

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*
(Ten.) Steenis) UNTUK MENINGKATKAN JUMLAH LEUKOSIT DAN
AKTIVITAS FAGOSITOSIS IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI
BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

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

Oleh :
**M. EKA SUPRIYA DANNY
NIM. 105080500111037**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*
(Ten.) Steenis) UNTUK MENINGKATKAN JUMLAH LEUKOSIT DAN
AKTIVITAS FAGOSITOSIS IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI
BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**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 :

**M. EKA SUPRIYA DANNY
NIM. 105080500111037**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*(Ten.) Steenis) UNTUK MENINGKATKAN JUMLAH LEUKOSIT DAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh:

M. EKA SUPRIYA DANNY
NIM. 105080500111037

DOSEN PENGUJI I

FANI FARIEDAH, S.PI, MP
NIP. 82030808120397
Tanggal:

Menyetujui,

DOSEN PEMBIMBING I

Prof. Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS
NIP. 19611106 198602 2 001
Tanggal:

DOSEN PEMBIMBING II

Ir. HENY SUPRASTYANI, MS
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal:

Mengetahui,
KETUA JURUSAN MSP

Dr. Ir. ARNING W. EKAWATI, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal:

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 15 Agustus 2014
Mahasiswa,

M. EKA SUPRIYA DANNY



UCAPAN TERIMAKASIH

Atas selesainya laporan penelitian ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen pembimbing I atas bimbingan dan arahannya.
2. Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing II atas bimbingan dan arahannya.
3. Dr. Ir. Maftuch, M.Si selaku dosen penguji I.
4. Fani Fariedah, S.Pi, MP selaku dosen penguji II.
5. Tim Binahong (Huriyatul Fitriyah. N atas segalanya yang diberikan dan Sulaiman), terimakasih banyak, semangat teman.
6. Keluarga yang di rumah terimakasih atas doa dan dukungannya.
7. Pak Udin, Pak Yit dan Mb titin atas semua bantuan yang telah diberikan.
8. Sahabat teman-teman BP'10 (Winda, Sony, Cahya, Erika, Nana, Agung, Akbar dan semua keluarga Holigan) terima kasih atas semua bantuan, doa, dukungan, dan kebersamaan kita.
9. Teman-teman Margojoyo 05.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik Bapak, Ibu, dan saudara sekalian. Amin.

RINGKASAN

M. EKA SUPRIYA DANNY. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk Meningkatkan Jumlah Leukosit dan Aktivitas Fagositosis Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* (dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Ir. Heny Suprastyani, MS**).

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) merupakan jenis ikan hias air tawar yang bernilai ekonomis penting, dengan peningkatan ekspor non migas sebesar 5,24 juta dollar AS pada tahun 2012. Tetapi seringkali kali petani dan konsumen ikan koi ini mengalami gangguan dalam pemeliharaan yang disebabkan oleh beberapa penyakit, salah satunya adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Namun hingga saat ini pencegahannya masih menggunakan antibiotik yang berbahan kimia yang dapat menyebabkan efek resistensi terhadap lingkungan maupun organismenya, oleh karena itu diperlukan alternatif pencegahan yang ramah lingkungan dengan memanfaatkan senyawa aktif binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* tanpa menimbulkan efek resistensi terhadap lingkungan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk meningkatkan leukosit dan aktifitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2014 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimen, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan, 2 kontrol dan 3 kali ulangan. Perlakuannya yakni ekstrak kasar Daun binahong A (dosis 0,2 ppt), B (dosis 0,4 ppt), dan C (dosis 0,6 ppt), K- (kontrol normal) dan K+ (kontrol infeksi). Dengan parameter uji jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis pada pra dan post infeksi bakteri *A. Hydrophila*.

Hasil pemberian ekstrak kasar binahong (*A.cordifolia*.) dengan perlakuan yang berbeda memberi pengaruh terhadap jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis ikan koi. Dari hasil pengamatan jumlah leukosit, perlakuan B (0,4 ppt) sangat berpengaruh sangat nyata untuk meningkatkan jumlah leukosit pra infeksi sebesar $8,57 \times 10^4$ sel/ml menjadi $9,62 \times 10^4$ sel/ml pada post infeksi. Nilai tersebut berbeda jauh dari nilai perlakuan K (0 ppt) pada pra dan post infeksi sebesar $2,55 \times 10^4$ sel/ml dan $3,48 \times 10^4$ sel/ml. Hal tersebut membuktikan pemberian ekstrak daun binahong sangat berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan jumlah leukosit ikan koi yang diinfeksi bakteri *A. Hydrophila*.

Pada pengamatan aktivitas fagositosis, perlakuan B (0,4 ppt) memberikan pengaruh terbaik terhadap peningkatan proses aktivitas fagositosis pada pra infeksi sebesar 35,73% menjadi 39,12% pada post infeksi bakteri *A. Hydrophila*. Nilai tersebut berbeda jauh dari nilai perlakuan K (0 ppt) pada pra dan post infeksi sebesar 28,18% dan 26,31%. Hal tersebut menjadikan ekstrak daun binahong memberikan pengaruh sangat nyata terhadap peningkatan aktivitas fagositosis ikan koi yang diinfeksi bakteri *A. Hydrophila*. Dari hasil penelitian ini didapat dosis optimum untuk meningkatkan imunostimulan ikan koi sebesar 0,14 - 0,23 ppt.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat, cinta kasih dan karunia serta penyertaan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk Meningkatkan Jumlah Leukosit dan Aktivitas Fagositosis Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*”. sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis megharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan ini. Namun demikian, penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan pihak yang memerlukan.

Malang, Agustus 2014

Penulis

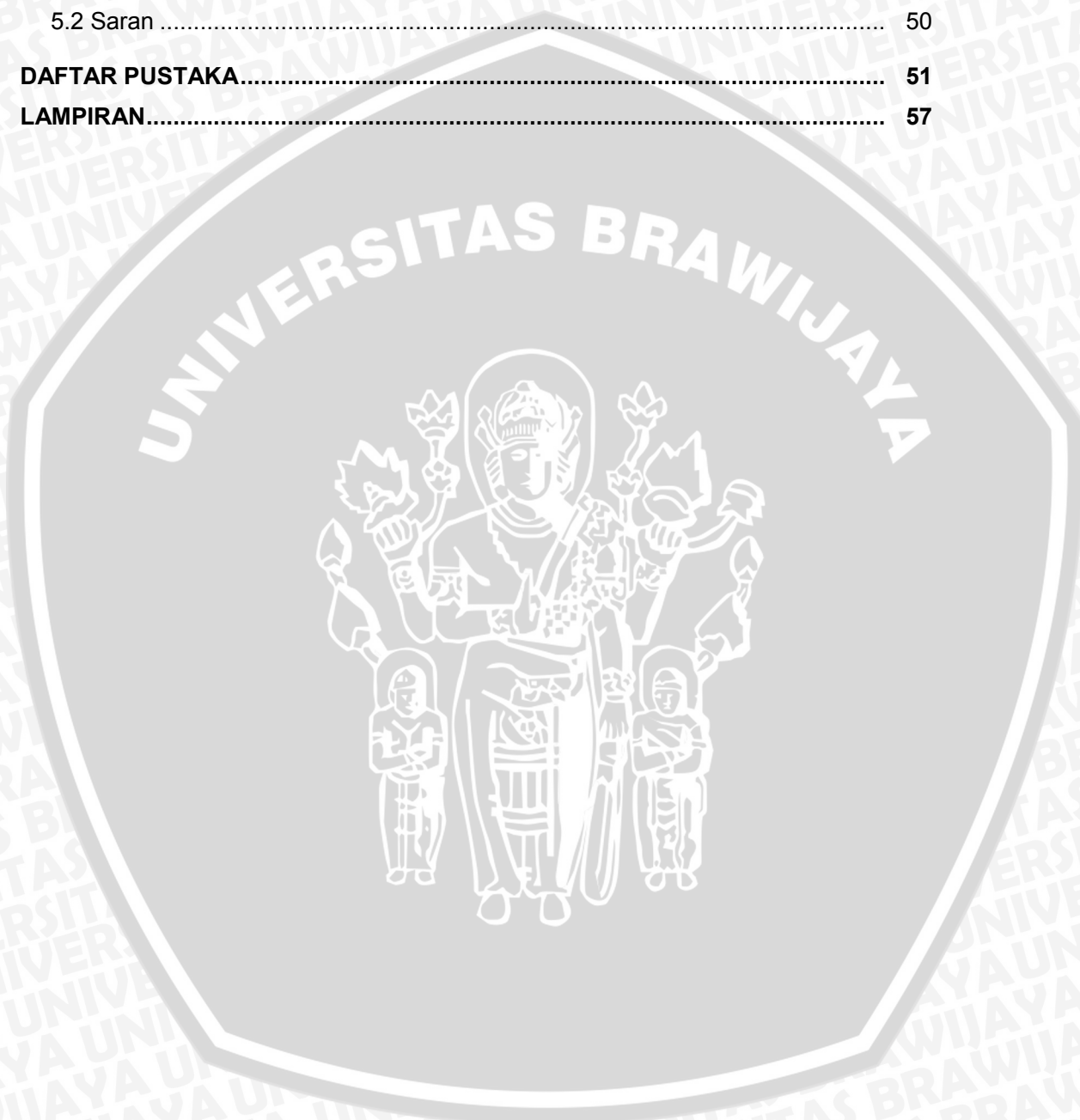


DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN ORISINALITAS	i
UCAPAN TERIMAKASIH.....	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>).....	4
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	4
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	5
2.1.3 Perkembangbiakan.....	6
2.1.4 Makanan dan Kebiasaan Makan.....	7
2.2 Binahong <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	8
2.2.2 Kandungan dan Kegunaan Tanaman Binahong	9
2.2.3 Zat Antimikroba Tanaman Binahong.....	11
a). Flavonoid	11
b). Saponin.....	11
c). Alkaloid.....	11
d). Terpenoid	12
e). Minyak Atsiri.....	12
f). Tanin	12
2.3 Bakteri <i>Aeromonas hydrophilla</i>	13

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	13
2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan.....	14
2.4 Darah Ikan.....	16
2.4.1 Leukosit.....	16
2.5 Aktivitas Fagositosis.....	17
2.5.1 Fagositosis	17
2.6 Sistem Imun Ikan.....	18
2.6.1 Respon Imun Non-Spesifik	18
2.7 Imunostimulan.....	20
2.7.1 Metode Pemberian Imunostimulan	20
3. METODOLOGI	22
3.1 Materi Penelitian.....	22
3.1.1 Alat.....	22
3.1.2 Bahan.....	23
3.2 Metodologi Penelitian	24
3.2.1 Metode Penelitian.....	24
3.2.2 Uji Pendahuluan	24
3.2.3 Rancangan Penelitian.....	26
3.3 Prosedur Penelitian	28
3.3.1 Persiapan Wadah	28
3.3.2 Adaptasi Ikan Uji.....	28
3.3.3 Pembuatan Ekstrak	28
3.3.4 Mekanisme Penelitian.....	29
3.3.5 Bakteri <i>A. Hydrophila</i> 10 ⁹ Standar McFarland.....	29
3.3.6 Pembiakan Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	30
3.3.7 Pemberian Dosis Ekstrak Daun Binahong Sebagai Imunostimulan	31
3.3.8 Penginfeksian Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	31
3.4 Parameter Uji	32
3.4.1 Parameter Utama	32
3.4.2 Parameter Penunjang.....	33
3.5 Analisis Data	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun Binahong (<i>A.cordifolia</i>).....	35
4.2 Jumlah Darah Putih (Leukosit)	36

4.3 Aktivitas Fagositosis	42
4.4 Kualitas Air	48
5. KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	4
2. Induk betina dan jantan ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
3. Daun Binahong <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis.....	8
4. Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	13
5. Sel darah ikan mas strain Sinyonya	17
6. Denah Penelitian.....	27
7. Leukosit.....	37
8. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Jumlah Leukosit Ikan Koi pada Pra Infeksi.....	40
9. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Jumlah Leukosit Ikan Koi pada Post Infeksi.....	40
10. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Aktivitas Fagositosis Pra infeksi <i>A. hydrophila</i>	45
11. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Aktivitas Fagositosis Post infeksi <i>A. hydrophila</i>	45
12. Pengamatan Aktifitas Fagositosis.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat Penelitian	22
2. Bahan Penelitian	23
3. Rancangan Perlakuan	27
4. Standar McFarland	30
5. Hasil Perparasi Daun Binahong	35
6. Jumlah Total Leukosit Ikan Koi Pra dan Post Infeksi.....	36
7. Analisa Sidik Ragam Jumlah Leukosit	38
8. Uji BNT Jumlah Leukosit.....	39
9. Rata-rata Aktivitas Fagositosis (%) Ikan Koi	42
10. Analisa Sidik Ragam Aktivitas Fagositosis.....	43
11. Uji BNT Persentase Aktivitas Fagositosis	44
12. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Alat dan Bahan Penelitian.....	56
2. Bagan Uji Pendahuluan.....	60
3. Ekstraksi Daun Binahong.....	63
4. Pembuatan Media TSA, NB dan Pembiakan Murni Bakteri <i>A. hydrophilla</i>	64
5. Data hasil perhitungan jumlah total leukosit ikan koi.....	66
6. Data hasil perhitungan aktivitas fagositosis ikan koi.....	72



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dewasa ini ekspor non migas, khususnya komoditas ikan hias mengalami peningkatan dengan dibuktikan adanya kenaikan total kontribusi ekspor ikan hias Indonesia dalam neraca perdagangan perikanan pada 2011 mencapai 3,26 juta dollar AS dan hingga April 2012 telah mencapai 5,24 juta dollar AS. Hal tersebut tidak terlepas dari keberadaan lima negara pengimpor ikan hias dunia, antara lain Singapura 2,3 juta dollar AS, Jepang 2,2 juta dollar AS, Amerika Serikat 2 juta dollar AS, Malaysia 1,5 juta dollar AS dan Hongkong sebesar 2,9 juta dollar AS. Dan untuk budidaya ikan koi (*Cyprinus carpio*) itu sendiri dalam sebulan menghasilkan 20.000 ekor ikan koi. Dengan penjualan berkisar 10.000 ekor dengan omzet mencapai Rp 80 juta (Utami, 2013).

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) ini sangat rentan akan serangan hama dan penyakit pada waktu masih dalam bentuk benih, dan penyakit yang sering menyerang seperti bakteri *Aeromonas hydrophila*. Menurut Suhermanto *et al.*, (2011) pada ikan, respon imun baru terbentuk secara sempurna disaat ikan telah dewasa. Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri gram negatif, bersifat saprofit dan parasit obligat. Sehingga bakteri ini mudah sekali menyebar dari satu inang ke inang lainnya. Tetapi hingga saat ini solusi untuk pencegahan penyakit tersebut hanya dilakukan pemberian antibiotik yang mengandung bahan kimia yang dapat menyebabkan resistensi terhadap lingkungan maupun organismenya sendiri, selain itu antibiotik ini juga memiliki harga yang cukup mahal. Menurut Dayanti *et al.*, (2012), pemakaian antibiotika dapat menimbulkan resistensi bakteri *A. hydrophila* terhadap antibiotik tertentu. Pengaruh lain dari penggunaan antibiotik ini dikawatirkan akan menimbulkan akumulasi dalam tubuh ikan dan membahayakan manusia yang mengkonsumsinya.

Salah satu alternatif pencegahan dari efek penyakit yang menyerang ikan yaitu dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan (sistem imun). Mutdjiutami *et al.*, (2005) menyatakan bahwa imunostimulan adalah suatu zat yang termasuk dalam pencegahan, mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Penggunaan immunostimulan pada budidaya ikan merupakan sesuatu yang baru bagi kesehatan ikan dan pencegahan terhadap penyakit. Oleh karena itu perlu dilakukannya penelitian tentang pemanfaatan senyawa aktif binahong (*Anredera cordifolia*(Ten.) Steenis) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa menimbulkan efek resistensi yang dikaji melalui peningkatan leukosit dan aktivitas fagositosis ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Menurut Anasta *et al.*, (2013), hasil skrining fitokimia ekstrak daun binahong mengandung senyawa fenolik, flavonoid, triterpenoid, β -sitosterol, alkaloid, dan saponin yang bersifat antimikroba. Menurut Dayanti *et al.*, (2012), untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotika, maka penanggulangan penyakit ikan diupayakan dengan menggunakan tanaman obat yang mempunyai khasiat anti bakteri (*herbal medicine*).

1.2. Perumusan Masalah

Menurut Saselah *et al.*, (2012), ikan koi merupakan jenis ikan hias air tawar yang bernilai ekonomis penting, dengan peningkatan ekspor non migas sebesar 5,24 juta dollar AS pada tahun 2012. Tetapi seringkali kali petani dan konsumen ikan koi ini mengalami gangguan dalam pemeliharaan yang disebabkan oleh beberapa penyakit, salah satunya adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Namun hingga saat ini pencegahannya masih menggunakan antibiotik yang berbahan kimia yang dapat menyebabkan efek resistensi terhadap lingkungan maupun organismenya, oleh karena itu diperlukan alternatif pencegahan yang ramah lingkungan dengan memanfaatkan senyawa

aktif binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa menimbulkan efek resistensi. Menurut Anasta *et al.*, (2013), Hasil skrining fitokimia ekstrak daun binahong mengandung senyawa fenolik, flavonoid, triterpenoid, β -sitosterol, alkaloid, dan saponin yang bersifat antimikroba. Berkaitan dengan hal tersebut, maka rumusan dari penelitian ini adalah:

- Apakah pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat berpengaruh terhadap peningkatan leukosit dan aktifitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk meningkatkan leukosit dan aktifitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

1.4. Hipotesis

H₀ : Pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) tidak mempengaruhi jumlah leukosit dan aktifitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

H₁ : Pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diduga dapat mempengaruhi jumlah leukosit dan aktifitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Labolatorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret sampai Mei 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan koi menurut Priyagung (2008) adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Superkelas	: Gnathostomata
Kelas	: Osteichthyes
Superordo	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysi
Famili	: Cyprinidae
Genus	: Cyprinus
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>



Gambar 1. Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) (Susanto, 2005).

Badan ikan koi berbentuk seperti torpedo dengan perangkat gerak berupa sirip, yang meliputi sebuah sirip punggung, sepasang sirip dada, sepasang sirip perut, sebuah sirip anus, dan sebuah sirip ekor. Pertumbuhan badannya bergantung pada suhu air, pakan dan jenis kelamin. Dalam tempo setengah tahun

ikan koi tumbuh sangat cepat. Umumnya ikan koi jantan tumbuh langsing, sedangkan ikan koi betina membulat. Sampai umur 2 tahun, ikan koi jantan tumbuh lebih pesat dibandingkan betina. Namun setelah itu terjadi sebaliknya, betina tumbuh lebih pesat daripada jantan. Di dalam air ikan koi mampu mengenali pakannya dan bahkan mencarinya di antara lumpur dan kotoran, karena ikan koi mempunyai organ penciuman yang sangat tajam. Organ pencium ini berupa dua pasang kumis yang menghiasi mulutnya (Susanto, 2005).

