|--------|
|                     |        | 13.333 | 14.333 | 15       | 16       | 16.333   |        |
| K (-)               | 13.333 | 0      |        |          |          |          | a      |
| K (+)               | 14.333 | 1      | 0      |          |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 15     | 1.667  | 0.667  | 0        |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 16     | 2.667  | 1.667  | 1        | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 16.333 | 3      | 2      | 1.333    | 0.333    | 0        | d      |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis yang terbaik yaitu pada dosis C (6 mg vaksin/gram pakan) dengan jumlah monosit sebesar 16,3% karena dapat meningkatkan jumlah monosit dalam darah.

Untuk mengetahui hubungan total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 28. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total monosit pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.



Gambar 28. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total monosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -1,225 + 0,367x + 3,379x^2$  dengan nilai determinasi ( $R^2$ )= 0,898 dan korelasi ( $r$ )= 0,948. Hal ini menunjukkan bahwa 89,8% jumlah monosit ditentukan variabel dalam setiap perlakuan sedangkan 10,2% dipengaruhi variabel lain dan hubungan dosis vaksin *crude* protein yang diberikan dengan jumlah total sel monosit pada ikan mas memiliki korelasi tinggi.

#### 4.7.3 Jumlah Total Neutrofil Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida*

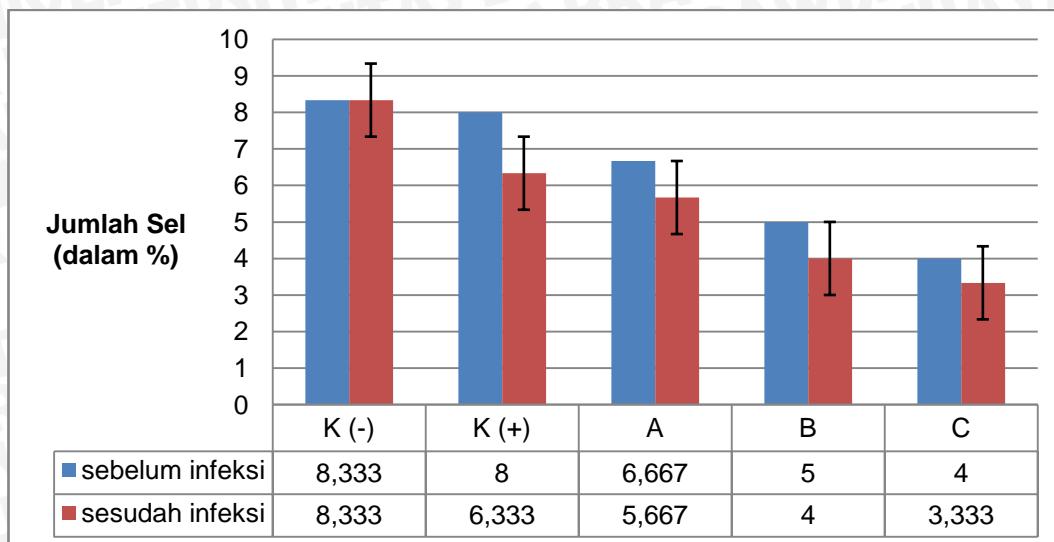
Menurut Bijanti (2005), neutrofil merupakan fagosit kuat yang dilakukan dengan cara mendekati partikel asing dan mengeluarkan pseudopodi kesegala arah sekitar partikel. Satu partikel dapat memfagosit 5-20 bakteri sebelum kemudian tidak aktif (Gambar 29).

Meningkatnya jumlah neutrofil dapat diindikasikan adanya infeksi bakteri atau dapat juga karena infeksi viral. Neutrofil menunjukkan aktifitas fagositik yaitu mampu menyerang dan membunuh bakteri, virus-virus dan agen-agen lain yang merugikan atau berbahaya yang menyerang tubuh (Vadstein, 1997 dalam hendriawan, 2009).



Gambar 29. Neutrofil ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x)

Rata-rata jumlah total neutrofil ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan di sajikan pada beberapa perlakuan disajikan pada Gambar 30.



Gambar 30. Pengaruh pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 4% sampai 8,3% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan jumlah neutrofil menjadi 3,3% sampai 8,3%. Hal ini disebabkan karena yang merespon pertama terhadap serangan bakteri adalah monosit sehingga apabila monosit naik maka sel neutrofil akan turun. Diagram diatas menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan C (6 mg vaksin/gram pakan), dimana perlakuan C dapat menekan meningkatnya jumlah neutrofil didalam darah ikan mas (*C. carpio L.*). Menurut Anderson (1974) jumlah normal neutrofil sebesar 6-8 %. Hal ini diperkuat dengan literatur lain yang menyatakan bahwa persentase monosit pada ikan mas berkisar antara 3-5% (Svobodova dan Vykusova, 1991 dalam Vonti, 2008).

Berdasarkan analisa sidik ragam total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Analisa sidik ragam total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK      | KT      | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|---------|---------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 47.0667 | 11.7667 | 17.65** | 5.99 | 3.48 |
| Galat       | 10 | 6.66667 | 0.66667 |         |      |      |
| Total       | 14 | 53.7333 |         |         |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude* protein *A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude* protein *A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah neutrofil ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 13.

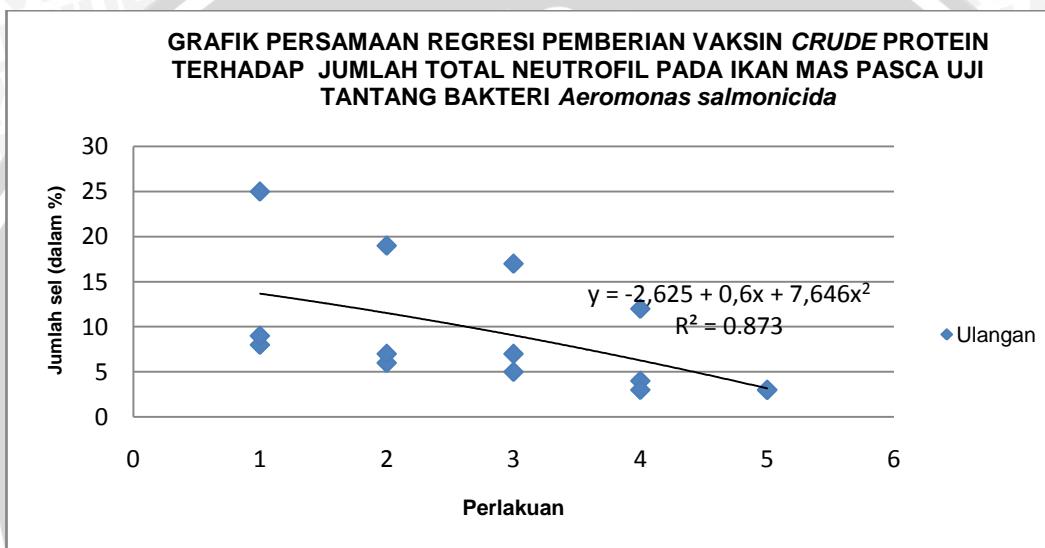
Tabel 13. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |       | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-) | Notasi |
|---------------------|-------|----------|----------|-------|-------|--------|
|                     |       | 3.333    | 4        | 5.667 | 6.333 |        |
| C (6 mg)            | 3.333 | 0        |          |       |       | a      |
| B (4 mg)            | 4     | 0.667    | 0        |       |       | a      |
| A (2 mg)            | 5.667 | 2.333    | 1.667    | 0     |       | b      |
| K (+)               | 6.333 | 3        | 2.333    | 0.667 | 0     | b      |
| K (-)               | 8.333 | 5        | 4.333    | 2.667 | 2     | c      |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis yang terbaik yaitu pada dosis C (6 mg vaksin/gr pakan) dengan jumlah neutrofil sebesar 3,3%, karena dapat menekan jumlah neutrofil didalam darah sehingga sel yang memberikan respon

pertama yaitu monosit yang memberikan respon terhadap serangan *A. salmonicida*.

Untuk mengetahui hubungan total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 31. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total neutrofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.



Gambar 31. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total neutrofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -2,625 + 0,6x + 7,646x^2$  dengan nilai determinasi ( $R^2$ )= 0,873 dan korelasi ( $r$ )= 0,934. Hal ini menunjukkan bahwa 87,3% jumlah total neutrofil ditentukan variabel dalam setiap perlakuan sedangkan 12,7% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin *crude protein* yang diberikan dengan jumlah total neutrofil pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

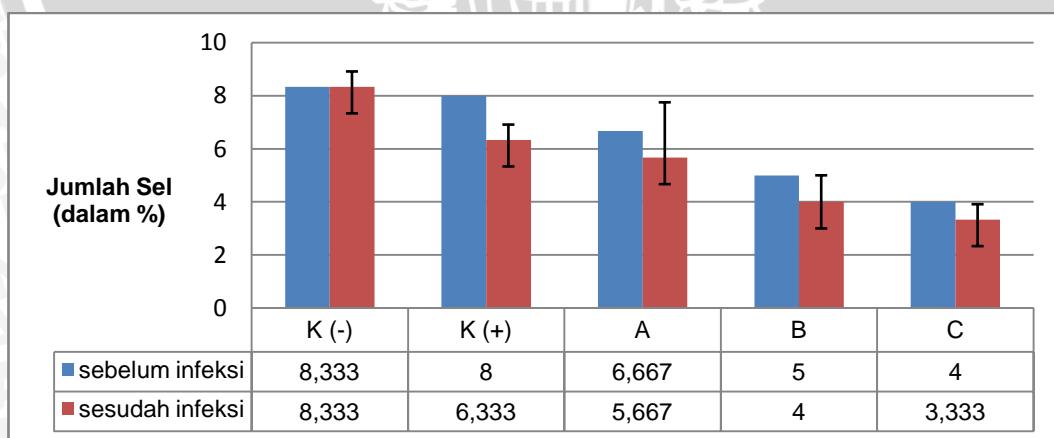
#### 4.7.4 Jumlah Total Eosinofil Ikan Mas (*C. carpio L.*) Sebelum dan Sesudah Uji Tantang Bakteri *Aeromonas salmonicida*

Eosinofil merupakan sel granular eosinofilik, secara normal berada pada berbagai macam jaringan pada ikan (Gambar 32). Sel ini berakumulasi ketika terjadi proses inflamasi, khususnya sebagai akibat infeksi parasit (Feldman et al., 2000 dalam Vonti, 2008).



Gambar 32. Eosinofil ikan mas pengamatan dengan mikroskop cahaya (Perbesaran 1000x)

Rata-rata jumlah total eosinofil ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida* pada beberapa perlakuan di sajikan pada beberapa perlakuan disajikan pada Gambar 33.



Gambar 33. Pengaruh pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Nilai rata-rata jumlah eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) sebelum infeksi berkisar antara 6,67% sampai 7,67% dan setelah dilakukan infeksi mengalami penurunan jumlah eosinofil menjadi 4% sampai 6,67%. Peningkatan dan penurunan jumlah eosinofil pada tubuh ikan lebih disebabkan adanya serangan parasit pada wadah pemeliharaan. Kemampuan inang untuk menahan serangan patogen ditentukan oleh tingkat kekebalan atau immunitas ikan. Kekebalan ditentukan oleh adanya antibodi dalam darah ikan yang dapat mewujudkan antigen yang masuk dalam tubuh. Imunisasi dirancang untuk melengkapi ikan dengan antibodi yang efektif terhadap patogen tertentu. Hal ini dapat dicapai dengan memasukkan protein patogen ke dalam tubuh ikan dalam bentuk yang aman, seperti patogen yang telah mati atau dilemahkan. Kekebalan yang dimiliki oleh ikan meliputi kekebalan non spesifik dan kekebalan spesifik, dimana keduanya dapat distimulasi dengan menggunakan berbagai bahan melalui proses vaksinasi. *Lernaeid* atau cacing jangkar adalah hama paling umum pada ikan mas dan juga pada ikan salmon serta ikan lainnya. Parasit ini terutama sangat patogen pada ikan kecil (Anshary, 2008).

Berdasarkan analisa sidik ragam total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Analisa sidik ragam total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*

| Sidik ragam | db | JK     | KT    | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|--------|-------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 27.067 | 6.767 | 5.342** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 12.667 | 1.267 |         |      |      |
| Total       | 14 | 39.733 |       |         |      |      |

\*\* : berbeda sangat nyata (*highly significant*).

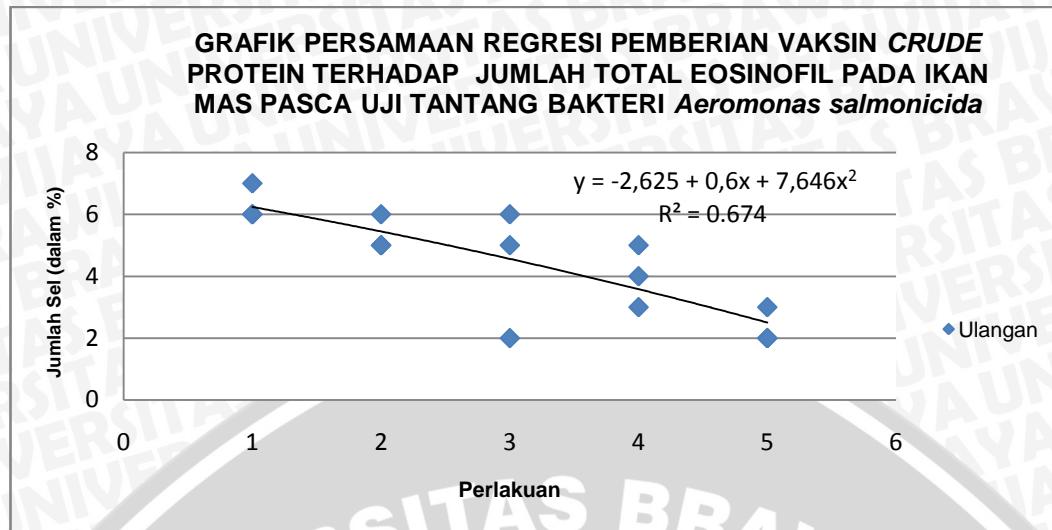
Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis *crude protein A. salmonicida* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5%. Dengan demikian pemberian vaksin *crude protein A. salmonicida* pada ikan mas (*C. carpio L.*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah eosinofil ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 15.

Tabel 15. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |       | C (6 mg) | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-) | Notasi |
|---------------------|-------|----------|----------|----------|-------|-------|--------|
|                     |       | 2.333    | 4        | 4.333    | 5.333 | 6.333 |        |
| C (6 mg)            | 2.333 | 0        |          |          |       |       | a      |
| B (4 mg)            | 4     | 1.667    | 0        |          |       |       | a      |
| A (2 mg)            | 4.333 | 2        | 0.333    | 0        |       |       | a      |
| K (+)               | 5.333 | 3        | 1.333    | 1        | 0     |       | ab     |
| K (-)               | 6.333 | 4        | 2.333    | 2        | 1     | 0     | ab     |

Berdasarkan hasil uji BNT, dosis C (6 mg vaksin/gr pakan) masih terdapat eosinofil sebesar 2,3%. Hal ini lebih disebabkan masih terdapatnya parasit pada wadah pemeliharaan ikan mas.

Untuk mengetahui hubungan total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida* digunakan persamaan regresi polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 34. Berikut ini adalah gambar hubungan regresi jumlah total eosinofil pada ikan mas (*C. carpio L.*) pasca uji tantang bakteri *A. salmonicida*.



Gambar 34. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

Berdasarkan persamaan grafik kuadratik diatas diketahui bahwa  $y = -2,625+0,6x+7,646x^2$  dengan nilai  $R^2 = 0,674$  dan korelasi ( $r$ )= 0,82. Hal ini menunjukkan bahwa 67,4% jumlah total eosinofil ditentukan variabel dalam setiap perlakuan sedangkan 32,6% dipengaruhi variabel lain. Untuk korelasi ( $r$ ) menunjukkan hubungan dosis vaksin *crude* protein yang diberikan dengan jumlah total eosinofil pada ikan mas memiliki korelasi sangat tinggi.

#### 4.8 Pengamatan Kualitas Air

Pemberian vaksin digunakan untuk mencegah terjadinya penyakit dan hal tersebut harus didukung dengan kualitas air yang baik untuk tumbuh dan berproduksi secara normal. Selama penelitian berlangsung pengukuran kualitas air yang dilakukan meliputi suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH dan Oksigen terlarut (DO) pada setiap akuarium. Faktor-faktor tersebut harus diperhatikan selama penelitian berlangsung karena air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan itu

sendiri. Data hasil pengamatan kualitas air media pemeliharaan setiap perlakuan disajikan pada lampiran 6.

Selama pengamatan berlangsung suhu air berkisar antara  $25,47 - 26,57^{\circ}\text{C}$ . Menurut Anderson (1974), menyatakan bahwa ikan-ikan yang diimunisasi pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  akan memproduksi antibodi secara baik bahkan ketika dipindahkan ke suhu  $12^{\circ}\text{C}$ . Dijelaskan juga, sel-sel fagosit akan aktif melakukan fagositosis partikel asing pada suhu  $21^{\circ}\text{C}$ , sedangkan suhu antara  $18^{\circ}-21^{\circ}\text{ C}$  partikel asing akan terikat pada permukaan sel fagosit tetapi tidak terjadi fagositosis.

pH pada setiap akuarium menunjukkan 7. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Perairan asam akan kurang produktif, malah dapat membunuh hewan budidaya. Pada pH rendah (keasaman yang tinggi) kandungan oksigen terlarut akan berkurang, sebagai akibatnya konsumsi oksigen menurun, aktivitas pernapasan naik dan selera makan ikan berkurang. Hal sebaliknya terjadi pada suasana basa. Atas dasar ini, maka usaha budidaya perairan akan berhasil dengan apabila pH 6,5-9,0 dan kisaran optimal adalah pH 7,5-8,7. (Kordi dan Tancung, 2007).

