PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP HEMATOLOGI IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :

INDAH RAHAYU

NIM. 115080501111006

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP HEMATOLOGI 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 :

INDAH RAHAYU
NIM. 115080501111006

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2015

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP HEMATOLOGI IKAN KOI (*Cyprinus carpio)* YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh :

INDAH RAHAYU

NIM. 115080501111006

Menyetujui,

Dosen Penguji I	**Dosen Pembimbing I**
Dr. Ir. Abd Rahem Faqih, M.Si	**Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS**
NIP:19671010 199702 1 001	**NIP: 19550213 198403 1 001**
TANGGAL :	**TANGGAL :**
Dosen Penguji II	**Dosen Pembimbing II**
Ir. Ellana Sanoesi, MP	**Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**
NIP: 19630924 199803 2 002	**NIP: 19621014 198701 1 001**
TANGGAL :	**TANGGAL :**

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP : 19620805 198603 2 001
TANGGAL :

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

INDAH RAHAYU. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Hematologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. ARIEF PRAJITNO, MS** dan **Dr. Ir. M. FADJAR, M.Sc.**

Koi (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu ikan hias yang sejak dulu hingga saat ini terkenal di masyarakat, khususnya pencinta ikan hias yang terjun langsung memelihara koi dan mengomersialkannya. Hal ini disebabkan koi memiliki warna yang indah dan eksotis, bentuk dan gerakan yang menarik. Namun kendala dalam budidaya ikan koi biasanya sering terjadi penyakit yang disebabkan bakteri. *Aeromonas hydrophila* disebut bakteri oportunistik yaitu mampu menyebabkan penyakit pada kondisi tertentu diantaranta perubahan kondisi lingkungan, stress, dan kondisi inang yang terinfeksi. Bakteri *A. hydrophila* dapat menginfeksi melalui permukaan tubuh yang luka atau insang kemudian masuk ke dalm pembuluh darah (Ulfiana *et al*., 2012).Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteri alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri, salah satunya adalah dengan penggunaan daun mengkudu (*Morinda citrifolia*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap hematologi ikan Koi (*C. carpio*) yang diinfeksi *A. hydrophila.* Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret 2015. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan yaitu dengan menggunakan dosis A (200 ppm), B (400 ppm), C (600 ppm) dan D (800 ppm). Parameter utama dalam penelitian ini adalah perhitungan total sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan diferensial leukosit (limfosit, monosit dan neutrofil) dan sedangkan untuk parameter penunjang dalam penelitian ini adalah gejala klinis dan kualitas air (suhu, pH, dan DO).

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut: perhitungan eritrosit pada perlakuan D (800 ppm) memiliki rata-rata jumlah eritrosit tertinggi yaitu $190{,}67 \times 10^4$ sel/mm^3. Hubungan antara dosis yang berbeda dengan total eritrosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu yaitu sebesar 0,923 dengan persamaan y = -1,36x+835,5.

Pada perhitungan leukosit pada perlakuan D (800 ppm) memiliki rata-rata jumlah leukosit terendah yaitu $7{,}67 \times 10^3$ sel/mm^3, hubungan antara dosis yang berbeda dengan total leukosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu yaitu sebesar 0,921 dengan persamaan y = 0,025x -1,69

Pada perhitungan diferensial leukosit adalah sebagai berikut: limfosit pada perlakuan D (800 ppm) memiliki rata-rata jumlah limfosit tertinggi yaitu 72,07%, hubungan antara dosis yang berbeda dengan total limfosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu yaitu sebesar 0,972 dengan persamaan y = 0,79x -330,06. Monosit pada perlakuan D (800 ppm) memiliki rata-rata jumlah monosit terendah yaitu 20,64%, hubungan bahwa antara dosis yang berbeda dengan total monosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu yaitu sebesar 0,944 dengan persamaan y = 0,55x – 250,7. Neutrofil pada perlakuan D (800 ppm) memiliki

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

rata-rata jumlah neutrofil terndah yaitu 5,82%, hubungan antara dosis yang berbeda dengan persentase total neutrofil memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu yaitu sebesar 0,854 dengan persamaan y = -0,024x + 22,41.

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, Mei 2015

Mahasiswa

Indah Rahayu

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan atas terselesaikannya laporan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT atas limpahan rahmat serta karunia-Nya.
2. Bapak Tarmudji dan Ibu Samiatin tersayang atas segala dukungan, motivasi, bimbingan dan do'anya sebagai orangtua.
3. Kak Hadi Prayitno, Kak Anik serta keponakanku Atika Rafanda Hasya yang selalu menjadi penghibur.
4. Untuk partner terbaikku Bagas Aji Pamungkas yang selalu memberikan semangat dan dukungan.
5. Seluruh rekan-rekan tim parasiters yang telah banyak membantu dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesaikannya skripsi ini.
6. Mbak Fitria Ramdhany Permatasari yang memberikan bantuan penulis dalam menyusun laporan skripsi ini.
7. Sahabat-sahabatku Elinda, Dian, Anggi dan Dani yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
8. Teman-teman Aquatic Spartans BP 2011 yang telah ikut serta mendukung penyelesaian skripsi ini.
9. Seluruh pihak yang sudah membantu penulis selama penelitian.

Malang, Mei 2015

Penulis

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan nikmat serta karunia-Nya, maka penyusunan skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu *(Morinda citrifolia)* terhadap Hematologi Ikan Koi *(Cyprinus carpio)* yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*" dapat diselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada :

10. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku pembimbing 1 yang telah meluangkan waktu, selalu sabar dalam membimbing dan memberi motivasi.
11. Bapak Dr. Ir. Mohamad Fadjar M.Sc selaku pembimbing 2 yang telah meluangkan waktu, senantiasa selalu memberi saran, motivasi dan dukungan.
12. Bapak Dr. Ir. Abd Rahem Faqih, M.Si selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran yang membangun.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurang tepat dan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Malang, Mei 2015

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN ..... **iv**

KATA PENGANTAR ..... **viii**

DAFTAR ISI ..... **ix**

DAFTAR GAMBAR ..... **xi**

DAFTAR TABEL ..... **xii**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **xiii**

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.4 Hipotesis 4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan 5

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) 6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi 6
2.1.2 Habitat 7
2.1.3 Pakan dan Kebiasaan Makan 8
2.1.4 Penyakit Ikan Koi 9
2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila* 9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi 9
2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan 10
2.2.3 Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* 11
2.3 Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) 12
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi 12
2.3.2 Komposisi dan Manfaat Daun Mengkudu *(Morinda citrifolia)* 13
2.4 Hematologi 14
2.4.1 Sel Darah Merah (Eritrosit) 15
2.4.2 Sel Darah Putih(Leukosit) 16
2.4.3 Limfosit 17
2.4.4 Monosit 18
2.4.5 Neutrofil 19
2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba 20
2.6 Sistem Kekebalan Tubuh 21

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian 23
3.1.1 Alat-alat Penelitian 23
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian 23

3.2 Metode Penelitian 23
3.3 Rancangan Penelitian 24
3.4 Prosedur Penelitian 26
3.4.1 Persiapan Penelitian 26
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian 28
3.5 Parameter Uji 31
3.5.1 Parameter Utama 31
3.5.2 Parameter Penunjang 32
3.6 Analisa Data 32

4. HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Pengamatan Hematologi 33
4.1.1 Jumlah Eritrosit 33
4.1.2 Jumlah Leukosit 37
4.1.3 Diferensial Leukosit 41
4.2 Gejala Klinis 52
4.3 Kualitas Air 55
4.3.1 Suhu 55
4.3.2 Derajat Keasaman (pH) 55
4.3.3 DO(*Dissolved Oxygen*)/Oksigen Terlarut 56

5. KESIMPULAN DAN SARAN
5.1 Kesimpulan 57
5.2 Saran 57

DAFTAR PUSTAKA 58

LAMPIRAN 62

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) 7
2. Bakteri *Aeromonas hydrophila* 10
3. Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) 13
4. a. Eritrosit Immature dan b. Eritrosit Mature Perbesaran 500 x 16
5. a. Limfosit, b. Eritrosit dengan Perbesaran 500 x 18
6. a. Monosit, b. Eritrosit, c, Limfosit dengan Perbesaran 500 x 19
7. a. Neutrofil, b. Eritrosit dengan Perbesaran 500 x 20
8. Denah Penelitian 25
9. a) Eritrosit Perbesaran 400 x, b)Eritrosit Perbesaran 1000 x 35
10. Grafik Regresi Total Eritrosit Ikan Koi 35
11. Leukosit Perbesaran 400 x (Dokumentasi Penelitian) 39
12. Grafik Regresi Total Leukosit Ikan Koi 39
13. Limfosit Ikan Koi Perbesaran 1000 x (Dokumentasi Penelitian) 43
14. Grafik Regresi Persentase Limfosit 43
15. Monosit Ikan Koi Perbesaran 1000 x (Dokumentasi Penelitian) 47
16. Grafik Regresi Persentase Monosit 47
17. Neutrofil Ikan Koi Perbesaran 1000 x (Dokumentasi Penelitian) 50
18. Grafik Regresi Persentase Neutrofil 51
19. Gejala Klinis Ikan a. Sisik Mengelupas, b. Perut Membusuk 53

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Jumlah Eritrosit Ikan Koi (10^4 sel/mm^3) 33
2. Analisis Ragam Jumlah Eritrosit Ikan Koi 34
3. Uji BNT Jumlah Eritrosit Ikan Koi 34
4. Jumlah Leukosit Ikan Koi (10^3 sel/mm^3) 37
5. Analisis Ragam Jumlah Leukosit Ikan Koi 38
6. Uji BNT Jumlah Leukosit Ikan Koi 38
7. Persentase Jumlah Limfosit Ikan Koi 41
8. Analisis Ragam Jumlah Limfosit Ikan Koi 42
9. Uji BNT Jumlah Limfosit Ikan Koi 42
10. Persentase Jumlah Monosit Ikan Koi (%) 45
11. Analisis Ragam Jumlah Monosit Ikan Koi 46
12. Uji BNT Jumlah Monosit Ikan Koi 46
13. Persentase Jumlah Neutrofil Ikan Koi (%) 49
14. Analisis Ragam Jumlah Limfosit Ikan Koi 49
15. Uji BNT Jumlah Neutrofil Ikan Koi 50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Alat-alat Penelitian 62
2. Bahan-bahan Penelitian 65
3. Dokumentasi Kegiatan Penelitian 67
4. Cara Perhitungan Sidik Ragam, Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan Analisa Regresi 68
5. Perhitungan Jumlah Eritrosit 71
6. Perhitungan Jumlah Leukosit 76
7. Perhitungan Jumlah Limfosit 81
8. Perhitungan Jumlah Monosit 86
9. Perhitungan Jumlah Neutrofil 91
10. Tabel Pengamatan Kualitas Air 96

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan hias memiliki nilai tambah yang menarik. Banyak hal yang dapat dijadikan sebagai faktor pendukung dalam melakukan usaha ikan hias, diantaranya mempunyai nilai ekonomis dan banyak peminat yang sudah menyebar ke seluruh lapisan masyarakat. ikan koi bukan merupakan komoditas baru di Indonesia, hanya saja kurang dikenal jika dibandingkan dengan ikan mas koki. Ikan koi sebagai ikan hias yang mempunyai warna menarik, merupakan salah satu budaya Jepang yang sangat dijunjung tinggi seperti halnya tanaman bonsai. Ekspor ikan hias Indonesia mencapai 10 juta dolar AS tahun 2009 dan pada tahun 2010 diperkirakan mencapai 12 juta dolar AS. Sedangkan nilai ekspor ikan koi mencapai 200 miliar pada tahun 2009 (KKP 2010 *dalam* Prasetya, Subekti dan Kismiyati, 2013).

Koi (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu ikan hias yang sejak dulu hingga saat ini terkenal di masyarakat, khususnya pencinta ikan hias. Para hobiis dan pebisnis terjun langsung memelihara koi dan mengomersialkannya. Hal ini disebabkan koi memiliki warna yang indah dan eksotis, bentuk dan gerakan yang menarik (Jaya dan Iqbal 2009).

Pencapaian target produksi agar sesuai dengan yang diharapkan, tak lepas dari permasalahan menghambat upaya peningkatan produksi tersebut, antara lain kegagalan produksi akibat serangan wabah penyakit ikan yang bersifat patogenik misalnya dari golongan bakteri. Degradasi mutu lingkungan budidaya yang semakin buruk juga menyebabkan masalah dalam kegiatan produksi. Pada dasarnya serangan wabah penyakit tersebut terjadi karena adanya gangguan keseimbangan dan interaksi ikan, lingkungan yang tidak

menguntunkan ikan dan berkembangnya patogen penyebab penyakit (Kordi 2004 *dalam* Mulyani, Bachtiar dan Untung, 2013).

Salah satu mikroorganisme yang merupakan patogen bagi ikan adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini disebut bakteri oportunistik yaitu mampu menyebabkan penyakit pada kondisi tertentu diantaranya perubahan kondisi lingkungan, stress, dan kondisi inang yang terinfeksi. Bakteri *A. hydrophila* dapat menginfeksi melalui permukaan tubuh yang luka atau insang kemudian masuk ke dalam pembuluh darah (Ulfiana, Mahasri dan Suprapto, 2012).

A. hydrophila merupakan bakteri gram negatif yang yang menyebabkan infeksi pada makanan dan ikan hias. Keberadaannya bersifat ancaman pada usaha budidaya. Infeksi bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan *Aeromonas septicemia* dan *hemorrhagic bacterial* pada ikan. Bakteri ini biasanya menyerang ikan lele, ikan mas, dan ikan koi (Thangaviji, Michaelbabu, Anand, Gunasekaran dan Citarasu, 2012).

Penanggulangan penyakit pada sistem budidaya umumya menggunakan antibiotik. Akan tetapi, penggunaan antibiotik saat ini sudah dilarang karena dapat menimbulkan efek resisten terhadap antibiotik serta mengakibatkan pencemaran pada lingkungan. Penggunaan antibiotik pada ikan konsumsi dapat meninggalkan residu pada tubuh inangnya, sehingga tidak aman apabila terkonsumsi oleh manusia, karena dapat menyebabkan efek resistensi pada bakteri yang bersifat *infectious* bagi manusia. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan lain yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan efek resisten terhadap bakteri. Pengobatan tradisional dengan fitofarmaka dan pemanfaatan bahan obat alamiah lainnya mulai menjadi perhatian dunia sekarang (Kamaludin, 2011).

Indonesia merupakan negara dengan spesies tumbuhan berguna yang cukup besar. Pemanfaatan tumbuhan tersebut sudah dipraktekkan dan digunakan baik pada hewan maupun manusia meskipun dengan jumlah yang tidak banyak. Pada dasarnya masing-masing tumbuhan berguna tersebut mengandung zat atau senyawa yang bisa memberikan efek pengobatan atau pencegahan terhadap penyakit (Hadiroseyani, Hafifudiin dan Supriyadi, 2005).

Salah satu tanaman obat Indonesia yang akhir-akhir ini banyak dimanfaatkan adalah daun Mengkudu *(Morinda citrifolia)*. Tanaman Mengkudu (*M. citrifolia*) belakangan ini menjadi sangat populer. Tanaman ini banyak terdapat di Indonesia sebagai tanaman liar atau tanaman pekarangan yang dimanfaatkan sebagai sayuran atau tanaman obat. Khasiatnya yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit pada manusia mendorong banyak peneliti untuk melakukan penelitian tentang kandungan tanaman mengkudu serta khasiatnya. Zat yang dikandung dalam tanaman Mengkudu yang berperan sebagai antibakteri seperti flavonoid, tanin, saponi dan alkaloid. Zat ini terbukti dapat menekan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa, Proteus morganii, Staphylococus aureus, Bacillus subtilis,* dan *Escherichia coli* (Kameswari, Mahatmi dan Besung, 2013).

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang menyerang ikan air tawar. Ikan yang sering diserang bakteri ini adalah ikan Lele, Mas dan Koi. Keberadaan bakteri ini akan menyebabkan kematian massal organisme yang dibudidayakan. Pengobatan yang sering dilakukan oleh pembudidaya adalah menggunakan bahan-bahan kimia yang akan berdampak buruk pada jangka panjang karena akan menjadi residu di dalam tubuh ikan dan menyebabkan resistensi terhadap obat tersebut. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai penggunaan

antibakteri yang berasal dari bahan-bahan alami yang tidak akan menimbulkan efek jangka panjang. Pada daun mengkudu terdapat senyawa aktif yang berfungsi sebagai zat antibakteri, yaitu saponin, flavonoid, tanin, dan alkaloid. Senyawa aktif tersebut bersifat bakterisidal, dimana dapat membunuh bakteri.

Daun Mengkudu *(M. citrifolia)* sering digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai salah satu obat herbal yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Tanaman ini mengandung senyawa saponin, flavonoid dan tanin yang bersifat antibakteri.

Sehingga berdasarkan uraian tersebut, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak kasar Daun Mengkudu dapat mengobati penyakit Ikan Koi yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar Daun Mengkudu terhadap kadar hematologi Ikan Koi *(C. carpio)* yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh ekstrak daun Mengkudu dalam mengobati penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila.*
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar Daun Mengkudu terhadap kadar hematologi Ikan Koi *(C. carpio)* yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

H0 : Pemberian ekstrak kasar Daun Mengkudu *(M. citrifolia)* dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap kadar hematologi Ikan Koi *(C. carpio)* yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila.*

H1 : Pemberian ekstrak kasar Daun Mengkudu *(M. citrifolia)* dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap kadar hematologi Ikan Koi *(C. carpio)* yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila.*

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 5 Januari- 3 Maret 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Koi *(C. carpio)*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Udin dan Sitanggang (2010), sistem taksonomi ikan koi digolongkan sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Superclass : Osteichthyes

Kelas : Actinopterygii

Subkelas : Neopterygii

Infraclass : Teleostei

Superorder : Ostariophysi

Ordo : Cypriniformes

Keluarga : Cyprinidae

Genus : Cyprinus

Spesies : *C. carpio*

Ikan koi (Gambar 1) mempunyai badan yang berbentuk torpedo dengan alat gerak berupa sirip. Sirip-sirip yang melengkapi bentuk morfologi koi adalah sebuah sirip punggung (*dorsal fin*), sebuah sirip anus (*anal fin*), sebuah sirip ekor (*caudal fin*) dan sepasang sirip dada (*pectoral fin*), sepasang sirip perut (*ventral fin*). Sirip-sirip tersebut sangat penting bagi koi untuk berpindah tempat. Morfologi koi tidak jauh berbeda dengan ikan species lainnya, badan koi ditutupi oleh dua lapisan kulit, yaitu kulit luar (epidermis) dan kulit dalam (dermis). Epidermis berguna untuk melindungi kulit dari lingkungan luar atau sebagai

proteksi seperti benturan, kotoran, dan hama penyakit (Bachtiar, 2002 *dalam* Prasetya, Subekti dan Kismiyati, 2013).