2.1.2 Habitat dan Daerah Penyebaran

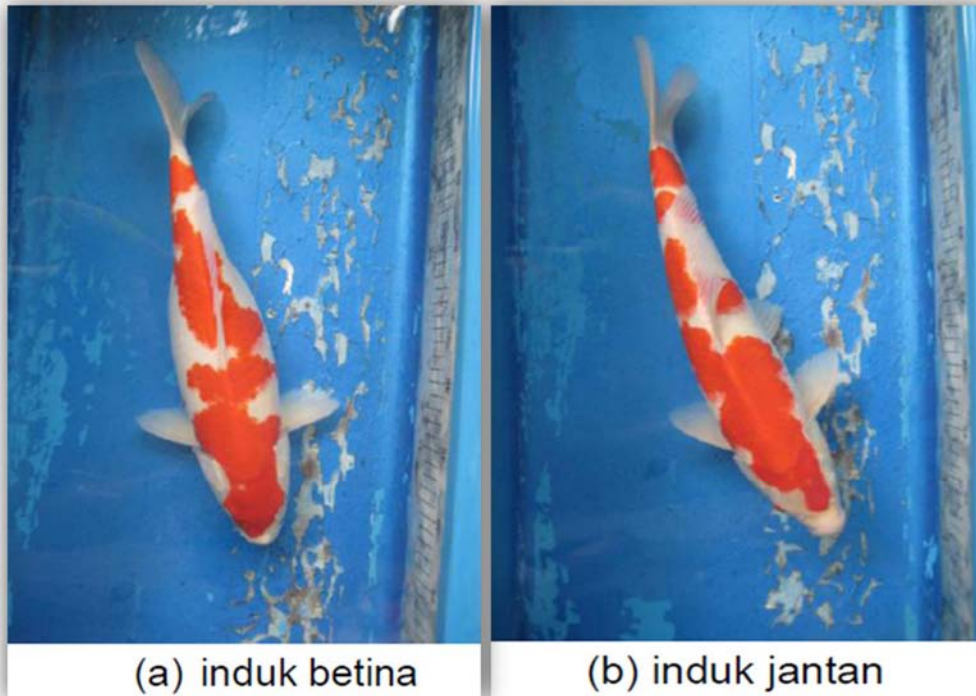
Ikan koi (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu jenis ikan hias yang saat ini sedang mendapat perhatian pemerintah Jawa Timur untuk pengembangan budidayanya, karena menurut Gustiano *et al.*, (2008), Jawa Timur merupakan salah satu daerah penghasil ikan hias air tawar terbesar di Indonesia. Menurut Trimariani dan Rustikawati (1990), daerah pengembang budidaya ikan hias di Jawa Timur yaitu Kabupaten Kediri, Tulungagung, serta Blitar sebagai sentra budidaya ikan koi.

Ikan koi merupakan ikan air tawar, akan tetapi ikan koi masih dapat hidup pada air yang agak asin. Ikan koi masih bisa bertahan hidup pada air dengan salinitas 10 ppt. Ikan koi hidup pada salinitas berkisar 6 - 7,5 ppt, akan tetapi ikan koi masih bisa hidup pada salinitas basah antara 5 - 6 ppt. Kisaran pH yang dibutuhkan ikan koi agar tumbuh sehat yaitu pada kisaran 6,5 - 8,5 (Susanto, 2005).

Ikan koi merupakan hewan yang hidup di daerah beriklim sedang dan bisa hidup pada suhu 8°C - 30°C. Oleh karena itu ikan koi bisa dipelihara di seluruh wilayah Indonesia, mulai dari pantai hingga pegunungan. Ikan koi asli merupakan ikan air tawar, tapi masih bertahan pada air yang agak asin, yaitu sekitar 10 permil (Ardias, 2008).

2.1.3 Perkembangbiakan

Ikan koi umumnya mencapai ukuran induk pada umur dua atau tiga tahun. Tidak ada perlakuan khusus dalam pematangan induk, untuk memacu pematangan induk yang dilakukan adalah pemberian pakan dengan takaran dan kandungan nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan tubuh induk. Syarat utama induk adalah calon induk sudah matang kelamin. Matang kelamin artinya induk jantan sudah menghasilkan sperma dan induk betina sudah menghasilkan telur yang matang. Induk jantan matang kelamin bila perutnya diurut akan mengeluarkan cairan berwarna putih pekat, sperma. Sedangkan induk betina dilihat dari ukuran perut yang membesar dan warna lubang genital kemerahan. Matang tubuh artinya, secara fisik induk ikan sudah siap menjadi induk-induk produktif (Firdaus, 2010).



Gambar 2. Induk betina dan jantan ikan koi (*Cyprinus carpio*) (Firdaus, 2010)

Menurut Firdaus (2010), pemijahan ikan koi dilakukan dengan perbandingan satu ekor induk betina dengan dua atau tiga ekor induk jantan. Bila induk jantan berukuran besar cukup satu banding satu. Namun, perbandingan ini

cukup beresiko. Jika induk jantan tersebut tidak mengeluarkan sperma, maka pemijahan gagal dilakukan. Pemilihan varietas induk jantan dan betina sangat mempengaruhi varietas benih yang akan dihasilkan. Maka, jika ingin menghasilkan varietas anak tertentu harus mengetahui kombinasi yang tepat antara varietas jantan dan betinanya.

2.1.4 Makanan dan Kebiasaan Makan

Menurut Khairuman dan Sudenda (2002), ikan koi bersifat omnivor, artinya memakan segala. Dengan demikian dapat diberikan jenis pakan yang beranekaragam, misalnya ikan kecil, kerang–kerangan atau jenis tumbuh–tumbuhan. Pakan utama anak ikan koi adalah udang–udang renik seperti *Daphnia* sp. Sejalan dengan pertumbuhan badannya mereka dapat memakan serangga air, jentik–jentik nyamuk atau lumut–lumut yang menempel pada tanaman. Pakan ikan koi akan mempengaruhi pembentukan zat warna tubuhnya. Tubuh ikan koi yang berwarna–warni disebabkan adanya zat warna yang antara lain: zat pigmen karoten (jingga), rutin (kuning), atasantun (merah).

Menurut Firdaus (2010), larva tidak diberi pakan dari luar hingga kuning telur habis (kurang lebih umur 5 hari). Saat umur 5 hari dilakukan penjarangan larva untuk mencegah kematian massal karena jumlah yang terlalu padat. Penjarangan dilakukan dengan membagi larva yang ada ke dalam dua kolam pemeliharaan larva. Menurut Susanto (2005), di dalam air ikan koi mampu mengenali pakannya dan bahkan mencarinya diantara lumpur didasar kolam, karena ikan koi mempunyai organ penciuman yang sangat tajam. Organ penciuman ini berupa dua pasang kumis yang terletak pada bagian kiri dan kanan mulutnya. Ikan koi akan memburu sepotong pakan atau mengaduk–aduk lumpur untuk mendapatkan pakan yang dibutuhkan. Mulut ikan koi berukuran cukup besar dan dapat disembulkan. Letaknya diujung moncong (terminal). Air bersama –

sama pakan memasuki rongga mulut. Pakan yang kecil langsung ditelan dan air ditelan lewat insang setelah keping–keping insang menyerap oksigen yang terdapat di air, pakan masuk kedalam kerongkongan pakan dibawa langsung ke usus yang panjangnya sekitar 5x panjang tubuh.

2.2 Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi tanaman binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Menurut

Khunaifi (2010) adalah :

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
- Sub Kelas : Hamamelidae
- Ordo : Caryophyllales
- Famili : Basellaceae
- Genus : *Anredera*
- Spesies : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis



Gambar 3. Daun Binahong *Anredera cordifolia*(Ten.) Steenis (Manoi, 2009).

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah tanaman obat potensial yang dapat mengatasi berbagai jenis penyakit. Tanaman ini berasal

dari dataran Cina dengan nama asalnya adalah Dheng shan chi, di Inggris disebut *madeira vine*. Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) termasuk dalam famili Basellaceae merupakan salah satu tanaman obat yang mempunyai potensi besar ke depan untuk diteliti, karena dari tanaman ini masih banyak yang perlu digali sebagai bahan fitofarmaka. Tanaman ini berasal dari Cina dan menyebar ke Asia Tenggara. Tanaman merambat ini perlu dikembangkan dan diteliti lebih jauh. Terutama untuk mengungkapkan khasiat dari bahan aktif yang dikandungnya. Berbagai pengalaman yang ditemui di masyarakat, binahong dapat dimanfaatkan untuk membantu proses penyembuhan penyakit-penyakit berat (Manoi, 2009).

Tanaman binahong berupa tumbuhan menjalar, berumur panjang, bisa mencapai panjang +/- 5 m. Akar berbentuk rimpang, berdaging lunak. Batang lunak, silindris, saling membelit, berwarna merah, permukaan halus, kadang membentuk semacam umbi yang melekat di ketiak daun dengan bentuk tak beraturan dan bertekstur kasar. Daun tunggal, bertangkai sangat pendek, tersusun berseling, berwarna hijau, panjang 5 - 10 cm, lebar 3 - 7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk, tepi rata, permukaan licin, bisa dimakan. Bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5 - 1 cm, berbau harum. Perbanyak generatif (biji), namun lebih sering berkembang atau dikembangbiakan secara vegetatif melalui akar rimpangnya (Mus, 2008).

2.2.2 Kandungan Dan Kegunaan Tanaman Binahong

Manfaat tanaman ini sangat besar dalam dunia pengobatan, secara empiris binahong dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Dalam pengobatan, bagian tanaman yang digunakan dapat berasal dari akar, batang,

daun, dan bunga maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Tanaman ini dikenal dengan sebutan *Madeira Vine* dipercaya memiliki kandungan antioksidan tinggi dan antivirus. Tanaman ini masih diteliti meski dalam lingkup terbatas. Percobaan pada tikus yang disuntik dengan bahan ekstrak dari binahong dapat meningkatkan daya tahan tubuh, peningkatan agresivitas tikus dan tidak mudah sakit. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah: kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke, wasir, rheumatik, pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan, menyembuhkan segala luka dalam dan khitanan, radang usus, melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing-pusing, sakit perut, menurunkan panas tinggi, menyuburkan kandungan, maag, asam urat, keputihan, pembengkakan hati, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh, (Manoi, 2009).

Menurut Tshikalange *et al.*, (2007). ekstrak air akar binahong dengan dosis 50 mg/ml memiliki daya hambat terhadap bakteri Gram-positif (*B.pumilus*, *B.subtilis* dan *S.aureus*) serta pada bakteri Gram-negatif (*Enterobacter cloacae*, *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, dan *Enterobacter aerogenes*) pada dosis 60 mg/ml, tetapi tidak pada bakteri *B.sereus*. Rachmawati (2007) telah melakukan skrining fitokimia daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis dengan melakukan maserasi terhadap serbuk kering daun dengan menggunakan pelarut n-heksana dan metanol didapatkan kandungan kimia berupa saponin triterpenoid, flavanoiod dan minyak atsiri. Rochani (2009). melakukan ekstraksi dengan cara maserasi daun binahong dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan etanol, setelah dilakukan uji tabung ditemukan kandungan alkaloid, saponin dan flavanoid, sedangkan pada analisis secara KLT ditemukan senyawa alkaloid, saponin dan flavanoid. Setiaji (2009) telah melakukan ekstraksi pada rhizome binahong dengan pelarut etil asetat, petroleum eter, dan etanol 70%

di dapatkan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan polifenol. Pada ekstrak dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 2 % dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Selain itu juga dijelaskan (Uchida, 2003) bahwa di dalam daun binahong terdapat aktifitas antioksidan, asam askorbat dan total fenol yang cukup tinggi.

2.2.3 Zat Antimikroba Tanaman Binahong

a). Flavanoid

Flavanoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, menthanol, butanol, aseton, dan lain-lain (Markham,1988). Flavanoid dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavanoid, gula yang terikat pada flavanoid mudah larut dalam air (Harbone,1996). Flavanoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, senyawa fenol mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Nurachman (2002) menambahkan bahwa senyawa-senyawa flavanoid umumnya bersifat antioksidan dan banyak yang telah digunakan sebagai salah satu komponen bahan baku obat-obatan.

b). Saponin

Saponin dibedakan sebagai saponin triterpenoid dan saponin steroid.. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba dan saponin tertentu menjadi penting karena dapat diperoleh dari beberapa tumbuhan dengan hasil yang baik dan digunakan sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid yang digunakan dalam bidang kesehatan. Saponin merupakan glukosida yang larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter (Nurachman, 2002).

c). Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Alkaloid sering bersifat racun bagi manusia dan banyak yang mempunyai kegiatan

fisiologi yang menonjol, jadi digunakan secara luas dalam bidang pengobatan.

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Robinson, 1995).

d). Terpenoid

Terpenoid atau isoprenoid merupakan salah satu senyawa organik yang hanya tersebar di alam. Terpenoid banyak ditemukan dalam tumbuhan tingkat tinggi sebagai minyak atsiri yang memberi bau harum dan bau khas pada tumbuhan dan bunga. Selain itu terpenoid juga terdapat dalam jamur, invertebrata laut dan feromon serangga. Sebagian besar terpenoid ditemukan dalam bentuk glikosida atau glikosil ester. Terpenoid tumbuhan mempunyai manfaat penting sebagai obat tradisional, anti bakteri, anti jamur dan gangguan kesehatan (Thomson, 1993).

e). Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan senyawa volatil yang dihasilkan oleh jaringan tertentu suatu tanaman, baik berasal dari akar, batang, daun, kulit, bunga, bijibijian. Ajizah (2004) menjelaskan, minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen.

f). Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang diduga berperan sebagai antibakteri, karena dapat membentuk kompleks dengan protein dan interaksi hidrofobik. Tanin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang bersifat fenol, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanismenya adalah dengan merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan ikatan

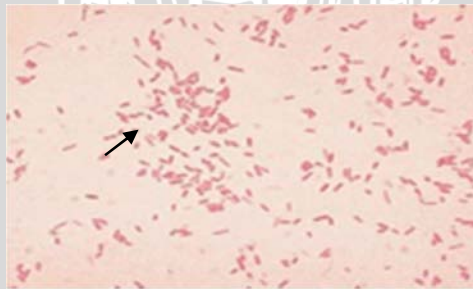
senyawa kompleks terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu ikatan kompleks tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. (Akiyama *et al.*, 2001). Ajizah, (2004) menjelaskan, aktivitas antibakteri senyawa tanin adalah dengan cara mengkerutkan dinding sel atau membran sel, sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati.

2.3 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

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

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



Gambar 4. Bakteri *A. hydrophila* (↗) (Anonymous, 2012c).

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0-1,5 μm dan lebar 15,7-15,8 μm , termasuk bakteri Gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu polar flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakultatif

anaerobik dan merupakan bakteri penyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37° C. Berikut merupakan gambar bakteri *A. hydrophila* ditunjukkan pada Gambar 4.

2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

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

Bakteri *A. hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen ydan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair. Bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-30°C, pH 5,5–9. Perkembangbiakannya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1993).

A. hydrophila sering muncul pada musim kemarau, karena pada musim ini kandungan bahan organik perairan tinggi. Kandungan O₂ yang rendah, suhu tinggi, dan akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan serta pola padat penebaran dengan kepadatan tinggi akan berkorelasi positif terhadap perkembangbiakannya (Christian *et al.*, 2001).

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

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

Menurut Gardenia *et al.*, (2010), *A. hydrophila* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang banyak ditemukan di lingkungan air tawar dan air payau. *A. hydrophila* dikenal dengan bakteri oportunistis karena biasanya menimbulkan masalah pada saat ikan sedang mengalami stress pada ikan. Infeksi bakteri dapat menyebabkan kematian masal dan merusak mutu ikan yang terinfeksi sehingga sangat merugikan bagi pembudidaya.

A. hydrophila sebelum melakukan infeksi, terlebih dahulu melakukan penempelan menggunakan flagel ke dalam *host cell*. Faktor virulen dalam mikroba beradaptasi dalam sel host/inang dan memantapkan keberadaannya. Umumnya aeromonas menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh ikan disertai dengan pendarahan pada organ dalam. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi dan dapat mengakibatkan kematian benih sampai 90 % (Shome dan Shome, 1999).

Infeksi bakteri dapat terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau masuk melalui insang, kemudian masuk ke pembuluh darah dan akan menyebar pada organ dalam lainnya. Infeksi bakteri gram negatif ini bersifat laten (berkepanjangan), jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit

meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Organ yang dapat diserang antara lain insang, ginjal, pankreas, spleen bahkan otot tulang. Simptom penyakit ini bervariasi mengingat kondisi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain virulensi dari bakteri, resistensi ikan terhadap infeksi, hadir atau tidaknya septicemia dan bacteremia serta faktor yang diasosiasikan dengan stres pada ikan (Kabata, 1985).

2.4 Darah Ikan

Darah terdiri dua kelompok besar yaitu sel dan plasma. Darah dianggap sebagai jaringan khusus sirkulasi, terdiri atas berbagai macam sel dalam cairan yang disebut plasma. Darah tersusun atas cairan darah (plasma darah) dan elemen-elemen seluler (sel-sel darah). Plasma darah terdiri dari air, protein (albumin, globulin, dan faktor-faktor koagulasi), lipid dan ion. Sel darah terdiri dari sel darah merah (eritrosit) dan sel darah putih (leukosit). Sel dan cairan darah (plasma darah) mempunyai peran fisiologi sangat penting (Fujaya, 2004).

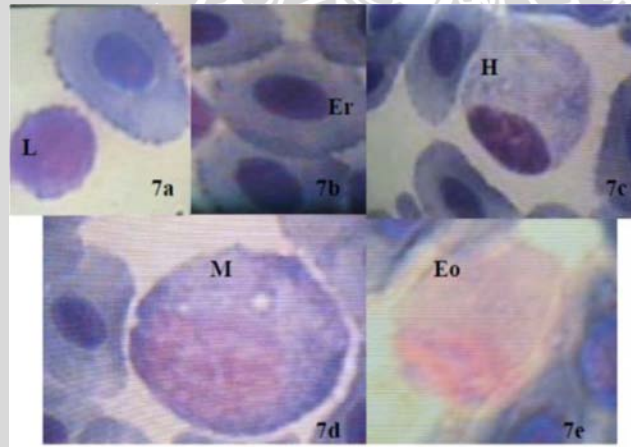
Berdasarkan warnanya sel darah dibagi menjadi sel darah merah dan sel darah putih. Darah mengandung sel-sel yang dirancang untuk mencegah infeksi, menghentikan pendarahan dan mengangkut hormon. Sel darah mempunyai peranan sangat penting dalam sistem kekebalan, terutama leukosit atau sel darah putih. Jenis-jenis leukosit mempunyai beberapa fungsi dalam melawan benda asing yang berhasil masuk ke dalam tubuh (Johnny *et al.*, 2003).

2.4.1 Leukosit

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

melindungi tubuh dari infeksi. Sel ini bekerja sama dengan erat bersama protein respon imun, immunoglobulin dan komplemen. Neutrofil, eosinofil, basofil dan monosit merupakan fagosit (Hoffbrand dan Atul, 2005).