DO (*Disolved Oxygen*) hasil dari penelitian di setiap akuarium berkisar antara  $6,49-6,68\text{ ppm}$ . Menurut Andayani (2005), ikan akan mati jika kelarutan oksigen kurang dari  $0,3\text{ mg/liter}$ , konsentrasi larutan oksigen dibawah  $5,0\text{ mg/liter}$  sebagai suatu hal yang kurang baik di kolam.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang Pengaruh Pemberian *crude protein* pada Ikan Mas (*C. carpio*) Pasca Uji Tantang dengan Bakteri *A. salmonicida* yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- Berdasarkan pengamatan hematologi dan analisis regresi menunjukkan bahwa *crude protein* *A. salmonicida* merupakan bahan yang potensial untuk digunakan sebagai vaksin pada ikan mas (*C. carpio L.*), karena terbukti dapat meningkatkan sel darah putih serta diferensial leukosit yang sangat berperan dalam respon imun.
- Adapun perlakuan terbaik yang di dapat dari penelitian ini adalah pada perlakuan C (6 mg/gr pakan) karena pada leukosit dan diferensial leukosit yaitu limfosit, perlakuan C menunjukkan peningkatan yang tinggi pada saat pemberian vaksin.
- Pada hasil pengukuran suhu, pH dan DO di dapatkan nilai suhu berkisar antara 25,5-26,5°C, nilai pH 7 dan DO bekisar antara 6,4,3-6,8 mg/l. Kondisi parameter abiotik yang diukur pada wadah pemeliharaan masih dalam kisaran normal untuk pertumbuhan ikan mas.
- Perubahan total hematokrit, eritrosit, leukosit dan diferensial leukosit lebih besar disebabkan karena adanya pemberian vaksin dan infeksi bakteri.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka di sarankan :

- Perlunya dilakukan penelitian lanjutan tentang vaksin *crude protein* berdasarkan dosis yang berbeda.

- Perlunya dilakukan penelitian lanjutan tentang vaksin *crude protein* dengan teknik pemberian vaksin yang berbeda.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR PUSTAKA

- Affandi R dan Tang UM. 2002. **Fisiologi Hewan Air.** Riau: Uni press.
- Andayani, S. 2005. **Manajemen Kualitas Air untuk Budidaya Perairan.** Universitas Brawijaya Malang. Malang.
- Anderson, D.P. 1974. **Fish Immunology.** In S. F. Snieszko and H.R. Axelrod (Ed.). Diseases of Fish. TFH Publications, Hongkong. 239 p.
- Angka S. L., BP. Priosoeryanto, BW. Lay dan E. Harris. 2004. **Penyakit Motile Aeromonas Septicaemia Pada Ikan Lele Dumbo.** Forum Pascasarjana Vol. 27. Hal : 339-350
- Anonymous<sup>a</sup>, 2006. **Biosimilar dan Permasalahannya.** Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- \_\_\_\_\_<sup>b</sup>, 2007. **Penuntun Praktikum Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Ikan.** Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Anshary H, 2008. **Modul Pembelajaran Berbasis Student Center Learning (SCL) Mata Kuliah Parasitologi Ikan.** Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan. Universitas Hasanuddin
- Arry, 2007. **Pengaruh Suplementasi Zat Besi (fe) dalam Pakan Buatan terhadap Kinerja Pertumbuhan dan Imunitas Ikan Kerapu Bebek Cromileptes altivelis.** Skripsi Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- A'yunnin, Q. 2008. Skripsi : **Gambaran Hematologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*, Dilukai, Dipuaskan Dan Kontrol.** Universitas Brawijaya. Malang.
- Bellanti, J. A.1993. **Imunologi III.** Alih Bahasa; A. S. Wahab. Gadjah Mada Press. Yogyakarta
- Berek, M. 2010. **Potensi Antagonistik Protein Crude *Vibrio alginolyticus* terhadap *Vibrio harveyi* secara In Vitro.** Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang. Malang.
- Bijanti, R. 2005. **Hematologi Ikan : Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan.** Bagian Ilmu Kedokteran Hewan Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Hal 31.
- Biofagri, A. R. 2006. **Respirasi Laporan Praktikum Fisiologi Hewan.** [www.docstoc.com](http://www.docstoc.com) Diakses pada tanggal 19 Oktober 2010.
- Boyd, C. E. 1982. **Water Quality Management for Pond Fish Culture.** Deparetement of Fisheries and Allied Aquacultures, Agriculture Experiment Station, auburn University, Alabama, U.S.A

- Cahyono, B. 2004. **Budidaya Ikan Air Tawar**. Kanasius. Yogyakarta. 100 hal  
 Chinabut, S. et.al .1991. **Histology of The Walking Catfish Clarias Batrachus**.  
 IDRC. Canada.
- Cholik, F., A. G. Jagatraya, R.R. Poernomo dan A. jauzi, 2005. **Akuakultur Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa**. Masyarakat Perikanan Nusantara. Jakarta.
- Dwijoseputro. 2005. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Hal 206.  
 Effendie, H. 2000. **Telaahan Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan Perairan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Effendi dan Zukesti. 2003. **Peranan Leukosit Sebagai anti Inflamasi Alergik Dalam Tubuh**. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. USU Digital Library. 98 hal.
- Endarti, 2009. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) Sebagai Immunostimulan terhadap Hematologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias Gariepinus*) setelah Uji Tantang dengan Bakteri *Aeromonas hydrophila***. Skripsi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Fadhil, F. Darmadi, Hendrayana Cucun, 2009. **Penentuan Nilai Hematokrit Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*)**. [www.scribd.com](http://www.scribd.com). Diakses pada tanggal 18 Oktober 2010.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan. **Dasar Pengembangan Teknik Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta.
- Gusrina, 2007. **Budidaya Ikan Jilid 3**. Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan. Departemen Pendidikan Nasional.
- Hendriawan, 2009. **Pengaruh Pemberian Ekstrak *Sargassum Polycystum* sebagai Imunostimulan terhadap Gambaran Hematologi dan Aktivitas Fagositosis Ikan Patin (*Pangasius Pangasius*) Setelah Uji Tantang dengan Bakteri *Aeromonas Hydrophila***. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Irianto, A. 2005. **Patologi Ikan Teleostei**. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hal.
- Jawetz, M., and Adelberg's. 1991. **Medical Microbiology**. 19<sup>th</sup> Edition, Appleton and Lange, USA, p; 130-132.
- Johny, F., Zafran, D., Rona dan K. Mahardika, 2003. **Hematologi Beberapa Spesies Ikan Laut Budidaya**. Dalam Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Edisi Aquakultur. Badan Riset Kelautan Perikanan dan Departemen Kelautan dan Perikanan.



- Kordi, M. H. G N Tancung, AB. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan.** Rineka cipta. Jakarta.
- Kusmaryani, 2005. **Prospek Tepung Belalang Kayu (*Melanoplus Cinereus*) sebagai Alternatif Sumber Protein Hewani bagi Kesehatan Masyarakat.** Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Leminem, 2007. **Kajian Efektifitas Ciprofloxacin Terhadap Infeksi *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*).** Tesis. Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 75 hal.
- Maftuch, 2006. **Karakterisasi Protein Adhesin Omp *Vibrio Alginolyticus* dan Antibodi Hasil Induksinya serta Pengaruhnya terhadap Respon Imun Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).** Disertasi. Program Studi Ilmu Kedokteran Kekhususan Biomedik. Universitas Brawijaya, Malang.
- Maryanti, L. 2010. **Potensi Antagonistik *Extracellular Product (ECP) Vibrio alginolyticus* terhadap *Vibrio harveyi* secara *in Vitro*.** Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan. Universitas Brawijaya, Malang.
- Moyle P. B dan Cech Jr. J. J. 2004. *Fishes. An Introduction to Ichthyology.* 5th ed. USA: Prentice Hall, Inc.
- Muhammad, 2001. **Pengaruh Ammonia terhadap Gambaran Patolis Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*).** Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Muhammad, F. 2010. **Rencana Strategis Kementerian Kelautan dan Perikanan Tahun 2010–2014.** [www.dkp.go.id](http://www.dkp.go.id). Diakses pada tanggal 29 September 2010.
- Murdjani, 2002. **Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginotycus* .**Pada Ikan Kerapu Tikus. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.
- Nabib, R dan F. Pasaribu. 1989. **Patologi dan penyakit ikan.** Departemen pendidikan dan kebudayaan. Direktorat Jendral Perguruan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Nazir, 2005. **Metode Penelitian.** Ghalia Indonesia. Bogor. Hal 152. Pusat Karantina Pertanian. 1997. Determinasi Penyakit Bakterial. Jakarta.
- Prasetyo, Yanti, Purwanto, 2008. **Efektifitas Pengaruh Pemberian Ekstrak Bawang Putih untuk Pengobatanikan Lele *Clarias sp* yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*.** Diakses pada tanggal 10 Juli 2011.
- Putra, W. A., 2010. ***Aeromonas salmonicida*.** <http://whedacaine.wordpress.com>. Diakses pada tanggal 3 November 2010.



- 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.
- Salsalia, Sulanjari, Ratnawati, 2001. **Studi Hematologi Ikan Air Tawar.** Diakses pada tanggal 10 Mei 2011.
- Setiawati, M. 2004. **Kebutuhan Nutrien Pakan Peningkat Daya Tahan Tubuh Ikan dalam Akuakultur.** [www.rudyct.com](http://www.rudyct.com) Diakses Pada Tanggal 12 Juni 2010.
- Shahrani, A. R. 2003. Interaksi antara Pestida dan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor. Hal 5-6.
- Sjafei, D. S., F. Rahardjo, R. Affandi dan sulistyono. 1989. **Ikthiologi.** Fakultas Perikanan. IPB. Bogor. Hal 183.
- Soeripto, 2002. **Pendekatan Konsep Kesehatan Hewan melalui Vaksinasi.** [www.pustaka-deptan.go.id](http://www.pustaka-deptan.go.id). Diakses pada tanggal 12 Oktober 2010.
- Sugianti, B. 2005. **Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional dalam Pengendalian Penyakit Ikan.** [www.rudyct.com](http://www.rudyct.com). Diakses pada tanggal 12 Oktober 2010.
- Sumisdiyanto, 2009. **Pengaruh Immonostimulan Bakterin *Vibrio Alginolyticus* terhadap Respon Immun Selulener Udang Windu (*Peneaus monodon*) yang Dipapar Bakteri *Vibrio alginolyticus*.** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Susanto H. dan Rochdianto. 2002. **Kiat Budidaya Ikan Mas di Lahan Kritis.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Suseno, D. 2000. **Pengelolaan Usaha Pemberian Ikan Mas.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Syawal, H. Syafriadiaman, Hidayah Syauqi, 2008. **Pemberian Ekstrak Kayu Siwak (*Salvadora persica L.*) untuk Meningkatkan Kekebalan Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*) yang dipelihara dalam Keramba.** [www.unsjournals.com](http://www.unsjournals.com). Diakses pada tanggal 19 Oktober 2010.
- Tahir, I. 2008. **Arti Penting Kalibrasi pada Proses Pengukuran Analitik: Aplikasi pada Penggunaan pH meter dan Spektrofotometer uv-vis.** <http://iqmal.staff.ugm.ac.id> .Diakses pada tanggal 11 Oktober 2010.
- Tizard, 1988. **Pengantar Imunologi.** Veteriner. Airlangga University Press. 497 hal.
- Viramedika, 2008. **Membedakan Bakteri Gram Positif dan Negatif.** <http://scrib.com/doc/25146430>. Diakses pada tanggal 10 Oktober 2010.



- Vonti, O. 2008. **Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus Carpio Linn*) Strain Sinyonya yang Berasal dari Daerah Ciampela Bogor.** Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Bogor. IPB, Bogor.
- Waluyo, L. 2008. **Teknik Metode Dasar Mikrobiologi.** UPT. Penerbitan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 122.
- Widajatiningrum, L. 2007. **Penggunaan Sampel Darah Ikan Mas Koi (*Cyprinus carpio koi*) yang terinfeksi Koi Herpes Virus dalam Pengujian PCR (Polymerase Chain Reaction) dan Analisis Hematologinya.** Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



### Lampiran 1. Jumlah Total Pemberian Vaksin Crude Protein pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*)

| Perlakuan    | Akuarium | Bobot Total Ikan (mg) | Pemberian Pakan (mg) | Pemberian Pakan/14 Hari (mg) | Pemberian Vaksin/Hari (mg) | Pemberian Vaksin/14 Hari (mg) |
|--------------|----------|-----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| K (-)        | 1        | 122                   | 3.67                 | 51.24                        |                            |                               |
|              | 2        | 121.6                 | 3.65                 | 51.1                         |                            |                               |
|              | 3        | 120.9                 | 3.63                 | 50.82                        |                            |                               |
| K (+)        | 1        | 121.5                 | 3.65                 | 51.1                         |                            |                               |
|              | 2        | 120.9                 | 3.63                 | 50.82                        |                            |                               |
|              | 3        | 120.5                 | 3.62                 | 50.68                        |                            |                               |
| A (2 mg)     | 1        | 122.3                 | 3.67                 | 51.38                        | 7.34                       | 102.76                        |
|              | 2        | 120.2                 | 3.61                 | 50.54                        | 7.22                       | 101.08                        |
|              | 3        | 118                   | 3.54                 | 49.56                        | 7.08                       | 99.12                         |
| B (4 mg)     | 1        | 120.2                 | 3.61                 | 50.54                        | 14.44                      | 202.16                        |
|              | 2        | 120.4                 | 3.61                 | 50.54                        | 14.44                      | 202.16                        |
|              | 3        | 118.2                 | 3.55                 | 49.7                         | 14.2                       | 198.8                         |
| C (6 mg)     | 1        | 122                   | 3.62                 | 50.68                        | 21.72                      | 304.08                        |
|              | 2        | 121.6                 | 3.65                 | 51.1                         | 21.9                       | 306.6                         |
|              | 3        | 120.8                 | 3.62                 | 50.68                        | 21.72                      | 304.08                        |
| <b>Total</b> |          | <b>1811.1</b>         | <b>54.33</b>         | <b>760.48</b>                | <b>130.06</b>              | <b>1820.84</b>                |

- \* = Pemberian Pakan menggunakan FR 3%

Contoh Perhitungan:

Peralkuan A (2 mg) pada akuarium 1:

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Bobot Total Ikan} &= 18,8 \text{ mg} + 20,7 \text{ mg} + 19,6 \text{ mg} + 21,3 \text{ mg} + 22 \text{ mg} + 20 \\
 &\quad \text{mg} \\
 &= 122 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

$$2. \text{ Pemberian pakan per hari} = \text{FR 3\%} \times \text{Bobot total ikan}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{3}{100} \times 122 \text{ mg} \\
 &= 3,67 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

3. Pemberian pakan per 14 hari =  $3,67 \text{ mg} \times 14 \text{ hari}$

$$= 51,38 \text{ mg}$$

4. Pemberian vaksin per hari =  $3,67 \text{ mg} \times \text{dosis}$

$$= 3,67 \text{ mg} \times 2 \text{ mg/1 gr pakan}$$

$$= 7,34 \text{ mg}$$

5. Pemberian vaksin per 14 hari =  $7,34 \text{ gr} \times 14 \text{ hari}$

$$= 102,76 \text{ mg}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**Lampiran 2. Mortalitas ikan mas pasca uji tantang dengan bakteri *Aeromonas salmonicida***

| Pelakuan | Akuarium | Jumlah Ikan (ekor) | Mortalitas Ikan (ekor) | Jumlah Ikan Setelah Mortalitas (ekor) |
|----------|----------|--------------------|------------------------|---------------------------------------|
| K (-)    | 1        | 6                  | 0                      | 0                                     |
|          | 2        | 6                  | 0                      | 0                                     |
|          | 3        | 6                  | 0                      | 0                                     |
| K (+)    | 1        | 6                  | 2                      | 4                                     |
|          | 2        | 6                  | 2                      | 4                                     |
|          | 3        | 6                  | 1                      | 5                                     |
| A (2 mg) | 1        | 6                  | 1                      | 5                                     |
|          | 2        | 6                  | 0                      | 6                                     |
|          | 3        | 6                  | 2                      | 4                                     |
| B (4 mg) | 1        | 6                  | 0                      | 6                                     |
|          | 2        | 6                  | 0                      | 6                                     |
|          | 3        | 6                  | 0                      | 6                                     |
| C (6 mg) | 1        | 6                  | 0                      | 6                                     |
|          | 2        | 6                  | 0                      | 6                                     |
|          | 3        | 6                  | 0                      | 6                                     |



### Lampiran 3. Prosedur Penelitian

#### a. Pembuatan Vaksin Crude Protein



Kultur bakteri *A. salmonicida*  
pada media TSA



Pewarnaan gram  
(gram staining)



Hasil pewarnaangram  
bakteri gram negatif



Pengamatan bakteri pada  
mikroskop



Perbanyakan bakteri pada  
Media TSB



Bakteri di kultur dalam *waterbath shaker*  
pada suhu 37°C selama 24 jam

Lampiran 3 (Lanjutan)



Hasil biakan ditambahkan TCA 3%

Dirotasi selama 1 jam



Ditambahkan PBS 5 ml

Disentrifugasi (6000 rpm 15')



Pemotongan pili (6000 rpm 30 detik)