Dalam perkembangannya ada beberapa jenis koi yang pembagian jenisnya berdasarkan pola warna bahkan menjadi koi yang sangat dihargai penggemarnya. Beberapa contohnya adalah kohaku yang warna putih dan merahnya berkombinasi serasi, taisho sanke yang warna dasar tubuhnya putih dengan kombinasi bercak hitam dan merah, ada showa sanke yang berwarna dasar hitam dengan kombinasi bercak merah dan putih, ada juga tancho kohaku yang warna dasar tubuhnya putih dan di bagian kepala dihiasi bulatan berwarna merah mirip bendera Jepang (Agus, Dianawati, Dipo, Irawan, Miharja, Gusyadi, Luluk, Maman, Karno, Udin, Ujang, Yana, dan Sastro, 2002).

Gambar 1. Ikan Koi *(C. carpio)*(Google Image, 2015).

2.1.2 Habitat

Habitat asli ikan koi adalah di perairan dengan mata air yang bersih dan selalu mengalir. Oleh sebab itu, kolam ikan harus dijaga agar kualitas dan kebersihan airnya tetap terjaga serta memiliki sistem aliran air. Suhu yang ideal bagi ikan koi berkisar antara 1-25 °C. Jadi, iklim di Indonesia cukup layak untuk memelihara ikan koi. Hal yang perlu diperhatikan adalah agar kolam koi tidak terkena sinar matahari secara langsung, karena untuk mencegah suhu kolam

melebihi suhu ideal. Selain itu, ikan koi yang sering terkena matahari secara langsung warnanya cenderung pudar (Esther dan Sipayung, 2010).

Ikan koi merupakan ikan hias air tawar tetapi masih bertahan hidup dalam air yang agak asin sekitar 10 ppm. Koi merupakan hewan yang hidup di daerah beriklim sedang dengan suhu 17-32 °C. Koi tidak tahan jika mengalami perubahan suhu yang drastis. Jika hidup pada suhu terlalu rendah, dalam tempo singkat koi tidak dapat bertahan hidup. Jika tubuhnya diselimuti dengan lapisan berwarna putih itu menandakan koi sakit akibat suhu terlalu rendah. Perlu adanya aerasi yang cukup dan alat sirkulasi air agar koi dapat bertahan hidup (Udin dan Sitanggang, 2010).

2.1.3 Pakan dan Kebiasaan Makan

Menurut Bachtiar (2002), koi memiliki kecenderungan makan secara terus menerus dan kadang-kadang melebihi batas. Salah satu ciri koi yang sehat adalah selalu merasa lapar. Pada sore hari pemberian pakan lebih baik pada pukul 14 atau 15 karena suhu air relatif tinggi. Pemberian pakan sebaiknya dilakukan dalam jumlah yang sedikit tapi sering, sekitar 2 jam sekali. Pemberian pakan lebih sering baik karena koi bersifat cepat lapar dan cepat kenyang. Pemberian pakan dilakukan langsung di tepi kolam dengan cara ditebar secara merata supaya koi memperoleh kesempatan makan yang sama. Pakan yang ditebar harus dipastikan habis dimakan koi agar tidak mengendap di dasar perairan.

Ikan koi tidak terlalu rewel dan cenderung mau makan apa saja pakan yang diberikan. Koi memakan makanan jenis dari hewan maupun dari tumbuh-tumbuhan. Selain pakan buatan juga perlu disediakan pakan alami seperti udang-udangan, cacing tanah, kepiting, dan siput (Esther dan Sipayung, 2010).

Di alam bebas, saat koi masih kecil senang makan udang-udangan renik seperti daphnia. Sejalan dengan pertumbuhan badannya, koi mulai makan jenis

serangga air seperti jentik nyamuk atau lumut yang menempel pada tanaman. Sebagai hewan omnivora, koi akan memburu sepotong makanan atau mengaduk-aduk lumpur untuk mendapatkan makanan yang dibutuhkan. Ikan koi tidak memiliki gigi di bagian rahangnya, sehingga koi menyantap makanannya dengan gigi faring yang ada di rongga mulut (Udin dan Sitanggang, 2010).

2.1.4 Penyakit Ikan Koi

Penyakit yang sering menyerang ikan koi biasanya penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Hal ini dapat terjadi karena pecahnya kista pada kulit dan insang sehingga menyebabkan pendarahan intens dan menyebabkan infeksi sekunder bakteri oportunistik. Salah satu mikroorganisme yang digolongkan dalam bakteri oportunistik adalah bakteri *A. hydrophila* karena mampu menyebabkan penyakit pada kondisi tertentu diantaranya perubahan kondisi lingkungan, stress dan kondisi inang yang telah terinfeksi oleh parasit (Ulfiana, 2012).

Aeromonas dan *Pseudomonas* adalah dua jenis bakteri yang paling banyak ditemukan pada ikan koi. Ikan yang terinfeksi akan mengalami kemerahan pada kulit, misalnya di sekitar luka. Jika dibiarkan, bakteri dapat mengakibatkan bengkak pada jaringan tubuh. Pembengkakkan akan nampak pada bagian mata. Kondisi ini sering disebut dropsi dan membutuhkan perawatan antibiotik untuk mencegah penyebaran lebih luas serta kemungkinan terjadinya kematian. Ketika bakteri menyerang insang, penyakit ini disebut penyakit bakterial insang (Twigg, 2008).

2.2 Bakteri *A. hydrophyla*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Holt (1979) *dalam* Prajitno (2007), klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

Filum : Protophyta

Klas : Schizomyecetes

Ordo : Pseudomonodale

Sub Ordo : Pseumodineae

Family : Vibrionceae

Genus : Aeromonas

Spesies : *A. hydrophila*

Gambar 2. Bakteri *A. hydrophila* Perbesaran 1000x (Halim, 2014)

A. hydrophila (Gambar 2) merupakan bakteri gram negatif yang bersifat aerob dan fakultatif anaerob, oksidasi positif. Bakteri ini bergerak secara cepat dan hidup pada lingkungan perairan dan di saluran gastrointestine ikan (Laith dan Najiah, 2013). *A. hydrophila* bersifat mesofil, motil, dengan flagella polar, dan dapat dijumpai di perairan tawar daerah tropis maupun subtropis (Irianto, Hernayanti dan Iriyanti, 2006).

2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Istilah pertumbuhan umumnya digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain, biasanya pada pertambahan jumlah atau massa sel dan bukan perubahan individu organisme. Bakteri yang dikembangbiakkan ke dalam suatu medium yang sesuai dan pada keadaan yang optimum bagi

pertumbuhannya, maka terjadi kenaikan jumlah yang amat tinggi dalam waktu yang relatif pendek (Pelezar dan Chan, 1986 *dalam* Hidayati, 2009).

Perkembangbiakan bakteri *A. hydrophila* secara aseksual dengan pemanjangan sel yang diikuti pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1988). Bakteri *A. hydrophila* termasuk kelompok bakteri gram negatif. Bakteri ini dapat tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38^0C - 41^0C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0^0C - 5^0C dengan kisaran pH 5,5-9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.2.3 Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophyla*

Infeksi *Aeromonas* dapat berakibat peradangan dan hemoragik (pendarahan) pada bagian ginjal, jaringan otot, punggung dan usus. Nekrosis dapat terjadi pada organ hati dan ginjal dan dapat menyebabkan kematian. Setelah *Aeromonas* masuk ke dalam tubuh, bakteri ini akan menembus masuk ke dalam pembuluh darah dan akhirnya tersebar di seluruh tubuh. Dampak yang terjadi yaitu pembuluh darah di dekat kulit pecah, sehingga permukaan tubuh berwarna kemerahan. Peradangan akan berlanjut ke seluruh tubuh dan organ-organ dalam. Pada kejadian yang demikian ini maka sel-sel bakteri patogen dapat dijumpai di organ hati dan ginjal (Irianto *et al*., 2006).

Salah satu penyakit yang dapat timbul pada usaha budidaya air tawar adalah timbulnya bercak merah pada permukaan tubuh ikan yang dikenal sebagai *haemorrhagic septicaemia.* Penyakit ini disebabkan karena serangan bakteri *A. hydrophila*. Bakteri *A. hydrophila* umumnya menyerang ikan-ikan air tawar seperti koi, lele, mas, dan nila (Kusumawardani, Kusdarwati dan Handijatno, 2008).

Bakteri *A. hydrophila* secara normal hidup di air tawar. Infeksi bakteri ini dapat terjadi akibat perubahan kondisi lingkungan, stress, perubahan temperatur,

air yang terkontaminasi dan ketika host tersebut telah terinfeksi oleh virus, bakteri atau parasit lainnya (infeksi sekunder). Oleh karena itu bakteri ini disebut sebagai bakteri yang bersifat patogen oportunistik. Infeksi bakteri ini dapat menimbulkan penyakit dengan gejala-gejala di antaranya, kulit mudah terkelupas, bercak merah pada seluruh tubuh, insang berwarna suram atau kebiruan, *exopthalmia* (bola mata menonjol keluar), pendarahan sirip punggung, sirip dada, sirip perut, dan sirip ekor, juga terjadinya pendarahan pada anus, dan hilang nafsu makan (Mulia, 2003).

Radang merupakan gejala yang timbul akibat adanya patogen yang masuk ke dalam tubuh inang dan menyebabkan infeksi. Gejala yang nampak adalah berupa pembengkakan pada permukaan tubuh dan adanya perubahan warna. Hemoragi merupakan suatu proses keluarnya darah dari sistem pembuluh darah sebagai akibat adanya luka. Nekrosis adalah kematian sel yang diakibatkan kerusakan sel secara akut, ditandai dengan adanya jaringan otot mati yang masih menempel pada permukaan tubuh ikan. Tukak adalah luka terbuka akibat lepasnya jaringan otot yang sudah mati pada permukaan tubuh (Kamaludin, 2011).

2.3 Daun Mengkudu *(M. citrifolia)*

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Sjabana (2002) *dalam* Aryadi (2014), Tanaman Mengkudu diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Subdivisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledone*

Anak kelas : *Sympetalae*

Bangsa : *Rubiales*

Suku : *Rubiaceae*

Genus : *Morinda*

Spesies : *M. citrifolia*

Tanaman Mengkudu (Gambar 3) berbentuk pohon dengan tinggi dapat mencapai 8 m. Mengkudu banyak dimanfaatkan sebagai pewarna dan obat. Tanaman ini tumbuh di tepi pantai, di kebun, bahkan di halaman rumah. Tanaman ini dapat tumbuh dengan cepat dan mulai menghasilkan buah pada usia 3-4 tahun. Batang pendek dan bercabang banyak. Daun tersusun berhadapan dan bertangkai pendek. Daunnya lebar, tebal dan mengkilap. Bentuk daun lonjong menyempit ke arah pangkal (Mangoting 2005 *dalam* Purba 2007).

Gambar 3. Daun Mengkudu (Dalimartha 2006 *dalam* Aryadi 2014)

2.3.2 Komposisi dan Manfaat Daun Mengkudu *(M. citrifolia)*

Para ilmuwan semula menduga ada sejumlah zat yang berbeda-beda dalam buah mengkudu yang bekerja secara bersama-sama menghasilkan efek yang baik bagi tubuh. Setelah ditelusuri, ternyata mengkudu baik dari akar, kulit, buah, daun, serta bunganya juga memiliki khasiat sebagai obat. Kandungan senyawa yang berada di dalamnya antara lain adalah moridon, morindin,

morindanigrin, antrakuinon, klororubin, monometil eter, dammacanthal, asperulosida, saranjidiol, sterol, resin, glikosida, zat kapur, protein, zat besi, karoten, asam glutamat, asam askorbat, tirosin, tiamin, asam ursalat, proxeronin, skopoletin, asam benzoat, asam oktanoat, potasium, terpenoid, glukosa, eugenol, heksanal, glikosida flavon, asam oleat, dan asam palmiat. Kandungan flavonoid total dalam daun mengkudu adalah 254 mg/100g fw (Rahmawati, 2009).

Secara empiris daun Mengkudu dipergunakan sebagai kompres untuk menyembuhkan bagian kulit yang luka, sendi yang terkilir, dan juga untuk mengurangi rasa nyeri. Di beberapa daerah, infusa daunnya dikonsumsi sebagai minuman untuk pengobatan demam secara umum, pengobatan malaria, dan sebagai analgesik. Bahan aktif yang terdapat pada daunnya yaitu saponin, triterpen, tanin, alkaloid, glikosida iridoid, dan flavonoid. (Sabirin, Maskoen dan Hernowo, 2013).

Menurut Nuraini (2014), daun mengkudu (*M. citrifolia*) mengandung antharakinon dan proxeronin. Antharakinon berfungsi sebagai antimikroba dan antijamur, sedangkan proxeronin bermanfaat dalam peremajaan sel. Selain itu daun mengkudu juga mengandung catechin, serat kasar, protein, zat kapur, karoten, asam amino utuh dan vitamin A. Bahan aktif yang ada pada daun mengkudu juga dapat berfungsi sebagai antialergi juga antibakteri

2.4 Hematologi

Hematologi adalah ilmu yang mempelajari komponen sel darah serta kelainan fungsional dari sel tersebut. Analisis karakteristik sel darah dapat memberikan beberapa petunjuk mengenai keberadaan penyakit yang ditemukan dalam tubuh suatu organisme. Pemeriksaan darah sangat perlu dilakukan terutama pada organisme dalam kondisi patologis tertentu. Pemeriksaan darah

ikan meliputi jumlah eritrosit, jumlah leukosit, dan total perhitungan differensial leukosit (Anderson dan Swicki, 1995).

Menurut Alamanda, Handajani dan Budiharjo (2007), pemeriksaan darah (hematologis) dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan suatu penyakit. Studi hematologis merupakan kriteria penting untuk diagnosis dan penentuan kesehatan ikan. Hal ini dikarenakan pada ikan yang terserang penyakit terjadi perubahan pada nilai hematokrit, kadar hemoglobin, jumlah sel darah merah dan jumlah sel darah putih.

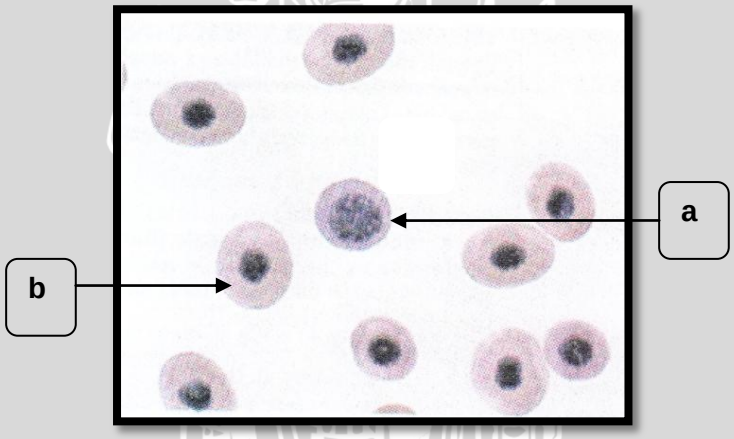
Standar normal hematologi ikan sangat diperlukan dalam melakukan diagnosis penyakit ikan secara laboratorik. Manfaat pemeriksaan darah ikan antara lain untuk membantu diagnosis suatu penyakit, mengetahui jalannya suatu penyakit, menentukan prognosa, mengetahui efek suatu pengobatan, meneliti sistem imun dan untuk mengetahui status kesehatan ikan. Adanya gangguan kesehatan maupun perubahan status fisiologi hewan sering dapat diketahui melalui komponen darahnya . Pemeriksaan parameter hematologi ikan meliputi nilai hematokrit, kadar hemoglobin, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih dan pengamatan parasit yang terdapat dalam darah. Selama ini perhitungan yang dilakukan menggunakan mikroskop optik masih dilakukan secara manual dengan menghitung jumlah sel darah yang tampak pada mikroskop pada setiap bidang pandang (Noercholis, Muslim dan Maftuch, 2013).

2.4.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Menurut Fujaya (2008), Ikan sebagaimana vertebrata lainnya memiliki sel darah merah (eritrosit) berinti dengan bentuk dan ukuran bervariasi antara satu dengan yang lain . Jika diwarnai dengan pewarna giemsa, inti sel akan berwarna ungu dan dikelilingi oleh plasma berwarna biru muda. Rendahnya eritrosit merupakan indikator terjadinya anemia, sedangkan tingginya jumlah eritrosit menandakan ikan dalam keadaan stress. Jumlah eritrosit bervariasi pada tiap

spesies dan biasanya dipengaruhi oleh stress dan suhu lingkungan. Jumlah eritrosit pada teleostei berkisar antara 1,05 x 10^6 sel/mm^3 dan 3,0 x 10^6 sel/mm^3.