Leukosit memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan sel darah merah, yaitu berkisar antara $20.000/\text{mm}^3$ hingga $150.000/\text{mm}^3$. Bentuk sel darah putih adalah lonjong hingga bulat. Leukosit terdiri dari agranulosit (monosit dan limfosit) dan granulosit (heterofil, eosinofi dan basofil). *Leukosit* memiliki bermacam-macam fungsi, erat kaitannya untuk menghilangkan benda asing (termasuk mikroorganisme patogen). Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah leukosit adalah kondisi dan kesehatan tubuh ikan. Infiltrasi granulosit muncul 12-24 jam setelah diinjeksi oleh bakteri pada ikan rainbow trout. Setelah itu persentase granulosit dan makrofag akan meningkat hingga 2-4 hari (Noercholis *et al.*, 2013).



Gambar 5. Sel darah ikan mas strain Sinyonya: 7a. Limfosit (L), 7b. Eritrosit (Er), 7c. Heterofil (H), 7d. Monosit (M), 7e. Eosinofil (Eo) (Noercholis *et al.*, 2013).

2.5 Aktivitas Fagositosis

2.5.1 Fagositosis

Fagositosis adalah proses penyerapan dan eliminasi mikroba atau partikel lain oleh sel-sel khusus yang disebut fagosit. Fagosit adalah sel-sel darah putih atau sel-sel yang berasal dari sel-sel darah putih tersebut, yang terdapat di dalam

aliran darah. Di dalam proses penghancuran bakteri atau kuman, fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau virus berada. Peningkatan kekebalan tubuh dapat diketahui dari aktivitas sel fagosit dari hemosit. Sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan (Brown, 2000 *dalam* Amrullah, 2004).

Menurut Yahya (2003), mekanisme terbentuknya antibodi spesifik karena rangsangan antigen dimulai dari masuknya antigen ke dalam tubuh ikan, kemudian difagositosis (dimakan) oleh makrofag. Fagositosis adalah salah satu elemen paling penting dalam sistem kekebalan. Proses ini memberi perlindungan segera dan efektif terhadap infeksi. Mekanisme pertahanan tubuh terdiri atas tiga tahapan penting, yaitu :

1. Pengenalan musuh yang dihadapi. Dalam hal ini musuh yang dihadapi adalah antigen (mikroorganisme), bisa berupa bakteri ataupun virus.
2. Penghancuran antigen oleh sistem pertahanan.
3. Kembali ke keadaan normal.

2.6 Sistem Imun Ikan

2.6.1 Respon Imun Non-Spesifik

Respon imun terdiri dari respon seluler dan respon humoral. Respon seluler bersifat nonspesifik sedangkan respon humoral bersifat spesifik. Aktivitas respon imunitas tersebut dapat distimulasi oleh imunostimulator. Respon imunitas dibentuk oleh jaringan limfoid yang menyatu dengan myeloid yang dikenal dengan jaringan limfomyeloid pada ikan. Organ limfomyeloid pada ikan teleostei adalah limpa, hati dan ginjal depan. Produk jaringan limfomyeloid adalah sel-sel darah dan respon imunitas baik seluler maupun humoral. Interleukin, interferon, dan sitokin tersebut berperan sebagai komunikator dan amplikasi dalam mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan. Oleh sebab itu, mekanisme pertahanan

tubuh yang sinergis antara pertahanan humoral dan seluler ditandai dengan adanya interleukin, interferon, dan sitokin (Aliffudin, 1999).

Pembentukan respon imun dimulai oleh stimulasi patogen (antigen). Setelah terjadi aklifasi antigenik, melalui proses fagositosis makrofag yang merupakan pertahanan pertama akan menghancurkan antigen tersebut, mengirimkan sandi-sandi ke sel-sel limfosit. Sel limfosit berpoliferasi membentuk sel T (respon imun seluler) dan sel B (respon imun humoral). Sel T akan membentuk sel efektor yang berperan dalam respon pertahanan yang diperantai sel. Sel efektor ini berpartisipasi dalam eliminasi benda asing melalui suatu proses fagositosis. Sedangkan sel B akan membentuk antibodi (immunoglobulin). Selain membentuk antibodi terhadap suatu patogen, sel B juga membentuk sel memori terhadap patogen tersebut. Dengan adanya sel memori ini akan mempercepat waktu pembentukan respon sekunder terhadap patogen yang sama (Lamers *et al.*, 1985).

Imunostimulan merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan baik seluler maupun humoral (Alifuddin, 1999).

Seperti halnya dengan vaksin, imunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (oral) dan perendaman. Pemilihan cara aplikasi imunostimulan ini didasarkan pada kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya. Pemanfaatan dalam kegiatan budidaya ini dapat mengoptimalkan produksi budidaya melalui peningkatan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit infeksi (Anderson, 1992).

Alternatif penanggulangan agar ikan tidak terinfeksi bakteri yaitu dengan pemberian imunostimulan. Imunostimulan merupakan zat kimia, obat-obatan, stresor, atau aksi untuk meningkatkan respon imun ikan yang berinteraksi secara langsung dengan sel sistem imun (Sakai, 1999).

Menurut Anderson (1992) cara penggunaan immunostimulan memiliki pola yang sama dengan penggunaan antibiotik atau bahan kimia, tetapi penggunaannya masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Pada pemberian dosis tinggi immunostimulan akan menyebabkan penekanan mekanisme pertahanan. Pemberian dosis rendah, immunostimulan menjadi tidak efektif, hal ini nyata pada pemberian secara suntikan. Pada penyelidikan levamisol, penyuntikan dosis tinggi menyebabkan penekanan respon imun spesifik dan penurunan jumlah leukosit.

2.7 Immunostimulan

2.7.1 Metode Pemberian Immunostimulan

Menurut Dayanti *et al.*, (2012), Dosis immunostimulan untuk ikan uji direndam dengan menggunakan ekstrak ke dalam 5 liter air dengan konsentrasi P1 (0,2 g/l), P2 (0,4 g/l), P3 (0,6 g/l) selama 5 menit, pada saat perendaman diberikan aerasi, setelah itu ikan diambil secara perlahan dan dimasukkan kembali ke dalam akuarium, perendaman dilakukan 1 kali sehari selama 30 hari. Pada hari ke 31 darah ikan diambil untuk dilakukan pemeriksaan hematologi. Setelah diistirahatkan selama 2 hari ikan diinfeksi dengan *A. hydrophila*. Gejala klinis ikan diamati selama 14 hari.

Menurut Jasmanidar (2009), immunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan immunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Dugger dan Jory (1999) dalam Jasmanidar (2009), menyatakan bahwa pemberian immunostimulan secara luas dengan maksud untuk mengaktifkan sistem imun non spesifik sel seperti makrofag pada vertebrata dan *hemocyte* pada avertebrata. Pemberian immunostimulan dapat dilakukan dengan :

- Penyuntikan : penyuntikan *beta glucan* dan stimulant imun lainnya dapat memberikan respon non spesifik yang kuat, tetapi biasa tidak praktis dan efektif dalam hal biaya dalam usaha budidaya.
- Perendaman : memberikan respon imun non spesifik yang sedikit, tetapi lebih efektif dalam hal biaya daripada dengan penyuntikan. Namun dapat menimbulkan stress karena meningkatnya penanganan dan kepadatan dalam perendaman. Makrofag dapat diaktifkan pada fase larva ikan.
- Oral : memberikan respon imun non spesifik yang baik dan merupakan metode yang lebih efektif.

Seperti halnya dengan vaksin, immunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (oral) dan perendaman. Pemilihan cara aplikasi immunostimulan ini didasarkan pada kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya. Pemanfaatan dalam kegiatan budidaya ini dapat mengoptimalkan produksi budidaya melalui peningkatan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit infeksi (Anderson, 1990 dalam Jasmanidar, 2009).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Berikut alat beserta fungsinya yang akan digunakan dalam penelitian ini

terdapat pada Tabel 1 :

Tabel 1. Alat penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Baskom	Sebagai tempat bahan binahong
2	Gunting atau pisau	Sebagai alat pemotong bahan
3	Timbangan Analitik	Untuk menimbang bahan
4	Timbangan Digital	Untuk menimbang bahan
5	Beaker Glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
6	Gelas Ukur	Sebagai alat dalam mengukur bahan larutan
7	Labu Erlenmeyer	Sebagai tempat pembiakan bakteri
8	Botol Akuades	Sebagai tempat akuades
9	Cawan Petri	Sebagai tempat agar dan bakteri
10	Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
11	Autoklave	Sebagai alat sterilisasi
12	Loyang	Sebagai tempat bahan dalam proses waterbath
13	Bunsen	Sebagai alat sterilisasi
14	Magnetik Stirer	Untuk menghomogenkan larutan
15	Tabung Reaksi	Sebagai tempat kultur bakteri
16	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
17	Jarum Ose	Sebagai alat penggoresan bakteri
18	Spektrofotometer	Untuk mengukur panjang gelombang bahan
19	Spatula	Untuk menghomogenkan larutan
20	Hot Plate	Sebagai alat pemanas
21	Lemari Pendingin	Untuk menyimpan bakteri pada suhu rendah
22	Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
23	Pipet Volume	Untuk mengambil larutan dalam jumlah banyak
24	Mikropipet	Untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit
25	Bola Hisap	Sebagai alat bantu untuk mengambil larutan
26	Triangle	Sebagai penyangga pada bunsen
27	Mistar	Untuk mengukur zona hambat bakteri
28	Akuarium	Sebagai wadah air media
29	Aerator dan Batu Aerasi	Sebagai alat bantu penghasil oksigen
30	Selang Aerator	Sebagai alat bantu aerasi
31	Blower	Sebagai alat penghasil oksigen
32	Scoop Net	Untuk memindahkan ikan uji
33	Termometer	Untuk mengukur suhu
34	pH Meter	Untuk mengukur pH air media
35	DO Meter	Untuk mengukur kandungan oksigen terlarut
36	Mikroskop	Sebagai alat mengamati sel makrofag dalam darah
37	Obyek Glass	Untuk tempat darah yang diamati di mikroskop

38	Cover Glass	Sebagai penutup obyek glass
39	Jarum Suntik (Sprit)	Untuk mengambil darah ikan uji
40	Haemocytometer	Untuk menghitung jumlah sel makrofag
41	Hand Tally Counter	Sebagai alat bantu menghitung jumlah sel makrofag
42	Selang Sifon	Untuk membersihkan air media di akuarium
43	Filter	Untuk menyaring air media
44	Oven	Sebagai alat pemanas
45	Kamera Digital	Sebagai alat dokumentasi pengambilan gambar
46	Avendof	Sebagai tempat sampel darah ikan uji
47	Rotary evaporator vacuum	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak fenol
48	Sentrifuge	Sebagai alat setrifugasi suspensi makrofag

3.1.2 Bahan

Berikut bahan beserta fungsinya yang akan digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Ekstrak kasar binahong	Sebagai bahan immunostimulan
2	Biakan Murni Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	Sebagai bahan penginfeksi
3	Spirit	Sebagai bahan bakar bunsen
4	Kertas cakram	Bahan zona hambat
5	Alkohol	Sebagai bahan sterilisasi
6	Etanol 96%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
7	Akuades	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
8	Kertas Label	Sebagai penanda
9	Kertas Koran	Sebagai pembungkus sterilisasi
10	Kertas Saring	Untuk menyaring bahan ekstrak
11	Tissue	Sebagai bahan pembersih
12	Kapas	Untuk menutup labu erlemeyer
13	Aluminium Foil	Sebagai penutup tabung reaksi dan erlemeyer
14	Benang	Sebagai pengikat
15	Masker	Sebagai penutup mulut
16	Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan
17	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	Sebagai media kultur bakteri (cair)
18	TSA (<i>Tryptone Soya Agar</i>)	Sebagai media tumbuh bakteri
19	Natrium Fisiologis	Sebagai larutan isotonis
20	NA (<i>Nutrient Agar</i>)	Sebagai bahan peremajaan bakteri
21	Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	Sebagai hewan uji
22	Air Media	Sebagai media hidup hewan uji
23	Pakan Ikan	Sebagai nutrisi ikan uji
24	Na Sitrat 3,8%	Sebagai antikoagulan

25	Larutan Giemsa	Sebagai pewarnaan darah ikan
26	RPMI FBS 2%	Sebagai bahan medium dalam aktivitas fagositosis
27	Chlorin	Untuk bahan diisfektan pada akuarium
28	Na-Thiosulfat	Untuk menghilangkan toksik pada akuarium

3.2. Metodologi Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental, dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi.

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

3.2.2 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui nilai uji LC50 (Lethal concentration) dimana batas dosis toleransi ikan terhadap bahan ekstrak, sehingga dosis bersifat immunostimulan dan tidak mematikan ikan. Selain itu juga dilakukan uji booster, yang bertujuan untuk mengetahui waktu perendaman ikan dengan baham ekstrak yang optimal untuk peningkatan immunostimulan.

Pada awal uji LC50 menggunakan dosis ekstrak untuk perendaman yaitu 0 ppt, 0,2 ppt, 0,4 ppt, 0,6 ppt, 0,8 ppt, 1 ppt dan 1,2 ppt. Kemudian didapat nilai

LC50, dimana ikan mengalami kematian hingga 50% populasi awal pada dosis 0,8 ppt. Jadi dosis di atas 0,8 ppt bersifat mematikan bagi hewan uji dan dosis dibawah 0,8 ppt bersifat immunostimulan. Dengan hasil tersebut maka dalam penelitian ini digunakan dosis ekstrak daun binahong untuk peningkatan immunostimulan yaitu 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt. Menurut Dayanti *et al.*, (2012), hasil perendaman dosis sebesar 0,6 ppt optimal untuk pencegahan. Penelitian Lukistyowati (2012), menunjukan Larutan sambiloto tidak bersifat racun bagi ikan bila diberikan dibawah dosis 6 g/l, sehingga bila di aplikasi pada ikan diperlukan pembatasan dosis larutan yang tidak bersifat racun tetapi dapat meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap serangan bakteri.

Setelah uji LC50 dilakukan uji LD50 untuk mengetahui pada kepadatan berapa dan berapa lama, bakteri *A. hydrophila* dapat membunuh ikan uji sebanyak 50% dari populasi awal. Dari hasil uji pendahuluan didapat hasil uji LD50 dengan kepadatan bakteri *A. hydrophila* 10^7 sel/ml dapat membunuh ikan uji sebanyak 50% dari populasi awal selama 24 jam.

Uji booster menggunakan waktu perendaman 5 menit, 50 menit, 500 menit, dan 1500 menit dengan masing-masing menggunakan dosis dari hasil uji LC50 yaitu 0 ppt, 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt. Dari hasil uji booster didapat waktu yang optimum untuk meningkatkan immunostimulan yaitu dengan perendaman selama 50 menit. Jadi dalam penelitian ini menggunakan dosis ekstrak bahan binahong sebesar 0 ppt, 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt dengan waktu perendaman selama 50 menit. Dan kemudian dilakukan uji tantang menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi 10^7 sel/ml dengan pengamatan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis. Menurut Sahan dan Duman (2010) dalam Samad (2010), sel leukosit dapat diaktivasi oleh substansi kimia seperti immunostimulan sehingga menyebabkan resistensi terhadap virus, bakteri, jamur dan infeksi parasit. Oleh

karena itu, jumlah jumlah sel leukosit dapat digunakan sebagai parameter awal penentuan konsentrasi imunostimulan.

3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

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

Penelitian ini terdiri dari satu faktor penelitian dengan 3 perlakuan dan 1 kontrol dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis ekstrak binahong terhadap ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Sebagai perlakuan, menggunakan ikan koi yang berumur 4-5 bulan dengan berat 25-35 gram dan panjang 8-10 cm (Laelawati, 2008).

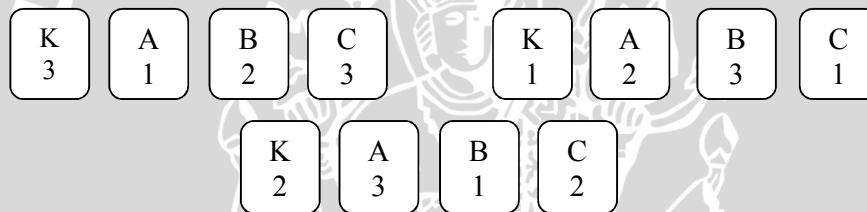
Dosis ekstrak binahong yang digunakan mengacu dari hasil uji pendahuluan dengan menggunakan dosis 0 ppt, 0.2 ppt, 0.4 ppt, 0.6 ppt, 0.8 ppt 1 ppt, dan 1,2

ppt menghasilkan nilai toksisitas pada dosis diatas 0.8 ppt, jadi dosis ekstrak yang digunakan dibawah dosis 0.8 ppt yaitu dosis C: 0.2 ppt, B: 0.4 ppt, A: 0.6 ppt dan K: 0 ppt. Menurut Dayanti *et al.*, (2012), hasil perendaman dosis sebesar 0,6 ppt optimal untuk pencegahan atau memacu peningkatan jumlah leukosit maupun aktifitas fagositosis.

Tabel 3. Rancangan Perlakuan

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

Untuk denah penelitian dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Denah Penelitian

Keterangan:

A : Perlakuan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* serta perendaman dengan dosis 0,2 ppt ekstrak daun binahong pada ulangan ke-n.

B : Perlakuan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* serta perendaman dengan dosis 0,4 ppt ekstrak daun binahong pada ulangan ke-n.

C : Perlakuan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* serta perendaman dengan dosis 0,6 ppt ekstrak daun binahong pada ulangan ke-n.

K : Kontrol infeksi/kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak daun binahong dengan penginfeksi bakteri).

1,2,3: Ulangan.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Wadah

Akuarium sebanyak 15 buah dengan ukuran 30x30x30 cm yang dilengkapi dengan aerator, selang dan batu aerasi. Sebelum digunakan akuarium tersebut disuci hamakan dengan larutan 2 ml chlorin selama 24 jam, kemudian diisi air dengan ketinggian air 30 cm, dan diaerasi selama 24 jam.

3.3.2 Adaptasi Ikan Uji

Ikan koi yang digunakan berukuran 10 - 12 cm berasal dari kelompok pembudidaya ikan koi di Desa Kemloko, Blitar. Sebelum perlakuan, ikan uji terlebih dahulu diadaptasikan selama 5 hari. Selama adaptasi ikan diberi pakan pellet 781 - 2 PT. Charoen Pokphan dengan kandungan protein 30%, dengan frekuensi pemberian 3 kali sehari (pagi, siang dan sore), kemudian ikan di ambil secara acak dan dimasukkan ke dalam wadah penelitian (akuarium), setiap akuarium di isi 10 ekor ikan.

3.3.3 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Daun binahong yang digunakan untuk penelitian sebanyak 5 kg didapat dari pekarangan rumah di kota Malang. Daun dicuci sampai bersih. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kering selama 5 hari, setelah kering diblender sampai menjadi bubuk.

Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi dengan cara melarutkan serbuk simplisia sebanyak 50 gram ke dalam 150 ml etanol 96% lalu ditutup dengan alumunium foil dan dibiarkan selama 48 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam, sampel yang direndam tersebut disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Filtrat dievaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun binahong. Kemudian dilanjutkan

pemekatan ekstrak dengan penangas air (*water bath*) dengan suhu 50°C sampai hampir kering untuk mengkilangkan kadar air (Dayanti *et al.*, 2012).

3.3.4 Mekanisme Penelitian

Untuk penelitian inti dilakukan selama tujuh hari, dengan dua pengamatan pra infeksi dan post infeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk pra infeksi atau sebelum infeksi bakteri, pada hari pertama ikan uji terlebih dahulu di booster menggunakan ekstrak daun binahong dengan dosis 0,2 ppt, 0,4 ppt, 0,6 ppt dan 0 ppt selama 50 menit dan diambil darah untuk pengamatan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosisnya. Setelah dua hari kemudian, hari ketiga ikan uji di ambil darahnya untuk melihat jumlah leukosit dan aktivitas fagositosisnya, apabila kedua parameter tersebut mengalami penurunan dari hari pertama maka dilakukan booster kembali untuk meningkatkan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosisnya. Pada hari kelima dilakukan pengamatan seperti hari ketiga untuk melihat penurunan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosisnya dan data hari kelima ini yang digunakan sebagai data pra infeksi. Untuk post infeksi, pada hari keenam ikan uji diinfeksi dengan perendaman menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml selama 24 jam, dan setelah 24 jam atau pada hari ketujuh di ambil darah untuk pengamatan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis sebagai data post infeksi.

3.3.5 Bakteri *A. hydrophila* 10^9 Standar McFarland

Disiapkan 9 tabung reaksi dalam rak tabung dengan McFarland Scale (Tabel 4). Isilah dengan 1% BaCl₂ dan 1% H₂SO₄ sesuai dengan catatan di tabel standar McFarland. Bawa rak tabung ke alat spektrofotometer untuk mengukur kekeruhannya. Tentukan alat spektrofotometer pada λ di antara 440 nm dan 650 nm. Tuangkan 1 ml sampel “blanko” ke dalam kuvet plastic spektrofotometer. Netralkan alat spektrofotometer dan periksa serapan sampel-sampel lain pada λ

yang sama dengan cara penuangan ke dalam kuvet yang tidak menambahkan gelombang tapi memang mengokokan isi tabung reaksi dan menghasilkan sampel yang rata-rata.

Standar McFarland berada dalam skala yang bernomor 0,5 sampai 10 yang menjelaskan konsentrasi spesifik dari bakteri per mL.

Tabel 4. Standar McFarland (Sutton, 2011).

Standard no.	Vol (ml)		No. of Bacteria/ mL/(10 ⁸)
	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

3.3.6 Pembiakan Bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BKL Juanda, Surabaya dengan kepadatan 10⁹ sel/ml sebanyak 1000 ml. Biakan bakteri *A. hydrophila* diinkubasi selama 18 - 24 jam dengan suhu 24 - 250°C dalam media TSA miring pada tabung reaksi kemudian diambil menggunakan jarum ose sampai memenuhi lingkaran jarum ose. setelah itu dilarutkan 25 ml dalam media TSB, selanjutnya bakteri tersebut di inkubasi selama 18 - 24 jam dalam *water bath* pada suhu 270°C. Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan koi yaitu dengan kepadatan 10⁷ sel/ml. Untuk memperoleh dosis 10⁷ sel/ml maka dilakukan pengenceran berseri dengan menggunakan eppendorf dan mikropipet secara aseptik (Asniatih *et al.*, 2013). Sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino (1988), sebagai berikut :

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

Dimana :

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

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

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

3.3.7 Pemberian Dosis Ekstrak Daun Binahong sebagai Imunostimulan

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan ukuran 8-10 cm diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian dilakukan perendaman ekstrak daun binahong sebagai imunostimulan dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 0,2 ppt, 0,4 ppt, 0,6 ppt dan 0 ppt selama 50 menit, pada saat perendaman diberikan aerasi, setelah itu ikan diambil secara perlahan dan dimasukkan kembali ke dalam akuarium, perendaman dilakukan 1 kali sehari selama 2 hari. Pada hari ke 3 darah ikan diambil untuk dilakukan pemeriksaan hematologi (jumlah leukokrit dan aktivitas fagositosis). Setelah diistirahatkan selama 2 hari ikan diinfeksi dengan *A. hydrophila*. Gejala klinis ikan diamati selama 14 hari.

3.3.8 Penginfeksian Bakteri *A. hydrophila*

Penginfeksian dilakukan 48 jam setelah perlakuan pemberian ekstrak. Penginfeksian menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman pada akuarium yang berbeda selama 24 jam dengan kepadatan bakteri 10^7 sel/ml, kemudian ikan koi dimasukkan kembali ke dalam akuarium perlakuan. Pengambilan darah dilakukan pra dan 24 jam post infeksi bakteri (Suhermanto *et al.*, 2011), kemudian dilakukan pengamatan jumlah leukosit dan aktifitas fagositosis. Selain itu, pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi

gejala klinis ikan dan kualitas air selama penginfeksi sebagai parameter penunjang.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

a) Perhitungan Jumlah Leukosit

Penghitungan jumlah leukosit yaitu darah sampel dihisap dengan pipet yang berisi bulir pengaduk warna putih sampai skala 0,5 kemudian ditambahkan Larutan Turk's sampai skala 11. Darah dalam pipet diaduk dengan cara menggoyangkan pipet membentuk angka delapan selama 3 – 5 menit sehingga darah tercampur rata. Dua tetes pertama larutan darah dalam pipet tersebut dibuang, selanjutnya larutan darah tersebut ditetaskan di atas haemocytometer yang telah diletakkan gelas penutup di atasnya. Jumlah sel darah putih (leukosit) dapat dihitung dengan bantuan mikroskop dengan pembesaran 400x. Perhitungan dilakukan pada 5 kotak besar haemocytometer dan jumlahnya dihitung dengan rumus (Nabib dan Pasaribu, 1989 dalam Kamaludin, 2011).

Perhitungan jumlah leukosit menurut Svobodova (1991) dalam Suhermanto (2008) : $SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$

Dimana : SDP = Jumlah leukosit

A = Jumlah sel leukosit terhitung

N = Jumlah kotak haemocytometer yang diamati: 4 kotak besar

V = Volume kotak haemocytometer yang diamati: 4 mm^3

Fp = Faktor pengenceran: 20

b. Perhitungan Aktivitas Fagositosis

Uji Aktivitas Fagositosis dilakukan berdasarkan metode Anderson and Siwicki (1995) dalam Nuryati *et al.*, (2010), Sebanyak 50 μl darah dimasukkan ke dalam mikrotiter plate, ditambahkan 50 μl suspensi *A. hydrophila* dalam FBS (10^8

sel/ml). Campuran darah dan bakteri dihomogenkan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 20 menit. Sebanyak 5 µl campuran darah dan bakteri diambil untuk dibuat sediaan ulas darah. Pembuatan preparat ulas darah dilakukan menurut Svobodova dan Vyukusova (1991) dalam Nuryati *et al.*, (2010), gelas objek yang akan digunakan, direndam dalam metanol untuk menghilangkan lemak yang menempel. Pembuatan preparat ulas darah dilakukan dengan menempatkan setetes darah pada gelas objek, gelas obyek kedua diletakkan dengan sudut 45° terhadap gelas obyek pertama, kemudian digeser ke belakang sehingga menyentuh darah. Selanjutnya gelas obyek kedua digeser berlawanan arah sehingga membentuk lapisan tipis darah. Preparat dikeringudarkan dan selanjutnya difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Preparat dibilas dengan akuades dan dikeringudarkan kembali sebelum diwarnai dengan pewarna Giemsa 10% selama 15 menit. Preparat dicuci kembali dengan akuades untuk mengurangi kelebihan warna dan dikeringkan dengan tisu.

Preparat ulas darah yang telah dibuat selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x. Aktivitas fagositosis dihitung berdasarkan persentase sel yang menunjukkan proses fagositosis dari 100 sel fagosit yang teramati.

$$\text{Aktivitas Fagositosis} = \frac{\sum \text{sel fagosit yang melakukan fagositosis}}{\sum \text{sel fagosit yang teramati}} \times 100\%$$

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut, dimana :

- Suhu yang diukur menggunakan termometer
- pH air yang diukur menggunakan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter.

3.5 Analisis Data

Analisis data jumlah leukosit dan aktifitas fagositosis dilakukan secara statistik mempergunakan program SPSS 16 for windows. Data yang didapatkan terlebih dahulu di uji kenormalannya menggunakan uji normalitas (kolmogorov-smirnov). Apabila $\text{sig} > 0,01$ maka dilanjutkan analisis keragaman menggunakan ANOVA sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisis Ragam dilakukan untuk menguji pengaruh dosis ekstrak fenol terhadap parameter uji. Sedangkan uji setelah analisis ragam yang digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan mean (rata-rata) parameter uji antara perlakuan dosis ekstrak, yaitu dengan Uji Tukey atau BNT (Beda Nyata Terkecil). Analisis Regresi dilakukan untuk mencari bentuk hubungan antara dosis ekstrak fenol (X) dengan parameter uji (jumlah leukosit dan aktifitas fagositosis) (Y). Perlakuan dosis ekstrak bersifat kuanditatif dengan 4 macam dosis, jadi perlu dilakukan Analisis Regresi dengan derajat polinom maksimum $4-1=3$, dengan praduga Persamaan Garis Regresi kurva linier $Y = c + b_1x$, kurva kudratik $Y = c + b_1x + b_2x^2$ dan kurva kubik $Y = c + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun Binahong (*A.cordifolia*)

Rendemen hasil ekstraksi bergantung pada sifat kelarutan komponen bioaktifnya. Dari hasil ekstraksi dengan menggunakan etanol 96%. Dapat dilihat bahwa komponen bioaktif dari *A.cordifolia* bersifat polar. Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi dengan cara melarutkan serbuk simplisia sebanyak 678 gr ke dalam 2,1 lt etanol 96% dan menghasilkan ekstrak sebanyak 271 gr. Kadar air daun binahong sebesar 77,66% diperoleh dari perbandingan berat awal daun sebelum dikeringkan (3 kg) dikurangi berat akhir daun setelah dikeringkan (678 gr) dengan berat awal daun dalam persen. Nilai rendemen daun binahong didapat dari perbandingan berat ekstrak (271 gr) dengan berat serbuk simplisia (678 gr) dalam persen.

Tabel 5. Hasil Perparasi Daun Binahong

indikator	Hasil Penelitian			Selawa <i>et al.</i> , (2013)		
	Kondisi	Kadar air	Rendemen	Kondisi	Kadar air	Rendemen
Bentuk	Serbuk	77.66 %	4%	Serbuk	81,99 %	3,29%
Warna	Hijau tua			Hijau tua		
Bau	Seperti jamu			Berbau khas		
Tekstur	Halus becek			Halus lembab		

Pada sampel segar tidak mengalami proses pengolahan lebih lanjut sehingga warna masih terlihat cerah. Hal tersebut sejalan dengan pendapat yang dikemukakan oleh Winarno *et al.*, (1980) dalam Selva *et al.*, (2013) yaitu proses pengeringan menyebabkan pigmen warna menjadi rusak dan berkurang, sampel segar memiliki kandungan air masih tinggi sehingga kandungan cairan masih besar yang membuat tekstur sampel halus dan lembab. Pada dasarnya, nilai rendemen tidak dapat dibandingkan karena jenis dan karakteristik kelarutan senyawa yang berbeda. Hal tersebut bisa terjadi karena senyawa aktif pada masing-masing tanaman mempunyai spesifikasi yang berbeda dalam melarutkan

bahan aktifnya. Menurut Anawariyah (2011), menambahkan bahwa presentase kadar air ini dipengaruhi oleh habitat dan lingkungannya. Kandungan air dalam suatu bahan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran dan daya tahan bahan tersebut. Sehingga semakin rendah kandungan air pada suatu bahan, maka kualitas bahan tersebut akan semakin baik.

4.2 Jumlah Darah Putih (Leukosit)

Perendaman ekstrak daun binahong (*A. cordifolia*) memberikan pengaruh daya hambat infeksi *A. Hydophila* dengan rata-rata total leukosit pada ikan koi. Jumlah total leukosit merupakan salah satu indikator adanya infeksi tertentu pada ikan. Hasil pengamatan total leukosit ikan koi pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 6. Data di sederhanakan dalam bentuk 10^4 , karena data memiliki nilai nominal ribuan.

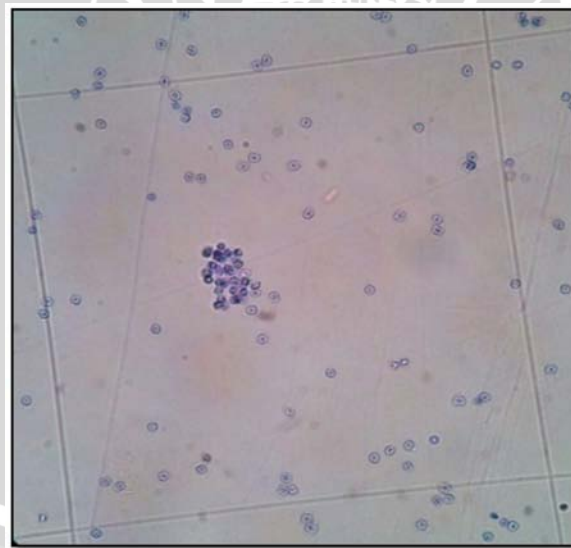
Tabel 6. Jumlah Total Leukosit Ikan Koi Pra dan Post Infeksi

Perlakuan	Pra Infeksi (10^4 sel/ml)				Post Infeksi (10^4 sel/ml)			
	Ulangan			Rata-rata ± SD	Ulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3		1	2	3	
Kontrol	3,09	2,40	2,16	2,55±4,86	4,16	3,40	3,02	3,48±5,00
A	6,20	8,08	6,64	6,97±9,78	8,08	7,61	7,30	7,66±3,94
B	7,67	7,96	10,0	8,57±1,30	7,91	9,67	11,1	9,62±1,64
C	3,86	4,76	3,57	4,06±6,17	4,96	5,25	5,87	5,36±4,61

Keterangan : Dosis K = 0; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt

Jumlah rata-rata total leukosit pada pra infeksi tertinggi dicapai pada perlakuan B ($8,57 \times 10^4$ sel/ml), diikuti berturut-turut A ($6,97 \times 10^4$ sel/ml), C ($4,06 \times 10^4$ sel/ml) dan kontrol ($2,55 \times 10^4$ sel/ml). Jadi pada pra infeksi bakteri, ekstrak daun binahong dapat meningkatkan jumlah total leukosit pada darah ikan koi dengan dibuktikan peningkatan jumlah total leukosit pada perlakuan A, B, C berkisar antara $4,06 \times 10^4$ sel/ml – $8,57 \times 10^4$ sel/ml, sedangkan pada kontrol mencapai $2,55 \times 10^4$ sel/ml). Menurut Harikrishnan *et al.*, (2003) dalam Suhermanto *et al.*, (2011), menyatakan terjadi peningkatan jumlah leukosit ikan mas yang di tretmen ekstrak herbal.

Rata-rata total leukosit ikan koi setelah post infeksi dengan bakteri *A. Hydrophila* mengalami peningkatan dari jumlah pra infeksi, dengan jumlah total leukosit tertinggi pada perlakuan B ($9,62 \times 10^4$ sel/ml), berturut-turut diikuti perlakuan A ($7,66 \times 10^4$ sel/ml), C ($5,36 \times 10^4$ sel/ml), dan kontrol ($3,48 \times 10^4$ sel/ml). Hasil tersebut menunjukkan peningkatan jumlah total leukosit setelah diinfeksi dengan bakteri *A. Hydrophila*, akan tetapi jumlah tersebut masih dalam batas normal. Jumlah leukosit yang ada pada suatu jenis ikan tertentu dapat berubah sesuai dengan tingkat kesehatan ikan yang bersangkutan. Apabila ikan terinfeksi oleh suatu bakteri patogen tertentu maka ikan tersebut akan meningkatkan jumlah total leukosit atau menurunkan jumlah leukosit. Menurut Mudjiutami *et al.*, (2007), jumlah leukosit normal ikan sekitar $20 - 15 \times 10^4$ sel/mm³ darah. Jumlah total leukosit ikan normal berkisar antara $20 - 15 \times 10^4$ sel/mm (Erfika, 2008 dalam Septiarini *et al.*, (2012). Jumlah leukosit normal ikan mas berkisar antara $16.240 - 24.620 \times 10^3$ sel/mm³ (Lenka *et al.*, (2013).



Gambar 7. Pengamatan Jumlah Leukosit Menggunakan Mikroskop pada Kamar Hitung Hemacitometer dengan Perbesaran 400x

Penghitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* pada derajat kepercayaan 95 %.

Tabel 7. Analisa Sidik Ragam Jumlah Leukosit (10^3 sel/ml) Selama Penelitian Pra Infeksi dan Post Infeksi.

Pra Infeksi

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	Df (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	66.585	3	22.195	27.765**	0.000
Acak	6.395	8	0.799		
Total	72.980	11			

Keterangan: ** sangat berbeda nyata (sig<0,01)

Post Infeksi

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	Df (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	54.134	3	18.045	42.178**	0.000
Acak	3.423	8	0.428		
Total	57.557	11			

Keterangan: ** sangat berbeda nyata (sig<0,01)

Tabel 7 menunjukkan bahwa nilai signifikasi (sig.) dari pra infeksi dan post infeksi memiliki nilai signifikasi (sig.) <0,01 sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian perlakuan ekstrak daun binahong berpengaruh sangat berbeda nyata terhadap jumlah total leukosit ikan koi sebelum dan setelah diinfeksi bakteri *A. Hydrophila*. Menurut Anderson (1992) dalam Alifuddin (2002), imunostimulan merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan. Menurut Syahida *et.al*, (2013), leukosit memiliki bermacam-macam fungsi, erat kaitannya untuk menghilangkan benda asing (termasuk mikroorganisme patogen) serta sebagai system pertahanan tubuh ikan.

Dari Tabel 7 dapat dilihat bahwa jumlah leukosit ikan koi menghasilkan pengaruh yang sangat berbeda nyata (sig<0,01) dipengaruhi oleh perlakuan dosis ekstrak daun binahong untuk meningkatkan jumlah total leukosit ikan koi, oleh karena itu dilakukan perhitungan Uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan.