Disentrifugasi  
(12000 rpm 15')

**Lampiran 3 (Lanjutan)**

Vaksin crude protein

**b. Pencampuran dan Pemberian Pakan**

Penimbangan Pakan dan Vaksin



Pakan dan vaksin yang telah ditimbang



Pemberian pakan + vaksin

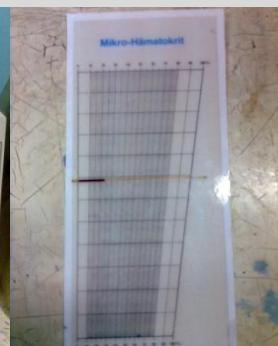


Pencampuran Pakan dengan vaksin Crude protein

**Lampiran 3 (Lanjutan)****c. Pengambilan Darah**

Pengambilan Darah

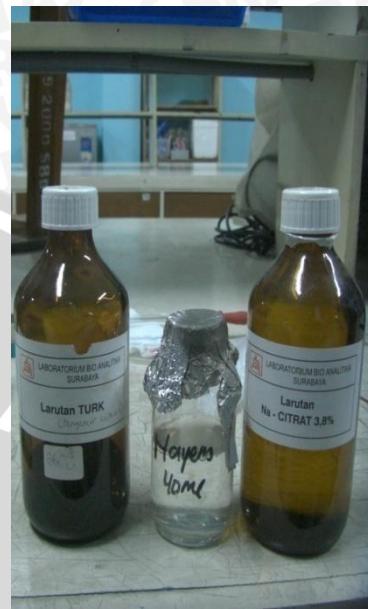
Di masukkan dalam Eppendorf

**d. Pengamatan Hematokrit**

Lampiran 3 (Lanjutan)  
e. Pengamatan Eritrosit dan leukosit



Alat yang digunakan



Bahan yang digunakan



Pengamatan dengan Mikroskop



Pengambilan Darah

Lampiran 3 (Lanjutan)  
f. Pengamatan Deferensial Leukosit



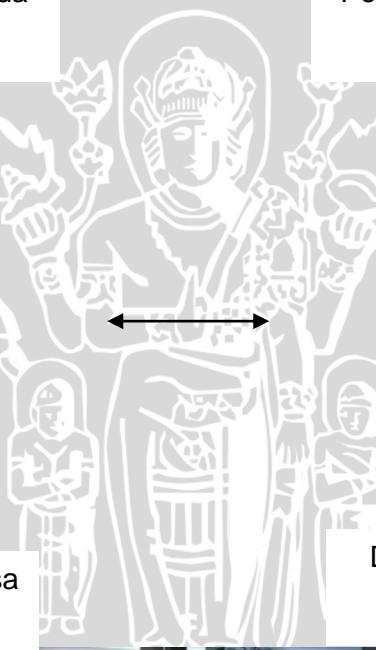
Penghapusan Darah pada object glass



Penambahan Alkohol 90%



Pewarnaan dengan Giemsa



Dibilas dengan Aquades



Pengamatan menggunakan Mikroskop



**Tabel Lampiran 4. Jumlah Diferensial Leukosit pada Ikan Mas terhadap Vaksin Crude Protein dan setelah Uji Tantang dengan Bakteri *Aeromonas salmonicida***

|       | LIMFOSIT |       |       |         | MONOSIT |       |       |         | NEUTROFIL |      |      |         | EUSINOFIL |      |      |         | JUMLAH |     |     |         |
|-------|----------|-------|-------|---------|---------|-------|-------|---------|-----------|------|------|---------|-----------|------|------|---------|--------|-----|-----|---------|
|       | 72       | 71    | 72    | 72      | 13      | 13    | 13    | 14      | 6         | 6    | 7    | 6       | 9         | 10   | 8    | 8       | 100    | 100 | 100 | 100     |
| K (-) | 71       | 71    | 71    | 72      | 13      | 14    | 13    | 13      | 6         | 6    | 6    | 6       | 10        | 9    | 10   | 9       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71       | 72    | 72    | 72      | 13      | 13    | 14    | 13      | 7         | 6    | 6    | 7       | 9         | 9    | 8    | 8       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71.33    | 71.33 | 71.67 | 72      | 13      | 13.33 | 13.33 | 13.33   | 6.33      | 6    | 6.33 | 6.33    | 9.33      | 9.33 | 8.67 | 8.33    | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71.33    | 71.33 | 71.67 | 72      | 13      | 13.33 | 13.33 | 13.33   | 6.33      | 6    | 6.33 | 6.33    | 9.33      | 9.33 | 8.67 | 8.33    | 100    | 100 | 100 | 100     |
| C     | 72       | 75    | 75    | 76      | 13      | 13    | 15    | 15      | 6         | 8    | 8    | 9       | 9         | 4    | 2    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 76    | 75    | 76      | 14      | 13    | 14    | 15      | 6         | 8    | 8    | 8       | 8         | 3    | 3    | 1       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71       | 74    | 75    | 75      | 13      | 13    | 13    | 15      | 6         | 8    | 7    | 9       | 10        | 5    | 5    | 1       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71.67    | 75    | 75    | 75.67   | 13.33   | 13    | 14    | 15      | 6         | 8    | 7.67 | 8.67    | 9         | 4    | 3.33 | 0.67    | 100    | 100 | 100 | 100     |
| B     | 71       | 75    | 74    | 76      | 13      | 14    | 14    | 13      | 6         | 8    | 8    | 11      | 10        | 3    | 4    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 75    | 74    | 77      | 13      | 14    | 14    | 13      | 7         | 7    | 8    | 10      | 8         | 4    | 4    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 74    | 73    | 78      | 13      | 14    | 14    | 12      | 7         | 8    | 8    | 10      | 8         | 4    | 5    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71.67    | 74.67 | 73.67 | 77      | 13      | 14    | 14    | 12.67   | 6.67      | 7.67 | 8    | 10.3    | 8.67      | 3.67 | 4.33 | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
| A     | 71       | 74    | 72    | 78      | 13      | 15    | 14    | 11      | 6         | 7    | 7    | 11      | 10        | 4    | 7    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 74    | 73    | 78      | 14      | 15    | 13    | 10      | 7         | 6    | 7    | 12      | 7         | 5    | 7    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 73       | 73    | 73    | 78      | 13      | 15    | 13    | 9       | 7         | 7    | 7    | 13      | 7         | 5    | 7    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 73.67 | 72.67 | 78      | 13.33   | 15    | 13.33 | 10      | 6.67      | 6.67 | 7    | 12      | 8         | 4.67 | 7    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
| K (+) | 71       | 72    | 72    | 79      | 13      | 13    | 13    | 8       | 7         | 6    | 6    | 13      | 9         | 9    | 9    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 71    | 71    | 80      | 13      | 14    | 13    | 7       | 6         | 6    | 6    | 13      | 9         | 9    | 10   | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 72       | 71    | 72    | 79      | 13      | 13    | 13    | 8       | 7         | 6    | 6    | 13      | 8         | 10   | 9    | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
|       | 71.67    | 71.33 | 71.67 | 79.33   | 13      | 13.33 | 13    | 7.667   | 6.67      | 6    | 6    | 13      | 8.67      | 9.33 | 9.33 | 0       | 100    | 100 | 100 | 100     |
| HARI  | 0        | 7     | 14    | INJEKSI | 0       | 7     | 14    | INJEKSI | 0         | 7    | 14   | INJEKSI | 0         | 7    | 14   | INJEKSI | 0      | 7   | 14  | INJEKSI |



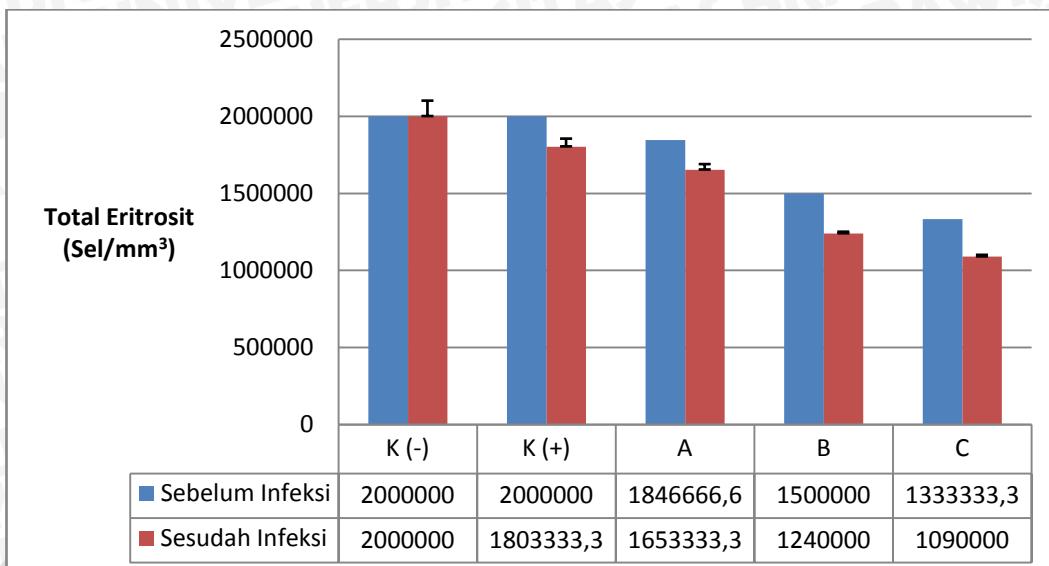
**Lampiran 5. Perhitungan jumlah total sel darah pada ikan mas sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida***

**a. Eritrosit**

Tabel. Jumlah total eritrosit sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke -   |             |             | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           |           | 0           | 7           | 14          |             |
| K ( - )   | 1         | 2000000     | 2000000     | 2000000     | 1900000     |
|           | 2         | 2000000     | 1990000     | 2000000     | 2000000     |
|           | 3         | 1980000     | 1930000     | 2000000     | 2100000     |
|           | rata-rata | 1993333.333 | 1973333.333 | 2000000     | 2000000     |
| K ( + )   | 1         | 1950000     | 2150000     | 2100000     | 1810000     |
|           | 2         | 2000000     | 2050000     | 1900000     | 1850000     |
|           | 3         | 1960000     | 1950000     | 2000000     | 1750000     |
|           | rata-rata | 1970000     | 2050000     | 2000000     | 1803333.333 |
| A (2mg)   | 1         | 2000000     | 1880000     | 1870000     | 1620000     |
|           | 2         | 1980000     | 1830000     | 1820000     | 1650000     |
|           | 3         | 1970000     | 1840000     | 1850000     | 1690000     |
|           | rata-rata | 1983333.333 | 1850000     | 1846666.667 | 1653333.333 |
| B (4 mg)  | 1         | 1950000     | 1500000     | 1490000     | 1240000     |
|           | 2         | 1980000     | 1520000     | 1510000     | 1230000     |
|           | 3         | 1990000     | 1530000     | 1500000     | 1250000     |
|           | rata-rata | 1973333.333 | 1516666.667 | 1500000     | 1240000     |
| C (6mg)   | 1         | 1920000     | 1350000     | 1320000     | 1090000     |
|           | 2         | 1980000     | 1360000     | 1350000     | 1080000     |
|           | 3         | 2000000     | 1340000     | 1330000     | 1100000     |
|           | rata-rata | 1966666.667 | 1350000     | 1333333.333 | 1090000     |

### Lampiran 5 (Lanjutan)



Gambar. Pengaruh pemberian *crude protein* terhadap jumlah total eritosit pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang dengan bakteri *A. salmonicida*

Tabel. Data perolehan jumlah eritosit pada ikan mas setelah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |         |         | Total    | Rata-Rata | SD         |
|-----------|---------|---------|---------|----------|-----------|------------|
|           | I       | II      | III     |          |           |            |
| K (-)     | 1900000 | 2000000 | 2100000 | 6000000  | 2000000   | 100000     |
| K (+)     | 1810000 | 1850000 | 1750000 | 5410000  | 1803333.3 | 50332.2296 |
| A (2)     | 1620000 | 1650000 | 1690000 | 4960000  | 1653333.3 | 35118.8458 |
| B (4)     | 1240000 | 1230000 | 1250000 | 3720000  | 1240000   | 10000      |
| C (6 mg)  | 1090000 | 1080000 | 1100000 | 3270000  | 1160000   | 10000      |
| Total     |         |         |         | 23360000 |           |            |

#### Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \bullet \quad FK &= \frac{G^2}{n} \\
 &= \frac{23360000^2}{15} \\
 &= 3,637 \cdot 10^{13}
 \end{aligned}$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

- $$\begin{aligned} \bullet \quad JK_{\text{total}} &= [(K(-1)^2 + \dots + (C3)^2] - FK \\ &= [(1900000)^2 + \dots + (1100000)^2] - 3.637 \cdot 10^{13} \\ &= 1,782 \cdot 10^{12} \end{aligned}$$

- $$\begin{aligned} \bullet \quad JK_{\text{perlakuan}} &= (\Sigma K(+))^2 + \dots + (\Sigma C)^2 / 3 - FK \\ &= \frac{21030000^2}{3} - 3.637 \cdot 10^{13} \\ &= 1,754 \cdot 10^{12} \end{aligned}$$

$$JK_{\text{acak}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}}$$

$$\begin{aligned} &= 1,782 \cdot 10^{12} - 1,754 \cdot 10^{12} \\ &= 2,793 \cdot 10^{10} \end{aligned}$$

Tabel. Sidik ragam jumlah total eritrosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK                    | KT                    | Fhit      | F5%  | F1%  |
|-------------|----|-----------------------|-----------------------|-----------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | $1.754 \cdot 10^{12}$ | $4.386 \cdot 10^{11}$ | 157.013** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 27933333333           | 27933333333           |           |      |      |
| Total       | 14 | $1.782 \cdot 10^{12}$ |                       |           |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau  $157,013 > 5.99 \rightarrow **$  atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

- $$\begin{aligned} \bullet \quad SED &= \sqrt{\frac{2 \cdot KT \text{ acak}}{n}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 27933333333}{3}} \\ &= 43153,473 \end{aligned}$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

- BNT 5% =  $T_{tabel\ 5\%} \times SED$   
 $= 2.228 \times 43153,473$   
 $= 96145,94$

- BNT 1% =  $T_{tabel\ 1\%} \times SED$   
 $= 3,169 \times 43153,473$   
 $= 136753,4$

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total eritrosit pada ikan mas

| Rata-rata Perlakuan |            | C (6 mg)   | B (4 mg)   | A (2 mg)   | K (+)      | K (-)   | Notasi |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|--------|
|                     |            | 1160000    | 1240000    | 1653333.33 | 1803333.33 | 2000000 |        |
| C (6 mg)            | 1160000    | 0          |            |            |            |         | a      |
| B (4 mg)            | 1240000    | 80000      | 0          |            |            |         | ab     |
| A (2 mg)            | 1653333.33 | 493333.333 | 413333.333 | 0          |            |         | b      |
| K (+)               | 1803333.33 | 643333.333 | 563333.333 | 150000     | 0          |         | c      |
| K (-)               | 2000000    | 840000     | 760000     | 346666.667 | 196666.667 | 0       | d      |

Kesimpulan : Urutan Perlakuan Terbaik yaitu K(-) → K(+) → A → B → C

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total eritrosit pada ikan mas

| Perlakuan                                  | Data (Ti) | Pembandin g (Ci)     |                   |                      |                   |
|--|-----------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
|  |           | Liner                | Kuadrati k        | Kubik                | Kuartik           |
| K (-)                                      | 6000000   | -2                   | 2                 | -1                   | 1                 |
| K (+)                                      | 5410000   | -1                   | -1                | 2                    | -4                |
| A (2)                                      | 4960000   | 0                    | -2                | 0                    | 6                 |
| B (4)                                      | 3720000   | 1                    | -1                | -2                   | -4                |
| C (6 mg)                                   | 3270000   | 2                    | 2                 | 1                    | 1                 |
| Q <sub>i</sub> = $\sum Ci \cdot Ti$        |           | -7150000             | -510000           | 650000               | 2510000           |
| K <sub>r</sub> = ( $\sum Ci^2$ ) $\cdot r$ |           | 30                   | 42                | 30                   | 210               |
| JK = Q <sub>2</sub> : K <sub>r</sub>       |           | $1.7 \cdot 10^{12}$  | $6.19 \cdot 10^9$ | $1.41 \cdot 10^{10}$ | $3 \cdot 10^{10}$ |
| JK Total                                   |           | $1.75 \cdot 10^{12}$ |                   |                      |                   |

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam regresi jumlah total eritrosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK                      | KT                   | Fhit     | F5%  | F1% |
|-------------|----|-------------------------|----------------------|----------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | $1.75436 \cdot 10^{12}$ |                      |          |      |     |
| linier      | 1  | $1.70408 \cdot 10^{12}$ | $1.7 \cdot 10^{12}$  | 6.101265 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 6192857143              | $6.19 \cdot 10^9$    | 0.022173 |      |     |
| kubik       | 1  | 14083333333             | $1.41 \cdot 10^{10}$ | 0.050424 |      |     |
| kuartik     | 1  | 30000476190             | $3.10^{10}$          | 0.107413 |      |     |
| acak        | 10 | $2.793 \cdot 10^{12}$   | $2.79 \cdot 10^{11}$ |          |      |     |
| total       | 14 |                         |                      |          |      |     |

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{6192857143}{6192857143 + 2.793 \cdot 10^{12}} = 0,926$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{14083333333}{14083333333 + 2.793 \cdot 10^{12}} = 0,335$$

Ternyata  $R^2$  Kuadratik (0,926) >  $R^2$  Kubik (0,335) → regresi kuadratik sesuai untuk kurva respons