Eritrosit ikan (Gambar 4) yang matang secara normal berbentuk oval atu ellips dengan sitoplasma eosinofilik dan inti yang berbentuk oval atau ellips juga. Inti eritrosit ikan relatif besar ukurannya kurang lebih seperempat dari volume sel eritrosit. Butir kromatin intinya padat dan berwarna ungu gelap. Bentuk dan ukuran sel darah merah ikan bervariasi tegantung jenis spesiesnya. Contohnya eritrosit ikan kelas Chondricthyes umumnya lebih besar daripada kelas Osteichthyes. Eritrosit matang pada beberapa ikan berbentuk bikonvek tapi pada spesies lain ada yang berbentuk datar dan bikonkaf (Bijanti, Yuliani, Wahjuni dan Utomo, 2010).



Gambar 4. a. Eritrosit Immature dan b. Eritrosit Mature Perbesaran 500 x (Thrall, 2005)

2.4.2 Sel Darah Putih (Leukosit)

Pemeriksaan total leukosit juga bertujuan untuk melihat status kesehatan ikan. Terjadinya peningkatan jumlah leukosit dapat dijadikan sebagai tanda adanya infeksi, stres ataupun leukemia. Adanya infeksi akan menyebabkan ”inflamasi” yang merupakan karakteristik tanggap kebal nonspesifik. Respon serupa juga akan muncul akibat adanya beberapa faktor seperti trauma, bahan

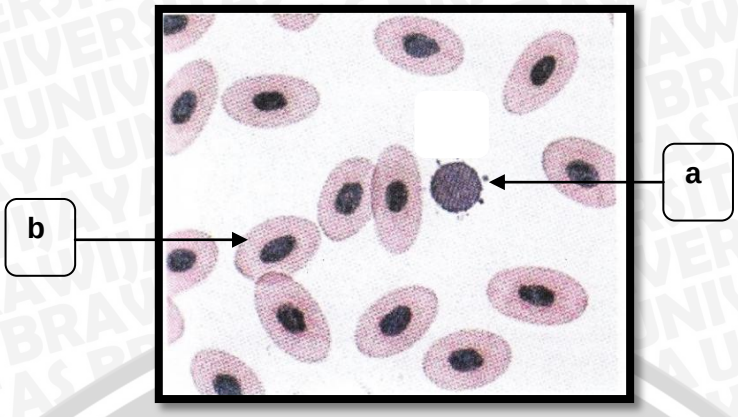
kimia, toksin, parasit, bakteri, dan virus. Total leukosit dapat meningkat akibat adanya infeksi, penyakit darah, dan stres (Anderson dan Siwicki, 1993).

Leukosit merupakan kompenen penting, mempunyai peran dalam sistem kekebalan tubuh ikan. Peningkatan jumlah sel darah putih ini merupakan respon dalam bentuk proteksi terhadap adanya sel asing termasuk adanya infeksi bakteri yang masuk ke tubuh ikan. Hasil produksi leukosit akan diarahkan menuju daerah terinfeksi sebagai pertahanan ikan. Naiknya jumlah leukosit merupakan indikator adanya infeksi yang mengakibatkan terjadinya inflamasi (Suhermanto, Andayani dan Maftuch, 2011).

Leukosit memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan sel darah merah, yaitu berkisar antara 20.000/mm^3 hingga 150.000/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. Setelah itu persentase granulosit dan makrofag akan meningkat hingga 2-4 hari (Noercholis, Mulim, dan Maftuch, 2013)

2.4.3 Limfosit

Limfosit (Gambar 5) memiliki diameter berkisar antara 8-12 µm. Sitoplasma berwarna biru pucat, inti berbentuk bulat hingga oval, lebih sering berbentuk tidak beraturan, serta berisi vakuola kecil dan granula azurofilik (Abbas *et al.,* 2010 *dalam* Suhermanto *et al*., 2011). Limfosit banyak ditemukan pada hapusan darah tepi pada ikan. Ukuran diameternyaberkisar antara 5-8µm. Limfosit berbentuk bulat dengan inti yang besar dan sitoplasma yang sedikit (Bijanti *et al.,* 2010).



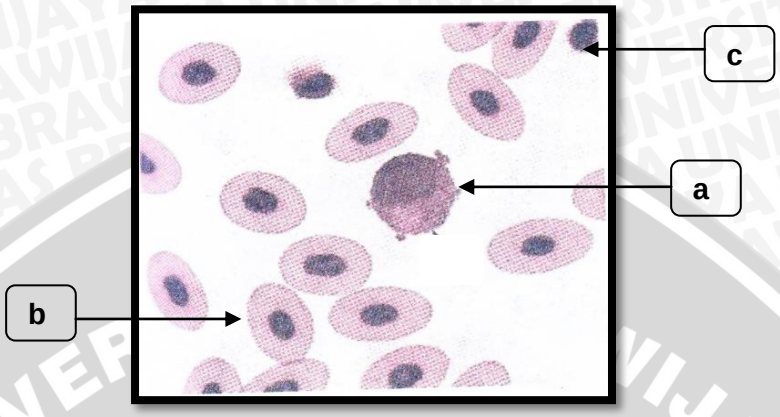
Gambar 5. a. Limfosit, b. Eritrosit dengan Perbesaran 500 x (Thrall, 2005).

Menurut Mundriyanto, Taufik, Taukhid (2002), mekanisme kerja limfosit dalam peranannya untuk system kekebalan tubuh berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh dengan cara mengenali antigen melalui reseptor spesifik pada membran sel. Pada limfosit T, ketika tubuh atau jaringan terpapar oleh antigen, maka limfosit T tidak mampu mengenal antigen tersebut sendirian tanpa melalui reseptor spesifik. Dengan adanya sel reseptor spesifik ini memungkinkan sel T lebih cepat mengenali antigen yang ada sehingga langsung memberikan reaksi kekebalan dan menstimulasi sel B untuk mengeluarkan antibodi.

2.4.4 Monosit

Monosit (Gambar 6) terdiri dari sitoplasma berwarna biru keabu-abuan hingga biru, bentuk inti bervariasi mulai bulat hingga oval. Monosit merupakan sel dalam aliran darah dan mendiami tempat ini selama beberapa hari sebelum memasuki jaringan dan berkembang menjadi makrofag. Makrofag ini berfungsi hampir sama dengan neutrofil sebagai fagosit yaitu menghancurkan benda asing yang masuk kedalam tubuh, namun aktivitas fagosit dari sel ini realtif lama tergantung pada sifat bahan yang ditelan, jika bahan mudah dicerna oleh enzim lisosom yang banyak mengandung beragam enzim pencernaan dan senyawa

bakterisidal sehingga dengan mudah menghancurkan sel bakteri, maka makrofag semakin lama hidup dan sebaliknya (Tizard, 1982 *dalam* Suhermanto, Andayani, Maftuch, 2013).



Gambar 6. a. Monosit, b. Eritrosit, c, Limfosit Perbesaran 500 x (Thrall, 2005)

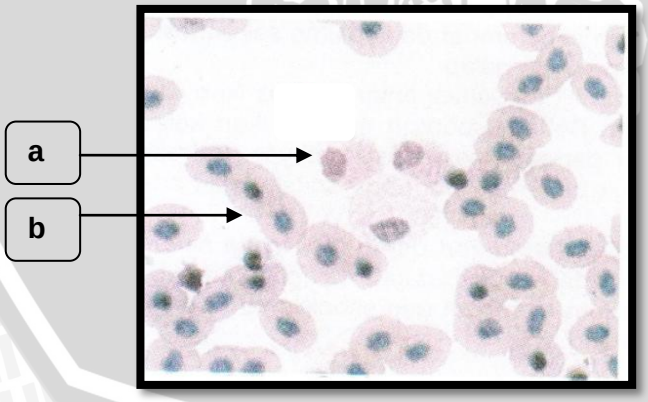
Monosit berasal dari sumsung tulang, kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah dan berubah menjadi makrofag di dalam jaringan. Fugnsi utama dari monosit adalah memfagositosit partikel besar atau makromolekuler serta membuang sel-sel yang rusak dan mati. Monosit merupakan leukosit mononuclear yang berukuran besar dengan sitoplasma kebiruan dan didalamnya terdapat vakuola-vakuola. Tepi sitoplasmanya terkadang tidak rata karena adanya seudopodia. Intinya berbentuk seperti ginjal atau bilobus dan ukurannya bermacam-macam, pada umumnya mencapai 50% dari volume sitoplasmanya (Bijanti *et al.,* 2010).

2.4.5 Neutrofil

Neutrofil (Gambar 7) merupakan sel pagosit sistem polymorphonuklear yang bekerja cepat dalam melakukan fagosit tetapi tidak mampu bertahan lama dan akan mati oleh apoptosis sekitar 24 jam. Sel ini berupa sel bundar dengan sitoplasma bergranula halus dan ditengahnya terdapat nukleus bersegmen. Sel ini merupakan fagosit kuat, fagositosis dilakukan dengan cara mendekati partikel asing dan mengeluarkan pseudopodi kesegala arah sekitar partikel (rangsangan

kimiawi eksternal), satu neutrofil dapat memfagosit 5 – 20 bakteri sebelum kemudian tidak aktif (Tizard, 1982 *dalam* Suhermanto *et al.,* 2013).

Neutrofil ikan berbentuk bulat sampai oval dengan eksentrik nucleus. Nukleus neutrofil yang matang mempunyai bermacam-macam bentuk, butir kromatinnya memadat dan pewarnaannya lebih basofilik. Neutrofil beberapa jenis ikan seperti ikan mas mempunyai granulosit dengan granula sitoplasma yang lebih asidofilik, sitoplasma tidak berwarna dan inti yang eksentrik dan selnya lebih digolongkan sebagai heterofil. Diaemeter berukuran kurang lebih µm. Neutrofil merupakan pertahanan efektif terhadap mikroba terutama bakteri. Fungsi neutrofil sebagai pertahan antibakteri melalui beberapa mekanisme efektif yaitu kemotaksis (kemampuan neutrofil tertarik ke tempat infeksi dan peradangan) dan sebagai fagositosis (neutrofil mempunyai kemampuan untuk memakan dan menghancurkan mikroba). Granula neutrofil yang disebut dengan neutrofil segmen atau leukosit polimorfonukleat mempunyai afinitas sedikit terhadap zat warna basa (eosin) dan memberi warna biru atau merah muda pucat dikelilingi sitoplasma yang berwarna merah muda (Bijanti *et al.,* 2010).



Gambar 7. a. Neutrofil, b. Eritrosit dengan Perbesaran 500 x (Thrall, 2005).

2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba

Mekanisme penghambatan antimikroba dapat dikelompokan menjadi 5, yaitu menghambat sintesis sinding sel mikrobia, merusak keutuhan dinding sel

mikrobia, menghambat sintesis protein mikrobia, menghambat sintesis asam nukleat dan merusak asam nukleat sel mikrobia. Permeabilitas membran sel mikroba akan diganggu oleh antibakteri, sehingga sintesis dinding sel terhambat dengan cara mengikat reseptor sel (enzim transpeptida). Selanjutnya terjadi penghambatan reaksi transpeptidase dan sintesis peptidoglikan. Mekanisme diakhiri dengan penghentian aktivitas penghambat enzim autolisis pada dinding sel (Sulistyo, 1971).

Pada lingkungan hipertonik sel akan mengalami lisis, mikroba berubah menjadi protoplas atau sferoflas yang hanya tertutup oleh selaput sel yang rapuh. Selanjutnya antibakteri akan menghambat proses sintesis protein sel mikroba dimana senyawa antibakteri yang bekerja dengan senyawa ini, diharapkan mempunyai selektifitas yang tinggi, sehingga hanya sintesis asam nukleat bakteri saja yang dihambat. Umumya senyawa penghambat akan berikatan dengan enzim atau salah satu komponen yang berperan dalam tahapan sintesis, sehingga akhirnya reaksi akan terhenti karena tidak ada substrat yang direaksikan dan asam nukleat tidak dapat terbentuk. Proses sintesis yang terganggu ini akan merusak asam nukleat dari sel mikroba (Widiati, 2011).

2.6 Sistem Kekebalan Tubuh

Kekebalan adalah kemampuan kemampuan organisme untuk melawan semua jenis organisme atau toksin yang cenderung merusak jaringan dan organ. Ada dua sistem kekebalan pada organisme yakni kekebalan nonspesifik dan kekebalan spesifik. Kekebalan nonspesifik adalah kekebalan sebagai akibat proses-proses umum, misalnya fagositosi bakteri oleh sel darah putih atau destruksi organisme yang tertelan dalam lambung oleh asam yang disekresi lambung dan oleh enzim-enzim pencernaan. Sedangkan kekebalan spesifik adalah sistem kekebalan khusus yang membentuk antigen dan membuat limposit

peka untuk segera menyerang dan menghancurkan organisme spesifik atau toksin (Fujaya, 2008).

Sistem imun dapat membedakan zat asing dari zat yang berasal dari tubuh sendiri. Pada beberapa keadaan patologik, sistem imun ini tidak dapat membedakan self dari zat asing sehingga sel-sel dalam sistem imun membentuk zat anti terhadap jaringan tubuhnya sendiri yang disebut autoantibodi. Apabila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi yaitu respon imun nonspesifik dan sistem imun spesifik. Respon imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut, sedangkan respon imun spesifik merupakan respon didapat yang timbul terhadap antigen tertentu, terhadap mana tubuh pernah terpapar sebelumnya (Kresno, 1991).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave, inkubator, lemari pendingin, *rotary evaporator*, timbangan analitik, *hot plate*, *stirrer*, *vortex*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, erlenmeyer, kawat inokulasi, pipet volume, mikropipet, blue tip, gelas ukur, beaker glass 1000 ml, bola hisap, spatula, hot plate, sectio set, corong, mikrotube, *spuit dispossible*, nampan, lap, akuarium, termometer, seser, botol film, aerator set, pipa paralon, kabel rol, heater akuarium, selang siphon, pH meter, *haemocytometer*, objek glass, mikroskop dan kamera digital.

3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan koi (*C. carpio*) yang berasal dari petani ikan di Batu. Ikan yang digunakan berukuran 7-12 cm. Bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml yang telah diencerkan dengan kepadatan awal 10^{10} sel/ml. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksrtrak kasar daun Mengkudu *(M. citrifolia)* kertas saring, kain saring, kertas label, alkohol 70%, tisu, aquades, TSB (*Trypticase Soy Broth*), TSA (*Trypticase Soy Agar*), NaCl, larutan turk, larutan hayem, Na-sirtrat 3,8 %, methanol, giemsa, pakan ikan (pellet), air tawar.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang akan didapat menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan

perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Sugiyono, 2010).

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu peneliti 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).

3.3 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). Perhitungan RAL dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan :
μ = nilai rata-rata (mean)
τ = pengaruh faktor perlakuan
ε = pengaruh galat

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun mengkudu dengan dosis 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, dan 800 ppm. Dosis ini berdasarkan dari percobaan in vitro ekstrak daun mengkudu terhadap bakteri *A. hydrophila*. Pada penelitian ini digunakan kontrol negatif sebagai perlakuan sampel tanpa penginfeksian bakteri dan tanpa pemberian ekstrak kasar daun mengkudu, sedangkan kontrol positif

sebagai perlakuan sampel dengan penginfeksian bakteri dan tanpa pemberian ekstrak. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 18 sampel. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

A : Perlakuan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dengan perendaman ekstrak 200 ppm

B : Perlakuan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dengan perendaman ekstrak 400 ppm

C : Perlakuan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dengan perendaman ekstrak 600 ppm

D : Perlakuan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dengan perendaman ekstrak 800 ppm

K(-) : Perlakuan sampel tanpa penginfeksian bakteri *A. hydrophilla* serta tanpa perendaman ekstrak

K(+) : Perlakuan sampel dengan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dan tanpa perendaman ekstrak

Untuk denah penelitian disajikan pada gambar berikut :

$K(-)_1$	C3	D1	$K(+)_3$	A1	B2
C2	B3	$K(-)_3$	D3	A2	$K(+)_2$
$K(+)_1$	A3	C3	$K(-)_2$	B1	D2

Gambar 8. Denah Penelitian

Keterangan:
A-B-C-D : perlakuan
K(-) : kontrol negatif
K(+) : kontrol positif
1, 2, 3 : ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a) Persiapan Ikan

Ikan uji yang dugunakan adalah ikan koi *(C. carpio)* yang diperoleh dari petani ikan di daerah kota Batu. Dipilih ikan koi yang sehat sebanyak 180 ekor ukuran 7-11 dan diaklimatisasi selama 7 hari pada akuarium. Proses aklimatisasi ini untuk mengetahui ikan yang akan digunakan adalah ikan yang benar-benar sehat dan telah beradaptasi dengan lingkungan barunya. Selama aklimatisasi ikan diberi pakan pelet secara adlibitum 2 kali sehari pada pagi hari pukul 09.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB. Selain itu juga dilakukan penyiponan setiap pagi apabila kondisi air pada akuarium telah kotor akibat sisa pakan dan feses. Apabila ikan sudah berdaptasi dengan lingkungan barunya, maka ikan siap untuk diuji tantang.

b) Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Mengkudu *(M. citrifolia)* dengan Etanol 96%

Pembuatan ekstrak kasar daun Mengkudu dilakukan dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5. Daun Mengkudu seberat 1 kg dibersihkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian dihaluskan sampai berbentuk serbuk. Dari 1 kg bahan basah dapat menghasilkan serbuk kering sebanyak 200 gram. Serbuk daun mengkudu 200 gram dimasukkan ke dalam toples dan diberi pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml kemudian dihomogenkan dengan diaduk menggunakan spatula. Toples ditutup dengan aluminium foil agar etanol tidak menguap. Proses maserasi ini didiamkan selama 2 hari pada tempat yang gelap. Setelah 2 hari hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dengan endapannya. Setelah terpisah, larutan hasil saringan kemudian di uapkan untuk mendapatkan ekstrak murni dari daun mengkudu. Proses penguapan ini menggunakan alat yang disebut *rotary*

evaporator dengan suhu 45°C dengan kecepatan 80 rpm (Aryadi, 2014). Setelah diupakan selama 1 jam maka akan dihasilkan ekstrak murni yang kental berwarna hijau kehitaman sebanyak 18 gr.