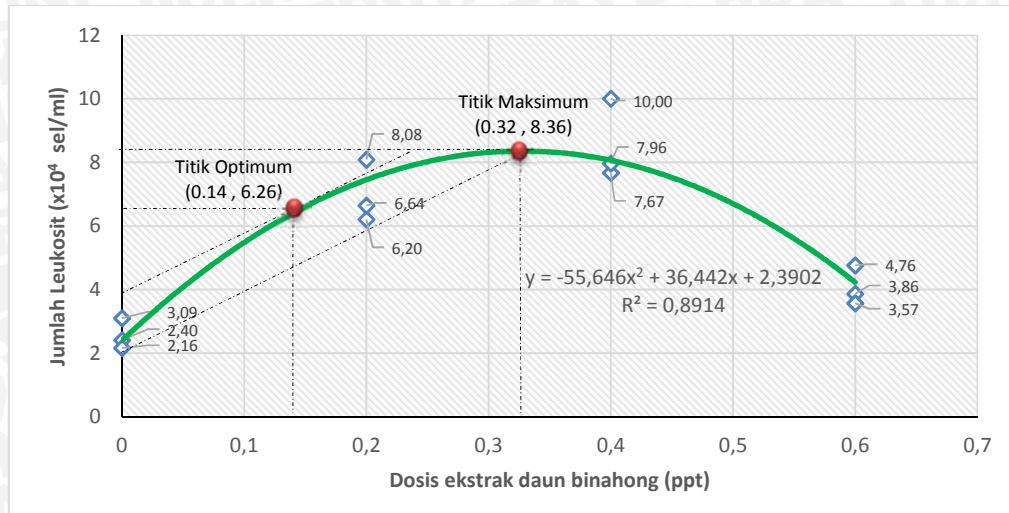
Hasil penghitungan uji BNT jumlah leukosit ikan koi pada pengamatan hari ke 2-6, dan post infeksi dapat dilihat pada (Tabel 8).

Tabel 8. Uji BNT Jumlah Leukosit (10^3 sel/ml) Selama Penelitian Pra Infeksi dan Post Infeksi.

Pra Infeksi					
Rerata Perlakuan	K	C	A	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
C	1,51 ^{ns}	-	-	-	ab
A	4,42 ^{**}	2,91 ^{**}	-	-	c
B	5,99 ^{**}	4,48 ^{**}	1,57 ^{ns}	-	c
Post infeksi					
Rerata Perlakuan	K	C	A	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
C	1,83 [*]	-	-	-	b
A	4,13 ^{**}	2,30 [*]	-	-	c
B	6,03 ^{**}	4,20 ^{**}	1,89 [*]	-	c

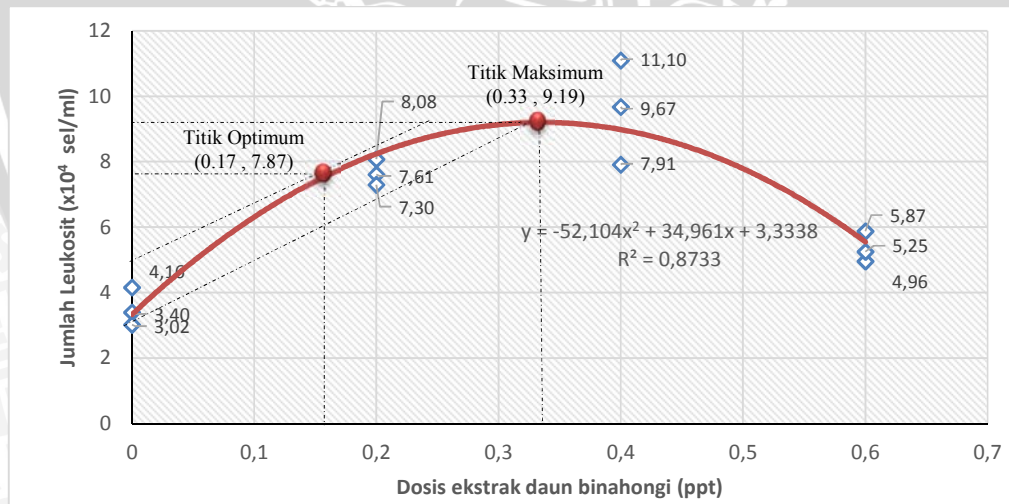
Pada Tabel 8 menunjukan hasil notasi dari keseluruhan tabel, jumlah leukosit pada pra infeksi dapat diketahui bahwa perlakuan K berbeda nyata terhadap perlakuan A dan B. Perlakuan C juga berbeda nyata dengan perlakuan A dan B. Dan hanya perlakuan K dan C yang tidak berbeda nyata. Dan pada perlakuan post infeksi dapat diketahui bahwa semua perlakuan berbeda nyata.

Ditunjukkan analisa pengaruh berbeda nyata dengan bertujuan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) dengan dosis yang berbeda terhadap peningkatan jumlah total leukosit ikan koi sebelum dan sesudah di infeksi bakteri *A. hydrophila*. Pada pra infeksi didapat hasil persamaan regresi polynomial orthogonal (Lampiran 5) $y = 2,3902 + 36,442x - 55,646x^2$ dengan koefisien determinasi sebesar (R^2) = 0,891. Hal ini berarti jumlah sel leukosit meningkat pada titik optimum, dan setelah mencapai titik maksimal jumlah leukosit menurun (Gambar 8) seiring bertambahnya dosis immunostimulan yang diberikan.



Gambar 8. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Jumlah Leukosit Ikan Koi pada Pra Infeksi

Pada post infeksi didapat hasil persamaan regresi polynomial orthogonal (Lampiran 5) $y = 3,3338 + 34,961 - 52,104x^2$ dengan koefisien determinasi sebesar (R^2) = 0,873. Hal ini berarti jumlah sel leukosit meningkat pada titik optimum, dan setelah mencapai titik maksimal jumlah leukosit menurun (Gambar 9) seiring bertambahnya dosis imunostimulan yang diberikan.



Gambar 9. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Jumlah Leukosit Ikan Koi pada Post Infeksi

Pada Gambar 8 dan 9, menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis daun binahong tidak mempengaruhi peningkatan jumlah total leukosit.

Menurut Suryati (2010) dalam Agung *et al.*, (2013), peningkatan leukosit merupakan salah satu indikator meningkatnya imunitas ikan. Pada perlakuan C dengan dosis tertinggi 0,6 ppt menghasilkan jumlah leukosit rata-rata $4,06 - 5,36 \times 10^4$ sel/mm³, sedangkan pada perlakuan A dan B dengan dosis berturut-turut 0,2 dan 0,4 ppt menghasilkan jumlah leukosit rata-rata $6,97 - 7,66 \times 10^4$ sel/mm³ dan $8,57 - 9,62 \times 10^4$ sel/mm³. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan nilai total leukosit pada perlakuan C, jadi dosis daun binahong yang optimum untuk meningkatkan jumlah total leukosit berkisar antara 0,14 – 0,17 ppt dengan peningkatan jumlah leukosit sebanyak $6,26 - 7,87 \times 10^4$ sel/mm³ (Gambar 8 dan 9) dan dosis di atas 0,33 ppt tidak begitu optimum dalam meningkatkan jumlah leukosit ikan koi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan sebagai immunostimulan semakin menurunkan sistem kekebalan tubuh ikan atau bersifat racun bagi hewan uji. Toksisitas akan dimulai pada saat mekanisme pertahanan sudah habis atau lingkungan mengalami kejenuhan sehingga ikan stres, ikan yang tidak tahan mengalami kematian.

Penelitian Lukistyowati (2012), menunjukan Larutan sambiloto tidak bersifat racun bagi ikan bila diberikan dibawah dosis 6 g/l, sehingga bila di aplikasi pada ikan diperlukan pembatasan dosis larutan yang tidak bersifat racun tetapi dapat meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap serangan bakteri.

Pemberian ekstrak daun binahong dapat meningkatkan kekebalan sistem imun non spesifik dengan meningkatnya total leukosit dikarenakan kandungan zat aktif pada daun binahong. Menurut Anasta *et al.*, (2013), hasil skrining fitokimia ekstrak daun binahong mengandung senyawa fenolik, flavonoid, triterpenoid, β -sitosterol, alkaloid, dan saponin yang dapat menghambat pertumbuhan *A. Hydrophila*. Flavonoid yang dapat mengaktifkan sistem limfe sehingga dapat meningkatkan produksi sel darah putih. Senyawa Polifenol, alkaloid, dan flavonoid dapat bersifat anti bakteri (Khunaifi, 2010).

4.3 Aktivitas Fagositosis

Hasil pengamatan yang dilakukan selama penelitian menggunakan ekstrak daun binahong sebagai immunostimulan dengan dosis A (0,2 ppt), B (0,4 ppt), C (0,6 ppt) dan K (ikan kontrol) sebelum dan sesudah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* memberikan hasil persentase aktivitas fagositosis ikan koi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 9. Data ditampilkan dalam bentuk arcsin, karena data dalam bentuk persentase. Transformasi ini diharapkan memberikan kestabilan ragam sehingga proses pengujian dapat mendekati kestabilan agar data dapat homogen.

Tabel 9. Rata-rata Aktivitas Fagositosis (%) Ikan Koi Selama Penelitian

Perlakuan	Pra Infeksi Bakteri				Post Infeksi Bakteri			
	Ulangan			Rata-rata ± SD	Ulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3		1	2	3	
K	26,8	28,8	28,7	28,18 ± 1,14	25,4	24,9	28,4	26,31 ± 1,89
A	29,6	32,5	30,0	30,75 ± 1,53	31,9	34,2	31,4	32,57 ± 1,51
B	34,8	35,0	37,2	35,73 ± 1,36	38,8	40,5	37,9	39,12 ± 1,31
C	32,9	35,3	32,4	33,57 ± 1,54	36,8	34,3	35,9	35,71 ± 1,29

Keterangan : Dosis K = 0 ppt; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt (data dalam bentuk arcsin)

Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa persentase aktivitas fagositosis ikan koi yang telah diberi immunostimulan berupa ekstrak daun binahong setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* (post infeksi) mengalami peningkatan dibanding sebelum uji tantang (pra infeksi). Tampak terlihat dari Tabel 9 bahwa rata-rata aktivitas fagositosis tertinggi pada pra infeksi bakteri *A. Hydrophyla* didapatkan pada perlakuan B (0,4 ppt) yang memberikan nilai aktivitas fagositosis sebesar 35,73%, sedangkan pada post infeksi didapat juga perlakuan B (0,4 ppt) yang memberikan nilai aktivitas fagositosis lebih tinggi dari pada saat pra infeksi sebesar 39,12%.

Karena data dalam bentuk persentase dilakukan transformasi dalam bentuk arcsin, diharapkan memberikan kestabilan ragam sehingga proses

pengujian dapat mendekati kestabilan. Setelah ditransformasikan dalam bentuk arcsin, data hasil perhitungan jumlah makrofag tersebut dimasukkan dalam uji sidik ragam. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows pada derajat kepercayaan 95 %. Hasil uji sidik ragam jumlah makrofag ikan kerapu macan dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Analisa Sidik Ragam Aktivitas Fagositosis Pra Infeksi dan Post Infeksi Bakteri *A. Hydrophila*

Pra Infeksi

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Perlakuan	97.607	3	32.536	16.545**	0.001
Acak	15.732	8	1.967		
Total	113.339	11			

Keterangan: ** sangat berbeda nyata (sig<0,01)

Post Infeksi

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Perlakuan	267.185	3	89.062	38.553**	0.000
Acak	18.481	8	2.310		
Total	285.666	11			

Keterangan: * sangat berbeda nyata (sig<0,01)

Analisis sidik ragam persentase aktivitas fagositosis pra infeksi di atas dapat diketahui sig. < 0,01 yang berarti bahwa pemberian ekstrak daun binahong sebagai immunostimulan pada ikan koi sangat berbeda nyata terhadap persentase aktivitas fagositosis ikan koi, sama halnya dengan post infeksi memiliki nilai sig. <0,01 yang berarti bahwa pemberian ekstrak daun binahong sangat berbeda nyata terhadap persentase aktivitas fagositosis ikan koi setelah uji tantang dengan bakteri *A.hydrophila*. Selanjutnya dilanjutkan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Hasil uji BNT persentase aktivitas fagositosis pada ikan koi pra infeksi dan post infeksi dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Uji BNT Persentase Aktivitas Fagositosis (%) Pra Infeksi dan Post Infeksi.**Pra Infeksi**

Rerata Perlakuan	K	A	C	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
A	2,56 ^{ns}	-	-	-	ab
C	5,39 ^{**}	2,82 [*]	-	-	bc
B	7,55 ^{**}	4,98 ^{**}	2,16 ^{ns}	-	c

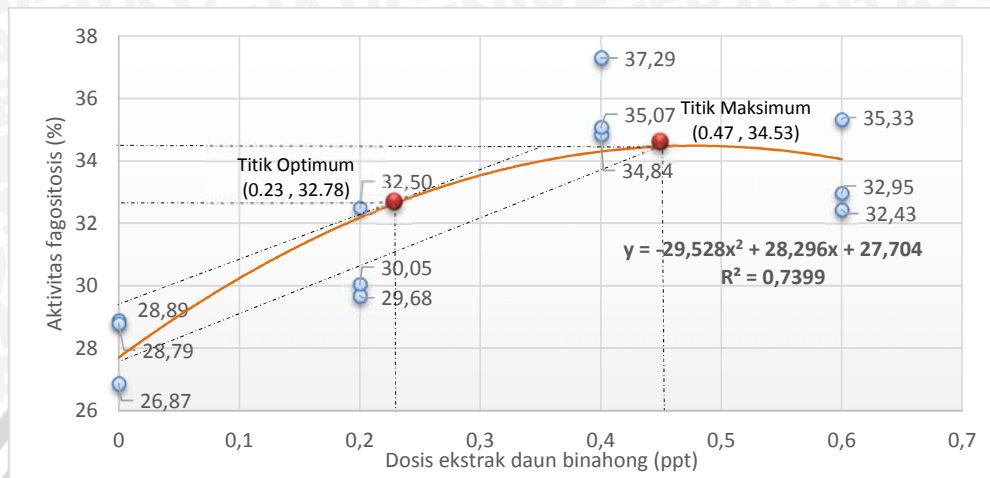
Post Infeksi

Rerata Perlakuan	K	A	C	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
A	6,25 ^{**}	-	-	-	b
C	9,40 ^{**}	3,14 [*]	-	-	bc
B	12,81 ^{**}	6,55 ^{**}	3,40 [*]	-	c

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

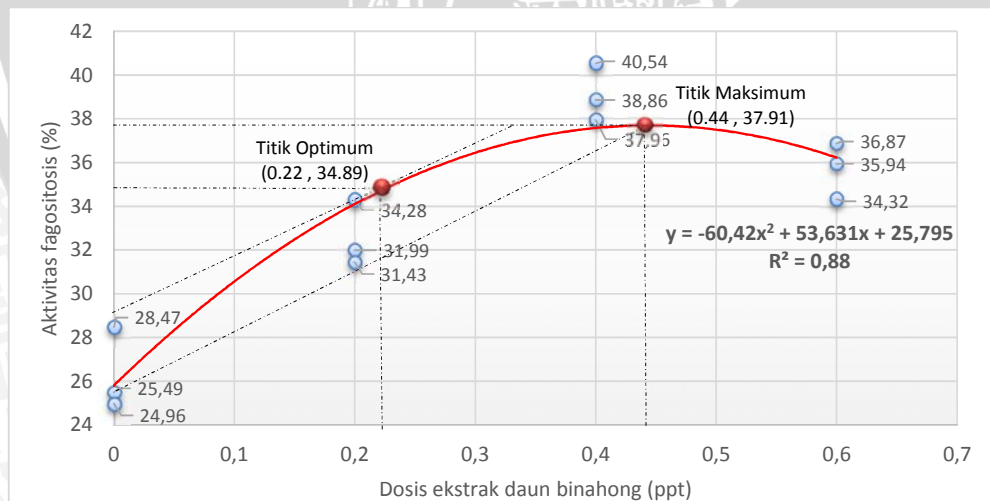
Ditunjukkan analisa pengaruh berbeda nyata dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows. Tujuannya yaitu untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun binahong dengan dosis yang berbeda terhadap peningkatan aktivitas fagositosis pada ikan koi sebelum dan sesudah infeksi bakteri *A. hydrophila*. Pada pra infeksi didapat hasil persamaan regresi polynomial orthogonal $y = 27,704 + 28,296x - 29,528x^2$ dengan koefisien determinasi sebesar (R^2) = 0,7399. Hal ini

berarti presentase aktivitas fagositosis meningkat ketika mencapai titik optimum dan menurun ketika dosis sudah mencapai titik maksimum.



Gambar 10. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Aktivitas Fagositosis Pra infeksi *A. hydrophila*.

Pada post infeksi didapat hasil persamaan regresi polynomial orthogonal $y = 25,795 + 53,631x - 60,42x^2$ dengan koefisien determinasi sebesar (R^2) = 0,88. Hal ini berarti presentase aktivitas fagositosis menurun seiring bertambahnya dosis imunostimulan yang diberikan.



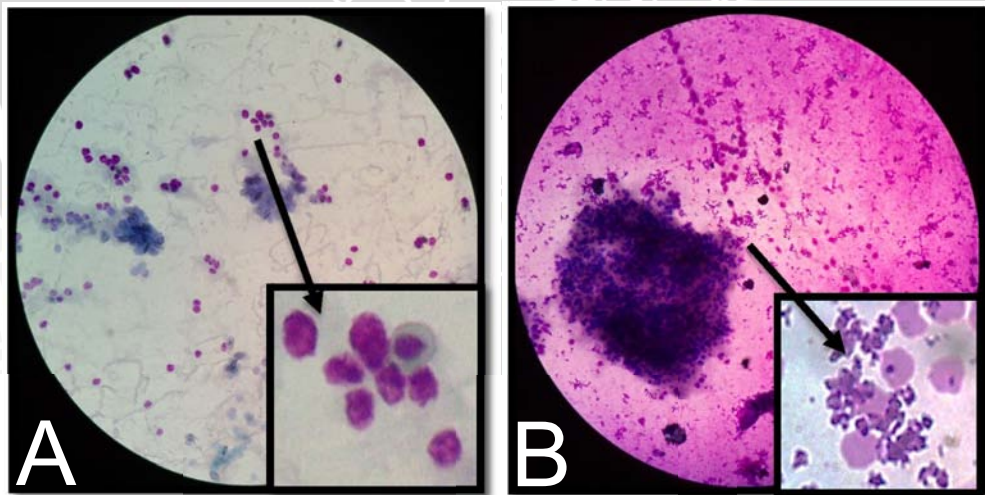
Gambar 11. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Binahong terhadap Aktivitas Fagositosis Post infeksi *A. hydrophila*.

Aktivitas fagositosis pra infeksi bakteri *A. Hydrophila* pada perlakuan B menunjukkan aktivitas fagositosis tertinggi dengan nilai rata-rata (35,73%) diikuti

berturut-turut perlakuan C (33,57%), perlakuan A (30,75%), dan Kontrol (28,18%). Sedangkan pada post infeksi bakteri *A. Hydrophila* perlakuan B menunjukkan aktivitas fagositosis tertinggi dengan nilai rata-rata 39,12% diikuti berturut-turut perlakuan C (35,71%), perlakuan A (32,57%), dan kontrol (26,31%). Jadi peningkatan aktivitas fagositosis yang optimum pada kisaran dosis 0,22 – 0,23 ppt (Gambar 10 dan 11) dengan peningkatan mencapai 32,78 – 34,89% dan dosis di atas 0,47 ppt tidak begitu optimum untuk meningkatkan aktivitas fagositosis ikan koi, hal ini terjadi karena saat ikan dalam keadaan normal, jumlah leukosit berkorelasi positif dengan aktivitas fagositosis. Dengan kata lain, semakin tinggi jumlah leukosit semakin tinggi pula aktifitas fagositosisnya. Dengan demikian penurunan dan peningkatan aktivitas fagositosis memiliki pola yang hampir sama dengan pola penurunan dan peningkatan jumlah total leukosit dari hasil penelitian sebelumnya yang sama-sama memiliki nilai tertinggi pada perlakuan B (0,4 ppt), jadi dapat dikatakan penurunan dan peningkatan nilai aktivitas pada ikan koi yang diinfeksi bakteri *A. hydrophyla* dipengaruhi oleh besar-kecilnya nilai jumlah total leukosit pada darah ikan koi. Menurut Marentek *et al.*, (2013) menyatakan bahwa semakin tinggi jumlah leukosit, maka semakin tinggi pula aktivitas fagositosis.