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0+0+2+4+6)-2.4}{5} = 1.92$$

Tabel. Persamaan regresi kuadratik jumlah total eritrosit pada ikan mas

|                           | 0       | 0       | 2       | 4       | 6       | $\sum x_j = 12$   |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------|
| $U_j$                     | -2      | -1      | 0       | 1       | 2       | $\sum u_j = 0$    |
| $U_j^2$                   | 4       | 1       | 0       | 1       | 4       | $\sum u_j^2 = 10$ |
| $U_j^4$                   | 16      | 1       | 0       | 1       | 16      | $\sum U_j^4 = 34$ |
| $Y \cdot U_j$             | 6000000 | 5410000 | 4960000 | 3720000 | 3270000 | 23360000          |
| $U_j \cdot Y \cdot U_j$   |         |         |         |         |         | -7150000          |
| $U_j^2 \cdot Y \cdot U_j$ |         |         |         |         |         | 46210000          |

### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b'_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$-7150000 = b'_1 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b'_1 = -7150000$$

$$b'_1 = -2383333,333$$

$$\sum Y_{ij} = b'_0 \cdot n + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$23360000 = b'_0 \cdot 15 + b'_2 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 23360000 \dots 1$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b'_0 \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$46210000 = b'_0 \cdot 15 \cdot 10 + b'_2 \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 46210000 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 23360000 \quad \rightarrow \quad 150 \cdot b'_0 + 300 \cdot b'_2 = 233600000$$

$$150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 46210000 \quad 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 46210000$$

$$198 \cdot b'_2 = 187390000$$

$$b'_2 = 946414,141$$

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 23360000$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot 946414,141 = 23360000$$

$$15 \cdot b'_0 = 23360000 - 28392424,24$$

$$b'_0 = -3354949$$

$$b'_0 = -3354949$$

$$b'_1 = -2383333,333$$

$$b'_2 = 946414,14$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$y = b_0' + b_1' \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -3354949 + -2383333,333x + 946414,141x^2$$

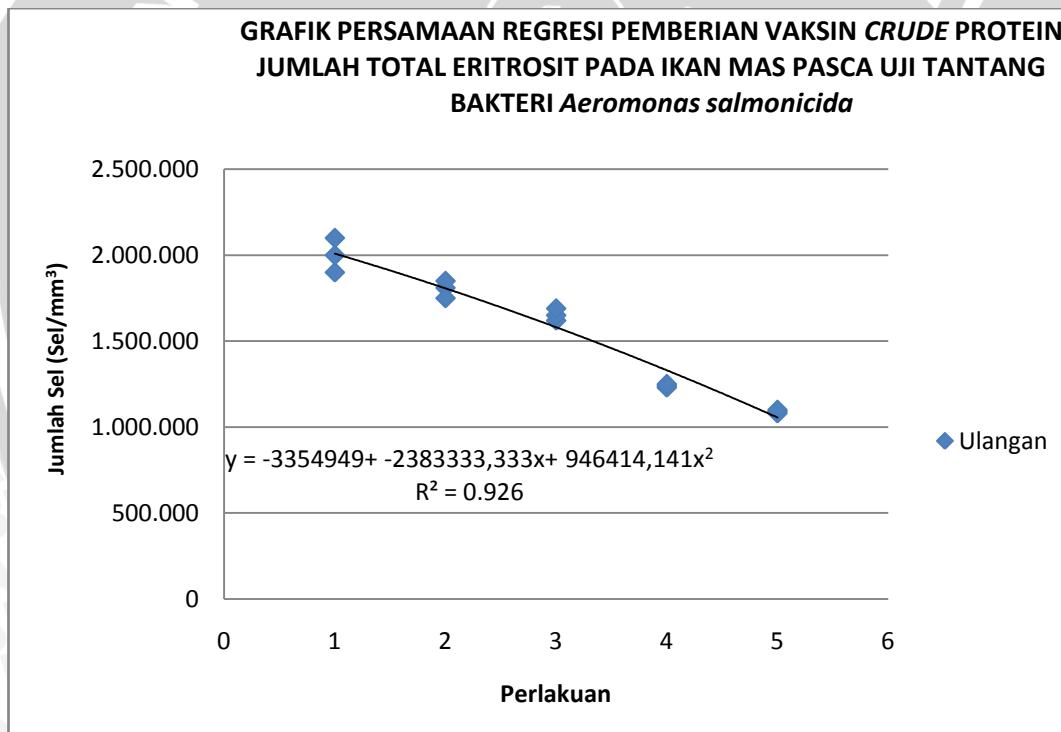
Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -3354949$

$K (+)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -3354949$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 2296576,632$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 11498313,1$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 3394717,764$



Gambar 4. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

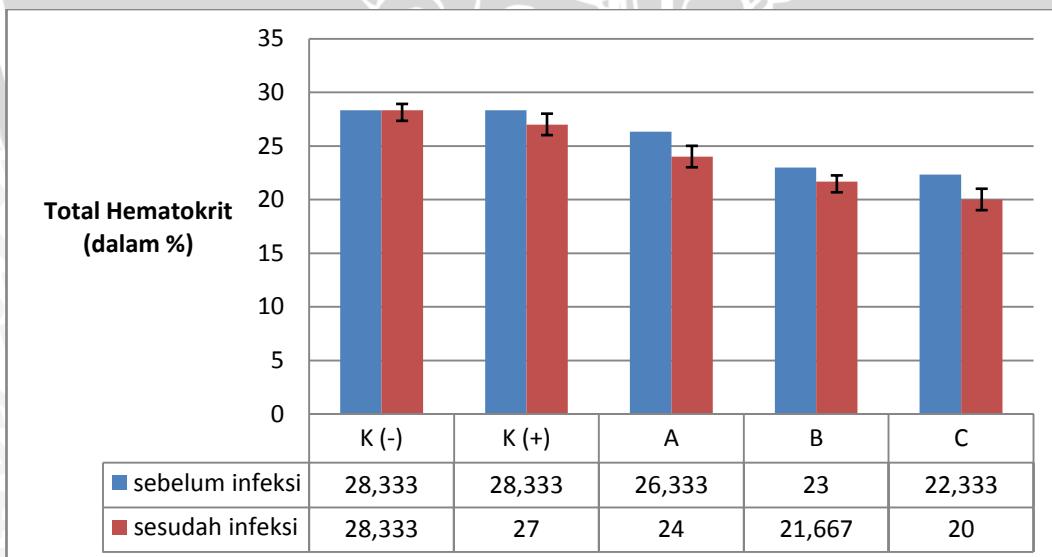


## Lampiran 5 (Lanjutan)

### b. Hematokrit

Tabel. Jumlah total hematokrit sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke -   |             |             | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           |           | 0           | 7           | 14          |             |
| K ( - )   | 1         | 28          | 27          | 29          | 28          |
|           | 2         | 28          | 29          | 28          | 29          |
|           | 3         | 28          | 28          | 28          | 28          |
|           | rata-rata | 28          | 28          | 28.33333333 | 28.33333333 |
| K ( + )   | 1         | 28          | 28          | 28          | 28          |
|           | 2         | 29          | 28          | 29          | 27          |
|           | 3         | 28          | 28          | 28          | 26          |
|           | rata-rata | 28.33333333 | 28          | 28.33333333 | 27          |
| A (2mg)   | 1         | 28          | 26          | 26          | 25          |
|           | 2         | 28          | 27          | 26          | 23          |
|           | 3         | 28          | 27          | 27          | 24          |
|           | rata-rata | 28          | 26.66666667 | 26.33333333 | 24          |
| B (4 mg)  | 1         | 29          | 23          | 24          | 21          |
|           | 2         | 28          | 23          | 23          | 22          |
|           | 3         | 28          | 23          | 22          | 22          |
|           | rata-rata | 28.33333333 | 23          | 23          | 21.66666667 |
| C (6mg)   | 1         | 28          | 23          | 22          | 21          |
|           | 2         | 28          | 23          | 22          | 19          |
|           | 3         | 29          | 22          | 23          | 20          |
|           | rata-rata | 28.33333333 | 22.66666667 | 22.33333333 | 20          |



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total hematokrit pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Data perolehan jumlah hematokrit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |    |     | Total | Rata-Rata | SD      |
|-----------|---------|----|-----|-------|-----------|---------|
|           | I       | II | III |       |           |         |
| K (-)     | 28      | 29 | 28  | 85    | 28.3333   | 0.57735 |
| K (+)     | 28      | 27 | 26  | 81    | 27        | 1       |
| A (2 mg)  | 25      | 23 | 24  | 72    | 24        | 1       |
| B (4 mg)  | 21      | 22 | 22  | 65    | 21.6667   | 0.57735 |
| C (6 mg)  | 21      | 19 | 20  | 60    | 20        | 1       |
| Total     |         |    |     | 363   |           |         |

#### Perhitungan

- $FK = \frac{G^2}{n}$   
 $= \frac{363^2}{15}$   
 $= 8784,6$
- $JK_{total} = [(K(+1)^2 + \dots + (C3)^2] - FK$   
 $= [(28)^2 + \dots + (20)^2] - 8784,6$   
 $= 154,4$
- $JK_{perlakuan} = (\Sigma K(+))^2 + \dots + (\Sigma C)^2 / 3 - FK$   
 $= \frac{330^2}{3} - 8784,6$   
 $= 147,067$
- $JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$   
 $= 154,4 - 147,06$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$= 7,333$$

Tabel. Sidik ragam jumlah total hematokrit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK      | KT     | Fhit     | F5%  | F1%  |
|-------------|----|---------|--------|----------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 147.067 | 36.767 | 50.136** | 3.38 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 7.333   | 0.733  |          |      |      |
| Total       | 14 | 154.4   |        |          |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau  $50,136 > 5.99 \rightarrow **$  atau berbeda sangat nyata (highly significant). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

$$\begin{aligned} \bullet \text{ SED} &= \sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{\mu}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 0.733}{3}} \\ &= 0,699 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bullet \text{ BNT } 5\% &= T \text{ tabel } 5\% \times \text{ SED} \\ &= 2.228 \times 0,699 \\ &= 1,557 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bullet \text{ BNT } 1\% &= T \text{ tabel } 1\% \times \text{ SED} \\ &= 3.169 \times 0,699 \\ &= 2,215 \end{aligned}$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Uji Berbeda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total hematokrit pada ikan mas (dalam %)

| Rata-rata Perlakuan |        | C (6 mg) | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-)  | Notasi |
|---------------------|--------|----------|----------|----------|-------|--------|--------|
|                     |        | 20       | 21.667   | 24       | 27    | 28.333 |        |
| C (6 mg)            | 20     | 0        |          |          |       |        | a      |
| B (4 mg)            | 21.667 | 1.667    | 0        |          |       |        | b      |
| A (2 mg)            | 24     | 4        | 2.333    | 0        |       |        | c      |
| K (+)               | 27     | 7        | 5.333    | 3        | 0     |        | d      |
| K (-)               | 28.333 | 8.333    | 6.667    | 4.333    | 1.333 | 0      | d      |

Kesimpulan : Urutan perlakuan terbaik yaitu K (-) = K (+) → A → B → C

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total hematokrit pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data<br>(Ti) | Pembanding<br>(Ci) |       |           |          |         |
|----------------------------|--------------|--------------------|-------|-----------|----------|---------|
|                            |              |                    | Liner | Kuadratik | Kubik    | Kuartik |
| K (-)                      | 85           | -2                 |       | 2         | -1       | 1       |
| K (+)                      | 81           | -1                 |       | -1        | 2        | -4      |
| A (2)                      | 72           | 0                  |       | -2        | 0        | 6       |
| B (4)                      | 65           | 1                  |       | -1        | -2       | -4      |
| C (6 mg)                   | 60           | 2                  |       | 2         | 1        | 1       |
| Q=ΣCi.Ti                   |              | -66                |       | 0         | 7        | -7      |
| Kr = (ΣCi <sup>2</sup> ).r |              | 30                 | 42    | 30        | 210      |         |
| JK= Q <sup>2</sup> : Kr    |              | 145.2              | 0     | 1.633333  | 0.233333 |         |
| JK Total                   |              | 147.0667           |       |           |          |         |

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam regresi jumlah total hematokrit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK      | KT    | Fhit    | F5%  | F1% |
|-------------|----|---------|-------|---------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 147.067 |       |         |      |     |
| linier      | 1  | 145.2   | 145.2 | 167.474 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 0       | 0     | 0       |      |     |
| kubik       | 1  | 1.633   | 1.633 | 1.883   |      |     |
| kuartik     | 1  | 0.233   | 0.233 | 0.269   |      |     |
| acak        | 10 | 7.333   | 0.733 |         |      |     |
| total       | 14 |         |       |         |      |     |

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{145.2}{145.2 + 7.333} = 0,952$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0}{0 + 7.333} = 0$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{1.633}{1.633 + 7.333} = 0,182$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.233}{0.233 + 7.333} = 0,031$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Ternyata  $R^2$  Linear (0,952) >  $R^2$  Kuadratik (0) >  $R^2$  kubik (0,182)

$R^2$  Kuartik (0,031) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

Tabel. Persamaan regresi kuadratik total hematokrit pada ikan mas

|                           | 0  | 0  | 2  | 4  | 6  | $\sum x_j = 12$   |
|---------------------------|----|----|----|----|----|-------------------|
| $U_j$                     | -2 | -1 | 0  | 1  | 2  | $\sum U_j = 0$    |
| $U_j^2$                   | 4  | 1  | 0  | 1  | 4  | $\sum U_j^2 = 10$ |
| $U_j^4$                   | 16 | 1  | 0  | 1  | 16 | $\sum U_j^4 = 34$ |
| $Y \cdot U_j$             | 85 | 81 | 72 | 65 | 60 | 355               |
| $U_j \cdot Y \cdot U_j$   |    |    |    |    |    | 9                 |
| $U_j^2 \cdot Y \cdot U_j$ |    |    |    |    |    | 763               |

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b'_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$9 = b'_1 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b'_1 = 9$$

$$b'_1 = 0,3$$

$$\sum Y_{ij} = b'_0 \cdot n + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$355 = b'_0 \cdot 15 + b'_2 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 355 \dots$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b'_0 \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$763 = b'_0 \cdot 15 \cdot 10 + b'_2 \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 763 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 355 \quad \rightarrow \quad 150 \cdot b'_0 + 300 \cdot b'_2 = 3550$$

$$150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 763 \quad 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 763$$

$$198 \cdot b'_2 = 2787$$

$$b'_2 = 14,076$$

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 355$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot 14,076 = 355$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$15. b_0' = 355 - 422,28$$

$$b_0' = -25,819$$

$$b_0' = -25,819$$

$$b_1 = 0,3$$

$$b_2' = 14,076$$

$$y = b_0' + b_1 \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -25,919 + 0,3x + 14,076x^2$$

Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -25,819$

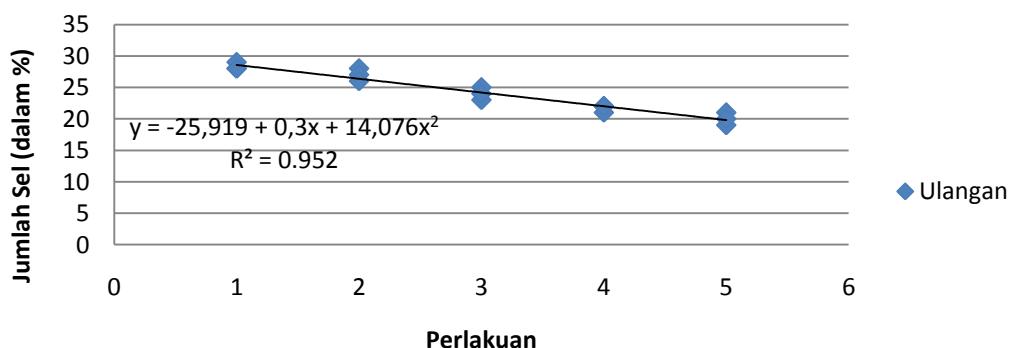
K (+) nilai  $x = 0 \rightarrow y = -25,819$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 30,985$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 200,497$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 482,617$

**GRAFIK PERSAMAAN REGRESI PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN TERHADAP JUMLAH TOTAL HEMATOKRIT PADA IKAN MAS PASCA UJI TANTANG BAKTERI *Aeromonas salmonicida***



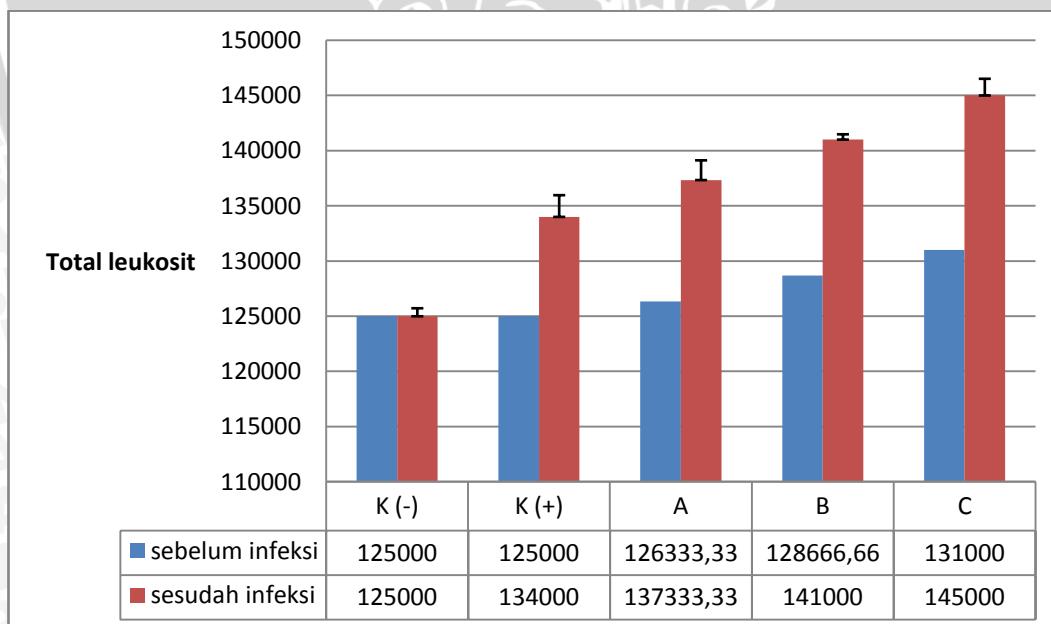
Gambar. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total hematokrit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