c) Persiapan Alat Penelitian

Wadah yang digunakan adalah akuarium dengan ukuran 40x40x40 cm^3 sebanyak 18 buah. Akuarium dicuci dengan detergen kemudian direndam dengan khlorin selama 30 menit dan kemudian dinetralisir dengan Na-Thiosulfat. Selanjutnya akuarium dibilas dan dikeringkan selama 2 hari untuk kemudian siap diisi dengan air peneliharaan. Menurut Syamashithoh (2014), air pemeliharaan ikan diisi sebanyak 15 liter untuk kepadatan 10 ekor ikan ukuran 7-11 cm. Akuarium dilengkapi dengan instalasi aerasi dan heater untuk ketersediaan oksigen dan juga kestabilan suhu.

d) Pengenceran Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara, Jawa tengah. Bakteri yang diperoleh adalah bakteri dengan kepadatan 6 x 10^9 sel/ml. Bakteri yan digunakan adalah bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml. Untuk mendapatkan kepadatan 10^7sel/ml dilakukan pengenceran dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :
N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)
N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)
V_1 : Volume suspense bakteri dalam NB yang dibutuhkan
V_2 : Volume yang diinginkan

Peremajaan bakteri 10^9 sel/ml dilakukan dengan penanaman bakteri pada media TSB (*Trypticase Soy Broth*) dan diinkubasi selama 1 hari pada inkubator. Bakteri 10^9 sel/ml tersebut kemudian diencerkan menggunakan air pada media infeksi dengan perbandingan yang dihitung menggunakan rumus di atas. Berdasarkan rumus di atas didapatkan bahwa untuk mendapatkan bakteri

kepadatan 10^7 sel/ml sebanyak 30 liter (30.000 ml) adalah dengan memasukkan bakteri kepadatan 10^9 sel/ml sebanyak 300 ml ke dalam air sebanyak 29.700 ml.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a) Penginfeksian Bakteri Pada Ikan Koi *(C. carpio)*

Dilakukan infeksi bakteri *A. hydrophila* kepadatan 10^7 sel/ml dengan cara perendaman selama 21 jam. Lama perendaman ini didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan bahwa ikan mati semua setelah perendaman bakteri selama 42 jam. Setelah perendaman dengan bakteri, ikan direndam dengan ektstrak daun mengkudu kemudian dipindahkan ke dalam akuarium yang berisi air tawar dan diamati gejala klinis ikan yang sudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Ikan dipelihara selama 1 minggu. Selama 1 minggu pemeliharaan, dilakukan pengamatan total eritrosit, leukosit dan differensial leukosit setiap 2 hari sekali. Pada setiap harinya dilakukan pengukuran suhu, pH dan DO setiap hari pada pagi dan sore hari (pukul 08.00 dan 16.00 WIB)

b) Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu pada Ikan Koi

Pemberian ekstrak kasar daun mengkudu dilakukan dengan cara akuarium diisi air sebanyak 15 liter dan ditambahkan ekstrak kasar daun mengkudu sesuai dengan dosis (200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan 800 ppm). Akuarium diberi aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut. Selanjutnya diambil sampel darah ikan koi yang terinfeksi sebelum perendaman dan dihitung total eritrosit, total leukosit dan difensial leukosit. Ikan koi direndam masing-masing 10 ekor/akuarium selama 42 jam. Lama waktu perendaman ini didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan bahwa ikan mati semua setelah perendaman menggunakan ekstrak daun mengkudu selama 84 jam dengan dosis 800 ppm. Ikan koi dipindahkan ke akuarium yang berisi air tawar dan dipelihara selama 1 minggu untuk selanjutnya diamati total eritrosit, total leukosit dan deferensial leukosit pada ikan selama 2 hari sekali.

c) Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah ikan koi diakukan dengan menggunakan spuit dispossible yang telah dibasahi Na Sitrat 3,8% sebagai anti koagulan. Pengambilan darah dilakukan di pangkal ekor dengan cara disuntik dengan posisi jarum 45^0 dan ditarik perlahan-lahan sampai darah masuk kedalam spuit. Darah yang didapat dimasukkan ke dalam *mikrotube* yang telah diberi antikoagulan agar darah tidak membeku.

d) Uji Hematologi

- **Perhitungan Jumlah Eritrosit**

Menurut Mones (2008), perhitungan jumlah sel darah merah dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Sel darah merah dihitung dengan menggunakan rumus :

$$SDM = (a/n) \times (1/v) \times Fp$$

Keterangan :
SDM = jumlah sel darah merah
A = jumlah sel darah merah yang terhitung
N = jumlah kotak *haemocytometer* yang diamati
V = volume *haemocytometer*
Fp = faktor pengenceran

Jumlah sel darah merah dihitung dengan cara pertama-tama sampel darah yang telah bercampur antikoagulan dihisap menggunakan pipet thoma eritrsoit sampai skala 0,5, kemudian larutan Hayem juga dihisap sampai skala menunjukkan pada angka 101 (pengenceran 1:200). Pipet bulir digoyang-goyangkan agar darah dan larutan hayem bercampur rata, setelah bercampur rata empat tetesan pertama dibuang dan tetesan selanjutnya diteteskan ke haemositometer, hal ini dilakukan karena diperkirakan pada tetesan ke lima, darah dan larutan hayem telah tercampur rata. Kemudian *haemocytometer* ditutup dengan cover glass, lalu diamati di bawah mikroskop dengan cara lensa kondensor diturunkan atau diafragma diturunkan secara perlahan. Diamati sel

darah dengan perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel eritrosit pada 5 kotak besar yang terdapat pada kamar hitung.

- **Perhitungan Jumlah Leukosit**

Jumlah sel darah putih dihitung dengan cara pertama-tama sampel darah yang telah bercampur antikoagulan dihisap menggunakan pipet thoma leukosit sampai skala 0,5, kemudian larutan Turk juga dihisap sampai skala menunjukkan pada angka 11 (Pengenceran 1:20). Pipet bulir digoyang goyangkan agar darah dan larutan Turk bercampur rata. Empat tetesan pertama dibuang dan tetesan selanjutnya diteteskan ke *haemocytometer*, hal ini dilakukan karena diperkirakan pada tetesan ke lima, darah dan larutan hayem telah tercampur rata, sehingga memudahkan kita pada saat perhitungan sel darah putih pada mikroskop. Kemudian *haemocytometer* ditutup dengan cover glass, lalu diamati di bawah mikroskop dengan cara lensa kondensor diturunkan atau diafragma diturunkan secara perlahan. Diamati sel darah dengan perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel leukosit pada 5 kotak besar yang terdapat pada kamar hitung.

Menurut Mones (2008), perhitungan jumlah sel darah putih dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Jumlah sel darah putih dihitung dengan menggunakan rumus :

$$SDM = (a/n) \times (1/v) \times Fp$$

Keterangan :
SDP = jumlah sel darah putih
A = jumlah sel darah putih yang terhitung
N = jumlah kotak *haemocytometer* yang diamati
V = volume *haemocytometer*
Fp = faktor pengenceran

Leukosit dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu agranulosit dan granulosit berdasarkan ada-tidaknya granul pada sitoplasma. Agranulosit terdiri atas limfosit dan monosit. Granulosit terdiri atas neutrofil, eosinofil dan basofil.

- **Perhitungan Jumlah Diferensial Leukosit**

Pengamatan diferensial leukosit dilakukan untuk menentukan persentase tiap jenis leukosit yang ada di dalam darah. Pengamatan ini dilakukan dengan mengamati preparat ulas darah di bawah mikroskop. Pembuatan preparat ulas darah dilakukan menurut Svobodova dan Vyukusova (1991) *dalam* Nuryati, Maswan, Akimudin, Sukendda, Sumantadinata, Pasirabu, Soejoedono dan Santika (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 dikering udarakan dan selanjutnya difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Preparat dibilas dengan akuades dan dikeringudarakan 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.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

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

- Perhitungan sel darah merah (eritrosit)
- Perhitungan sel darah putih (leukosit)

- Diferensial leukosit (Limfosit, Neutrofil dan Monosit)

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat perbedaan ikan mas yang sehat, yang terinfeksi bakteri dan ikan mas setelah diobati yaitu dengan melihat jumlah, leukosit, diferensial leukosit dan eritrosit ikan koi.

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang diamati dalam penelitian ini adalah gejala klnis dan kualitas air yang meliputi :

- Suhu yang diukur menggunakan thermometer
- pH air yang diukur dengan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dilakukan analisa secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipergunakan, digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dari fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Hematologi

4.1.1 Jumlah Eritrosit

Hasil penelitian yang telah dilakukan pada ikan kontrol didapatkan bahwa rata-rata jumlah eritrosit ikan koi pada kontrol negatif K (-) adalah sebesar 215,41 x 10^4 sel/mm^3 dan kontrol positif K (+) sebesar 102,16 x 10^4 sel/mm^3. Sedangkan pada perlakuan A (200 ppm) sebesar 109,5 x 10^4 sel/mm^3, B sebesar 143,58 x 10^4 sel/mm^3, C sebesar 178,67 x 10^4 sel/mm^3, perlakuan D sebesar 190,67 x 10^4 sel/mm^3. Hasil rata-rata dari jumlah eritrosit ikan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Jumlah Eritrosit Ikan Koi (10^4 sel/mm^3)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	109,5	109	108,75	327,25	109,08	0,38
B	152	120,25	158,5	430,75	143,58	20,47
C	174,5	187,5	174	536	178,67	7,65
D	194	188	190	572	190,67	3,06
K (+)	101,25	103,5	101,75	306,5	102,16	1,18
K (-)	221,25	215,5	209,5	646,25	215,41	5,8
Total				2818,75		

Pada perlakuan D (800 ppm) dapat dikatakan dosis yang optimal jika dibandingkan dengan hasil perhitungan eritrosit perlakuan A, B dan C. Berdasarkan hasil perhitungan jumlah eritrosit ikan koi pada tabel di atas, jumlah total eitrosit tertinggi terdapat pada perlakuan D (800 ppm) yaitu sebesar 190,67 10^4 sel/mm^3 dimana jumlah ini mendekati kontrol negatif sebesar 102,16 x 10^4 sel/mm^3. Hal ini dikarenakan ikan sudah dapat disembuhkan dengan dosis 800 ppm. Dimana pada dosis yang lebih besar, maka kandungan dari senyawa aktif dalam ekstrak juga semakin tinggi sehingga dapat lebih efektif dalam membunuh

bakteri. Analisis ragam jumlah eritrosit ikan koi pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Analisis ragam Jumlah Eritrosit Ikan Koi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	12209,70833	4069,903	33,43**	4,07	7,59
Acak	8	973,9167	121,7396			
Total	11					

Keterangan : ** = Sangat berbeda nyata

Dilihat dari perhitungan sidik ragam (Tabel 3) di atas menunjukkan hasil dari F hitung sebesar 33,43 lebih besar dari F tabel 1 %. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian perlakuan yang berbeda memberikan pengaruh sangat berbeda nyata terhadap jumlah eritrosit ikan koi. Selanjutnya dilakukan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan pada penelitian. Uji BNT jumlah eritrosit ikan koi pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini :

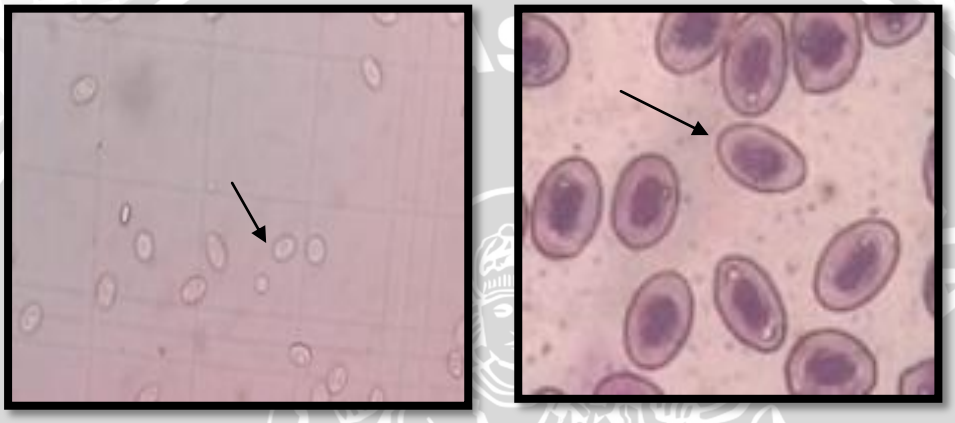
Tabel 3. Uji BNT Jumlah Eritrosit Ikan Koi

Perlakuan	Rata-rata	A	B	C	D	Notasi
		109,08	143,58	178,67	190,67	
A	109,08	_				a
B	143,58	34,50**	_			b
C	178,67	69,58**	35,08**	_		c
D	190,67	81,58**	47,08**	12,00^{ns}	_	cd

Keterangan : ns = Tidak Berbeda Nyata, ** = Sangat Berbeda Nyata

Dari uji BNT tersebut menunjukkan hasil bahwa perlakuan B menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata dengan perlakuan A maka perlakuan A diberi notasi a dan perlakuan B diberi notasi b. Pada perlakuan C menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata dengan perlakuan B sehingga perlakuan C diberi notasi c. Pada perlakuan D menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan D diberi notasi cd. Pada perhitungan eritrosit, dilakukan penambahan larutan hayem yang bertujuan agar

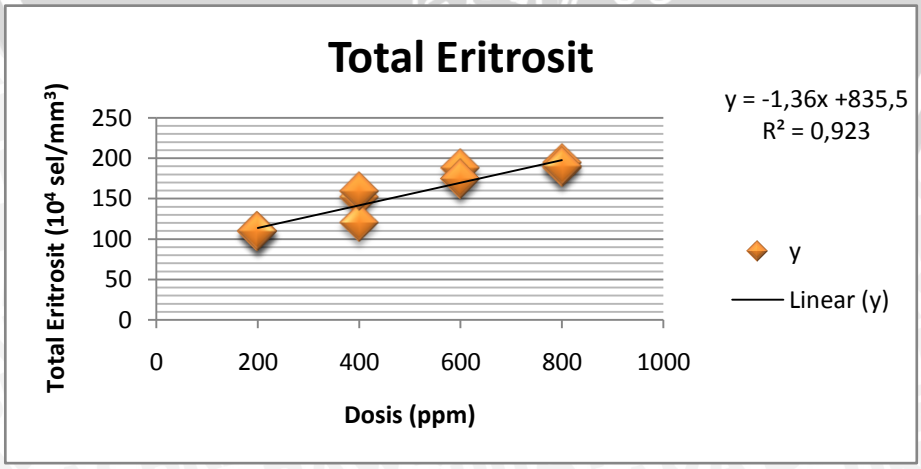
yang terlihat hanya eritrosit. Setelah diberi larutan hayem, eritrosit di dalam ruang haemositometer terlihat berbentuk oval dan tidak berwarna. Gambar eritrosit pada perhitungan di bawah haemositometer dengan perbesaran 400 x dapat dilihat pada Gambar 9a. Pada pengamatan ulas darah dengan pewarna giemsa, eritrosit terlihat berbentuk oval dengan inti yang seragam pada bagian tengah sel. Gambar eritrosit dengan perbesaran 1000 x melalui preparat ulas darah dapat dilihat pada Gambar 9b.



(a) (b)

Gambar 9. a) Eritrosit Perbesaran 400 x ; (b) Eritrosit Perbesaran 100 x (Dokumentasi Penelitian)

Dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon pemberian dosis ekstrak kasar daun mengkudu terhadap jumlah eritrosit ikan koi. Untuk mengetahui hubungan regresi pada masing-masing perlakuan maka dilakukan perhitungan R^2 (Lampiran 5).Grafik regresi disajikan pada Gambar 10 berikut ini :



Gambar 10. Grafik Regresi Total Eritrosit Ikan Koi

Grafik pada Gambar 10. menunjukkan bahwa antara dosis yang berbeda dalam perlakuan dengan total eritrosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu (karena nilai kolerasi yang didapat dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat karena mendekati 100%) yaitu sebesar 0,923 dengan persamaan y = -1,36x+835,5.

Menurut pendapat Irianto (2005) bahwa jumlah eritrosit pada ikan teleostei antara 105–300 x 10^4 sel/mm^3. Peningkatan jumlah eritrosit pada masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun mengkudu mampu mengobati ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* pada lingkungan pemeliharaan yang sesuai habitat ikan.

Ekstrak kasar daun mengkudu mengandung antibakteri yang dapat mematikan bakteri *A*. *hydrophila* karena mempunyai kandungan zat aktif seperti saponin, triterpen, tanin, alkaloid, glikosida iridoid, antrakuinon dan flavonoid. Senyawa aktif tersebut merupakan senyawa yang dapat bekerja sebagai antibakteri. Dari beberapa senyawa tersebut, senyawa yang paling efektif dalam membunuh bakteri adalah saponin dan flavonoid karena keduanya bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri sehingga senyawa mudah dalam menginaktivasi organel bakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Aryadi (2013), daun mengkudu memiliki kandungan saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan triterpen. Zat aktif tersebut bersifat bakterisidal dan dapat membunuh bakteri. Saponin merupakan komponen sekunder yang ditemukan dalam banyak tanaman dapat berbentuk busa stabil dalam larutan yang mengandung air. Secara kimiawi, saponin sebagai sebuah grup yang meliputi *glycosylated steroid, triterpenoids* dan *steroid alkaloids*. Sebagai antioksidan, *saponin* mempunyai kekuatan mereduksi, aktivitas membasmi radikal superoksid, aktivitas mengikat logam, dan antibakteri.