Selain jumlah leukosit, besar dosis perlakuan juga mempengaruhi besar kecilnya aktivitas fagositosis. Menurut Ridlo dan Rini (2009), senyawa aktif memberikan efek aktifitas atau jumlah senyawa aktif lebih kecil dari jumlah minimal yang diperlukan untuk memunculkan efek imunostimulan atau bahkan sebaliknya, apabila dosis yang terlalu tinggi tidak dapat memberikan efek sebagai inhibitor. Kemampuan imunostimulan untuk meningkatkan respon imun dan mengembangkan proteksi terhadap infeksi patogen dipengaruhi oleh dosis aplikasi (Sakai, 1999 *dalam* Ridlo dan Rini, 2009). Menurut Saptiani (2011), *dalam* Agung *et al.*, (2013), respon imunitas pada ikan dilakukan melalui mekanisme aktivitas fagositosis. Yin *et al.*, (2006) *dalam* Putri *et al.*, (2013) juga menyatakan bahwa

mekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang sistem imun tubuh adalah dengan cara meningkatkan aktivitas sel-sel fagosit. Selain dipengaruhi oleh jumlah leukosit, aktivitas fagositosis juga dipengaruhi oleh dosis ekstrak, hanya pada perlakuan B (0,4 ppt) aktivitas fagositosis tertinggi dan menurun pada perlakuan C (0,6 ppt). Menurut Putri *et al.*, (2013), dimana dosis aplikasi pemberian imunostimulan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi peningkatan respon imun. Menurut Setiawan *et al.*, (2012), menyatakan bahwa peningkatan leukosit berupa monosit terjadi karena fungsinya sebagai makrofag dan memfagosit benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh, sedangkan monosit tersebut berumur pendek dalam darah, lalu masuk ke dalam jaringan dan berdiferensiasi menjadi makrofag sehingga jumlah monosit berfluktuasi dalam darah. Oleh karena itu penurunan aktivitas fagositosis pada dosis C (0,6 ppt) diduga terjadi karena perlawanan sel darah putih ikan koi yang masuk ke dalam jaringan. Berikut gambar pengamatan aktivitas fagositosis yang dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Pengamatan Aktivitas Fagositosis dengan Mikroskop Pembesaran 400x, (↙) Pembesaran 1000x.

Keterangan: (A). Tidak terfagositosis (↙) tanpa paparan bakteri, (B). Aktivitas fagositosis (↙) dengan paparan bakteri.

Fagositosis adalah proses pemasukan partikel asing yang kecil ke dalam individu sel-sel fagosit seperti netrofil dan monosit. Menurut Fujaya (2002) *dalam* Sukenda *et al.*, (2008), monosit lebih kuat dibanding neutrofil dalam memfagositosis bakteri, bahkan dapat memfagositosis partikel yang lebih besar. Makrofag merupakan monosit matang yang mampu memfagosit 100 bakteri. Sedangkan satu netrofil hanya dapat memfagosit 5 sampai 20 bakteri sebelum netrofil menjadi tidak aktif dan mati. Pola peningkatan prosentase indeks fagositik ini merupakan fungsi dari peningkatan total leukosit maupun presentasi jenis leukosit masing-masing pada limfosit, monosit dan neutrofil (Amrullah, 2005 *dalam* Hastuti, 2012). Aktivitas fagositosis menunjukkan jumlah total dari sel fagosit yang aktif dibandingkan dengan jumlah sel fagosit yang teramati.

4.4 Kualitas Air

Dalam suatu kegiatan budidaya perairan, kualitas air merupakan salah satu faktor yang memegang peranan penting karena organisme hidup dalam perairan tersebut. Kualitas air yang diuji meliputi faktor fisika dan kimia, diantaranya adalah suhu, kandungan oksigen terlarut dan pH (Subarijanti, 2000).

Selama penelitian berlangsung, pengukuran kualitas air dilakukan yang meliputi suhu, oksigen terlarut (DO) dan pH pada setiap wadah media pemeliharaan. Faktor-faktor tersebut turut diperhatikan selama penelitian berlangsung karena air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan itu sendiri. Selama penelitian pengukuran kualitas air dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pagi dan malam hari. Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

No.	Parameter Kualitas Air	Parameter Kualitas Air pada Perlakuan	Partosuwiryo dan Warseno (2011)
1.	Suhu	26 – 28°C	25 – 30°C
2.	pH	6,75 – 8,38	6,5 – 8,5

3.	Oksigen Terlarut	4,38 – 7,41 ppm	3 – 7 ppm
----	------------------	-----------------	-----------

Berdasarkan Tabel 12, menunjukkan bahwa air sebagai media pemeliharaan dan media hidup ikan koi masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologisnya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk meningkatkan leukosit dan aktivitas fagositosis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Berdasarkan pengamatan jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) berpengaruh sangat nyata untuk meningkatkan jumlah total leukosit dan aktivitas fagositosis pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, dengan dosis optimum pada leukosit pra infeksi sebesar 0,14 ppt dengan persamaan grafik $y = 2,3902 + 36,442x - 55,7646x^2$ dengan dosis maksimal 0,32 ppt. Dan pada post infeksi didapat dosis optimum 0,17 ppt dengan persamaan grafik $y = 3,3338 + 34,961 - 52,104x^2$ dengan dosis maksimal 0,33 ppt. Pada aktivitas fagositosis pre infeksi didapat dosis optimum 0,23 ppt dengan persamaan grafik $y = 27,704 + 28,296x - 29,528x^2$ dengan dosis maksimal 0,47 ppt dan pada post infeksi didapat dosis optimal 0,22 ppt dengan persamaan grafik $y = 25,795 + 53,631x - 60,42x^2$ dengan dosis maksimal 0,44 ppt.

5.2 Saran

Menurut hasil penelitian ini, untuk pencegahan bakteri *A. Hydrophila* menggunakan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) sebaiknya digunakan dosis optimum sebesar 0,14 – 0,23 ppt. Karena dosis tersebut memberikan peningkatan optimum jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, L. A; Slamet, B. P; Sartjito. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Profil Darah Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Journal of Aquaculture Management and Technology. 2 (1): 87-101.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. Bioscientie. 1 (1): 8-31.
- Akiyama, H. F., K. Iwatsuki, T. 2001. Antibacterial Action Of Several Tennis Agains *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemoterapy. 48: 91-487.
- Aliffudin, M. 1999. Peran Immunostimulan (Lipopolisakaria, *Saccharomyces cerevisiae* dan Levamisol) Terhadap Peningkatan Respon Immunitas Ikan Jambal Siam *Pangasius hypophthalmus*. Program Studi Ilmu Perairan , Program Pascasarjana IPB. Bogor. Tesis tidak di publikasikan.
- Alifuddin, M. 2002. Immunostimulasi pada Hewan Akuatik. Jurnal Akuakultur Indonesia. 1 (2): 80-90.
- Amrullah, 2004. Penggunaan Immunostimulan *Spirulina platensis* Untuk Meningkatkan Ketahanan Tubuh Ikan Koi Terhadap Virus Herpes. Sekolah Pascasarjana IPB. Hlm 51.
- Anasta, P. Y; Mohammad, B; Indra, L. 2013. Skrining Fitokimia Metabolit Sekunder pada Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk Uji *In Vitro* Daya Hambat Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatra Utara. Hlm 1-9.
- Anawariyah, S. 2011. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan *Cymodocea Rotundata*. Skripsi tidak di publikasikan.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulant, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish Applications to Aquaculture. Annual Review Fish Dieses. Hlm 281.
- Ardias, N. 2008. Peranan NaCl Terhadap Derajat Pembuahan, Penetasan Telur dan Kelangsungan Hidup Larva Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi tidak di publikasikan.
- Asniatih., Idris M., Kadir S. 2013. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Mina Laut Indonesia. ISSN: 2303-3959. 03 (12): 13 - 21.
- Atmodjo, J.T. 2011. Modul 9 dan 10 Jenis Metode Penelitian. Universitas Mercubuana. Jakarta. Hlm 19.
- Bijanti R., 2005. Hematologi Ikan-Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hlm 195.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibsons. 1974. Determinative Bacteriology. Eighty

edition. Avery Press. Inc. USA. Hlm 126.

Christian, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., and Warnes, C., 2001. Detection of *Aeromonas hydrophilla* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Can. J. Microbiol.* 47 (8): 782-786.

Dayanti, Rani., Iesje. L., Morina. R. 2012. Ketahanan Non-Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diberi Larutan Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) Terhadap *Aeromonas hydrophilla*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Riau. Hlm 1-9.

Firdaus, R. 2010. Pembenihan Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hlm 84.

Fujaya, Y., 2004. Fisiologi Ikan- Dasar Pengembangan Teknik Perikanan. PT Rineka Cipta. Jakarta Pandang. Hlm 36.

Gardenia. L., Isti K., Hambali S. Dan Tatik M. 2010. Aplikasi Deteksi *Aeromons hydrophilla* Penghasil Aerolysin Dengan Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta. Hlm 883.

Grandiosa, R. 2010. Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Secara In Vitro dan Uji Toksisitasnya Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Bandung. Hlm 16.

Gustiano, R., T.H. Prihadi, dan E, Kusri. 2008. Survei Potensi, Distribusi Sumber Daya, dan Usaha Ikan Hias Air Tawar di Beberapa Sentra Produksi. 3 (1): 77-80.

Harikrishnan, R., M. N. Rani, and C. Balasundaram, 2003. Haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophilla* infection. *Aquaculture*, 22 (1): 41-50.

Hastuti, Sri D. 2012. Suplementasi β -glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam pakan terhadap aktivitas fagositosis, aktivitas NBT, total protein plasma dan aktivitas aglutinasi darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Depik. ISSN: 2089 – 7790. 1 (3): 149 – 155.

Hoffbrand, V dan Atul, M. 2005. At a Glance Hematologi Edisi Kedua. Erlangga. Jakarta. Hlm 117.

Holmes, P., Niccolls, L. M. And Sartory, D.P., 1996. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In the Genus *Aeromonas*, edited by B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. New York: Wiley. Hlm 150.

Jasmanidar, Y. 2009. Penggunaan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname *Litopenaeus vannamei*. Institut Pertanian Bogor. Tesis tidak di publikasikan.

Johnny, Zafran., Des Roza, dan Ketut Mahardika. 2003. Hematologis Beberapa Spesies Ikan Laut Budidaya. Jurnal Penelitian Indonesia. 9 (4): 65-71

- Kabata, Z., 1985. Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic. Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelphia. Hlm 318.
- Kamaludin Ikbal. 2011. Efektivitas Ekstrak Lidah Buaya *Aloe Vera* untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. Melalui Pakan. FPIK. Institut Pertanian Bogor. Skripsi tidak di publikasikan.
- Khairuman dan Sudenda, D. 2002. Budidaya Patin Secara Intensif. Agro Media Pustaka. Yogyakarta. Hlm 78.
- Khunaifi, Mufid. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang. Skripsi tidak di publikasikan.
- Laelawati, E. 2008. Respon tanggap kebal ikan mas (*Cyprinus carpio*) terhadap vaksin koi herpesvirus yang diberikan melalui injeksi dengan dosis berbeda. Skripsi. Hlm 68.
- Lamers, C.H.J dan M.H.J De Hass. 1985. Antigen Localization in the Lymphoid Organs of Carp (*Cyprinus carpio*). Cell Tissue Res. 242 (1): 491-498.
- Lengka, Kedis., Henky Manoppo dan Mangdalena. E.F.K. 2013. Peningkatan Respon Imun Non Spesik Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) Melalui Pemberian Bawang Putih (*Allium Sativum*). Jurnal Budidaya Peraira. 1 (2): 21-28.
- Lukistyowati, Isje. 2012. Studi Efektifitas Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) untuk Mencegah Penyakit *Edwardsiellosis* pada Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). Berkala Perikanan Tambak. ISSN: 0126 – 4265. 40(2): 56 – 74.
- Manoi, F. 2009. Binahong (*Anredera cordifolia*)(Ten) Steenis Sebagai Obat. Jurnal Warta Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri. 15 (1): 3 - 5.
- Marentek, G. A; Henky, M; dan Sammy, N. J. L. 2013. Evaluation of The Use of Garlic (*Allium sativum*) in Enhancing Nonspecific Immune Response and Growth of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jurnal Budidaya Perairan. 1 (1): 1 – 7.
- Markham, K.R.1998. *Cara mengidentifikasi flavanoid*. Bandung: penerbit ITB. Bandung. Hlm 39.
- Mus. 2008. *Informasi Spesies Binahong Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. <http://www.plantamor.com/spcdtail.php?recid=1387>. (diakses tanggal 20 Januari 2014)
- Mutdjiutami, E., Ciptoroso, Z. Zainun, Sumarjo dan Rahmat. 2005. Pemanfaatan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas. Jurnal Budidaya Air Tawar. 4 (1): 1-9.
- Mudjiutami, E; Ciptoroso; Zainudin, Z; Sumarjo; rahmat. 2007. Pemanfaatan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas. Jurnal Budidaya Air Tawar. 4 (1): 1-9.

- Noercholis, Achmad., Aziz. M dan Maftuch. 2013. Ekstraksi Fitur Roundness untuk Menghitung Jumlah Leukosit dalam Citra Sel Darah Ikan. Jurnal EECCIS. 7 (1): 1-9.
- Nurachman, Z. 2002. Artoindonesianin Untuk Antitumor. <http://www.chem-istrii>. (diakses pada tanggal 1 Januari 2014).
- Nuryati, S; A. Maswan; Alimuddin; Sukenda; K. Sumantadinata; F. H. Pasaribu; R. D. Soejoedono; A. Santika. 2010. Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Setelah Divaksinasi dengan Vaksin DNA. Jurnal Akuakultur Indonesia. 9 (1): 9-15.
- Partosuwiryo S; dan Y. Warseno. 2011. Kiat Sukses Budidaya Ikan Mas. Citra aji Parama. Yogyakarta. 60 hlm.
- Priyagung, T. P. 2008. Identifikasi Jenis Kelamin Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Menggunakan Voting *Feature Intervals*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi tidak dipublikasikan.
- Putri, F, M; Sarjito; dan Suminto. 2013. Pengaruh Penambahan *Spirulina* sp. dalam Pakan Buatan Terhadap Jumlah Total Hemosit dan Aktivitas Fagositosis Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Aquaculture Management and Technology. 2 (1): 102-112.
- Rachmawati, S. 2007. Studi Makroskopi, Dan Skrining Fitokimia Daun Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis. Fakultas Farmasi UNAIR Surabaya. Skripsi tidak di publikasikan.
- Ridlo, A dan Rini, P. 2009. Aplikasi Ekstrak Rumput Laut sebagai Agen Immunostimulan Sistem Pertahanan Non Spesifik pada Udang (*Litopenaeus vannamei*). Jurnal Ilmu Kelautan. 14 (3): 133 – 137.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi, diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB: Bandung. Hlm 347 – 367.
- Rochani, N. 2009. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) Terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimianya. Surabaya :Fakultas Farmasi UMS Surakarta. Skripsi tidak di publikasikan.
- Sakai, M. 1999. Current Research Status of Fis Immunostimulants Aquaculture 172 (2): 63-92.
- Samad, M.S.F. 2010. Pengaruh senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) terhadap hematologi dan aktivitas fagositosis ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis tidak di publikasikan.
- Saselah, Jetti. T., Reiny. A. T dan Henky. M. 2012. Determinasi Molekuler Koi Herpes Virus (KHV) yang Diisolasi dari Ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*). Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis. 8 (2): 1-5.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. Hlm 276.

- Selawa, W; Max, R. J. R; Gayatri, C. 2013. Kandungan Flavonoid Dan Kapasitas Antioksidantotal Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia*(Ten.)Steenis.). Jurnal Ilmiah Farmasi. ISSN 2302 – 2493. 2 (01): 1-6.
- Septiarini; Esti, H; Wardiyanto. 2012. Pengaruh Waktu Pemberian Probiotik yang Berbeda terhadap Respon Imun Non-Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Diuji Tantang dengan Bakteri *Aeromonas salmonicida*. Jurnal rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. ISSN: 2302 – 3600. 1 (1): 1-8.
- Setiaji, A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat Dan Etanol 70% Rhizoma Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Dan *Escherichia coli* ATCC 11229 Serta Skrining Fitokimianya. Fakultas Farmasi UMS Surakarta. Skripsi tidak di publikasikan.
- Setiawan, R. B; Dulm'iad, I; Rosidah. 2012. Eektivitas Vaksin dari Bakteri *Mycobacterium fortuitum* yang Diinaktivasi dengan Pemanasan untuk Pencegahan Penyakit Mycobacteriosis pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). Jurnal Perikanan dan Kelautan. ISSN: 2088 – 3137. 3 (1): 25-40.
- Shome, R., and B.R. Shome, 1999. A. Typical chronic from of *Aeromonas hydrophilla* infection in indian major carp, *Calta calta*, from Andaman. Curr. Sci. 7 (6): 1188-1190.
- Subarijanti,H. U. 2000. Pemupukan dan Kesuburan Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. Hlm 40.
- Suhermanto, Achmad., Sri Andayani dan Maftuch. 2011. Pemberian Total Fenol Teripang Pasir (*Holothuria Scabra*) untuk Meningkatkan Leukosit dan Diferensial Leukosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. Jurnal Kelautan. ISSN: 1907-993. 4 (2): 1-8.
- Sukenda; Jamal, D; Wahjuningrum, D; dan Hasan, A. 2008. Penggunaan Kitosan Untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. Jurnal Akuakultur Indonesia. 7 (2): 159 – 169.
- Suprastyani, H. 1989. Dasar-dasar Mempelajari Penyakit Bakterial Pada Ikan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hlm 52.
- Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tarsito. Bandung. Hlm 118.
- Susanto, H. 2005. Koi. Penebar Swadaya. Jakarta. Hlm 77.
- Sutton, S. 2011. Microbiology Topics - Determination of Inoculum for Microbiological Testing. 15 (3): 49.
- Thomson, R.H. 1993. The Chemistri Of Natural Producst. 2 Edition, chapman and hall ltd.glasgow,UK. Hlm 453.
- Trimariani, A. dan Rustikawati, I. (1990).Masalah Zooparasit dalam Pemeliharaan Benih Ikan Air Tawar. Prosiding Seminar Nasional II. Penyakit Ikan Dan Udang. Bogor. Hlm 16-18.