#### c. Leukosit

Tabel. Jumlah total leukosit sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke -   |             |             | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           |           | 0           | 7           | 14          |             |
| K ( - )   | 1         | 124000      | 125000      | 125000      | 126000      |
|           | 2         | 126000      | 125000      | 125000      | 124000      |
|           | 3         | 125000      | 123000      | 125000      | 125000      |
|           | rata-rata | 125000      | 124333.3333 | 125000      | 125000      |
| K ( + )   | 1         | 125000      | 125000      | 124000      | 134000      |
|           | 2         | 123000      | 124000      | 125000      | 135000      |
|           | 3         | 124000      | 125000      | 126000      | 133000      |
|           | rata-rata | 124000      | 124666.6667 | 125000      | 134000      |
| A (2mg)   | 1         | 124000      | 125000      | 126000      | 137000      |
|           | 2         | 126000      | 125000      | 127000      | 137000      |
|           | 3         | 125000      | 128000      | 126000      | 138000      |
|           | rata-rata | 125000      | 126000      | 126333.3333 | 137333.3333 |
| B (4 mg)  | 1         | 125000      | 129000      | 128000      | 141000      |
|           | 2         | 126000      | 127000      | 128000      | 142000      |
|           | 3         | 125000      | 127000      | 130000      | 140000      |
|           | rata-rata | 125333.3333 | 127666.6667 | 128666.6667 | 141000      |
| C (6mg)   | 1         | 123000      | 130000      | 130000      | 144000      |
|           | 2         | 126000      | 131000      | 132000      | 146000      |
|           | 3         | 124000      | 129000      | 131000      | 145000      |
|           | rata-rata | 124333.3333 | 130000      | 131000      | 145000      |



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total leukosit pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Data perolehan jumlah total leukosit pada ikan mas setelah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan |        |        | Total   | Rata-Rata | SD    |
|-----------|---------|--------|--------|---------|-----------|-------|
|           | I       | II     | III    |         |           |       |
| K (-)     | 126000  | 124000 | 125000 | 375000  | 125000    | 1000  |
| K (+)     | 134000  | 135000 | 133000 | 402000  | 134000    | 1000  |
| A (2)     | 137000  | 137000 | 138000 | 412000  | 137333.33 | 577.3 |
| B (4)     | 141000  | 142000 | 140000 | 423000  | 141000    | 1000  |
| C (6 mg)  | 144000  | 146000 | 145000 | 435000  | 145000    | 1000  |
| Total     |         |        |        | 2047000 |           |       |

Perhitungan

- $FK = \frac{G^2}{n}$   
 $= \frac{2047000^2}{15}$   
 $= 2,793 \cdot 10^{11}$
- $JK_{total} = [(K(-)1)^2 + \dots + (C3)^2] - FK$   
 $= [(126000)^2 + \dots + (145000)^2] - 2,793 \cdot 10^{11}$   
 $= 703733333.3$
- $JK_{perlakuan} = (\sum K(+))^2 + \dots + (\sum C)^2 / 3 - FK$   
 $= \frac{2049000^2}{3} - 2,793 \cdot 10^{11}$   
 $= 695066666.7$
- $JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$   
 $= 703733333.3 - 695066666.7$   
 $= 8666666.667$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total leukosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK           | KT         | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|--------------|------------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 6950666666.7 | 173766667  | 200.5** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 8666666.667  | 866666.667 |         |      |      |
| Total       | 14 | 703733333.3  |            |         |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau 200.5 > 5.99 → \*\* atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

- SED 
$$\begin{aligned} &= \sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{\mu}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 866666.667}{3}} \\ &= 760,117 \end{aligned}$$
- BNT 5% 
$$\begin{aligned} &= T \text{ tabel } 5\% \times \text{SED} \\ &= 2.228 \times 760,117 \\ &= 31693,541 \end{aligned}$$
- BNT 1% 
$$\begin{aligned} &= T \text{ tabel } 1\% \times \text{SED} \\ &= 3.169 \times 13760,117 \\ &= 2408,811 \end{aligned}$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total leukosit pada ikan mas

| Rata-rata Perlakuan |            | K (-)     | K (+)    | A (2 mg)   | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|------------|-----------|----------|------------|----------|----------|--------|
|                     |            | 125000    | 134000   | 137333.333 | 141000   | 145000   |        |
| K (-)               | 125000     | 0         |          |            |          |          | a      |
| K (+)               | 134000     | 9000      | 0        |            |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 137333.333 | 12333.333 | 3333.333 | 0          |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 141000     | 16000     | 7000     | 3666.667   | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 145000     | 20000     | 11000    | 7666.667   | 4000     | 0        | e      |

Kesimpulan : Urutan Perlakuan Terbaik yaitu C → B → A → K (+) → K(-)

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah leukosit pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data (Ti) | Pembanding (Ci) |             |           |            |         |
|----------------------------|-----------|-----------------|-------------|-----------|------------|---------|
|                            |           |                 | Liner       | Kuadratik | Kubik      | Kuartik |
| K (-)                      | 375000    | -2              |             | 2         | -1         | 1       |
| K (+)                      | 402000    | -1              |             | -1        | 2          | -4      |
| A (2)                      | 412000    | 0               |             | -2        | 0          | 6       |
| B (4)                      | 423000    | 1               |             | -1        | -2         | -4      |
| C (6 mg)                   | 435000    | 2               |             | 2         | 1          | 1       |
| $Q = \sum Ci \cdot Ti$     |           | 141000          |             | -29000    | 18000      | -18000  |
| $Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$ |           | 30              |             | 42        | 30         | 210     |
| $JK = Q^2 : Kr$            |           | 662700000       | 20023809.52 | 10800000  | 1542857.14 |         |
| JK Total                   |           | 695066666.7     |             |           |            |         |

Tabel. Sidik ragam regresi Jumlah total leukosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK          | KT          | Fhit    | F5%  | F1% |
|-------------|----|-------------|-------------|---------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 695066666.7 |             |         |      |     |
| linier      | 1  | 662700000   | 662700000   | 764.654 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 20023809.52 | 20023809.52 | 23.104  |      |     |
| kubik       | 1  | 10800000    | 10800000    | 12.462  |      |     |
| kuartik     | 1  | 1542857.143 | 1542857.143 | 1.780   |      |     |
| acak        | 10 | 8666666.667 | 866666.6667 |         |      |     |
| total       | 14 |             |             |         |      |     |



### Lampiran 5 (Lanjutan)

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{662700000}{662700000 + 8666666.667} = 0,987$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{20023809.52}{20023809.52 + 8666666.667} = 0,698$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{10800000}{10800000 + 8666666.667} = 0,555$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{1542857.143}{1542857.143 + 8666666.667} = 0,151$$

Ternyata  $R^2$  Linear (0,987) >  $R^2$  Kuadratik (0,698) >  $R^2$  kubik (0,555)

$R^2$  Kuartik (0,151) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{x_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

Tabel. Persamaan regresi kuadratik jumlah total leukosit pada ikan mas

|               | 0      | 0      | 2      | 4      | 6      | $\sum x_j = 12$   |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|
| $U_j$         | -2     | -1     | 0      | 1      | 2      | $\sum u_j = 0$    |
| $U_j^2$       | 4      | 1      | 0      | 1      | 4      | $\sum u_j^2 = 10$ |
| $U_j^4$       | 16     | 1      | 0      | 1      | 16     | $\sum U_j^4 = 34$ |
| $Y.U_j$       | 375000 | 402000 | 412000 | 423000 | 435000 | 2047000           |
| $U_j.Y.U_j$   |        |        |        |        |        | 141000            |
| $U_j^2.Y.U_j$ |        |        |        |        |        | 4065000           |



### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b_1' \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$141000 = b_1' \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b_1' = 141000$$

$$b_1' = 4700$$

$$\sum Y_{ij} = b_0' \cdot n + b_2' \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$2047000 = b_0' \cdot 15 + b_2' \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 2047000 \dots 1$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b_0' \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b_2' \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$4065000 = b_0' \cdot 15 \cdot 10 + b_2' \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 4065000 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 2047000 \rightarrow 150 \cdot b_0' + 300 \cdot b_2' = 20470000$$

$$150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 4065000 \quad 150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 4065000$$

$$198 \cdot b_2' = 16405000$$

$$b_2' = 82853,535$$

$$15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 2047000$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b_0' + 30 \cdot 82853,535 = 2047000$$

$$15 \cdot b_0' = 2047000 - 2485606,05$$

$$b_0' = -438606,05$$

$$b_0' = -438606,05$$

$$b_1 = 4700$$

$$b_2' = 82853,535$$

$$y = b_0' + b_1' \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -438606,05 + 4700x + 82853,535x^2$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

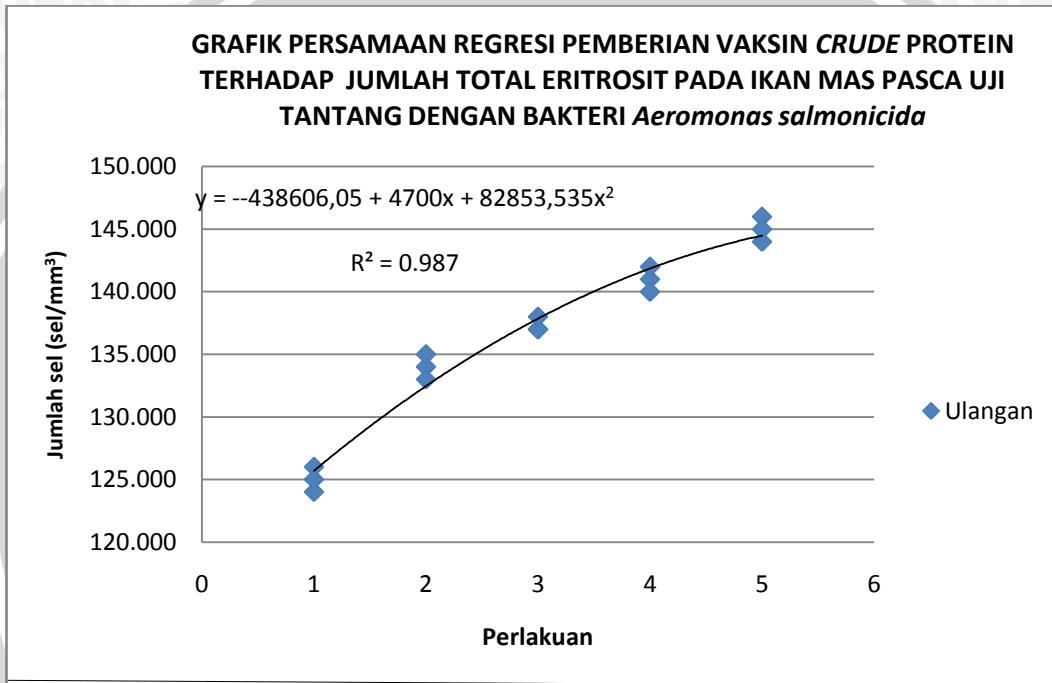
Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -438606,05$

$K (+)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -438606,05$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 313546,376$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 1347099,952$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 3069176,728$



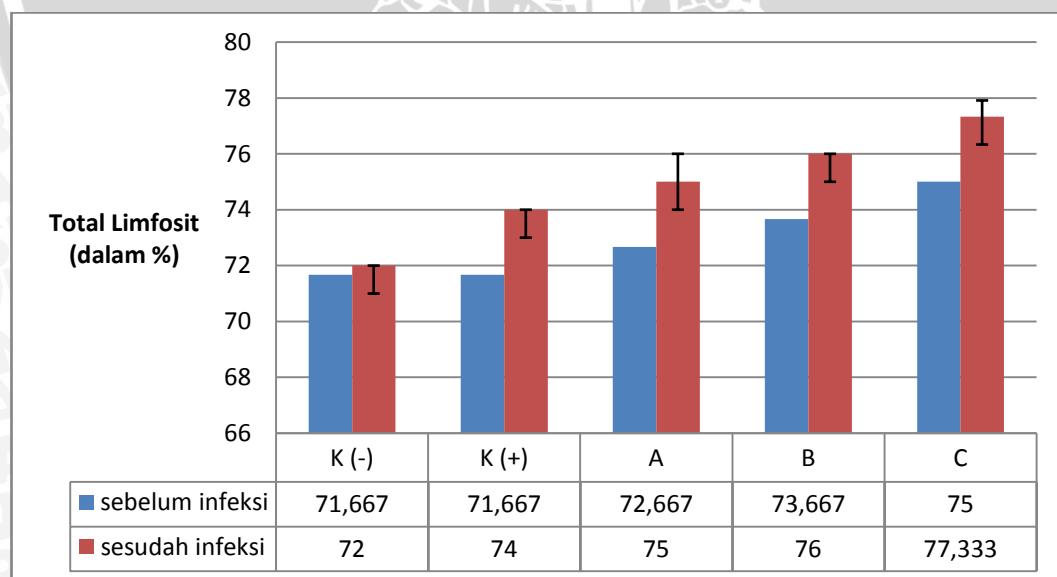
Gambar . Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total eritrosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

#### d. Limfosit

Tabel. Jumlah total limfosit sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke -    |              |              | Uji Tantang  |
|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|           |           | 0            | 7            | 14           |              |
| K (-)     | 1         | 72           | 71           | 72           | 72           |
|           | 2         | 71           | 71           | 71           | 72           |
|           | 3         | 71           | 72           | 72           | 72           |
|           | rata-rata | 71.333333333 | 71.333333333 | 71.666666667 | 72           |
| K (+)     | 1         | 71           | 72           | 72           | 74           |
|           | 2         | 72           | 71           | 71           | 74           |
|           | 3         | 72           | 71           | 72           | 74           |
|           | rata-rata | 71.666666667 | 71.333333333 | 71.666666667 | 74           |
| A (2mg)   | 1         | 71           | 74           | 72           | 74           |
|           | 2         | 72           | 74           | 73           | 75           |
|           | 3         | 73           | 73           | 73           | 76           |
|           | rata-rata | 72           | 73.666666667 | 72.666666667 | 75           |
| B (4 mg)  | 1         | 71           | 75           | 74           | 76           |
|           | 2         | 72           | 75           | 74           | 76           |
|           | 3         | 72           | 74           | 73           | 76           |
|           | rata-rata | 71.666666667 | 74.666666667 | 73.666666667 | 76           |
| C (6mg)   | 1         | 72           | 75           | 75           | 77           |
|           | 2         | 72           | 76           | 75           | 78           |
|           | 3         | 71           | 74           | 75           | 77           |
|           | rata-rata | 71.666666667 | 75           | 75           | 77.333333333 |



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total limfosit pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

**Lampiran 5 (Lanjutan)**

Tabel. Jumlah total limfosit sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |    |     | Total | Rata-Rata |
|-----------|---------|----|-----|-------|-----------|
|           | I       | II | III |       |           |
| K (-)     | 72      | 72 | 72  | 216   | 72        |
| K (+)     | 74      | 74 | 74  | 222   | 74        |
| A (2 mg)  | 74      | 75 | 76  | 225   | 75        |
| B (4 mg)  | 76      | 76 | 76  | 228   | 76        |
| C (6 mg)  | 77      | 78 | 77  | 232   | 77,333    |
| Total     |         |    |     | 1123  |           |

Perhitungan

- FK

$$\begin{aligned} &= \frac{G^2}{n} \\ &= \frac{1123^2}{15} \\ &= 84075,267 \end{aligned}$$

- JK<sub>total</sub>

$$\begin{aligned} &= [(K(+))^2 + \dots + (C3)^2] - FK \\ &= [(72)^2 + \dots + (77)^2] - 84075,267 \\ &= 51,733 \end{aligned}$$

- JK<sub>perlakuan</sub>

$$\begin{aligned} &= (\sum K(+))^2 + \dots + (\sum C)^2 / 3 - FK \\ &= \frac{1146^2}{3} - 84075,267 \\ &= 49,067 \end{aligned}$$

- JK<sub>acak</sub>

$$\begin{aligned} &= JK_{total} - JK_{perlakuan} \\ &= 51,733 - 49,067 \\ &= 2,667 \end{aligned}$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total limfosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit | F5%  | F1%  |
|-------------|----|--------|--------|------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 49.067 | 12.267 | 46** | 5.99 | 3.48 |
| Galat       | 10 | 2.667  | 0.267  |      |      |      |
| Total       | 14 | 51.733 |        |      |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau 70,7 > 5.99 → \*\* atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

$$\bullet \text{ SED} = \sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{2}}$$

$$= \sqrt{\frac{2 \times 0,267}{3}} \\ = 0,422$$

$$\bullet \text{ BNT } 5\% = T \text{ tabel } 5\% \times \text{SED}$$

$$= 2.228 \times 0,422 \\ = 0,94$$

$$\bullet \text{ BNT } 1\% = T \text{ tabel } 1\% \times \text{SED}$$

$$= 3.169 \times 0,422 \\ = 1,337$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total limfosit pada ikan mas (dalam%)

| Rata-Rata Perlakuan |        | K (-) | K (+) | A (2 mg) | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|--------|-------|-------|----------|----------|----------|--------|
|                     |        | 72    | 74    | 75       | 76       | 77.333   |        |
| K (-)               | 72     | 0     |       |          |          |          | a      |
| K (+)               | 77.333 | 5.333 | 0     |          |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 75     | 3     | 1     | 0        |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 76     | 4     | 2     | 1        | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 77.333 | 5.333 | 3.333 | 2.333    | 1.333    | 0        | e      |