4.1.2 Jumlah Leukosit

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah leukosit pada penelitian ini didapatkan bahwa rata-rata total leukosit pada perlakuan A (200 ppm) sebesar 13,84 x 10^3 sel/mm^3, perlakuan B(400 ppm) sebesar 12,16 x 10^3 sel/mm^3, perlakuan C (600 ppm) sebesar 9,60 x 10^3 sel/mm^3, dan perlakuan D (800 ppm) sebesar 7,67 x 10^3 sel/mm^3. Tingginya jumlah leukosit pada perlakuan A dikarenakan pada dosis tersebut, ikan belum mampu disembuhkan. Hal ini dikarenakan dosis yang digunakan masih rendah sehingga kandungan senyawa aktif pada ekstrak juga masih rendah. Rendahnya senyawa aktif pada dosis A belum mampu membunuh bakteri yang menginfeksi ikan koi. Rata-rata hasil perhitungan total leukosit dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini :

Tabel 4. Jumlah Leukosit Ikan Koi (10^3 sel/mm^3)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	13,79	14,09	13,63	41,51	13,84	0,23
B	12,05	12,68	11,76	36,49	12,16	0,47
C	8,5	11,43	8,86	28,79	9,60	1,60
D	7,61	7,78	7,62	23,01	7,67	0,10
K (+)	13,13	12,09	14,12	39,34	13,11	1,0
K (-)	7,7	8,21	7,86	23,77	7,92	0,26
Total				192,91		

Berdasarkan perhitungan di atas rata-rata jumlah leukosit tertinggi terdapat pada perlakuan A (200 ppm) sebesar 13,84 x 10^3 sel/mm^3. Terjadi peningkatan leukosit pada darah mengindikasikan bahwa terjadi peristiwa fagositosis dimana kemungkinan ada patogen atau bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Rata-rata jumlah leukosit terendah terdapat pada perlakuan D (800 ppm) sebesar 7,67 x 10^3 sel/mm^3.Analisis ragam jumlah leukosit dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini :

Tabel 5. Analisis ragam Jumlah Leukosit Ikan Koi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	66,97146667	22,32382	31,46**	4,07	7,59
Acak	8	5,6762	0,709525			
Total	11					

Keterangan : ** = Sangat Berbeda Nyata

Nilai F hitung pada tabel di atas menunjukkan bahwa F hitung sebesar 31,46 dimana hasil ini lebih besar daripada F tabel 1 %. Hal ini dapat diartikan bahwa setiap perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata. Dari hasil tersebut maka harus dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan yang diberikan. Uji BNT dapat dilihat pada Tabel 6 berikut ini :

Tabel 6. Uji BNT Leukosit Ikan Koi

Perlakuan	Rata-rata	D	C	B	A	Notasi
		7,67	9,60	12,16	13,84	
D	7,67	_				a
C	9,60	1,93*	_			b
B	12,16	4,49*	2,57**	_		c
A	13,84	6,17**	$4,24^{ns}$	$1,67^{ns}$	_	cd

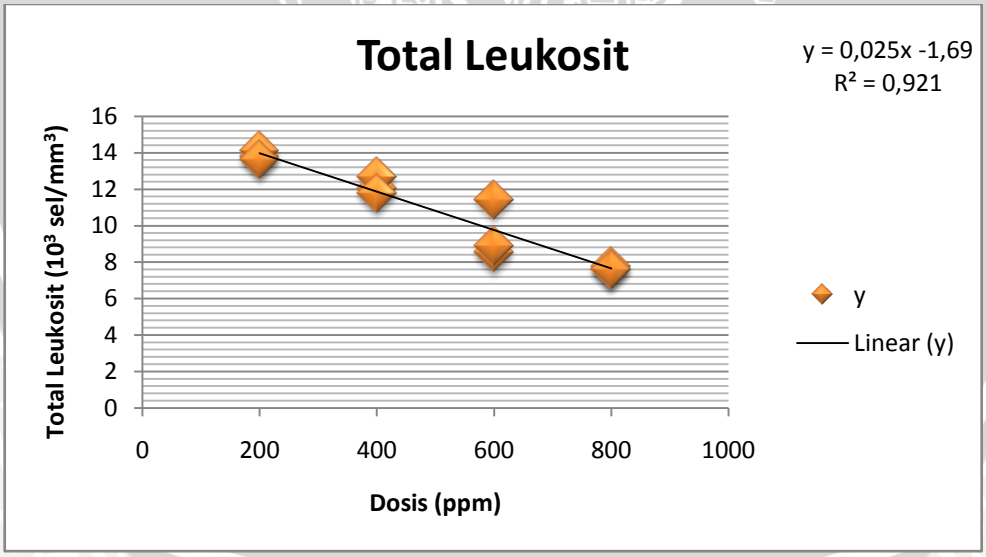
Keterangan : ns= Tidak Berbeda Nyata * = Berbeda Nyata,
** = Sangat Berbeda Nyata

Dari uji BNT tersebut menunjukkan hasil bahwa perlakuan C berbeda nyata dengan perlakuan D sehingga perlakuan D diberi notasi a, sedangkan perlakuan C diberi notasi b. Perlakuan B menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan B diberi notasi c. Pada perlakuan A menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan perlakuan B sehingga perlakuan A diberi notasi cd. Pada perhitungan jumlah leukosit dilakukan pemberian larutan turk yang bertujuan untuk menghancurkan sel darah merah sehingga yang terlihat hanya leukosit. Setelah diberi larutan turk, leukosit

terkihat berbentuk bulat tanpa inti dan berwarna kebiruan.Gambar pengamatan leukosit pada haemositometer dengan perbesaran 400 x dapat dilihat pada Gambar 11 berikut ini :

Gambar 11. Leukosit Perbesaran 400 x (Dokumentasi Penelitian)

Dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon pemberian dosis ekstrak kasar daun mengkudu terhadap jumlah leukosit ikan koi. Untuk mengetahui hubungan regresi pada masing-masing perlakuan maka dilakukan perhitungan R^2 (Lampiran 6). Grafik regresi disajikan pada Gambar 12 berikut :



Gambar 12. Grafik Regresi Total Leukosit Ikan Koi

Berdasarkan Gambar 12 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah leukosit pada setiap peningkatan dosis. Total leukosit tertinggi terdapat pada perlakuan A (200 ppm) dan terendah pada perlakuan D (800 ppm). Jumlah

leukosit pada perlakuan A (200 ppm) banyak karena ikan terserang bakteri dan mempengaruhi sistem kekebalannya. Grafik yang terbentuk merupakan grafik linier dimana belum ada titik optimum dalam pemberian dosis ekstrak daun mengkudu. Grafik pada Gambar 12 menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda dalam perlakuan dengan total leukosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu (karena nilai kolerasi yang didapat dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat karena mendekati 100%) yaitu sebesar 0,921 dengan persamaan y = 0,025x -1,69.

. Leukosit meningkat sebagai respons fisiologis untuk melindungi tubuh dari serangan bakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Dianti *et al*. (2013) bahwa leukosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminasi patogen. Leukosit dapat digunakan sebagai indikator adanya infeksi. Tubuh akan memproduksi lebih banyak leukosit ketika ada benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

Dalam melawan penyakit tersebut, leukosit berperan sebagai sistem imun dan pertahanan. Pada perlakuan D (800 ppm) memiliki nilai leukosit paling rendah yaitu sebessar 7,67 x 10^3 sel/mm^3 hal ini dikarenakan kemungkinan ikan yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dapat disembuhkan dengan pemberian ekstrak daun mengkudu dengan dosis 800 ppm. Daun mengkudu memiliki zat aktif yang yang dapat menghambat dan membunuh bakteri misalnya flavonoid, tanin dan saponin. Menurut Poeloengan dan Praptiwi (2010), saponin merupakan zat aktif yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga hemolisis sehingga apabila saponin berinteraksi dengan bakteri maka bakteri akan pecah. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mempunyai kecenderungan untuk mengikat protein sehingga dapat mengganggu metabolisme bakteri. Tanin dalam konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan

pada konsentrasi tinggi dapat bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma bakteri. Tanin, dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan pada konsentrasi tinggi, tanin bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma bakteri.

4.1.3 Diferensial Leukosit

Perhitungan diferensial leukosit dilakukan pada preparat ulas darah. Pengamatan diferensial leukosit bertujuan mengetahui perbedaan prosentase komponen sel leukosit. Leukosit ikan terbagi menjadi 2 bagian besar yaitu granulosit dan agranulosit. Diferensial leukosit yang diamati meliputi jenis sel limfosit, monosit dan neutrofil. Limfosit merupakan pembentuk antibodi pada darah ketika ikan terserang bakteri. Monosit merupakan agen yang memfagositosis partikel besar/makromolekuler. Neutrofil merupakan pertahanan efektif yang berperan sebagai kemotaksis dan fagositosis.

a. Limfosit

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah limfosit pada penelitian ini didapatkan rata-rata jumlah limfosit pada ikan koi masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut : A (200 ppm) sebesar 55,42%, B (400 ppm) sebesar 63,97%, C (600 ppm) sebesar 68,30 % dan D (800 ppm) sebesar 72,07 %. Rata-rata jumlah limfosit ikan koi dapat dilihat pada Tabel 7 berikut ini :

Tabel 7. Persentase Jumlah Limfosit Ikan Koi (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	56,25	55,11	54,89	166,25	55,42	0,75
B	63,93	63,11	64,88	191,92	63,97	0,89
C	67,99	68	68,9	204,89	68,30	0,52
D	73,11	68,9	74,21	216,22	72,07	2,8
K (+)	55,2	53,5	52,4	161,1	53,7	1,41
K (-)	79,8	81,5	87	248,3	82,76	3,7
Total				1188,68		

Dapat dilihat bahwa jumlah limfosit pada perlakuan A (200 ppm) mengalami penurunan jika dibandingkan dengan perlakuan D(800 ppm) yang semakin meningkat. Rata-rata jumlah limfosit mengalami penurunan pada perlakuan A (200 ppm) hal ini disebabkan karena adanya pengaruh benda asing sehingga kekebalan ikan mulai terganggu. Analisis ragam jumlah limfosit ikan koi dapat dilihat pada Tabel 8 berikut ini :

Tabel 8. Analisis ragam Jumlah Limfosit Ikan Koi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	461,3399333	153,78	99,95**	4,07	7,59
Acak	8	12,3081	1,538508			
Total	11					

Keterangan : ** = Sangat Berbeda Nyata

Hasil perhitungan sidik ragam di atas, nilai F hitung sebesar 99,9 dimana hasil ini lebih besar daripada F tabel 1 %. Hal ini dapat diartikan bahwa setiap perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap ikan koi. Selanjutnya dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan. Uji BNT limfosit ikan koi dapat dilihat pada Tabel 9 berikut ini :

Tabel 9. Uji BNT Jumlah Limfosit Ikan Koi

Perlakuan	Rata-rata	A	B	C	D	Notasi
		55,42	63,97	68,30	72,07	
A	55,42	_				a
B	63,97	8,56**	_			b
C	68,30	12,88**	4,32**	_		c
D	72,07	16,66**	8,10**	3,78**	_	d

Keterangan : ** = Sangat Berbeda Nyata

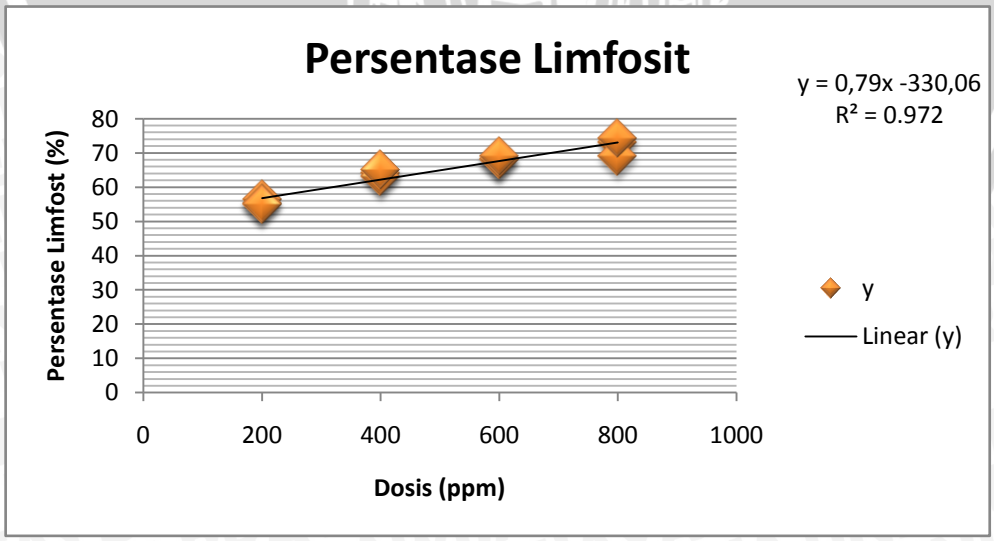
Dari uji BNT tersebut menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata pada masing-masing perlakuan. Pada perlakuan B sangat berbeda nyata dengan perlakuan A sehingga perlakuan A diberi notasi a dan perlakuan B diberi notasi

b. Perlakuan C sangat berbeda nyata dengan perlakuan B sehingga perlakuan C diberi notasi c. Perlakuan D sangat berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan D diberi notasi d.

Pada pengamatan ulas darah menggunakan pewarna giemsa, limfosit terlihat bulat dengan warna ungu dan tidak berinti. Ukuran limfosit paling kecil diantara sel darah yang lainnya. Gambar limfosit pada preparat ulas darah dengan perbesaran 1000 x dapat dilihat pada gambar 13 berikut ini :

Gambar 13. Limfosit Perbesaran 1000 x (Dokumentasi Penelitian)

Dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon pemberian dosis ekstrak kasar daun mengkudu terhadap jumlah limfosit ikan koi. Perhitungan R^2 dapat dilihat pada lampiran 7. Grafik regresi disajikan pada Gambar 14 berikut ini:



Gambar 14. Grafik Regresi Persentase Limfosit

Grafik pada Gambar 14 menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda dalam perlakuan dengan jumlah limfosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu (karena nilai kolerasi yang didapat dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat karena mendekati 100%) yaitu sebesar 0,972 dengan persamaan y = 0,79x -330,06.

Berdasarkan grafik tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningktan jumlah limfosit pada setiap peningkatan dosis. Total limfosit tertinggi terdapat pada perlakuan D (800 ppm) dan terrendah pada perlakuan A (200 ppm). Jumlah limfosit pada perlakuan A (200 ppm) rendah karena adanya penurunan jumlah limfosit yang diakibatkan serangan bakteri A. *hydrophila*. Ikan normal umumnya memiliki kandungan limfosit lebih dari 70% sebagai sistem pertahanan tubuh. Saat ikan terserang bakteri limfosit cenderung mengalami penurunan dan diikuti dengan meningkatnya jumlah monosit sebagai agen makrofag yang memakan antigen dari luar. Grafik yang terbentuk merupakan grafik linier dimana belum ada titik optimum dalam pemberian dosis ekstrak daun mengkudu.

Penurunan jumlah limfosit dapat berdampak negatif pada ikan karena kekebalan tubuh dapat menurun. Hal ini sesuai dengan pendapat Bijanti (2005), penurunan sel limfosit dipengaruhi adanya antigen asing sehingga zat kebal terganggu oleh masuknya infeksi yang menyebabkan jumlah limfosit menurun. Tizard *et al*. (1982) *dalam* Suhermanto *et al.* (2011) menyatakan penurunan limfosit disebabkan oleh darah pada perifer ditarik dari sirkulasi ke dalam jaringan yang mengalami peradangan, hal ini menyebabkan limfosit pada sirkulasi darah menjadi menurun. Selain itu adanya stres berkepanjangan akan meningkatkan kadar kortisol dalam darah sehingga menyebabkan hilangnya limfosit dalam sirkulasi darah dan organ limfoid. Limfosit merupakan sel yang secara spesifik mengenal dan merespon antigen dari luar dan selanjutnya sebagai mediator imum seluler dan humoral.