Tshikalange, T.E. 2007. In Vitro Anti-HIV-1 Properties Of Ethnobotanically Selected South African Plants Used In The Treatment Of Sexually Transmitted Diseases. University Of Pretoria. Journal Of Ethnopharmacology. 9 (6): 515-519.

Uchida, S. 2003. Production of a digital map of the hazardous conditions of soil erosion for the sloping lands of West Java, Indonesia using geographic information systems (GIS). JIRCAS. Indonesia. 48 (6): 348-356.

Utami, Saras Wati. 2013. Warta Ekspor, Peluang Ekspor Ikan Hias. Ditjen PEN/MJL,25/V/2013. Djpen.kemendag.go.id. Tradexpo Indonesia. Hlm 3-7.

Volk , W. dan M. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Penerbit Erlangga. Jakarta. Hlm 396.

Yahya, H. 2003. Menyingkap Rahasia Alam Semesta. <http://www.harunyahya.com>. (Diakses pada tanggal 9 Januari 2014).



LAMPIRAN

Lampiran 1. Gambar alat dan bahan penelitian

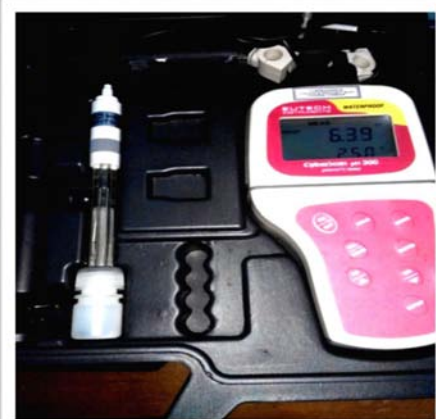
1a. Alat Penelitian



Rotary Evaporator



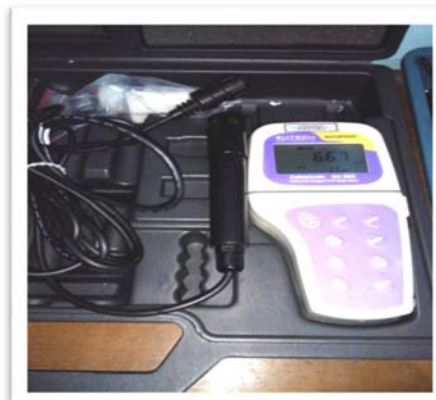
Timbangan Analitik



pH Meter



Inkubator



DO Meter

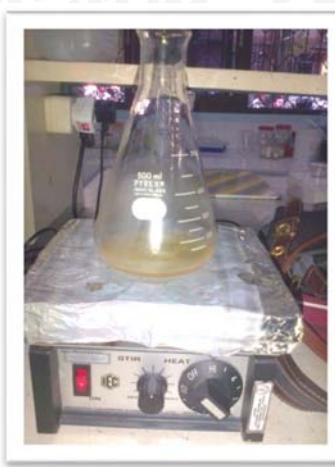


Autoclave

Lampiran 1 (Lanjutan)



Mikroskop



Hot Plate



Thermometer



Selang Aerator



Nampan dan Pipet Tetes



Batu Aerasi



Refrigator

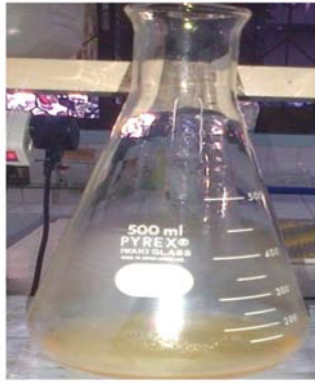


Laminary Flow



Rak

Lampiran 1 (Lanjutan)



Erlenmayer



Cawan Petri



Akuarium

1b) Bahan penelitian



Ikan koi



Binhong serbuk



TSA



TSB



Aquades



Aluminium Foil

Lampiran 1 (Lanjutan)



Sprit



Objekglass



Avendof



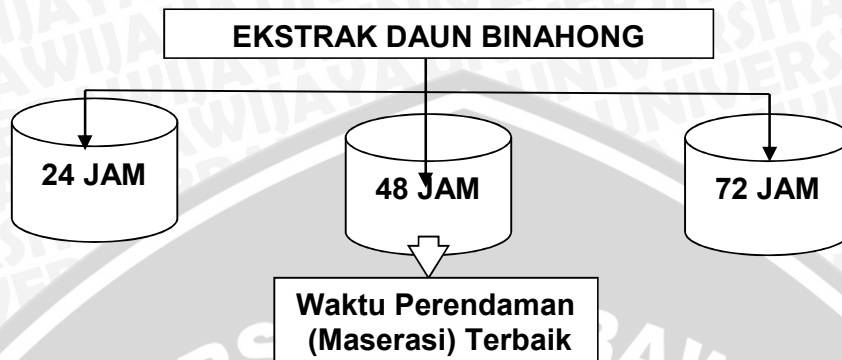
Ekstrak Kasar Daun Binahong



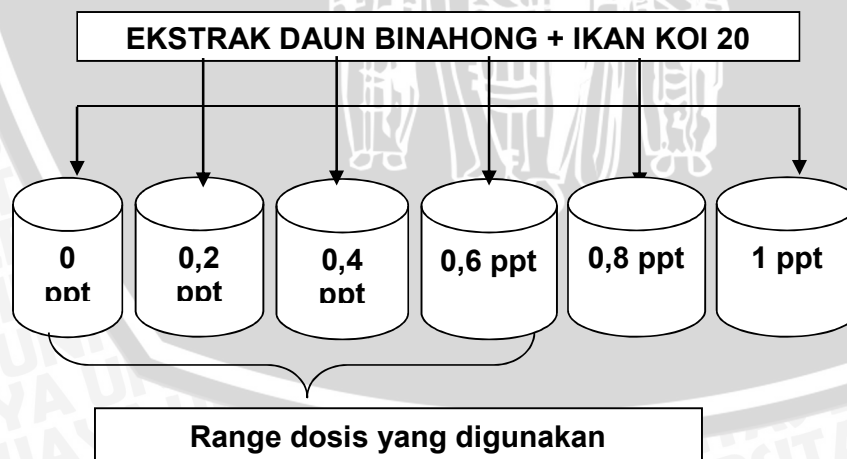
Alkohol 70



Mikroplat, Mikro pipet

Lampiran 2. Bagan Uji Pendahuluan**1) Penentuan Lama Perendaman (Maserasi) Terbaik Menggunakan Pelarut Etanol 96%**

Setelah mengetahui hasil pelarut terbaik untuk maserasi, penelitian pendahuluan dilanjutkan dengan mencari waktu maserasi terbaik, range waktu yang disarankan adalah selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah etanol 96%, dengan waktu maserasi selama 24 jam didapatkan hasil panjang gelombang yang rendah, sedangkan pada waktu maserasi 72 jam pelarut menguap. Sehingga dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa waktu maserasi yang optimal adalah 48 jam, setelah pengukuran panjang gelombang didapatkan hasil panjang gelombang lebih tinggi dibandingkan dengan maserasi 24 jam.

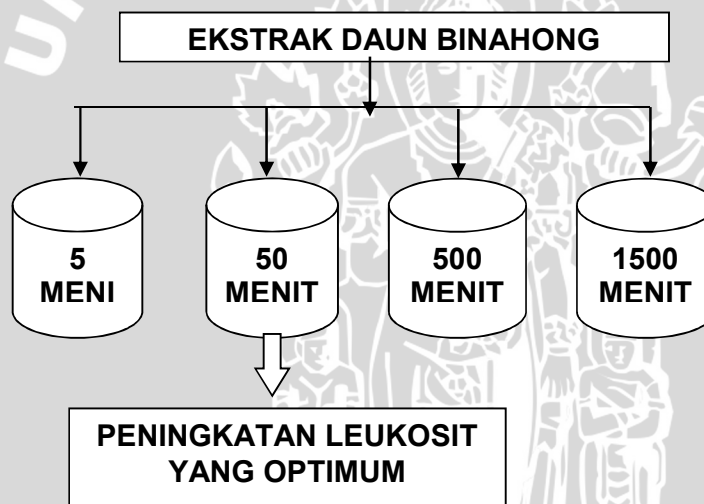
2) Uji LC50

Dari hasil uji LC50 menggunakan dosis ekstrak daun binahong untuk perendaman ikan koi didapat range yang optimum untuk peningkatan

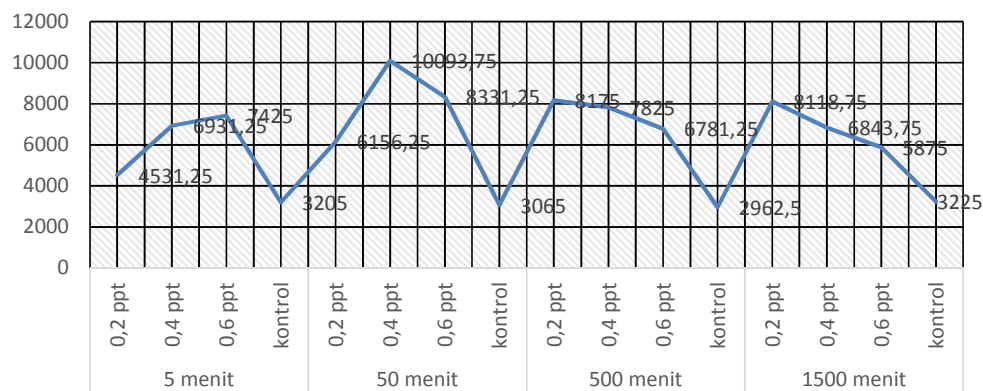
Lampiran 2 (Lanjutan)

immunostimulan ikan koi yaitu 0 ppt, 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt. Pada dosis 0,8 awal mematikan ikan uji pada waktu perendaman 18 jam dan mematikan 50% ikan uji ketika waktu perendaman 72 jam. Sedangkan pada dosis 1 ppt awal mematikan ikan uji pada waktu perendaman 14 jam dan mematikan 50% ikan uji ketika waktu perendaman 53 jam. Kematian ikan uji dikarenakan dosis ekstrak ikan terlalu pekat dan tinggi sehingga bukan bersifat sebagai immunostimulan bagi ikan koi, tapi malah bersifat mematikan. Dengan hasil tersebut maka dalam penelitian ini digunakan dosis ekstrak daun binahong untuk peningkatan immunostimulan yaitu 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt.

3) Uji Booster



Rata-Rata Uji Booster 1 & 2 Jml Leukosit

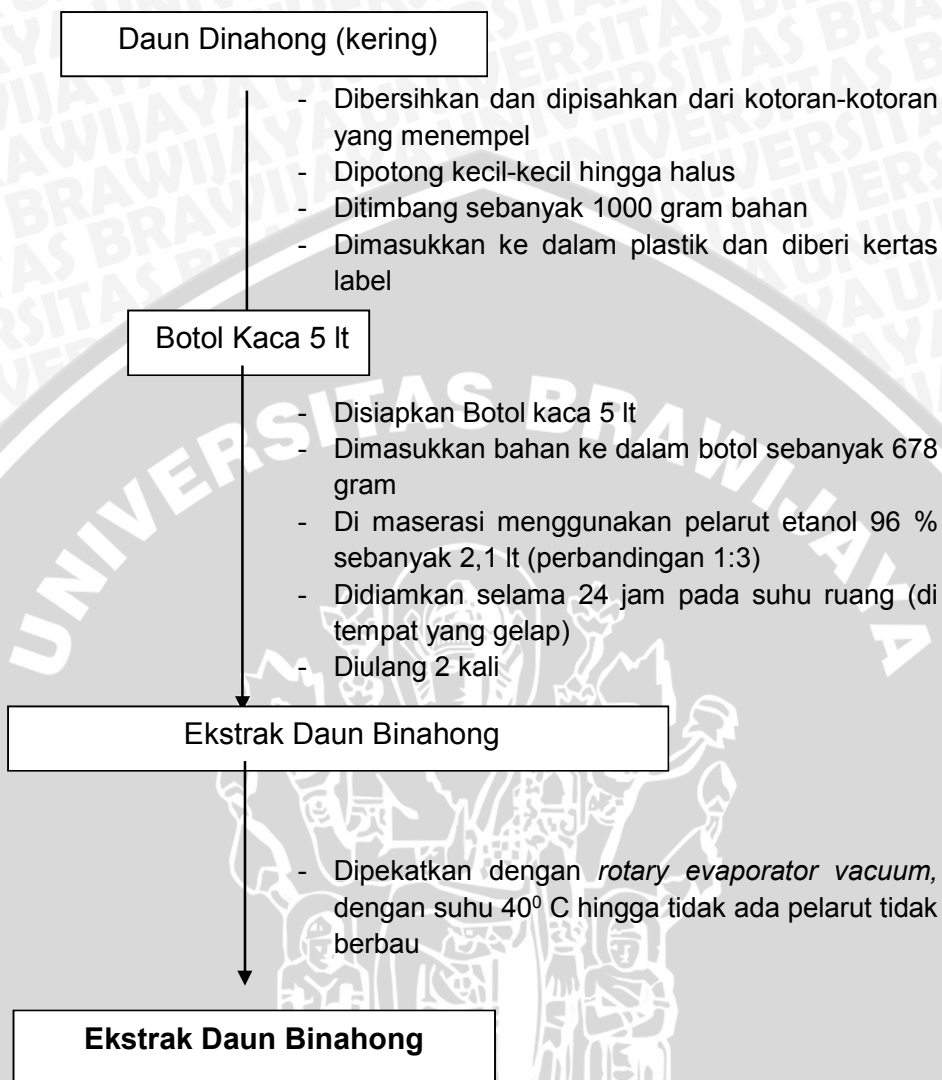


Lampiran 2 (Lanjutan)

Uji booster menggunakan waktu perendaman 5 menit, 50 menit, 500 menit, dan 1500 menit dengan masing-masing menggunakan dosis dari hasil uji LC50 yaitu 0 ppt, 0,2 ppt, 0,4 ppt, dan 0,6 ppt. Peningkatan jumlah leukosit tertinggi pada waktu perendaman 50 menit dengan jumlah leukosit 3.065 - 10.093,75 sel/mm³. Menurut Lengka, *et al.* (2013), jumlah leukosit dalam darah ikan mas berkisar 3.390-14.200 sel/mm³. Dengan hasil uji booster tersebut, maka penelitian ini menggunakan lama waktu perendaman ekstrak selama 50 menit.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 3. Ekstraksi Daun Binahong

Lampiran 4. Pembuatan Media TSA, NB dan Pembiakan Murni Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

A. Pembuatan Tryptone Soy Agar (TSA)

1. 40 gram TSA dilarutkan dengan 1 liter aquadest steril dalam Erlenmeyer.
2. Erlenmeyer ditutup kapas kemudian dididihkan hingga larut sempurna dan jernih. Larutkan TSA kemudian disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.
3. Media TSA yang sudah disterilisasi dituangkan ke dalam cawan petri steril dalam keadaan panas sebanyak 10-20 ml. penuangan dilakukan di dekat api bunsen, selanjutnya setelah penuangan selesai, cawan petri dipanaskan lagi. Media dibiarkan dingin dan memadat.
4. Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin sehingga dapat bertahan lama. Cawan petri diletakkan terbalik yaitu bagian tutup berada di bawah hal ini untuk menghindari tetesan air kondensasi dari tutup.
5. Media dari lemari pendingin, apabila akan digunakan dimasukkan kembali ke dalam inkubator, sehingga suhu media sama dengan suhu lingkungan dan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada media.

B. Pembuatan Media Cair Nutrient Broth (NB)

1. 13 gram *Nutrient Broth* dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup kapas kemudian dididihkan hingga larut sempurna dan jernih.
2. Media cair NB dalam Erlenmeyer disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media cair NB yang akan dipakai, dibiarkan dingin terlebih dahulu agar bakteri yang akan diinokulasi tidak mati.
3. Media NB yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin sehingga dapat bertahan lama.

Lampiran 4 (Lanjutan)

C. Pembiakan Murni Bakteri *Aeromonas hydrophilla*.

Biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophilla* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, sebelum digunakan bakteri dibiakkan terlebih dahulu dengan cara sebagai berikut :

1. Larutan NB disiapkan dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 ml.
2. Kemudian cawan petri yang berisi media TSA yang telah steril disiapkan.
3. Jarum ose dipanaskan di atas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan kebiakan murni bakteri murni *Aeromonas hydrophilla* dan diambil sebanyak 1 ose, kemudian dicelupkan ke NB.
4. Larutan NB dibiarkan selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 35°C .
5. Setelah NB menjadi keruh, jarum ose dicelupkan ke NB dan dioleskan ke permukaan media TSA.
6. Cawan petri ditutup dan sekelilingnya dipanaskan di atas Bunsen. Media yang telah terisi bakteri diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Lampiran 5. Data hasil perhitungan jumlah total leukosit ikan koi pra infeksi dan post infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

A. Pra Infeksi

Data Jumlah Leukosit (10^4 sel/ml) Ikan Koi

Perlakuan	Pra Infeksi (10 ⁴ sel/ml)			Rata-rata ± SD
	Ulangan			
	1	2	3	
Kontrol	3,09	2,40	2,16	2,55±4,86
A	6,20	8,08	6,64	6,97±9,78
B	7,67	7,96	10,0	8,57±1,30
C	3,86	4,76	3,57	4,06±6,17

Keterangan : Dosis K = 0; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt

Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Sminov ($p>0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Prainfeksi
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	5.5325
	Std. Deviation	2.57575
Most Extreme Differences	Absolute	.159
	Positive	.159
	Negative	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.549
Asymp. Sig. (2-tailed)		.923

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,549, $\alpha>0,05$, Sehingga data diatas normal.

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	Df (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	66.585	3	22.195	27.765	0.000
Acak	6.395	8	0.799		
Total	72.980	11			

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

Lampiran 5 (Lanjutan)

Post Hoc Test

Tukey

(I) Perlaku an	(J) Perlaku an	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	200	-4.42333*	.73001	.001	-6.7611	-2.0856
	400	-5.99333*	.73001	.000	-8.3311	-3.6556
	600	-1.51333	.73001	.240	-3.8511	.8244
200	0	4.42333*	.73001	.001	2.0856	6.7611
	400	-1.57000	.73001	.217	-3.9078	.7678
	600	2.91000*	.73001	.017	.5722	5.2478
400	0	5.99333*	.73001	.000	3.6556	8.3311
	200	1.57000	.73001	.217	-.7678	3.9078
	600	4.48000*	.73001	.001	2.1422	6.8178
600	0	1.51333	.73001	.240	-.8244	3.8511
	200	-2.91000*	.73001	.017	-5.2478	-.5722
	400	-4.48000*	.73001	.001	-6.8178	-2.1422

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Berdasarkan objek yang diamati:

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	K	C	A	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
C	1, 51 ^{ns}	-	-	-	ab
A	4,42 ^{**}	2,91 ^{**}	-	-	c
B	5,99 ^{**}	4,48 ^{**}	1,57 ^{ns}	-	c

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Ringkasan Model

Equatio n	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.077	.831	1	10	.383	4.616	.003		
Quadrat ic	.891	36.925	2	9	.000	2.390	.036	-5.565E-5	
Cubic	.812	27.765	3	8	.000	2.350	.024	4.292E-6	-6.660E-8

Lampiran 5 (Lanjutan)

Hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan Grafik Sebagai Berikut: $y = 2,3902 + 36,442x - 55,64x^2$.