Kesimpulan : Urutan perlakuan terbaik yaitu C → B → A → K (+) → K (-)

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total limfosit pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data (Ti) | Pembanding (Ci) |       |           |       |         |
|----------------------------|-----------|-----------------|-------|-----------|-------|---------|
|                            |           |                 | Liner | Kuadratik | Kubik | Kuartik |
| K (-)                      | 216       | -2              | 2     | -1        | 1     |         |
| K (+)                      | 222       | -1              | -1    | 2         | -4    |         |
| A (2)                      | 225       | 0               | -2    | 0         | 6     |         |
| B (4)                      | 228       | 1               | -1    | -2        | -4    |         |
| C (6 mg)                   | 232       | 2               | 2     | 1         | 1     |         |
| $Q = \sum Ci \cdot Ti$     | 38        |                 | -4    | 4         | -2    |         |
| $Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$ | 30        |                 | 42    | 30        | 210   |         |
| $JK = Q^2 : Kr$            | 48.133    | 0.381           | 0.533 | 0.019     |       |         |
| JK Total                   |           | 49.067          |       |           |       |         |

Tabel. Sidik ragam jumlah total limfosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit    | F5%  | F1% |
|-------------|----|--------|--------|---------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 49.067 |        |         |      |     |
| linier      | 1  | 48.133 | 48.133 | 180.477 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 0.381  | 0.381  | 1.428   |      |     |
| kubik       | 1  | 0.533  | 0.533  | 1.999   |      |     |
| kuartik     | 1  | 0.019  | 0.019  | 0.071   |      |     |
| acak        | 10 | 2.667  | 0.267  |         |      |     |
| total       | 14 |        |        |         |      |     |

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{48.133}{48.133 + 2.667} = 0,948$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.381}{0.381 + 2.667} = 0,124$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.533}{0.533 + 2.667} = 0,166$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.019}{0.019 + 2.667} = 0,007$$

Ternyata  $R^2$  Linear (0,948) >  $R^2$  Kuadratik (0,166) >  $R^2$  kubik (0,116)

$R^2$  Kuartik (0,007) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

Tabel. Persamaan regresi kuadratik jumlah total limfosit pada ikan mas

|                           | 0   | 0   | 2   | 4   | 6   | $\Sigma x_j = 12$   |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| $U_j$                     | -2  | -1  | 0   | 1   | 2   | $\Sigma u_j = 0$    |
| $U_j^2$                   | 4   | 1   | 0   | 1   | 4   | $\Sigma u_j^2 = 10$ |
| $U_j^4$                   | 16  | 1   | 0   | 1   | 16  | $\Sigma U_j^4 = 34$ |
| $Y \cdot U_j$             | 216 | 222 | 225 | 228 | 232 | 1181                |
| $U_j \cdot Y \cdot U_j$   |     |     |     |     |     | 9                   |
| $U_j^2 \cdot Y \cdot U_j$ |     |     |     |     |     | 2359                |



### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b_1' \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$9 = b_1' \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b_1' = 9$$

$$b_1' = 0,3$$

$$\sum Y_{ij} = b_0' \cdot n + b_2' \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$1181 = b_0' \cdot 15 + b_2' \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 1181 \dots 1$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b_0' \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b_2' \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$2359 = b_0' \cdot 15 \cdot 10 + b_2' \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 2359 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 1181 \rightarrow 150 \cdot b_0' + 300 \cdot b_2' = 11810$$

$$150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 2359 \quad 150 \cdot b_0' + 102 \cdot b_2' = 2359$$

$$198 \cdot b_2' = 9451$$

$$b_2' = 47,732$$

$$15 \cdot b_0' + 30 \cdot b_2' = 1181$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b_0' + 30 \cdot 47,732 = 1181$$

$$15 \cdot b_0' = 1181 - 1431,96$$

$$b_0' = -16,371$$

$$b_0' = -16,371$$

$$b_1 = 0,3$$

$$b_2' = 47,732$$

$$y = b_0' + b_1' \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -16,371 + 0,3x + 47,732x^2$$

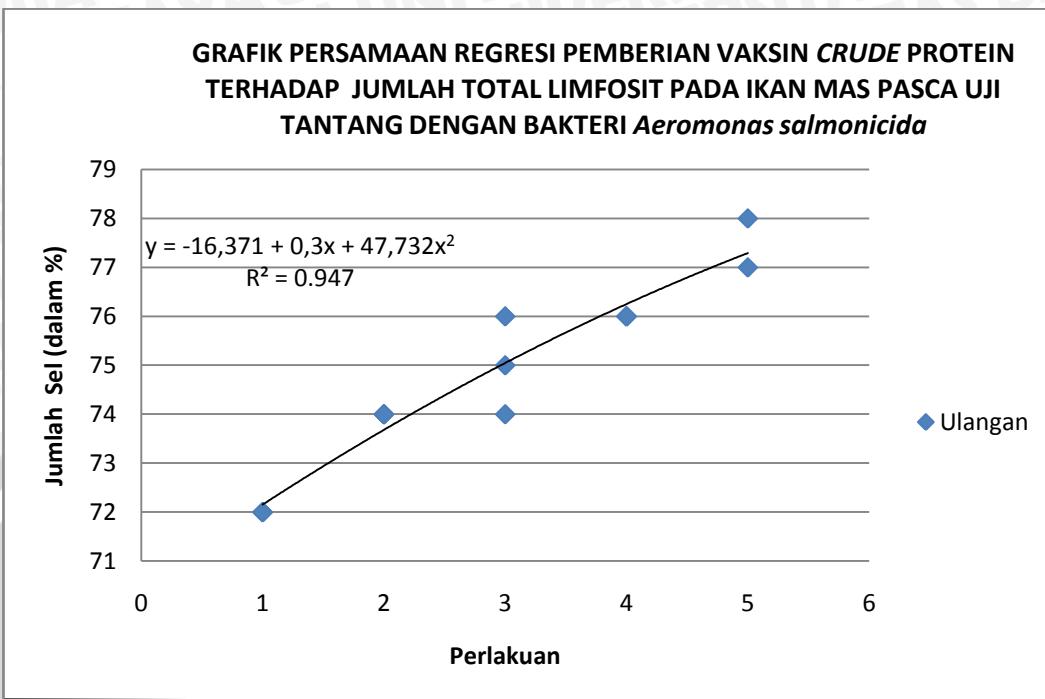
Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -16,371$

$K (+)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -16,371$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 79,693$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 175,757$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 271,821$



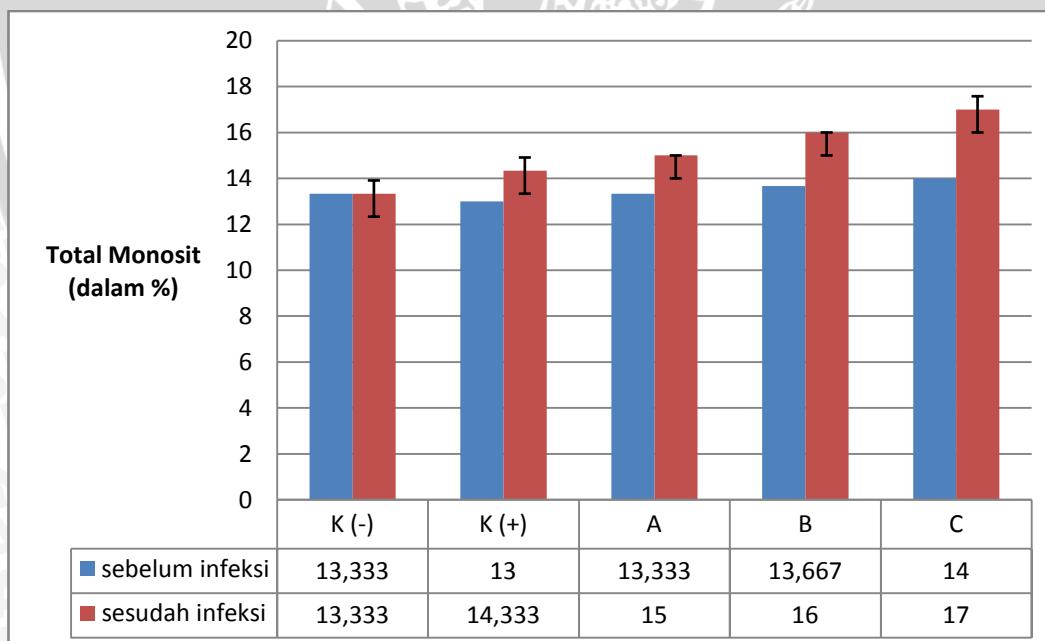
Gambar. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total limfosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

#### e. Monosit

Tabel. Jumlah total monosit pada ikan mas sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke - |        |        | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-----------|--------|--------|-------------|
|           |           | 0         | 7      | 14     |             |
| K (-)     | 1         | 13        | 13     | 13     | 14          |
|           | 2         | 13        | 14     | 13     | 13          |
|           | 3         | 13        | 13     | 14     | 13          |
|           | rata-rata | 13        | 13.333 | 13.333 | 13.333      |
| K (+)     | 1         | 13        | 13     | 13     | 14          |
|           | 2         | 13        | 14     | 13     | 15          |
|           | 3         | 13        | 13     | 13     | 14          |
|           | rata-rata | 13        | 13.333 | 13     | 14.333      |
| A (2mg)   | 1         | 13        | 15     | 14     | 15          |
|           | 2         | 14        | 15     | 13     | 15          |
|           | 3         | 13        | 15     | 13     | 15          |
|           | rata-rata | 13.333    | 15     | 13.333 | 15          |
| B (4 mg)  | 1         | 13        | 14     | 14     | 16          |
|           | 2         | 13        | 14     | 13     | 16          |
|           | 3         | 13        | 14     | 14     | 16          |
|           | rata-rata | 13        | 14     | 13.667 | 16          |
| C (6mg)   | 1         | 13        | 13     | 15     | 16          |
|           | 2         | 14        | 13     | 14     | 17          |
|           | 3         | 13        | 13     | 13     | 18          |
|           | rata-rata | 13.333    | 13     | 14     | 17          |



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total monosit pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Data perolehan jumlah monosit pada ikan mas setelah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |    |     | Total | Rata-Rata |
|-----------|---------|----|-----|-------|-----------|
|           | I       | II | III |       |           |
| K (-)     | 14      | 13 | 13  | 40    | 13.333    |
| K (+)     | 14      | 15 | 14  | 43    | 14.333    |
| A (2 mg)  | 15      | 15 | 15  | 45    | 15        |
| B (4 mg)  | 16      | 16 | 16  | 48    | 16        |
| C (6 mg)  | 16      | 17 | 16  | 49    | 16.333    |
| Total     |         |    |     | 225   |           |

Perhitungan:

- $FK = \frac{G^2}{n}$   
 $= \frac{225^2}{15}$   
 $= 3375$
- $JK_{total} = [(K(+))^2 + \dots + (C3)^2] - FK$   
 $= [(14)^2 + \dots + (16)^2] - 2065,067$   
 $= 20$
- $JK_{perlakuan} = (\sum K(+))^2 + \dots + (\sum C)^2 / 3 - FK$   
 $= \frac{86^2}{3} - 3375$   
 $= 18$
- $JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$   
 $= 20 - 18$   
 $= 2$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total monosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK | KT  | Fhit   | F5%  | F1%  |
|-------------|----|----|-----|--------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 18 | 4.5 | 22.5** | 5.99 | 3.48 |
| Galat       | 10 | 2  | 0.2 |        |      |      |
| Total       | 14 | 20 |     |        |      |      |

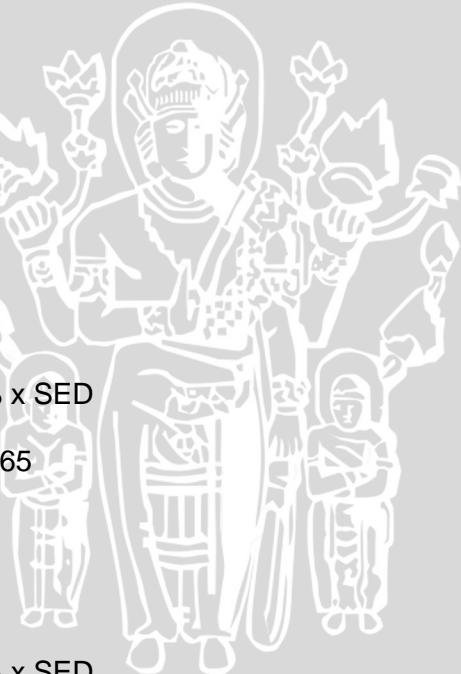
Karena  $F$  hitung  $> F$  1% atau  $22,5 > 5.99 \rightarrow **$  atau berbeda sangat nyata (highly significant). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

- SED  $= \sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{3}}$   
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,2}{3}}$   
 $= 0,365$

- BNT 5%  $= T \text{ tabel } 5\% \times \text{SED}$   
 $= 2.228 \times 0,365$   
 $= 0,813$

- BNT 1%  $= T \text{ tabel } 1\% \times \text{SED}$   
 $= 3.169 \times 0,365$   
 $= 1,157$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total monosit pada ikan mas (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |        | K (-)  | K (+)  | A (2 mg) | B (4 mg) | C (6 mg) | Notasi |
|---------------------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|--------|
|                     |        | 13.333 | 14.333 | 15       | 16       | 16.333   |        |
| K (-)               | 13.333 | 0      |        |          |          |          | a      |
| K (+)               | 14.333 | 1      | 0      |          |          |          | b      |
| A (2 mg)            | 15     | 1.667  | 0.667  | 0        |          |          | c      |
| B (4 mg)            | 16     | 2.667  | 1.667  | 1        | 0        |          | d      |
| C (6 mg)            | 16.333 | 3      | 2      | 1.333    | 0.333    | 0        | d      |

Kesimpulan : Urutan Perlakuan Terbaik yaitu C = B → A → K (+) → K (-)

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total monosit pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data (Ti) | Pembanding (Ci) |           |          |          |  |
|----------------------------|-----------|-----------------|-----------|----------|----------|--|
|                            |           | Liner           | Kuadratik | Kubik    | Kuartik  |  |
| K (-)                      | 40        | -2              | 2         | -1       | 1        |  |
| K (+)                      | 43        | -1              | -1        | 2        | -4       |  |
| A (2)                      | 45        | 0               | -2        | 0        | 6        |  |
| B (4)                      | 48        | 1               | -1        | -2       | -4       |  |
| C (6 mg)                   | 49        | 2               | 2         | 1        | 1        |  |
| $Q = \sum Ci \cdot Ti$     |           | 23              | -3        | -1       | -5       |  |
| $Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$ |           | 30              | 42        | 30       | 210      |  |
| $JK = Q^2 : Kr$            |           | 17.63333        | 0.214286  | 0.033333 | 0.119048 |  |
| JK Total                   |           | 18              |           |          |          |  |

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total monosit pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit   | F5%  | F1% |
|-------------|----|--------|--------|--------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 18     |        |        |      |     |
| linier      | 1  | 17.633 | 17.633 | 88.167 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 0.214  | 0.214  | 1.071  |      |     |
| kubik       | 1  | 0.033  | 0.033  | 0.167  |      |     |
| kuartik     | 1  | 0.119  | 0.11   | 0.595  |      |     |
| acak        | 10 | 2      | 0.2    |        |      |     |
| total       | 14 |        |        |        |      |     |

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{17.633}{17.633+2} = 0,898$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.214}{0.214+2} = 0,097$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.033}{0.033+2} = 0,016$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.119}{0.119+2} = 0,056$$

Ternyata  $R^2$  Linear (0,898) >  $R^2$  Kuadratik (0,097) >  $R^2$  kubik (0,016)

$R^2$  Kuartik (0,056) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel 35. Persamaan regresi kuadratik jumlah total monosit pada ikan mas

|                       | 0  | 0  | 2  | 4  | 6  | $\sum x_j = 12$   |
|-----------------------|----|----|----|----|----|-------------------|
| Uj                    | -2 | -1 | 0  | 1  | 2  | $\sum u_j = 0$    |
| Uj <sup>2</sup>       | 4  | 1  | 0  | 1  | 4  | $\sum u_j^2 = 10$ |
| Uj <sup>4</sup>       | 16 | 1  | 0  | 1  | 16 | $\sum u_j^4 = 34$ |
| Y.Uj                  | 40 | 43 | 45 | 48 | 49 | 83                |
| Uj.Y.Uj               |    |    |    |    |    | 11                |
| Uj <sup>2</sup> .Y.Uj |    |    |    |    |    | 161               |