Sedangkan peningkatan limfosit dipicu oleh senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun mengkudu. Hal ini sesuai dengan pendapat Yin *et al*. (2008) *dalam* Sugito, Nurliana, Aliza, dan Sumadi (2014) yang menjelaskan bahwa beberapa senyawa bioaktif pada beberapa jenis tanaman dapat memicu pembentukan dan aktivitas sel-sel leukosit. Aktivitas sel-sel tersebut menyebabkan aktivitas fagositosis dan pembentukan sel-sel leukosit juga meningkat.

b. Monosit

Berdasarkan perhitungan monosit pada penelitian ini didapatkan jumlah rata-rata limfosit pada ikan koi masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut : A (200 ppm) sebesar 30,05 %, B (400 ppm) sebesar 24,07 %, C (600 ppm) sebesar 22,44 % dan D (800 ppm) sebesar 20,64 %. Rata-rata jumlah monosit pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 10 berikut ini :

Tabel 10. Persentase Jumlah Monosit Ikan Koi (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	29,53	29,82	30,81	90,16	30,05	0,67
B	24,97	23,5	23,75	72,22	24,07	0,79
C	22,83	22,7	21,78	67,31	22,44	0,57
D	20,59	22,26	19,06	61,91	20,64	1,60
K (+)	29,9	29,6	31,01	90,51	30,17	0,74
K (-)	18,01	17,66	19,09	54.76	18,25	0,74
Total				437,27		

Hasil perhitungan dari monosit pada perlakuan A (200 ppm) memiliki jumlah monosit lebih banyak daripada perlakuan B (400 ppm), C (600 ppm) dan D (800 ppm). Jumlah monosit paling sedikit terdapat pada perlakuan D (800 ppm). Analisis ragam jumlah monosit pada ikan koi dapat dilihat pada Tabel 11 berikut ini :

Tabel 11. Analisis ragam Jumlah Monosit Ikan Koi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	150,1327333	50,04424	50,57**	4,07	7, 9
Acak	8	7,9167	0,989583			
Total	11					

Keterangan : ** = Sangat Berbeda Nyata

Berdasarkan tabel di atas hasil perhitungan F hitung sebesar 50,57 dimana hasil ini lebih besar daripada F tabel 1%. Dapat diartikan bahwa masing-masing perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata. Selanjutnya dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (Uji BNT) untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan. Uji BNT monosit ikan koi dapat dilihat pada Tabel 12 berikut ini :

Tabel 12. Uji BNT Jumlah Monosit Ikan Koi

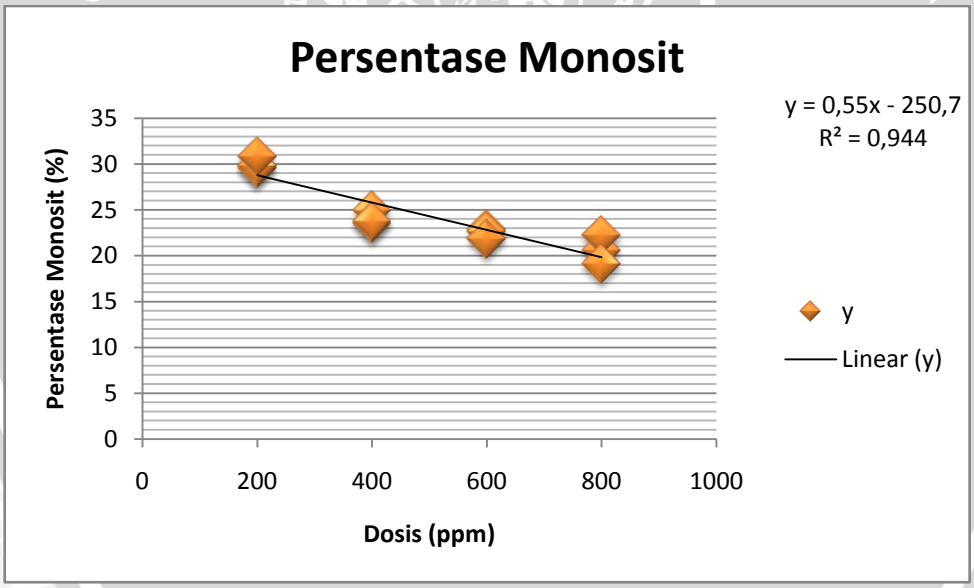
Perlakuan	Rata-rata	D	C	B	A	Notasi
		20,64	22,44	24,07	30,05	
D	20,64	_				a
C	22,44	$1,80^{ns}$	_			ab
B	24,07	3,44**	$1,64^{ns}$	_		bc
A	30,05	9,42**	7,62**	5,98**	_	d

Keterangan : ns = Tidak Berbeda Nyata, ** = Sangat Berbeda Nyata

Dari uji BNT tersebut menunjukkan bahwa perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D sehingga perlakuan D diberi notasi a dan perlakuan C diberi notasi ab. Perlakuan B juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan B diberi notasi bc. Perlakuan A menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata dengan perlakuan B sehingga pelakuan A diberi notasi d. Pada pengamatan ulas darah menggunakan pewarna giemsa, monosit terlihat berbentuk bulat dengan inti berwarna ungu yang hampir memenuhi sel. Monosit pada preparat ulas darah yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 x dapat dilihat pada gambar 15 berikut ini :

Gambar 15. Monosit Ikan Koi Perbesaran 1000 x (Dokumentasi Penelitian)

Dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon pemberian dosis ekstrak kasar daun mengkudu terhadap jumlah monosit ikan koi. Untuk mengetahui hubungan regresi pada masing-masing perlakuan maka perlu dilakukan perhitungan R^2. Perhitungan tersebut dapat dilihat pada lampiran 8. Grafik regresi disajikan pada Gambar 16 berikut ini :



Gambar 16. Grafik Regresi Persentase Monosit

Berdasarkan Gambar 16 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah monosit pada setiap peningkatan dosis. Total monosit tertinggi terdapat pada perlakuan A (200 ppm) dan terrendah pada perlakuan D (800 ppm). Jumlah monosit pada perlakuan A (200 ppm) tinggi karena adanya peningkatan jumlah monosit yang diakibatkan serangan bakteri *A. hydrophila*. Grafik pada Gambar

16 menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda dalam perlakuan dengan jumlah monosit memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu (karena nilai kolerasi yang didapat dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat karena mendekati 100%) yaitu sebesar 0,944 dengan persamaan y = 0,55x – 250,7.

Adanya kenaikan jumlah monosit ini mengindikasikan bahwa ikan sedang mengalami infeksi akibat bakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Irianto (2005) *dalam* Suhermanto *et al*. (2011), Peningkatan prosentase monosit selama proses infeksi disebabkan dalam tubuh ikan, mendorong monosit untuk menghancurkan benda asing yang masuk yaitu bakteri. Monosit merupakan sel dalam aliran darah dan berkembang menjadi makrofag. Ketika mengalami aktivasi, makrofag memiliki kapasitas fagosit lebih kuat daripada neutrofil meskipun granulosit mempunyai jumlah lebih besar.

Peningkatan jumlah monosit dikarenakan monosit yang bersifat makrofag mulai menyerang antigen dari luar sebagai pertahanan tubuh. Menurut Nuryati, Pupitaningtyas dan Wahjuningrum (2007), monosit adalah sel yang mampu menembus dinding pembuluh darah kapiler dan masuk ke dalam jaringan dan berdiferensiasi menjadi sel makrofag. Monosit bersama makrofag jaringan setempat akan memfagositosis sisa–sisa jaringan dan penyebab penyakit.

c. Neutrofil

Berdasarkan perhitungan jumlah neutrofil pada penelitian ini didapatkan hasil rata-rata neutrofil pada masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut : A (200 ppm) sebesar 14,53%, B (400 ppm) sebesar 11,95%, C (600 ppm) sebesar 9,47% dan D (800 ppm) sebesar 5,82%. Nilai pada perlakuan kontol positif K (+) sebesar 14,94% dan pada perlakuan kontrol negatif K (-) sebesar 3,9 %. Rata-rata jumlah neutrofil pada ikan koi dapat dilihat pada Tabel 13 berikut ini :

Tabel 13. Persentase Jumlah Neutrofil Ikan Koi (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	14,22	15,07	14,3	43,59	14,53	0,47
B	11,1	13,39	11,37	35,86	11,95	1,25
C	9,18	9,3	9.92	28,4	9,47	0,45
D	6,3	4,42	6.73	17,45	5,82	1,11
K (+)	15.01	14,67	15.15	44,83	14,94	0,24
K (-)	4,23	4,11	3,65	11,99	3,9	0,30
Total				182,03		

Hasil perhitungan rata-rata jumlah neutrofil seperti tabel di atas didapatkan hasil bahwa jumlah neutrofil paling sedikit yang mendekati dengan jumlah neutrofil kontrol negatif terdapat pada perlakuan D (800 ppm) sebesar 5,82 %. Sedangkan jumlah neutrofil paling banyak yang mendekati dengan kontrol positif K (+) terdapat pada perlakuan A (200 ppm) yaitu sebesar 14,53 %. Neutrofil merupakan pertahanan efektif terhadap mikroba terutama bakteri.

Analisis ragam neutrofil ikan koi dapat dilihat pada Tabel 14 berikut ini:

Tabel 14. Analisis ragam Jumlah Neutrofil Ikan Koi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	124,0225667	41,34086	15,34**	4,07	7,59
Acak	8	21,5510	2,693875			
Total	11					

Keterangan : ** = Sangat Berbeda Nyata

Berdasarkan analisis ragam di atas, hasil F hitung sebesar 15,34 lebih besar daripada F tabel 1 %. Dapat diartikan bahwa masing-masing perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata. Selanjutnya dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (Uji BNT) untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan. Uji BNT neutrofil ikan koi dapat dilihat pada Tabel 15 berikut ini :

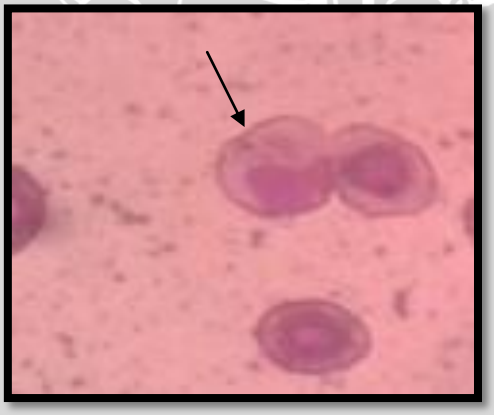
Tabel 15. Uji BNT Jumlah Neutrofil Ikan Koi

Perlakuan	Rata-rata	D	C	B	A	Notasi
		5,82	9,47	11,95	14,53	
D	5,82	_				a
C	9,47	3,65*	_			b
B	11,95	6,14**	2,49^{ns}	_		bc
A	14,53	8,71**	5,06**	2,58^{ns}	_	cd

Keterangan : ns= Tidak Berbeda Nyata , * = Berbeda Nyata,
** = Sangat Berbeda Nyata

Dari uji BNT tersebut menunjukkan perlakuan D berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan D diberi notasi a dan perlakuan C diberi notasi b. Perlakuan B tidak berbeda nyata dengan perlakuan C sehingga perlakuan B diberi notasi bc. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B sehingga perlakuan A diberi notasi cd.

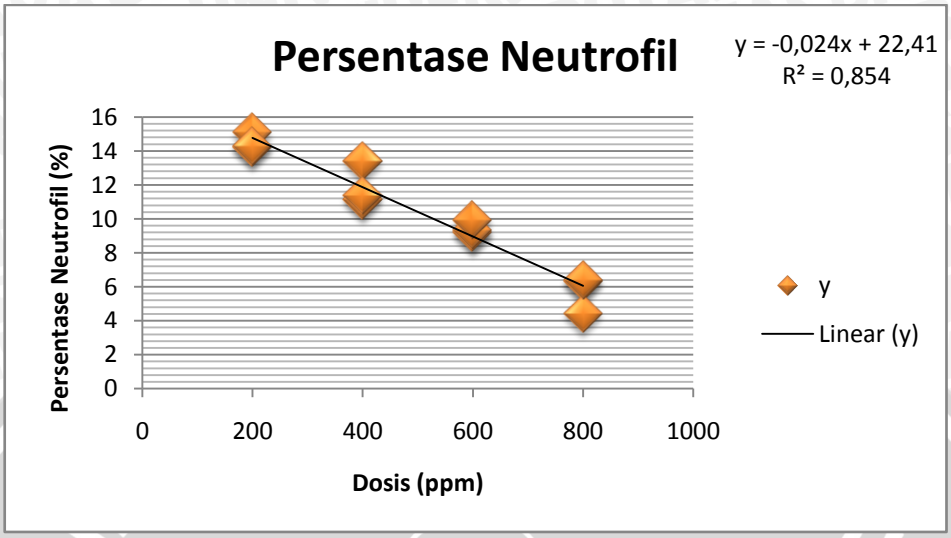
Pada pengamatan ulas darah menggunakan pewarna giemsa, neutrofil terlihat berbentuk tidak beraturan dengan inti bergranula berwarna ungu. Gambar neutrofil pada pengamatan ulas darah yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 x dapat dilihat pada gambar 17 berikut ini :



Gambar 17. Neutrofil Ikan Koi Perbesaran 1000x (Dokumentasi Penelitian)

Perlu dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui uji respon pemberian dosis ekstrak kasar daun mengkudu terhadap jumlah neutrofil ikan koi. Untuk mengetahui hubungan regresi pada masing-masing perlakuan maka

perlu dilakukan perhitungan R^2. Perhitungan tersebut dapat dilihat pada lampiran 9. Grafik regresi disajikan pada Gambar 18 berikut ini :



Gambar 18. Grafik Regresi Persentase Neutrofil

Berdasarkan Gambar 18 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah neutrofil pada setiap peningkatan dosis. Total neutrofil tertinggi terdapat pada perlakuan A (200 ppm) dan terrendah pada perlakuan D (800 ppm). Jumlah neutrofil pada perlakuan A (200 ppm) tinggi karena adanya peningkatan jumlah neutrofil yang diakibatkan serangan bakteri A. *hydrophila*. Neutrofil berperan melawan penyakit yang masuk. Neutrofil bertugas untuk memfagositosis zat asing dari luar. Semakin banyak jumlahnya menandakan adanya serangan dari luar yang mengharuskan neutrofil untuk memfagsitosisnya. Grafik yang terbentuk merupakan grafik linier dimana belum ada titik optimum dalam pemberian dosis ekstrak daun mengkudu.

Grafik pada Gambar 18 menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda dalam perlakuan dengan jumlah neutrofil memiliki hubungan yang nyata. Ditunjukkan dengan hasil R^2 mendekati nilai satu (karena nilai kolerasi yang didapat dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat karena mendekati 100%) yaitu sebesar = 0,854 dengan persamaan y = -0,024x + 22,41.

Fungsi dari neutrofil adalah sebagai pertahanan antibakteri melalui mekanisme kemotaksis dan fagositosis. Kemotaksis yaitu kemampuan neutrofil tertarik ke tempat infeksi dan perdangan, sedangkan fagositosis merupakan kemampuan untuk memakan dan menghancurkan mikroba. Peningkatan jumlah neutrofil ini menandakan bahwa ikan sedang melawan penyakit. Hal ini sesuai dengan pendapat Listiyanti (2011) *dalam* Matofani *et al*. (2013), neutrofil berfungsi untuk melawan penyakit bersama-sama dengan eosinofil yang disebabkan oleh organisme mikroseluler seperti bakteri dan virus.

Proses fagositoses bakteri menghasilkan radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan oleh neutrofil dan makrofag sebagai bagian dari sistem imun untuk membantu mempercepat penyembuhan dari serangan bakteri. Radikal bebas ini berupa oksigen reaktif yang apabila jumlahnya berlebihan maka terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan ROS. Ketidakseimbangan ini akan mengganggu proses metabolisme tubuh. Dalam hal ini daun mengkudu mengandung flavonoid yang merupakan komponen *polyphenolic* sebagai antioksidan yang kuat dan mempunyai kemampuan mengikat zat tertentu yang berbahaya bagi tubuh. Efek perlindungan dari flavonoid dalam sistem biologikal adalah kapasitasnya untuk mentransfer elektron kepada radikal bebas, mengikat katalis logam, mengaktifkan antioksidan enzimatik, mengurangi radikal bebas dan menghambat oksidasi.

4.2 Gejala Klinis

Salah satu tanda yang dapat digunakan sebagai indikator ikan terinfeksi bakteri adalah dengan pengamatan gejala klinis. Gejala klinis yang ditunjukkan oleh ikan kontrol positif K(+) adalah ikan berenang di dasar dan menggesek-gesekkan tubuhnya ke dinding akuarium. Ikan terlihat kurang aktif dengan mata pucat dan menonjol. Sisik ikan mengelupas ditandai banyak sisik yang terlepas

dan berada di dasar perairan. Hal ini dikarenakan serangan bakteri *A. hydrophila* sudah mulai menyerang kekebalan ikan koi dan ikan tidak diberi perlakuan pengobatan sehingga gejala ikan sakit mulai terlihat. Selain itu tubuhnya mengeluarkan lendir, hal ini dikarenakan ikan mulai mengeluarkan sistem pertahanan tubuhnya untuk melawan serangan bakteri. Berbeda dengan ikan kontrol negatif K (-) yang dipelihara di akuarium dengan kondisi lingkungan yang sama, ikan terlihat berenang aktif, badannya segar dan tidak terdapat cacat fisik. Gejala klinis ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 19 berikut :

a) b)

Gambar 19. Gejala Klinis Ikan a. Sisik Mengelupas, b. Perut Membusuk

Pada perlakuan A (200 ppm) setelah dipelihara ikan masih menunjukkan gejala klinis seperti sisik mengelupas (Gambar 19a) perut mulai membusuk (Gambar 19b) dan berenang menggesek-gesekkan ke dinding akuarium dan batu aerasi. Nafsu makan menurun dan pergerakan ikan masih lambat. Pada perlakuan B (400 ppm) tidak berbeda dengan perlakuan A (200 ppm) bahwa ikan gejala klinis ikan sakit juga masih terlihat. Sisik ikan mulai mengelupas dan badannya nampak pucat. Pada bagian mata terlihat keruh. Pada perlakuan C (600 ppm) sebagian ikan masih bergerak lamban namun ada beberapa ikan yang bergerak aktif. Ikan merespon pemberian makan dengan baik. Tidak ada sisik yang mengelupas dan mata ikan juga tidak terlihat gejala klinis ikan sakit. Sedangkan pada perlakuan D (800 ppm) ikan terlihat sehat dan perairannya

terjaga jernih karena kemungkinan ikan tidak mengeluarkan lendir yang menyebabkan perairan keruh. Tidak ada sisik ikan yang mengelupas dan nafsu makan ikan juga cukup baik.

Berdasarkan gejala klinis pada masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun mengkudu yang diberikan memberikan respon berbeda terhadap penyembuhan ikan koi yang diinfeksi bakteri A. *hydrophila*. Pada dosis yang diberikan, dosis A (200 ppm) belum menunjukkan respon yang baik terhadap penyembuhannya. Begitu juga dengan dosis B (400 ppm) dan C (600 ppm) juga masih belum menunjukkan penyembuhannya. Pada dosis D (800 ppm) ikan mampu disembuhkan dengan pemberian ektrak daun mengkudu sebesar 800 ppm. Dimana pada dosis 800 ppm ikan sudah mampu disembuhkan oleh senyawa aktif yang berada pada ekstrak daun mengkudu. Seperti yang diketahui bahwa bahan aktif yang terdapat pada daun mengkudu bersifat sebagai antibakteri. Antibakteri merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antibakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membran sel, antibakteri yang menghambat sintesis protein, dan antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas).

Berdasarkan gejala-gejala yang timbul selama penelitian sesuai dengan pendapat Mulia (2003) bahwa gejala-gejala serangan bakteri A. *hydrophila* di antaranya, kulit mudah terkelupas, bercak merah pada seluruh tubuh, insang berwarna suram atau kebiruan, *exopthalmia* (bola mata menonjol keluar),

pendarahan sirip punggung, sirip dada, sirip perut, dan sirip ekor, juga terjadinya pendarahan pada anus, dan hilang nafsu makan.

4.3 Kualitas Air

Air sangat diperlukan dalam kehidupan ikan, selain itu air merupakan media hidup terutama untuk berlangsungnya proses metabolisme dan pembentukan cairan tubuh. Kualitas air pada media pemeliharaan berperan sangat penting dalam kelangsungan hidup ikan yang dipelihara. Parameter yang berpengaruh dalam kelangsungan hidup ikan diantaranya adalah suhu, pH, DO (*Dissolved Oxygen*) atau oksigen terlarut. Parameter tersebut diukur setiap harinya pada pagi hari dan sore hari. Selain pengukuran kualitas air, setiap pagi hari dan sore hari juga dilakukan penyiponan dan pergantian air agar sisa pakan di dasar tidak mencemari perairan.