Titik Maksimum

Pra infeksi

$$Y = 2,39 + 36,44x - 55,64x^2$$

$$Y' = 36,44 - (2) \cdot 55,64x$$

$$Y' = 36,44 - 111,28x$$

$$111,28x = 36,44$$

$$X = \frac{36,44}{111,28}$$

$$X = 0,32$$

$$Y = 2,39 + 36,44x - 55,64x^2$$

$$Y = 2,39 + 36,44(0,32) - 55,64(0,32)^2$$

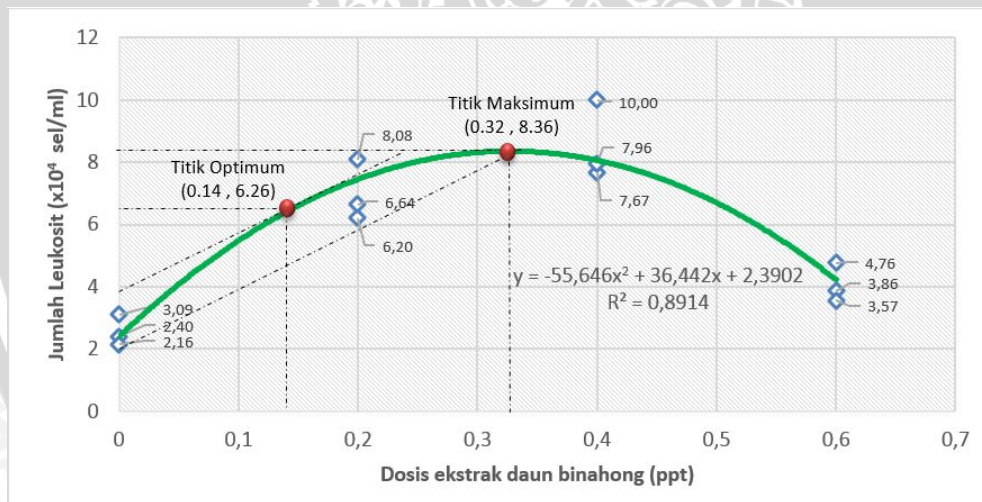
$$Y = 2,39 + 11,66 - 5,69$$

$$Y = 8,36$$

Keterangan:

x = dosis maksimum

y = jumlah leukosit



Berdasarkan grafik diatas, dosis maksimum untuk pemberian ekstrak daun binahong adalah sebesar 0,32 ppt dengan jumlah leukosit ikan koi sebesar $8,36 \times 10^4$ sel/ml. Sedangkan untuk dosis optimum 0,14 ppt dengan dengan jumlah leukosit ikan koi sebesar $6,26 \times 10^4$ sel/ml. Dosis optimum didapat dengan cara menarik garis singgung sampai titik perpotongan.

Lampiran 5 (Lanjutan)

B. Post Infeksi

Data Jumlah Leukosit (10^4 sel/ml) Ikan Koi Post Infeksi

Perlakuan	Post Infeksi (10^4 sel/ml)			Rata-rata $\pm$ SD
	1	2	3	
Kontrol	4,16	3,40	3,02	3,48 $\pm$ 5,00
A	8,08	7,61	7,30	7,66 $\pm$ 3,94
B	7,91	9,67	11,1	9,62 $\pm$ 1,64
C	4,96	5,25	5,87	5,36 $\pm$ 4,61

Keterangan : Dosis K = 0; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt

Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Sminov ($p>0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Post infeksi
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	6.4042
	Std. Deviation	2.28745
Most Extreme Differences	Absolute	.152
	Positive	.110
	Negative	-.152
Kolmogorov-Smirnov Z		.528
Asymp. Sig. (2-tailed)		.943

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,528, $\alpha>0,05$, Sehingga data diatas normal.

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	Df (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	54.134	3	18.045	42.178	0.000
Acak	3.423	8	0.428		
Total	57.557	11			

Keterangan: ** sangat berbeda nyata (sig<0,01)

Lampiran 5 (Lanjutan)

Post Hoc Test

PostInfeksi
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	200	-4.13667*	.53406	.000	-5.8469	-2.4264
	400	-5.54000*	.53406	.000	-7.2502	-3.8298
	600	-1.83333*	.53406	.036	-3.5436	-.1231
200	0	4.13667*	.53406	.000	2.4264	5.8469
	400	-1.40333	.53406	.112	-3.1136	.3069
	600	2.30333*	.53406	.011	.5931	4.0136
400	0	5.54000*	.53406	.000	3.8298	7.2502
	200	1.40333	.53406	.112	-.3069	3.1136
	600	3.70667*	.53406	.001	1.9964	5.4169
600	0	1.83333*	.53406	.036	.1231	3.5436
	200	-2.30333*	.53406	.011	-4.0136	-.5931
	400	-3.70667*	.53406	.001	-5.4169	-1.9964

Berdasarkan objek yang diamati:

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	K	C	A	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
C	1,83*	-	-	-	b
A	4,13**	2,30*	-	-	c
B	6,03**	4,20**	1,89*	-	c

Ringkasan Model

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.124	1.41	1	10	.261	5.369	.003		
Quadratic	.926	56.15	2	9	.000	3.408	.033	-4.902E-5	
Cubic	.911	42.17	3	8	.000	3.327	.024	-4.458E-6	-4.951E-8

Lampiran 5 (Lanjutan)

Hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan gambar sebagai berikut : $y = 3,3338 + 34,961x - 52,104x^2$.

Titik Maksimum

Post infeksi

$$Y = 3,33 + 34,96x - 52,10x^2$$

$$Y' = 36,96 - (2) \cdot 52,10x$$

$$Y' = 36,96 - 104,20x$$

$$104,20x = 36,96$$

$$x = \frac{36,96}{104,20}$$

$$x = 0,33$$

$$Y = 3,33 + 34,96x - 52,10x^2$$

$$Y = 3,33 + 34,96(0,33) - 52,10(0,33)^2$$

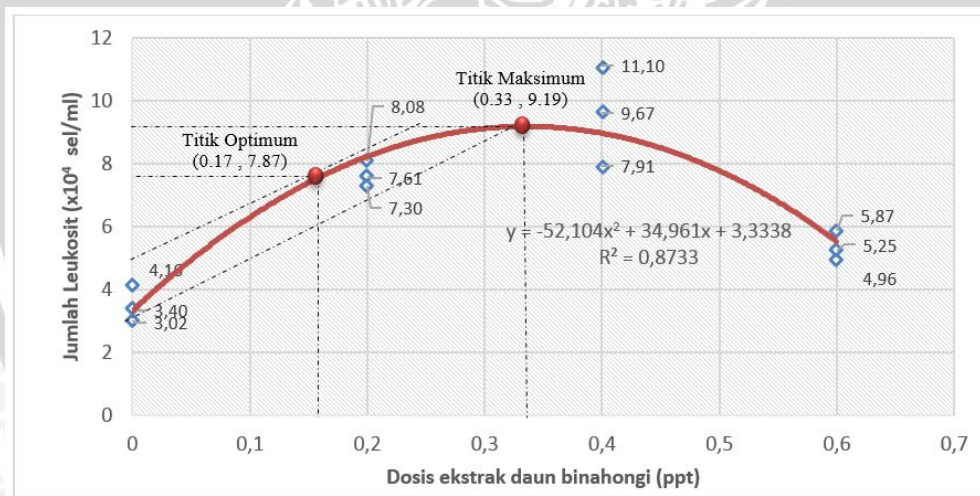
$$Y = 3,33 + 11,53 - 5,67$$

$$Y = 9,19$$

Keterangan:

x = dosis maksimum

y = jumlah leukosit



Berdasarkan grafik diatas, dosis maksimum untuk pemberian ekstrak daun binahong adalah sebesar 0,33 ppt dengan jumlah leukosit ikan koi sebesar $9,19 \times 10^4$ sel/ml. Sedangkan untuk dosis optimum 0,17 ppt dengan dengan jumlah leukosit ikan koi sebesar $7,87 \times 10^4$ sel/ml. Dosis optimum didapat dengan cara menarik garis singgung sampai titik perpotongan.

Lampiran 6. Data hasil perhitungan aktivitas fagositosis ikan koi Pra infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

A. Pra Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Data Aktivitas Fagositosis (%) Ikan Koi

Perlakuan	Pra Infeksi Bakteri			
	Ulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3	
K	26,8	28,8	28,7	28,18 ± 1,14
A	29,6	32,5	30,0	30,75 ± 1,53
B	34,8	35,0	37,2	35,73 ± 1,36
C	32,9	35,3	32,4	33,57 ± 1,54

Keterangan : Dosis K = 0 ppt; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt (data dalam bentuk arcsin)

Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Sminov ($p > 0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PraInfeksi
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	32.0575
	Std. Deviation	3.20992
Most Extreme Differences	Absolute	.151
	Positive	.151
	Negative	-.140
Kolmogorov-Smirnov Z		.522
Asymp. Sig. (2-tailed)		.948

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,522, $\alpha > 0,05$, Sehingga data diatas normal.

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Perlakuan	97.607	3	32.536	16.545	0.001
Acak	15.732	8	1.967		
Total	113.339	11			

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

Lampiran 6 (Lanjutan)

Post Hoc Test

PraInfeksi

Tukey HSD

(I) Perlakuan n	(J) Perlakuan n	Mean Difference (I-J)	Std. Error	95% Confidence Interval		
				Sig.	Lower Bound	Upper Bound
0	0.2	-2.56000	1.14500	.193	-6.2267	1.1067
	0.4	-7.55000*	1.14500	.001	-11.2167	-3.8833
	0.6	-5.38667*	1.14500	.007	-9.0534	-1.7200
0.2	0	2.56000	1.14500	.193	-1.1067	6.2267
	0.4	-4.99000*	1.14500	.010	-8.6567	-1.3233
	0.6	-2.82667	1.14500	.140	-6.4934	.8400
0.4	0	7.55000*	1.14500	.001	3.8833	11.2167
	0.2	4.99000*	1.14500	.010	1.3233	8.6567
	0.6	2.16333	1.14500	.304	-1.5034	5.8300
0.6	0	5.38667*	1.14500	.007	1.7200	9.0534
	0.2	2.82667	1.14500	.140	-.8400	6.4934
	0.4	-2.16333	1.14500	.304	-5.8300	1.5034

Beberapa perbandingan

Berdasarkan objek yang diamati:

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	K	A	C	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
A	2,56 ^{ns}	-	-	-	ab
C	5,39**	2,82*	-	-	bc
B	7,55**	4,98**	2,16 ^{ns}	-	c

Lampiran 6 (Lanjutan)

Ringkasan Model

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R ²	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.592	14.51	1	10	.003	28.885	10.575		
Quadratic	.740	12.78	2	9	.002	27.704	28.288	-29.521	
Cubic	.861	16.54	3	8	.001	28.183	-9.247	150.167	-199.653

Hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan gambar sebagai berikut : $y = 27,704 + 28,296x - 29,528x^2$

Titik Maksimum

Pra infeksi

$$Y = 27,70 + 28,29x - 29,52x^2$$

$$Y' = 28,29 - (2) \cdot 29,52x$$

$$Y' = 28,29 - 59,04x$$

$$59,04x = 28,29$$

$$x = \frac{28,29}{59,04}$$

$$x = 0,47$$

$$Y = 27,70 + 28,29x - 29,52x^2$$

$$Y = 27,70 + 28,29(0,47) - 29,52(0,47)^2$$

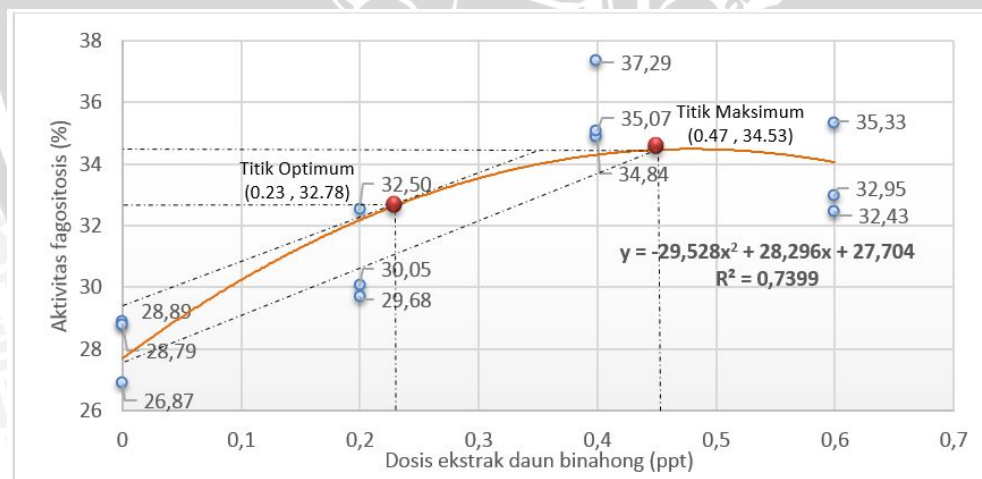
$$Y = 27,70 + 13,79 - 6,49$$

$$Y = 34,53$$

Keterangan:

x = dosis maksimum

y = aktivitas fagositosis



Berdasarkan grafik diatas, dosis maksimum untuk pemberian ekstrak daun binahong adalah sebesar 0,47 ppt dengan aktivitas fagositosis pada ikan koi sebesar 34,53%. Sedangkan untuk dosis optimum 0,23 ppt dengan dengan aktivitas fagositosis pada ikan koi sebesar 32,78%. Dosis optimum didapat dengan cara menarik garis singgung sampai titik perpotongan.

Lampiran 6 (Lanjutan)

C. Post Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Data Aktivitas Fagositosis (%) Ikan Koi

Perlakuan	Post Infeksi Bakteri			
	Ulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3	
K	25,4	24,9	28,4	26,31 ± 1,89
A	31,9	34,2	31,4	32,57 ± 1,51
B	38,8	40,5	37,9	39,12 ± 1,31
C	36,8	34,3	35,9	35,71 ± 1,29

Keterangan : Dosis K = 0 ppt; A = 0,2 ppt; B = 0,4 ppt dan 0,6 ppt (data dalam bentuk arcsin)

Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Sminov ($p > 0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PostInfeksi
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	33.4258
	Std. Deviation	5.09604
Most Extreme Differences	Absolute	.150
	Positive	.107
	Negative	-.150
Kolmogorov-Smirnov Z		.519
Asymp. Sig. (2-tailed)		.950

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,519, $\alpha > 0,05$, Sehingga data diatas normal.

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Perlakuan	267.185	3	89.062	38.553	0.000
Acak	18.481	8	2.310		
Total	285.666	11			

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

Lampiran 6 (Lanjutan)

Post Hoc Test

TUKEY HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	0.2	-6.26000*	1.24099	.004	-10.2341	-2.2859
	0.4	-12.81333*	1.24099	.000	-16.7874	-8.8392
	0.6	-9.40333*	1.24099	.000	-13.3774	-5.4292
0.2	0	6.26000*	1.24099	.004	2.2859	10.2341
	0.4	-6.55333*	1.24099	.003	-10.5274	-2.5792
	0.6	-3.14333	1.24099	.128	-7.1174	.8308
0.4	0	12.81333*	1.24099	.000	8.8392	16.7874
	0.2	6.55333*	1.24099	.003	2.5792	10.5274
	0.6	3.41000	1.24099	.095	-.5641	7.3841
0.6	0	9.40333*	1.24099	.000	5.4292	13.3774
	0.2	3.14333	1.24099	.128	-.8308	7.1174
	0.4	-3.41000	1.24099	.095	-7.3841	.5641

Berdasarkan objek yang diamati:

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	K	A	C	B	Notasi
K	-	-	-	-	a
A	6,25**	-	-	-	b
C	9,40**	3,14*	-	-	bc
B	12,81**	6,55**	3,40*	-	c

Ringkasan Model

Equation	Model Summary					Parameter Estimates			
	R ²	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2	b3
Linear	.635	17.365	1	10	.002	28.211	17.382		
Quadratic	.880	33.021	2	9	.000	25.794	53.644	-60.438	
Cubic	.835	31.553	3	8	.000	26.307	13.472	131.875	-213.681

The independent variable is
Perlakuan.

Lampiran 6 (Lanjutan)

Hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan gambar sebagai berikut : $y = 25,795 + 53,631x - 60,42x^2$

Titik Maksimum

Post infeksi

$$Y = 25,79 + 53,63x - 60,42x^2$$

$$Y' = 53,63 - (2) \cdot 60,42x$$

$$Y' = 53,63 - 120,84x$$

$$120,84x = 53,63$$

$$x = \frac{53,63}{120,84}$$

$$x = 0,44$$

$$Y = 25,79 + 53,63x - 60,42x^2$$

$$Y = 25,79 + 53,63(0,44) - 60,42(0,44)^2$$

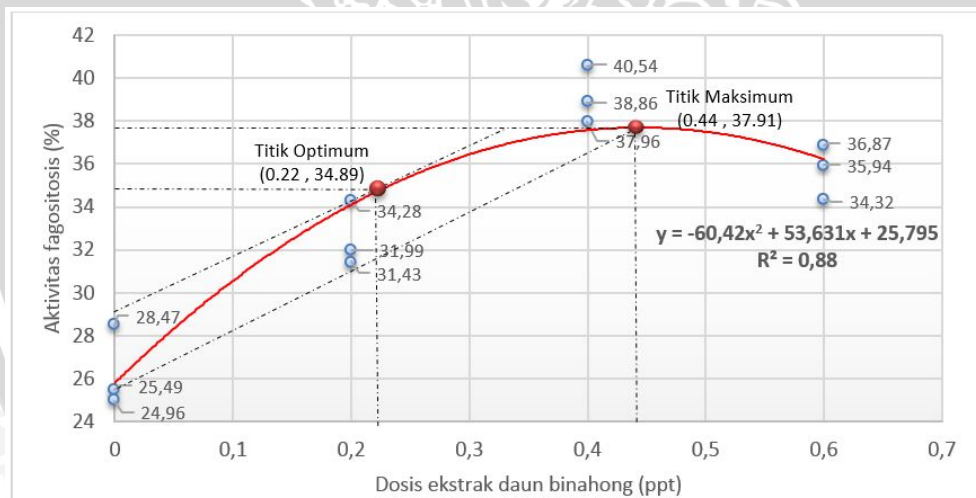
$$Y = 27,70 + 23,59 - 11,47$$

$$Y = 37,91$$

Keterangan:

x = dosis maksimum

y = aktivitas fagositosis



Berdasarkan grafik diatas, dosis maksimum untuk pemberian ekstrak daun binahong adalah sebesar 0,44 ppt dengan aktivitas fagositosis pada ikan koi sebesar 37,91%. Sedangkan untuk dosis optimum 0,22 ppt dengan dengan aktivitas fagositosis pada ikan koi sebesar 34,89%. Dosis optimum didapat dengan cara menarik garis singgung sampai titik perpotongan.