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b'_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$11 = b'_1 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b'_1 = 11$$

$$b'_1 = 0,367$$

$$\sum Y_{ij} = b'_0 \cdot n + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$83 = b'_0 \cdot 15 + b'_2 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 83 \dots 1$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b'_0 \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$161 = b'_0 \cdot 15 \cdot 10 + b'_2 \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 161 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 83 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 300 \cdot b'_2 = 830$$

$$150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 161 \quad 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 161$$

$$198 \cdot b'_2 = 669$$

$$b'_2 = 3,379$$

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 83$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot 3,379 = 83$$

$$15 \cdot b'_0 = 83 - 101,37$$

$$b'_0 = -1,225$$



**Lampiran 5 (Lanjutan)**

$$b_0' = -1,225$$

$$b_1 = 0,367$$

$$b_2' = 3,379$$

$$y = b_0' + b_1 \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -1,225 + 0,367x + 3,379x^2$$

Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -1,225$

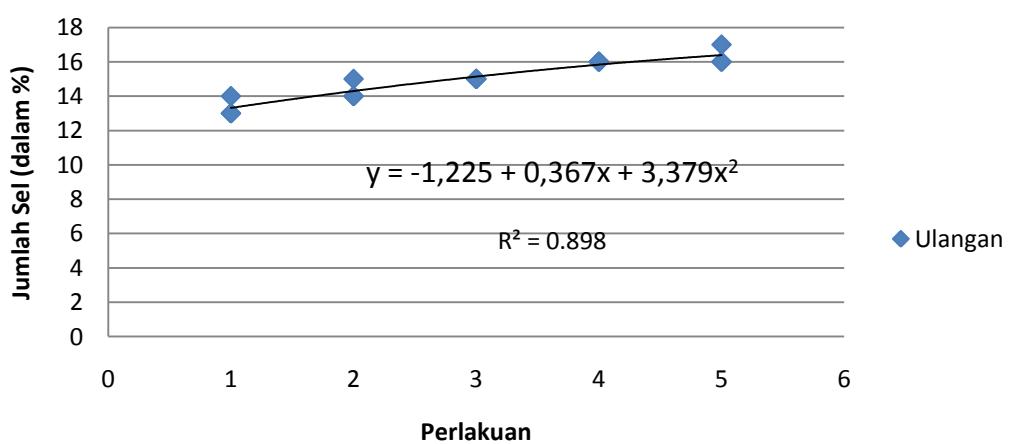
$K (+)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -1,225$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 6,267$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 13,759$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 21,251$

**GRAFIK PERSAMAAN REGRESI PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN TERHADAP JUMLAH TOTAL MONOSIT PADA IKAN MAS PASCA UJI TANTANG DENGAN BAKTERI *Aeromonas salmonicida***



Gambar. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total monosit pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

### Lampiran 5 (Lanjutan)

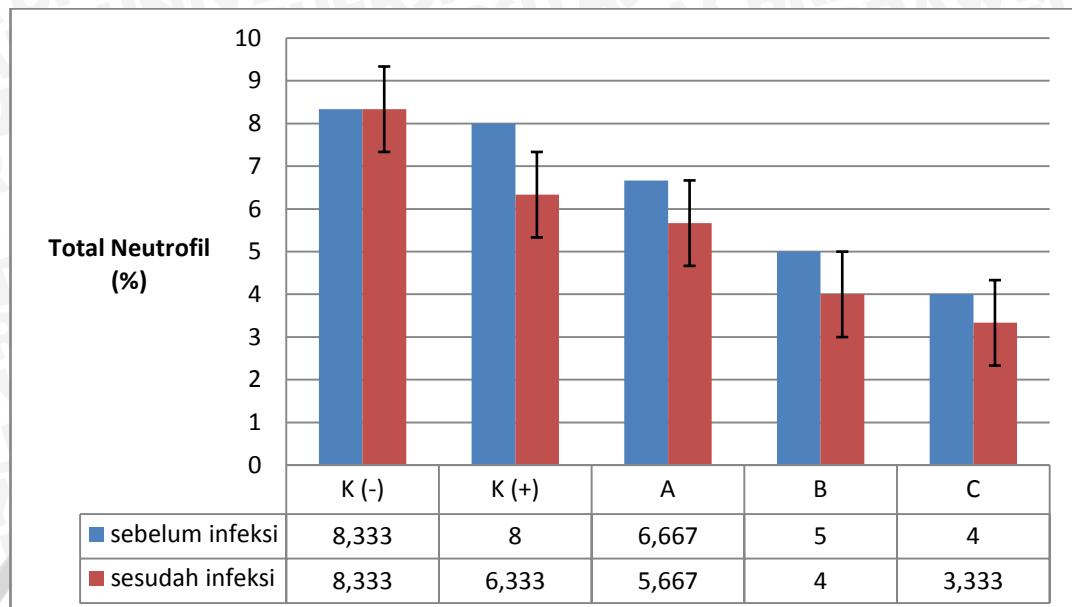
#### f. Neutrofil

Tabel. Jumlah total neutrofil pada ikan mas sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke -    |              |              | Uji Tantang  |
|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|           |           | 0            | 7            | 14           |              |
| K ( - )   | 1         | 8            | 8            | 9            | 8            |
|           | 2         | 8            | 8            | 8            | 8            |
|           | 3         | 9            | 8            | 8            | 9            |
|           | rata-rata | 8.3333333333 | 8            | 8.3333333333 | 8.3333333333 |
| K ( + )   | 1         | 8            | 8            | 7            | 6            |
|           | 2         | 9            | 8            | 9            | 6            |
|           | 3         | 7            | 8            | 8            | 7            |
|           | rata-rata | 8            | 8            | 8            | 6.3333333333 |
| A (2mg)   | 1         | 8            | 7            | 7            | 5            |
|           | 2         | 9            | 6            | 7            | 5            |
|           | 3         | 8            | 7            | 6            | 7            |
|           | rata-rata | 8.3333333333 | 6.6666666667 | 6.6666666667 | 5.6666666667 |
| B (4 mg)  | 1         | 8            | 5            | 5            | 5            |
|           | 2         | 9            | 4            | 5            | 4            |
|           | 3         | 8            | 6            | 5            | 3            |
|           | rata-rata | 8.3333333333 | 5            | 5            | 4            |
| C (6mg)   | 1         | 8            | 4            | 4            | 4            |
|           | 2         | 8            | 5            | 4            | 3            |
|           | 3         | 8            | 4            | 4            | 3            |
|           | rata-rata | 8            | 4.3333333333 | 4            | 3.3333333333 |



### Lampiran 5 (Lanjutan)



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total neutrofil pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

Tabel. Data perolehan jumlah total neutrofil pada ikan mas setelah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |    |     | Total | Rata-Rata |
|-----------|---------|----|-----|-------|-----------|
|           | I       | II | III |       |           |
| K (-)     | 8       | 8  | 9   | 25    | 8.33333   |
| K (+)     | 6       | 6  | 7   | 19    | 6.33333   |
| A (2 mg)  | 5       | 5  | 7   | 17    | 5.66667   |
| B (4 mg)  | 5       | 4  | 3   | 12    | 4         |
| C (6 mg)  | 4       | 3  | 3   | 10    | 3.33333   |
| Total     |         |    |     | 83    |           |

Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \cdot \text{ FK} &= \frac{G^2}{n} \\
 &= \frac{151^2}{15} \\
 &= 459,267
 \end{aligned}$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

- $$\begin{aligned} \bullet \quad JK_{\text{total}} &= [(K(-1)^2 + \dots + (C3)^2] - FK \\ &= [(6)^2 + \dots + (9)^2] - 459,267 \\ &= 53,733 \end{aligned}$$
- $$\begin{aligned} \bullet \quad JK_{\text{perlakuan}} &= (\sum K(+))^2 + \dots + (\sum C)^2/3 - FK \\ &= \frac{151^2}{3} - 459,267 \\ &= 47,067 \end{aligned}$$
- $$\begin{aligned} \bullet \quad JK_{\text{acak}} &= JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}} \\ &= 53,733 - 47,067 \\ &= 6,667 \end{aligned}$$

Tabel. Sidik ragam jumlah total neutrofil pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK      | KT      | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|---------|---------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 47.0667 | 11.7667 | 17.65** | 5.99 | 3.48 |
| Galat       | 10 | 6.66667 | 0.66667 |         |      |      |
| Total       | 14 | 53.7333 |         |         |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau  $17,65 > 5.99 \rightarrow **$  atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

$$\begin{aligned} \bullet \quad SED &= \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{3}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 0.667}{3}} \\ &= 0.667 \end{aligned}$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

$$\bullet \text{ BNT } 5\% = T \text{ tabel } 5\% \times \text{SED}$$

$$= 2.228 \times 0.667$$

$$= 1,486$$

$$\bullet \text{ BNT } 1\% = T \text{ tabel } 1\% \times \text{SED}$$

$$= 3.169 \times 0.667$$

$$= 2,114$$

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total neutrofil pada ikan mas

(dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |       | C (6 mg) | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-) | Notasi |
|---------------------|-------|----------|----------|----------|-------|-------|--------|
|                     |       | 3.333    | 4        | 5.667    | 6.333 | 8.333 |        |
| C (6 mg)            | 3.333 | 0        |          |          |       |       | a      |
| B (4 mg)            | 4     | 0.667    | 0        |          |       |       | a      |
| A (2 mg)            | 5.667 | 2.333    | 1.667    | 0        |       |       | b      |
| K (+)               | 6.333 | 3        | 2.333    | 0.667    | 0     |       | b      |
| K (-)               | 8.333 | 5        | 4.333    | 2.667    | 2     | 0     | c      |

Kesimpulan : Urutan perlakuan terbaik yaitu K (-) → K(+) = A → B = C

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total neutrofil pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data (Ti) | Pembanding (Ci) |       |           |       |         |
|----------------------------|-----------|-----------------|-------|-----------|-------|---------|
|                            |           |                 | Liner | Kuadratik | Kubik | Kuartik |
| K (-)                      | 25        | -2              | 2     | -1        | 1     |         |
| K (+)                      | 19        | -1              | -1    | 2         | -4    |         |
| A (2)                      | 17        | 0               | -2    | 0         | 6     |         |
| B (4)                      | 12        | 1               | -1    | -2        | -4    |         |
| C (6 mg)                   | 10        | 2               | 2     | 1         | 1     |         |
| $Q = \sum Ci \cdot Ti$     |           | -37             | 5     | -1        | 13    |         |
| $Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$ |           | 30              | 42    | 30        | 210   |         |
| $JK = Q^2 : Kr$            |           | 45.633          | 0.595 | 0.033     | 0.805 |         |
| JK Total                   |           | 47.067          |       |           |       |         |



### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total neutrofil pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit    | F5%  | F1% |
|-------------|----|--------|--------|---------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 47.067 |        |         |      |     |
| linier      | 1  | 45.633 | 45.633 | 114.083 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 0.595  | 0.595  | 1.489   |      |     |
| kubik       | 1  | 0.033  | 0.033  | 0.083   |      |     |
| kuartik     | 1  | 0.805  | 0.805  | 2.012   |      |     |
| acak        | 10 | 6.667  | 0.667  |         |      |     |
| total       | 14 |        |        |         |      |     |

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{45.633}{45.633 + 6.667} = 0,872$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadratik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.595}{0.595 + 6.667} = 0,081$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.033}{0.033 + 6.667} = 0,005$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}}$$

$$= \frac{0.805}{0.805 + 6.667} = 0,108$$

Ternyata  $R^2$  Linear (0,872) >  $R^2$  Kuadratik (0,0081) >  $R^2$  kubik (0,005)

$R^2$  Kuartik (0,005) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

**Lampiran 5 (Lanjutan)**

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

Tabel. Persamaan regresi kuadratik jumlah total neutrofil pada ikan mas

|                           | 0  | 0  | 2  | 4  | 6  | $\sum x_j = 12$   |
|---------------------------|----|----|----|----|----|-------------------|
| $U_j$                     | -2 | -1 | 0  | 1  | 2  | $\sum U_j = 0$    |
| $U_j^2$                   | 4  | 1  | 0  | 1  | 4  | $\sum U_j^2 = 10$ |
| $U_j^4$                   | 16 | 1  | 0  | 1  | 16 | $\sum U_j^4 = 34$ |
| $Y \cdot U_j$             | 25 | 19 | 17 | 12 | 10 | 190               |
| $U_j \cdot Y \cdot U_j$   |    |    |    |    |    | 18                |
| $U_j^2 \cdot Y \cdot U_j$ |    |    |    |    |    | 386               |

$$\sum U_j \cdot y_{ij} = b'_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$18 = b'_1 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 30 \cdot b'_1 = 18$$

$$b'_1 = 0,6$$

$$\sum Y_{ij} = b'_0 \cdot n + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2$$

$$190 = b'_0 \cdot 15 + b'_2 \cdot 3 \cdot 10 \rightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 190 \dots 1$$

$$\sum U_j^2 \cdot y_{ij} = b'_0 \cdot n \cdot \sum U_j^2 + b'_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$386 = b'_0 \cdot 15 \cdot 10 + b'_2 \cdot 3 \cdot 34 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 190 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 300 \cdot b'_2 = 1900$$

$$150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386 \quad 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386$$

$$198 \cdot b'_2 = 1514$$

$$b'_2 = 7,646$$

$$\begin{aligned}
 15. b_0' + 30. b_2' &= 190 \\
 \leftrightarrow 15. b_0' + 30. 7,646 &= 190 \\
 15. b_0' &= 190 - 229,38 \\
 b_0' &= -2,625 \\
 b_0 &= -2,625 \\
 b_1 &= 0,6 \\
 b_2 &= 7,646
 \end{aligned}$$

$$y = b_0' + b_1 \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -2,625 + 0,6x + 7,646x^2$$

Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -2,625$

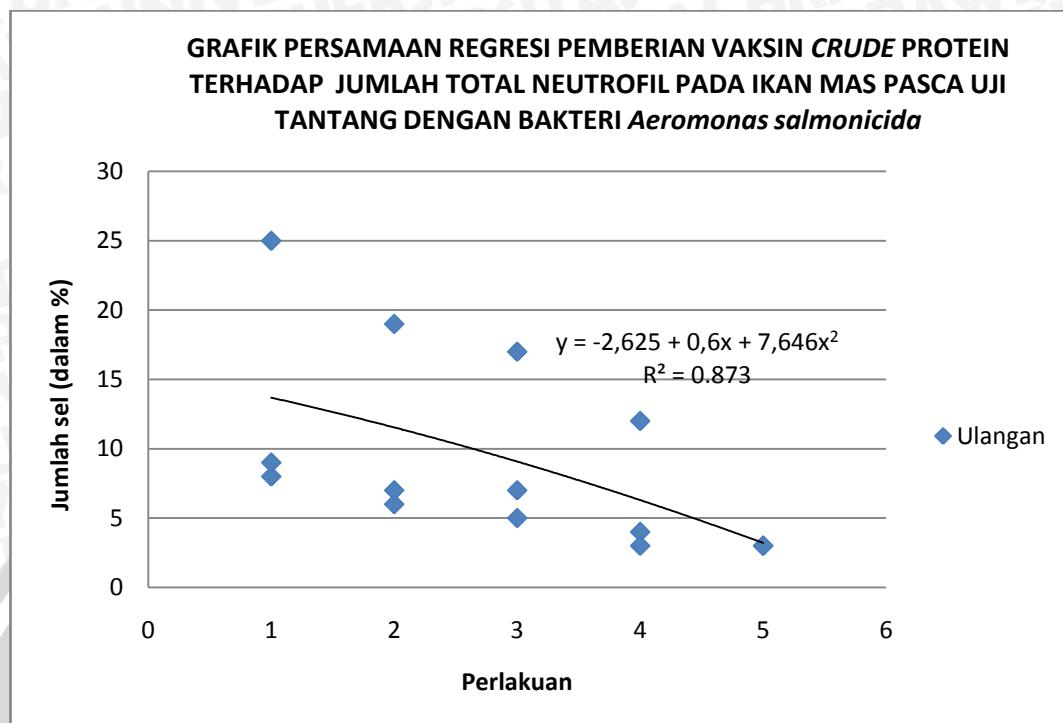
$K (+)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -2,625$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 13,867$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 122,111$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 276,231$



**Lampiran 5 (Lanjutan)**

Gambar. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin *crude protein* terhadap jumlah total neutrofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

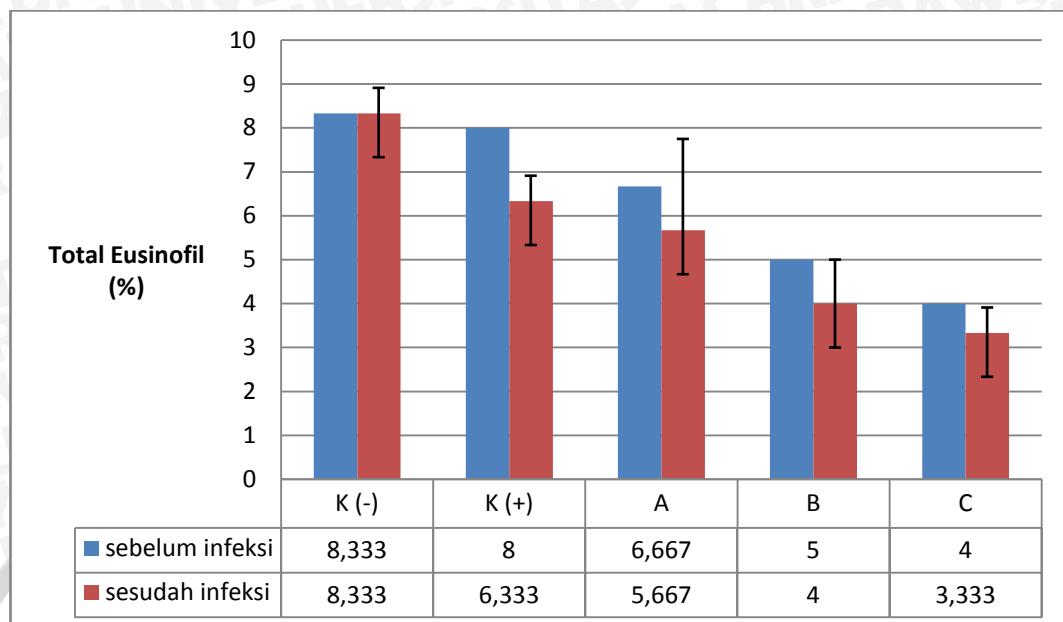
### Lampiran 5 (Lanjutan)