4.3.1 Suhu

Suhu sangat berpengaruh terhadap kondisi ikan yang dipelihara. Hal ini berkaitan dengan proses metabolisme ikan yang dipelihara. Suhu atau temperatur air sangat berpengaruh terhadap metabolisme dan pertumbuhan ikan koi serta mempengaruhi jumlah pakan yang dikonsumsi oleh ikan. Suhu juga memengaruhi oksigen terlarut dalam perairan. Suhu optimal untuk hidup ikan koi pada kisaran 25-30°C (Utami, Aida dan Pranata, 2013).

Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air, kisaran suhu yang diukur selama pengamatan berkisar antara 25°C - 26,48°C. Kisaran suhu ini masih dalam kategori normal. Hal ini sesuai dengan pendapat Ulfiana *et al.* (2012), bahwa kondisi suhu optimum dalam budidaya ikan koi berkisar antara 25-30°C.

4.3.2 Derajat Keasaman (pH)

pH merupakan tetapan ion hydrogen bebas dalam suatu sistem. Kisaran pH ditetapka mulai dari 1 hingga 14. Perairan dengan pH < 4 merupakan

perairan yang sangat asam dan dapat menyebabkan kematian makhluk hidup, sedangkan pH > 9,5 merupakan perairan yang sangat basa yang dapat menyebabkan kematian dan mengurangi produktivitas perairan. Penurunan pH terutama sebagai akibat dari menumpuknya kotoran dan sampah serta sisa makanan di akuarium tanpa terurai dengan baik (Utami *et al*., 2013).

Hasil pengukuran pH selama pemeliharaan berkisar antara 7,93-8,4. Nilai tersebut masih termasuk dalam kategori normal dan dapat ditoleransi oleh ikan koi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rudiyanti dan Ekasari (2009) bahwa nilai derajat keasaman sejenis ikan mas berkisar antara 6,5-8,5.

4.3.3 DO (*Dissolved Oxygen*)/Oksigen Terlarut

Oksigen adalah salah satu unsur kimia yang sangat penting sebagai penunjang utama kehidupan berbagai organisme. Oksigen dimanfaatkan oleh organisme perairan untuk proses respirasi dan menguraikan zat organik menjadi zat an-organik oleh mikro organisme. Oksigen terlarut dalam air berasal dari difusi udara dan hasil fotosintesis organisme berklorofil yang hidup dalam suatu perairan dan dibutuhkan oleh organisme untuk mengoksidasi zat hara yang masuk ke dalam tubuhnya (Nybakken 1988 *dalam* Simanjutak 2007).

Pada pengukuran DO selama pemeliharan ikan uji didapatkan nilai rata-rata DO berkisar antara 2,99-3,17 mg/l. Hal ini masih dalam kategori normal dan dapat ditoleransi oleh ikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Rudiyanti dan Ekasari (2009), bahwa kandungan oksigen dalam suatu perairan minimum sebesar 2 mg/l. Ini sudah cukup untuk mendukung kehidupan ikan secara normal.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang berjudul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap Hematologi Ikan Koi (*C. carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*" adalah sebagai berikut :

- Pemberian ekstrak dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap parameter hematologi ikan koi yang diuji. Terjadi peningkatan total eritrosit pada perlakuan D (800 ppm) yang mengindikasikan bahwa ikan sudah sembuh.
- Dosis yang terbaik dari empat dosis yang diberikan adalah 800 ppm. Pada dosis ini hasil perhitungan parameter hematologi seperti total eritrosit, total leukosit, persentase diferensial leukosit (limfosit, monosit dan neutrofil) mendekati perhitungan pada ikan kontrol negatif K (-).

5.2 Saran

Hasil dari penelitan ini dapat diaplikasikan kepada para pembudidaya di lapang dalam mengobati ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* sehingga meminimalisir penggunaan antibiotik. Hasil dalam penelitian ini menunjukkan hubungan pemberian dosis yang berbeda terhadap parameter hematologi ikan koi masih menunjukkan grafik yang linier. Oleh karena itu masih dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis yang optimal untuk pemberian ekstrak daun mengkudu untuk penyembuhan ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

Afrianto dan Liviawati 1992. Fisiologi Hewan. Gramedia. Jakarta. 97 hlm.

Agus, G.T.K, A. Dianawati, U. T. Dipo, E. S. Irawan, K. Miharja, L. Gusyadi, A. M. Luluk, N. Maman, P. S. Karno, S. Udin, J. M. Ujang, T. Yana, dan Y. Sastro. 2002. Koi. Agromedia Pustaka. Jakarta. 62 hlm.

Alamanda, I. E, N. S. Handajani dan A. Budiharjo. 2007. Penggunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah untuk Penetapan Kesehatan Ikan Lele Dumbo *(Clarias gariepienus)* di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Biodiversitas*. **8**(1): 34-36.

Anderson, D. P and A. K. Swicki. 1995. Basic hematology and serology for fish health program in diseases in Asia Aquaculture II. *J. Asian Fisheries society.* 185-202.

Aryadi, I. G. I. P. 2014. Pengaruh ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Sebagai Penyebab Abses Periodontal Secara *In Vitro.* Skripsi. Universitas Mahasarawati Denpasar. Bali. 64 hlm.

Bachtiar, Y. 2002. Mencemerlangkan Warna Koi. Agromedi Pustaka. Jakarta. 74 hlm.

Bijanti, R. 2005. Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 105 hlm.

Bijanti, R., M. G. A. Yuliani, R. S. Wahjuni, R. B. Utomo. 2010. Buku Ajar Patologi Klinik Veteriner. Universitas Airlangga Press. Surabaya. 97 hlm.

Dianti, L., S. B. Prayitno, R. W. Ariyati. 2013. Ketahanan Nondpesifik Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Direndam Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius)* terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology.* **2**(4) : 63-71.

Esther dan Sipayung. 2010. Panduan Praktis Memelihara Koi. Kanisius. Yogyakarta. 61 hlm

Fujaya, Y. 2008. Fisiologi Ikan. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hlm.

Hadiroseyani, Y, Hafifuddin, M. Alifuddin dan H. Supriyadi. 2005. Potensi Daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata*) untuk Pengobatan Penyakit Cacar pada Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) yang Disebabkan *Aeromonas hydrophilla* S26. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **4**(2): 139-144.

Halim, A. M. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kemangi (*Ocium sanctum* L.) terhadap Hematologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri (*Aeromonas hydrophila*). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang (Tidak dipublikasikan).

Hidayati, N. 2009. Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Teh (*Camellia sinensis* l, *v. assamica*) Tua Hasil Ekstraksi Menggunakan Pelarut Akuades Dan Etanol. Skripsi. Universitas Islam Negeri Malang. Malang. 64 hlm.

Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 116 hlm.

Irianto, A, Hemayanti dan N. Iriyanti. 2006. Pengaruh Suplementasi Probiotik A3-51 Terhadap Derajat Imunitas *Oreochromis niloticus* didasarkan pada Angka Kuman pada Ginjal Setelah Uji Tantang dengan *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida achromogenes*. *Jurnal Perikanan*. **8**(2): 144-152.

Jaya, I dan M. Iqbal. 2009. Pengembangan Teknik Penentuan Dini Jenis Kelamin Koi. *Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*. **1**: 7-15.

Kameswari, M. S, H. Mahatmi, I. N. K. Besung. 2013. Perasan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara *In Vitro. Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. **2**(2): 216-224.

Kamaludin, I. 2011. Efektivitas Ekstrak Lidah Buaya *Aloe Vera* untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. Melalui Pakan. Skripsi. IPB. Bogor. 54 hlm.

Kusumawardani, I. R, R. Kusdarwati dan D. Handijanto. Daya Antibakteri Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rose) dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. *Berkah Ilmiah Perikanan*. **3**(1): 75-82

Kresno, S. B. 1991. Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 288 hlm.

Laith, A. R and M. Najiah. 2013. Aeromonas hydrophila: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, Clarias gariepinus (Burchell). *J Aquac Res Development*. **5**(2) : 1-7.

Matofani, A. S, S. Hastuti dan F. Basuki. 2013. Profil Darah Ikan Nila Kunti (Oreochromis niloticus) yang Diinjeksi Streptococcus agalactiae dengan Kepadatan Berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **2** (2): 64-72.

Mulia, D.S. 2003. Pengaruh Vaksin *Debris* Sel *Aeromonas hydrophila* Dengan Kombinasi Cara Vaksinasi dan Booster Terhadap Respons Imun dan Tingkat Perlindungan Relatif Pada Lele Dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell).Tesis. PPs. UGM. Yogyakarta. 60 hlm.

Mundriyanto, H., Taufik,P dan Taukhid. 2002. Respon Histologis Tubuh Kodok (*Rana catesbeiana*) terhadap Infeksi Bakteri Patogen dan Potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai Immunostimulan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **8**(3): 55-63.

Mulyani, Y, E. Bachtiar dan M. Untung. 2013. Peranan Senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri Aeromonas hydrophila pada Ikan Mas *(Cyprinus carpio L.). Jurnal Akuatika*. **4**(1) : 1-9.

Nuraini, D. N. 2014. Aneka Daun Berkhasiat Obat. Gava Media. Yogyakarta. 258 hlm.

Nuryati, S, D. Puspitaningtyas dan D. Wahjuningrum. 2007. Potensi Ekstrak Bawang Putih *Allium sativum* untuk Mengaktifasi Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Akuakultur Indonesia.* **6**(2): 147-154.

Noercholis, A, M. A. Muslim dan Maftuch. Ekstraksi Fitur Roundness untuk Menghitung Jumlah Leukosit dalam Citra Sel Darah Ikan. *Jurnal EECCIS*. **7** (1) : 35-40.

Poeloengan, M dan Praptiwi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kosehatan*. **20**(2): 65-69

Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan – Udang Bakteri. UM Press. Malang. 113 hlm.

Prasetya, N, S. Subekti dan Kismiyati. 2013. Prevelensi Ektoparasit yang Menyerang Benih Ikan Koi *(Cyprinus carpio)* di Bursa Ikan Hias Surabaya. *Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan*. **5**(1): 113-116.

Purba, S. 2007. Uji Efektifitas Ekstrak Daun Mengkudu *(Morinda citrifolia)* terhadap *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera : Plutellidae) di Laboratorium. Skripsi. Universitas Sumatera Utara. Medan. 46 hlm.

Rahmawati, A. 2009. Kandungan Fenol Total Ekstrak Buah Mengkudu *(Morinda citrifolia).* Skripsi UI. Depok. 110 hlm.

Rudiyanti, S dan A. D. Ekasari. 2009. Pertumbuhan dan Survival Rate Ikan Ma (Cyprinus carpio Linn) pada Berbagai Konsentrasi Pestisida Regent 0,2 G. Jurnal Saintek Perikanan. **5** (1): 39-47.

Sabirin, I. P, A. M. Maskoen dan B.S. Hernowo. 2013. Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L*.) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar. MKB. **45**(4): 226-23.

Safitri, D, Sugito dan S. Suryaningsih. 2013. Kadar Hemoglobin Ikan Nila (Oreochromis niloticus) yang diberi Cekaman Panas dan Pakan yang Disuplementasikan Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb). Jurnal Medika Veterinaria. **7** (1): 39-41.

Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.

Simanjutak, M. 2007. Oksigen Terlarut dan *Apparent Oxygen Utilixatio* di Perairan Teluk Klabat, Pulau Bangka. *Ilmu Kelautan*. **12** (2): 59-66.

Sugito, Nurliana, D. Aliza dan Sumadi. 2014. Differensial Leukosit dan Ketahanan Hidup Pada Uji Tantang *Aeromonas hydrophila* Ikan Nila yang Diberi Stres Pana Dan Suplementasi Tepung Daun Jaloh dalam Pakan. *Jurnal Kedokteran Hewan*. **8**(2): 158-163

Suhermanto, A, S. Andayani dan Maftuch. 2011. Pemberian Total Fenol Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) untuk Meningkatkan Leukosit dan Differensial Leukosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Kelautan*. **4**(2): 49-56.

Suhermanto, A, S. Andayani Dan Maftuch. 2013. Pengaruh Total Fenol teripang Pasir (*Holothuria Scabra)* Terhadap Respon Imun Non Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*) . *Jurnal Bumi Lestari.* **13**(2): 225-233.

Sulistyo. 1971. Farmakologi dan Terapi. EKG. Yogyakarta. 79 hlm.

Syamashithoh, W. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kemangi (*O. citratum*) Terhadap Hematologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Skripsi. FPIK. Universitas Brawijaya. Malang. 98 hlm.

Thangaviji, V, M. Michaelbabu, S. B. Anand, P. Gunasekaran and C. Citarasu. 2012. Immunization with the Aeromonas OMP Provides Protection against Aeromonas hydrophila in Goldfish *(Carassius auratus)*. *J Microbial Biochem Technol*. **4**(2): 45-49.

Thrall, M. A. 2005. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincottt William and Wilkins.

Twigg, D. 2008. Buku Pintar Koi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 133 hlm.

Udin dan M. Sitanggang. 2010. Merawat dan Menangkarkan Koi. Agromedia Pustaka. Jakarta. 168 hlm

Ulfiana, R, G. M. Mahasri dan H. Suprapto. 2012. Tingkat Kejadian Aeromonasis pada Ikan Koi *(Cyprinus carpio)* yang Terinfeksi Myxobulus koi pada Derajat Infeksi yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **4**(2): 169-174.

Utami, D.A, Y. Aida dan F. S. Pranata. 2013. Variasi Kombinasi Tepung Labu Kuning (*Cucurbita moschata* D.) dan Tepung Azolla (*Azolla pinnata* R.br.) pada Kecerahan Warna Ikan Koi (*Cyprinus carpio* L.). 1-12.

Widiati, S. 2011. Daya Hambat Ekstrak Ampas Teh Hitam (*Camellia sinensis* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*. Skripsi. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. 54 hlm.

LAMPIRAN

Lampiaran 1. Alat-alat Penelitian

Rotary Evaporator

Akuarium

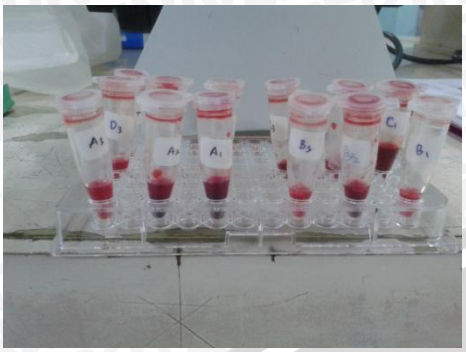
Objek Glass

Selang Aerasi dan Aerator

Timbangan Analitik

Sahli Meter

Lampiran 1. (Lanjutan)



Appendorf

Nampan dan Pipet Tetes

pH meter

DO meter

Spuit disposible

Haemositometer

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 1. (Lanjutan)

Washing botle

Timbangan digital

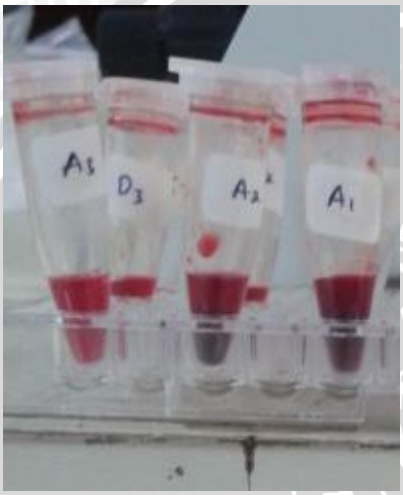
Handtally counter

Mikroskop

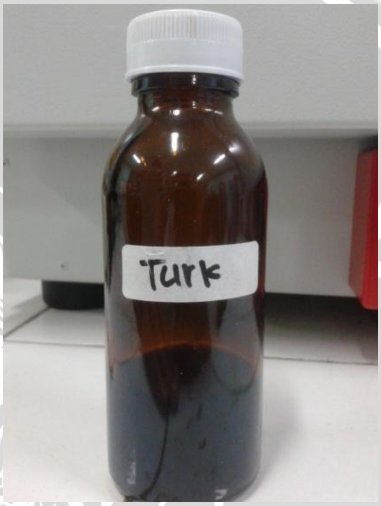
Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian

Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Ekstrak Kasar Daun Mengkudu



Sampel Darah Ikan Koi

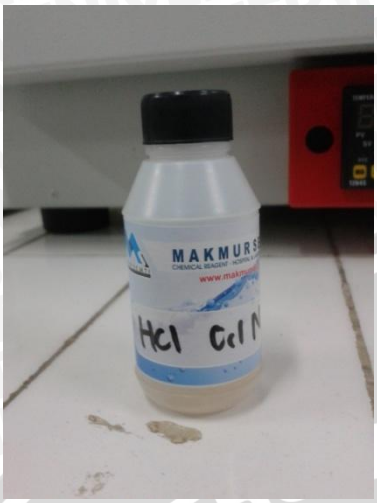


Turk

Hayem

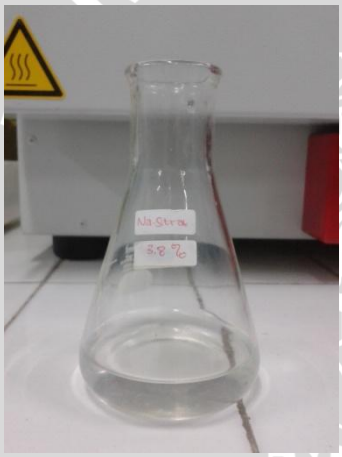
Giemsa

Lampiran 2. (Lanjutan)



HCl 0,1 N

Methanol



Na Sitrat

Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan Penelitian

Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Pembuatan Preparat pada Haemositometer

Pengambilan Sampel Darah

Pengamatan Di bawah Mikroskop

Pembuatan Preparat Ulas Darah

Penimbangan Ekstrak

Lampiran 4. Cara Perhitungan Sidik Ragam, Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan Analisa Regresi

Tabel Analisa Data

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	A_1	A_2	A_3	TA	RA
B	B_1	B_2	B_3	TB	RB
C	C_1	C_2	C_3	TC	RC
D	D_1	D_2	D_3	TD	RD
Total				G	

Perhitungan :

1. Jumlah Kuadrat (JK) :
   - Faktor Koreksi (FK) = G^2/n
   - JK Total = $(A_1^2 + A_2^2 + ...D_3^2) - FK = P$
   - JK Perlakuan = $\frac{(\sum A)2 + ... + (\sum D)2}{4} - FK$ = Q
   - JK Acak = JK Total – JK Perlakuan = P – Q = R

2. Hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel sidik ragam

Tabel Analisa Keragaman/Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F Hitung	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	3	Q	Q/3 = a	a/b	F α (3,9)	F α (3,9)
Acak	8	R	Q/8 = b			
Total	11	P				

- Jika F hitung < F tabel 5 % berarti hasilnya tidak berbeda nyata

Jika F tabel 5 % < F hitung < F tabel 1 % berarti hasilnya berbeda nyata. Pada F hitung diberi tanda satu bintang (*).