#### g. Eosinofil

Tabel. Jumlah total eosinofil sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke - |       |       | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-----------|-------|-------|-------------|
|           |           | 0         | 7     | 14    |             |
| K (-)     | 1         | 7         | 8     | 6     | 6           |
|           | 2         | 8         | 7     | 8     | 7           |
|           | 3         | 7         | 7     | 6     | 6           |
|           | rata-rata | 7.333     | 7.333 | 6.667 | 6.333       |
| K (+)     | 1         | 8         | 7     | 8     | 6           |
|           | 2         | 6         | 7     | 7     | 5           |
|           | 3         | 8         | 8     | 7     | 5           |
|           | rata-rata | 7.333     | 7.333 | 7.333 | 5.333       |
| A (2mg)   | 1         | 7         | 4     | 7     | 6           |
|           | 2         | 6         | 5     | 7     | 5           |
|           | 3         | 6         | 5     | 8     | 2           |
|           | rata-rata | 6.333     | 4.667 | 7.333 | 4.333       |
| B (4 mg)  | 1         | 8         | 6     | 7     | 3           |
|           | 2         | 6         | 7     | 8     | 4           |
|           | 3         | 7         | 6     | 8     | 5           |
|           | rata-rata | 7         | 6.333 | 7.667 | 4           |
| C (6mg)   | 1         | 7         | 8     | 6     | 3           |
|           | 2         | 6         | 6     | 7     | 2           |
|           | 3         | 8         | 9     | 8     | 2           |
|           | rata-rata | 7         | 7.667 | 7     | 2.333       |

### Lampiran 5 (Lanjutan)



Gambar. Pengaruh pemberian vaksin *crude* protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan Mas (*C. carpio*) sebelum dan sesudah uji tantang bakteri *A. salmonicida*

Tabel. Data perolehan jumlah eosinofil pada ikan mas setelah uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

| perlakuan | Ulangan |    |     | Total | Rata-Rata | SD    |
|-----------|---------|----|-----|-------|-----------|-------|
|           | I       | II | III |       |           |       |
| K (-)     | 6       | 7  | 6   | 19    | 6.333     | 0.577 |
| K (+)     | 6       | 5  | 5   | 16    | 5.333     | 0.577 |
| A (2 mg)  | 6       | 5  | 2   | 13    | 4.333     | 2.082 |
| B (4 mg)  | 3       | 4  | 5   | 12    | 4         | 1     |
| C (6 mg)  | 3       | 2  | 2   | 7     | 2.333     | 0.577 |
| Total     |         |    |     | 67    |           |       |

Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \bullet \quad FK &= \frac{G^2}{n} \\
 &= \frac{67^2}{15} \\
 &= 299,267
 \end{aligned}$$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

- $JK_{\text{total}} = [(K(+))^2 + \dots + (C3)^2] - FK$   
 $= [(6)^2 + \dots + (2)^2] - 299,267$   
 $= 39,733$

- $JK_{\text{perlakuan}} = (\sum K(+))^2 + \dots + (\sum C)^2/3 - FK$   
 $= \frac{86^2}{3} - 299,267$   
 $= 27,067$

- $JK_{\text{acak}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}}$   
 $= 39,733 - 299,267$   
 $= 12,667$

Tabel. Sidik ragam jumlah total eosinofil pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT    | Fhit    | F5%  | F1%  |
|-------------|----|--------|-------|---------|------|------|
| Perlakuan   | 4  | 27.067 | 6.767 | 5.342** | 3.48 | 5.99 |
| Galat       | 10 | 12.667 | 1.267 |         |      |      |
| Total       | 14 | 39.733 |       |         |      |      |

Karena F hitung > F 1% atau  $5,342 > 5.99 \rightarrow **$  atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

- $SED = \sqrt{\frac{2 KT \text{ acak}}{\mu}}$   
 $= \sqrt{\frac{2 \times 1.267}{3}}$   
 $= 0,92$



### Lampiran 5 (Lanjutan)

- BNT 5% = T tabel 5 % x SED

$$= 2.228 \times 0,298$$

$$= 2,049$$

- BNT 1% = T tabel 1 % x SED

$$= 3.169 \times 0,298$$

$$= 2,915$$

Tabel. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) jumlah total eosinofil pada ikan mas (dalam %)

| Rata-Rata Perlakuan |       | C (6 mg) | B (4 mg) | A (2 mg) | K (+) | K (-) | Notasi |
|---------------------|-------|----------|----------|----------|-------|-------|--------|
|                     |       | 2.333333 | 4        | 4.333    | 5.333 | 6.333 |        |
| C (6 mg)            | 2.333 | 0        |          |          |       |       | a      |
| B (4 mg)            | 4     | 1.667    | 0        |          |       |       | a      |
| A (2 mg)            | 4.333 | 2        | 0.333    | 0        |       |       | a      |
| K (+)               | 5.333 | 3        | 1.333    | 1        | 0     |       | ab     |
| K (-)               | 6.333 | 4        | 2.333    | 2        | 1     | 0     | ab     |

Kesimpulan : Urutan perlakuan terbaik yaitu K (-) → K(+)→ A = B = C

Tabel. Analisa polynomial orthogonal jumlah total eosinofil pada ikan mas

| Perlakuan                  | Data (Ti) | Pembanding (Ci) |           |       |         |
|----------------------------|-----------|-----------------|-----------|-------|---------|
|                            |           | Liner           | Kuadratik | Kubik | Kuartik |
| K (-)                      | 19        | -2              | 2         | -1    | 1       |
| K (+)                      | 16        | -1              | -1        | 2     | -4      |
| A (2)                      | 13        | 0               | -2        | 0     | 6       |
| B (4)                      | 12        | 1               | -1        | -2    | -4      |
| C (6 mg)                   | 7         | 2               | 2         | 1     | 1       |
| Q= $\sum Ci \cdot Ti$      |           | -28             | -2        | -4    | -8      |
| Kr = $(\sum Ci^2) \cdot r$ |           | 30              | 42        | 30    | 210     |
| JK= Q2 : Kr                |           | 26.133          | 0.095     | 0.533 | 0.305   |
| JK Total                   |           | 27.067          |           |       |         |



### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Sidik ragam jumlah total eosinofil pada ikan mas

| Sidik ragam | db | JK     | KT     | Fhit   | F5%  | F1% |
|-------------|----|--------|--------|--------|------|-----|
| Perlakuan   | 4  | 27.067 |        |        |      |     |
| linier      | 1  | 26.133 | 26.133 | 20.631 | 4.96 | 10  |
| kuadratik   | 1  | 0.095  | 0.095  | 0.075  |      |     |
| kubik       | 1  | 0.533  | 0.533  | 0.421  |      |     |
| kuartik     | 1  | 0.305  | 0.305  | 0.241  |      |     |
| acak        | 10 | 12.667 | 1.267  |        |      |     |
| total       | 14 |        |        |        |      |     |

Dari hasil sidik ragam regresi diatas berbeda sangat nyata pada perlakuan linier, kuadratik, kubik dan kuartik, maka regresi yang sesuai menggunakan regresi :

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ regresi linier}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{26.133}{26.133 + 12.667} = 0,674$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ regresi kuadrat ik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.095}{0.095 + 12.667} = 0,007$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ regresi kubik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.533}{0.533 + 12.667} = 0,04$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{JK \text{ regresi kuartik}}{JK \text{ total terkoreksi}} \\ = \frac{0.305}{0.305 + 12.667} = 0,023$$

Ternyata  $R^2$  Linear (0,674) >  $R^2$  Kuadratik (0,007) >  $R^2$  kubik (0,04) >

$R^2$  Kuartik (0,023) regresi kuadratik sesuai untuk kurva response

Mencari persamaan regresi kuadratik :

$$U_j = \frac{X_j - \bar{x}}{d} \rightarrow \bar{x} = \frac{(0 + 0 + 2 + 4 + 6) - 2.4}{5} = 1.92$$

### Lampiran 5 (Lanjutan)

Tabel. Persamaan regresi kuadratik jumlah total eosinofil pada ikan mas

|          | 0  | 0  | 2  | 4  | 6  | $\sum x_j = 12$   |
|----------|----|----|----|----|----|-------------------|
| Uj       | -2 | -1 | 0  | 1  | 2  | $\sum u_j = 0$    |
| UJ2      | 4  | 1  | 0  | 1  | 4  | $\sum u_j^2 = 10$ |
| Uj4      | 16 | 1  | 0  | 1  | 16 | $\sum u_j^4 = 34$ |
| Y.Uj     | 19 | 16 | 13 | 12 | 7  | 190               |
| Uj.Y.Uj  |    |    |    |    |    | 18                |
| Uj2.Y.Uj |    |    |    |    |    | 386               |

$$\sum Uj.y.ij = b'_1 \cdot r \cdot \sum Uj^2$$

$$18 = b'_1 \cdot 3.10 \rightarrow 30 \cdot b'_1 = 18$$

$$b'_1 = 0,6$$

$$\sum Y.ij = b'_0 \cdot n + b'_2 \cdot r \cdot \sum Uj^2$$

$$190 = b'_0 \cdot 15 + b'_2 \cdot 3.10 \rightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 190 \dots 1$$

$$\sum Uj^2.y.ij = b'_0 \cdot n \cdot \sum Uj^2 + b'_2 \cdot r \cdot \sum Uj^4$$

$$386 = b'_0 \cdot 15 \cdot 10 + b'_2 \cdot 3.34 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386 \dots 2$$

Substitusi

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 190 \rightarrow 150 \cdot b'_0 + 300 \cdot b'_2 = 1900$$

$$150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386 \quad 150 \cdot b'_0 + 102 \cdot b'_2 = 386$$

$$198 \cdot b'_2 = 1514$$

$$b'_2 = 7,646$$

$$15 \cdot b'_0 + 30 \cdot b'_2 = 190$$

$$\leftrightarrow 15 \cdot b'_0 + 30 \cdot 7,646 = 190$$



**Lampiran 5 (Lanjutan)**

$$15. b_0' = 190 - 229,38$$

$$b_0' = -2,625$$

$$b_0' = -2,625$$

$$b_1 = 0,6$$

$$b_2' = 7,646$$

$$y = b_0' + b_1 \cdot x + b_2' \cdot x^2 \Leftrightarrow y = -2,625 + 0,6x + 7,646x^2$$

Untuk  $\leftrightarrow K (-)$  nilai  $x = 0 \rightarrow y = -2,625$

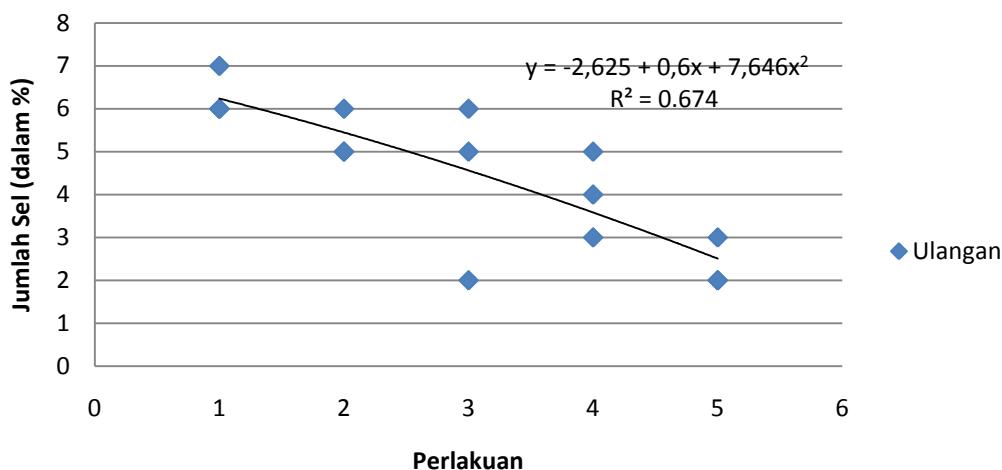
K (+) nilai  $x = 0 \rightarrow y = -2,625$

A nilai  $x = 2 \rightarrow y = 13,867$

B nilai  $x = 4 \rightarrow y = 122,111$

C nilai  $x = 6 \rightarrow y = 276,231$

**GRAFIK PERSAMAAN REGRESI PEMBERIAN VAKSIN CRUDE PROTEIN TERHADAP JUMLAH TOTAL EOSINOFIL PADA IKAN MAS PASCA UJI TANTANG DENGAN BAKTERI *Aeromonas salmonicida***



Gambar. Grafik persamaan regresi pemberian vaksin crude protein terhadap jumlah total eosinofil pada ikan mas pasca uji tantang bakteri *Aeromonas salmonicida*

### Lampiran 6. Data Parameter Penunjang

#### a. Suhu

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke - |       |       | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-----------|-------|-------|-------------|
|           |           | 0         | 4     | 8     |             |
| K (+)     | 1         | 26,4      | 26,6  | 25,5  | 26,2        |
|           | 2         | 26,4      | 26,6  | 25,5  | 26,2        |
|           | 3         | 26,4      | 26,5  | 25,4  | 26,3        |
|           | rata-rata | 26,4      | 26,57 | 25,47 | 26,23       |
| K (-)     | 1         | 26,5      | 26,4  | 25,4  | 26,3        |
|           | 2         | 26,3      | 26,5  | 25,4  | 26,4        |
|           | 3         | 26,5      | 26,5  | 25,6  | 26,2        |
|           | rata-rata | 26,43     | 26,47 | 25,47 | 26,33       |
| A (2mg)   | 1         | 26,5      | 26,5  | 25,5  | 26,3        |
|           | 2         | 26,6      | 26,5  | 25,6  | 26,3        |
|           | 3         | 26,6      | 26,5  | 25,5  | 26,3        |
|           | rata-rata | 26,57     | 26,5  | 25,53 | 26,33       |
| B (4 mg)  | 1         | 26,5      | 26,6  | 25,4  | 26,4        |
|           | 2         | 26,4      | 26,5  | 25,5  | 26,3        |
|           | 3         | 26,4      | 26,6  | 25,5  | 26,4        |
|           | rata-rata | 26,43     | 26,57 | 25,47 | 26,37       |
| C (6mg)   | 1         | 26,4      | 26,4  | 25,6  | 26,3        |
|           | 2         | 26,6      | 26,6  | 25,6  | 26,2        |
|           | 3         | 26,6      | 26,6  | 25,5  | 26,3        |
|           | rata-rata | 26,53     | 26,53 | 25,57 | 26,27       |



### Lampiran 6 (Lanjutan)

#### b. pH

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke - |   |   | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-----------|---|---|-------------|
|           |           | 0         | 4 | 8 |             |
| K (+)     | 1         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 2         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 3         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | rata-rata | 7         | 7 | 7 | 7           |
| K (-)     | 1         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 2         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 3         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | rata-rata | 7         | 7 | 7 | 7           |
| A (2mg)   | 1         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 2         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 3         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | rata-rata | 7         | 7 | 7 | 7           |
| B (4 mg)  | 1         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 2         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 3         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | rata-rata | 7         | 7 | 7 | 7           |
| C (6mg)   | 1         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 2         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | 3         | 7         | 7 | 7 | 7           |
|           | rata-rata | 7         | 7 | 7 | 7           |

### Lampiran 6 (Lanjutan)

#### c. DO (*Dissolved Oxygen*)

| Perlakuan | Ulangan   | Hari Ke - |      |      | Uji Tantang |
|-----------|-----------|-----------|------|------|-------------|
|           |           | 0         | 4    | 8    |             |
| K (+)     | 1         | 6,33      | 6,34 | 6,38 | 6,46        |
|           | 2         | 6,45      | 6,43 | 6,52 | 6,41        |
|           | 3         | 6,73      | 6,64 | 6,59 | 6,68        |
|           | rata-rata | 6,5       | 6,47 | 6,49 | 6,52        |
| K (-)     | 1         | 6,37      | 6,33 | 6,22 | 6,34        |
|           | 2         | 6,72      | 6,89 | 6,35 | 6,93        |
|           | 3         | 6,96      | 6,23 | 6,81 | 6,78        |
|           | rata-rata | 6,68      | 6,48 | 6,46 | 6,68        |
| A (2mg)   | 1         | 6,28      | 6,88 | 6,73 | 6,56        |
|           | 2         | 6,39      | 6,36 | 6,72 | 6,48        |
|           | 3         | 6,46      | 6,52 | 6,93 | 6,39        |
|           | rata-rata | 6,38      | 6,59 | 6,79 | 6,48        |
| B (4 mg)  | 1         | 6,87      | 6,84 | 6,58 | 6,55        |
|           | 2         | 6,89      | 6,69 | 6,51 | 6,48        |
|           | 3         | 6,35      | 6,41 | 6,69 | 6,51        |
|           | rata-rata | 6,7       | 6,65 | 6,59 | 6,51        |
| C (6mg)   | 1         | 6,47      | 6,86 | 6,47 | 6,82        |
|           | 2         | 6,84      | 6,64 | 6,58 | 6,68        |
|           | 3         | 6,39      | 6,57 | 6,75 | 6,53        |
|           | rata-rata | 6,56      | 6,69 | 6,6  | 6,68        |