Lampiran 4. (Lanjutan)

- Jika F hitung > F tabel 1 % berarti hasilnya berbeda sangat nyata. Pada F hitung diberi tanda dua bintang (**).

Apabila hasil perlakuan berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perlakuan mana yang terbaik, yaitu sebagai berikut :

1. Menghitung nilai BNT :

$$SED = \frac{\sqrt{2KT\,acak}}{3}$$

BNT 5 % = t tabel 5 % (db Acak) x SED

BNT 1 % = t tabel 1 % (db Acak) x SED

2. Menghitung selisih rata-rata perlakuan

Tabel BNT Perlakuan

Rata-rata Perlakuan	terkecil → terbesar				**Notasi**
Terkecil ↓ terbesar	-	-	-	-	

Ketentuan :

Selisih < BNT 5 % = ns (tidak berbeda nyata).

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

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

Lampiran 4. (Lanjutan)

Untuk menentukan hubungan fungsional antara respon (tanggapan) dengan perlakuan yang terlibat dalam kisaran taraf faktor penelitian dilakukan pengujian menurut metode ortogonal polinominal yaitu :

$Y = \alpha + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + ...+ \beta_n X^n$

Keterangan :

α = intersepsi

β_1 = (I=1,2,3..,n) Koefisien regresi parsial yang berasosiasi dengan derajat polinomial ke-1

Y = respon

X = perlakuan

Selanjutnya untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil atau berapa perubahan hasil per satuan perlakuan dilanjutkan dengan tabel polinominal ortogonal.

Lampiran 5. Perhitungan Jumlah Eritrosit

Perhitungan :

Total A = 109,5 + 109 + 108,75
= 327,25

A rata-rata = $\frac{327,25}{3}$
= 109,08

Total B = 152 + 120,25 + 158,5
= 430,75

B rata-rata = $\frac{430,75}{3}$
= 143,58

Total C = 174,5 + 187,5 + 174
= 536

C rata-rata = $\frac{536}{3}$
= 178,67

Total D = 194 + 188 + 190
= 572

D rata-rata = $\frac{572}{3}$
= 190,67

- **Tabel Total Eritrosit Ikan Koi (*C. carpio*)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	109,5	109	108,75	327,25	109,08
B	152	120,25	158,5	430,75	143,58
C	174,5	187,5	174	536	178,67
D	194	188	190	572	190,67
				1866	

Perhitungan Sidik Ragam**:**

1. Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{N}$
$= \frac{1866^2}{12}$
= 290163

2. Jumlah Kuadrat (JK total) $= \sum x_{ij}^2 - FK$
$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$
$= (109,5^2 + 109^2 + 108,75^2 + \dots + 190^2) - 290163$
= 13183,625

Lampiran 5. (Lanjutan)

3. JK Perlakuan $= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$= \frac{(TA^2+TB^2+TC^2+TD^2)}{r} - FK$

$= \frac{327,25^2+430,75^2+536^2+572^2}{3} - 290163 = 12209,71$

4. JK galat/acak = JK Total - JK Perlakuan

=13183,625 – 12209,708

= 973,91

5. db Perlakuan = n -1

= 4 – 1

= 3

6. KT Perlakuan $= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}}$

$= \frac{12209,71}{3}$

= 4069,9

7. db Galat = n -1

= 11 – 3

= 8

8. KT Galat $= \frac{\text{JK Galat}}{\text{db Galat}}$

$= \frac{973,91}{8}$

= 121,74

9. db Total = db Total - db Perlakuan

= 14 - 3

= 11

10. F hitung $= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT Galat}}$

$= \frac{4069,9}{121,74}$

= 33,43

- **Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel**

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	12209,708	4069,9	33,431**	4.07	7.59
Acak	8	973,91	121,74			
Total	11					

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

Lampiran 5. (Lanjutan)

Perhitungan Uji BNT:

SED $= \sqrt{\frac{2\ x\ KT\ acak}{ulangan\ \ (r)}} = \sqrt{\frac{2\ x\ 121{,}74}{3}} = 9{,}008$

BNT 5% = T tabel 5% (db Acak) x SED

= 2,31 x 9,008 = 20,77

BNT 1%= T tabel 1% (db Acak) x SED

= 3,36 x 9,008

= 30,22

➢ **Hasil Uji BNT Eritrosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

		A	B	C	D	Notasi
Rerata perlakuan		109,08	143,58	178,67	190,67	
A	109,08	0.00^{ns}				a
B	143,58	34,50**	0.00^{ns}			b
C	178,67	69,58**	35,08**	0.00^{ns}		c
D	190,67	81,58**	47,08**	12,00^{ns}	0.00^{ns}	cd

Keterangan : ns → Non Signifikan ** → Sangat Berbeda Nyata

➢ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A	327,25	-3	1	-1
B	430,75	-1	-1	3
C	536	1	-1	-3
D	572	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		839,5	-67,5	-71
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		11746,004	379,688	84,01

Lampiran 5. (Lanjutan)

Perhitungan Sidik Ragam Regresi:

KT Linear $= \frac{\text{JK Linear}}{\text{db Linear}}$

$= \frac{11746{,}004}{1}$

$= 11746{,}004$

F Hitung Linear $= \frac{\text{KT Linear}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{11746{,}004}{121{,}74}$

$= 96{,}484$

KT Kuadratik $= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}}$

$= \frac{379{,}688}{1}$

$= 379{,}688$

F Hitung Kuadratik $= \frac{\text{KT Kuadratik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{379{,}688}{121{,}74}$

$= 3{,}12$

KT Kubik $= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}}$

$= \frac{84{,}01}{1}$

$= 84{,}01$

F Hitung Kubik $= \frac{\text{KT Kubik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{84{,}01}{121{,}74}$

$= 0{,}69$

KT Acak $= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}}$

$= \frac{973{,}91}{8}$

$= 121{,}74$

- **Tabel Sidik Ragam Regresi Eritrosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	12209,70			4.07	7.59
Linear	1	11746,004	11746,004	96,48**		
Kuadratik	1	379,687	379,687	3,12		
Kubik	1	84,01	84,01	0,69		
Acak	8	973,91	121,74			
Total	11					

Lampiran 5. (Lanjutan)

Perhitungan Regresi :

$\bar{y} = b\,\bar{x} + a$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{10169550 - \frac{6000\,x\,1866}{4}}{3600000 - \frac{36000000}{4}}$$

$= -1,36$

$a = \bar{y} - (-1,36)\,\bar{x}$

$= 155,5 + 1,36 \times 500$

$= 835,5$

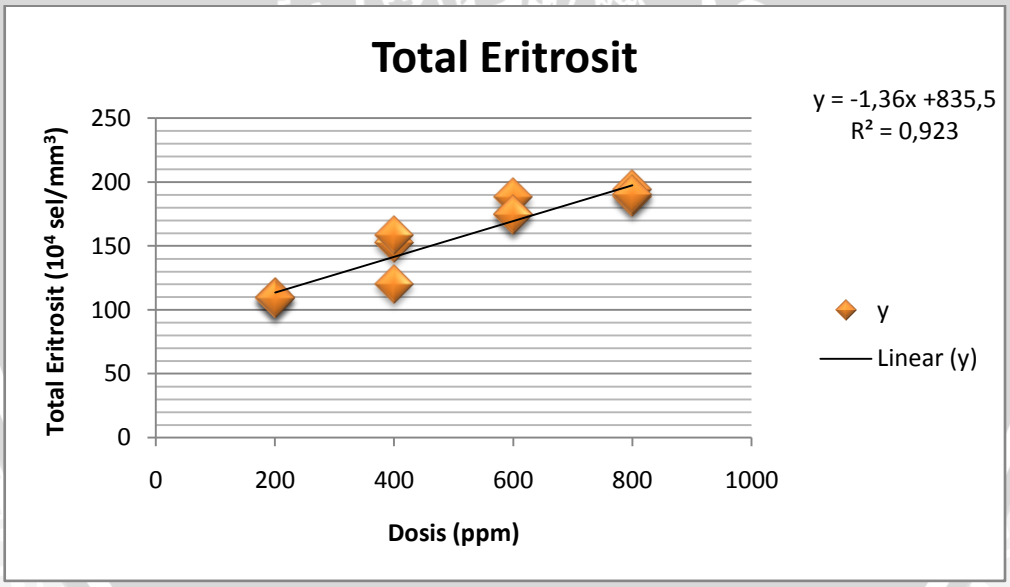
$$R^2 = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Total}}$$

$$= \frac{11746,004}{12683,91}$$

$= 0,923$

$\bar{y} = -1,36x+835,5$

- **Grafik Total Eritrosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**



Lampiran 6. Perhitungan Total Leukosit

Perhitungan :

Total A = 13,79 + 14,09 + 13,63
= 41,51

A rata-rata = $\frac{41,51}{3}$
= 13,84

Total B = 12,05 + 12,68 + 11,76
= 36,49

B rata-rata = $\frac{36,49}{3}$
= 12,16

Total C = 8,5 + 11,43 + 8,86
= 28,79

C rata-rata = $\frac{28,79}{3}$
= 9,60

Total D = 7,61 + 7,78 + 7,62
= 23,01

D rata-rata = $\frac{23,01}{3}$
= 7,67

- **Tabel Total Leukosit Ikan Koi (*C. carpio*)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata rata
	1	2	3		
A	113,79	14,09	13,63	41,51	13,84
B	12,05	12,68	11,76	36,49	12,16
C	8,5	11,43	8,86	28.79	9,60
D	7,61	7,78	7,62	23,01	7,67
				129,8	

Perhitungan Sidik Ragam**:**

1. Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$

   = $\frac{129,8^2}{12}$

   = 1404

2. Jumah Kuadrat (JK total) =$\sum x_{ij}^2$ – FK

   = ($A1^2 + A2^2 + A3^2 + \ldots + D3^2$) - FK

   = ($13,79^2 + 14,09^2 + 13,63^2 + \ldots + 7,62^2$) – 1404

   = 72,65

Lampiran 6. (Lanjutan)

3. JK Perlakuan $= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$= \frac{(TA^2+TB^2+TC^2+TD^2)}{r} - FK$

$= \frac{41,51^2+36,49^2+28,79^2+23,01^2}{3} - 1404 = 66,97$

4. JK galat/acak = JK Total - JK Perlakuan

=72,65 – 66,97

= 5,68

5. db Perlakuan = n -1

= 4 – 1

= 3

6. KT Perlakuan $= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}}$

$= \frac{66,97}{3}$

= 22,32

7. db Galat = n -1

= 11 – 3

= 8

8. KT Galat $= \frac{\text{JK Galat}}{\text{db Galat}}$

$= \frac{5,68}{8}$

= 0,71

9. db Total = db Total - db Perlakuan

= 14 - 3

= 11

10. F hitung $= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT Galat}}$

$= \frac{22,32}{0,72}$

= 31,46

➢ **Analisa Sidik Ragam Leukosit Ikan Koi dengan Uji F tabel**

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	66,9	22,3	31,46**	4.07	7.59
Acak	8	5,68	0,71			
Total	11	72,58				

Keterangan : ** Sangat Berbeda Nyata)

Lampiran 6. (Lanjutan)

Perhitungan Uji BNT:

SED $= \sqrt{\frac{2\ x\ KT\ acak}{ulangan\ \ (r)}} = \sqrt{\frac{2\ x\ 4069{,}9}{3}} = 0{,}68$

BNT 5% = T tabel 5% (db Acak) x SED

= 2,31 x 0,68 = 1,59

BNT 1%= T tabel 1% (db Acak) x SED

= 3,36 x 0,68

= 2,30

➢ **Hasil Uji BNT Leukosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

		D	C	B	A	Notasi
Rata-rata perlakuan		7,67	9,60	12,16	13,84	
D	7,67	0.00^{ns}				a
C	9,60	1,93*	0.00^{ns}			b
B	12,16	4,49*	2,57**	0.00^{ns}		c
A	13,84	6,17**	4,24**	1,67^{ns}	0.00^{ns}	cd

Keterangan : * → Berbeda Nyata

** → Sangat Berbeda Nyata

➢ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A	41,51	-3	1	-1
B	36,49	-1	-1	3
C	28,79	1	-1	-3
D	23,01	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		-63,2	-0,76	4,6
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		66,57	0,04	0,352

Lampiran 6. (Lanjutan)

Perhitungan Sidik Ragam Regresi:

KT Linear $= \frac{\text{JK Linear}}{\text{db Linear}}$

$= \frac{66,57}{1}$

$= 66,57$

F Hitung Linear $= \frac{\text{KT Linear}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{66,57}{0,71}$

$= 93,82$

KT Kuadratik $= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}}$

$= \frac{0,048}{1}$

$= 0,048$

F Hitung Kuadratik $= \frac{\text{KT Kuadratik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{0,048}{0,71}$

$= 0,06$

KT Kubik $= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}}$

$= \frac{0,352}{1}$

$=0,352$

F Hitung Kubik $= \frac{\text{KT Kubik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{0,352}{0,71}$

$= 0,49$

KT Acak $= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}}$

$= \frac{5,676}{8}$

$= 0,71$

- **Tabel Sidik Ragam Leukosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	66,97			4.07	7.59
Linear	1	66,57	66,57	93,82**		
Kuadratik	1	0,048	0,048	0,06		
Kubik	1	0,352	0,352	0,49		
Acak	8	5,676	0,71			
Total	11	72,24				

Lampiran 6. (Lanjutan)

Perhitungan Regresi :

$\bar{y} = b\,\bar{x} + a$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{58580 - \frac{6000\,x\,129{,}8}{4}}{3600000 - \frac{36000000}{4}}$$

$= 0{,}025$

$a = \bar{y} - 0{,}025\,\bar{x}$
$= 10{,}81 - 0{,}025 \times 500$
$= -1{,}69$

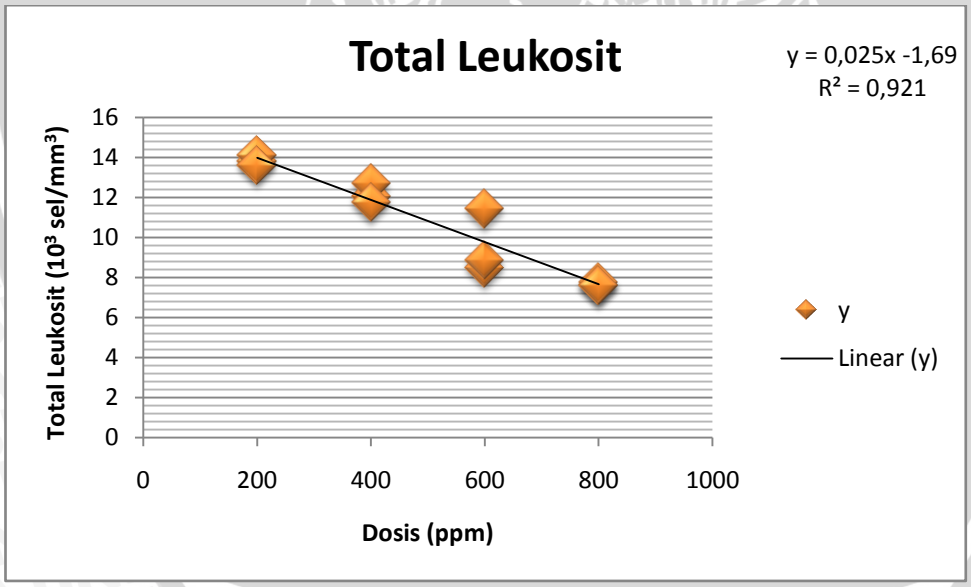
$$R^2 = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Total}}$$

$$= \frac{66{,}57}{72{,}24}$$

$= 0{,}921$

$\bar{y} = 0{,}025x - 1{,}69$

Grafik Total Leukosit Ikan Koi (*C. Carpio*)



Lampiran 7. Perhitungan Total Limfosit

Perhitungan :

Total A = 56,25 + 55,11 + 54,89
= 166,25

A rata-rata = $\frac{166,25}{3}$
= 55,42

Total B = 63,93 + 63,11 + 64,88
= 191,92

B rata-rata = $\frac{191,92}{3}$
= 63,97

Total C = 67,99 + 68 + 68,9
= 204,89

C rata-rata = $\frac{204,89}{3}$
= 68,30

Total D = 73,11 + 68,9 + 74,21
= 216,22

D rata-rata = $\frac{216,22}{3}$
= 72,07

- **Tabel Total Limfosit Ikan Koi (*C. carpio*)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata rata
	1	2	3		
A	56,25	55,11	54,89	166,25	55,42
B	63,93	63,11	64,88	191,92	63,97
C	67,99	68	68,9	204,89	68,30
D	73,11	68,9	74,21	216,22	72,07
				779,28	

Perhitungan Sidik Ragam**:**

1. Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$

   = $\frac{779,28^2}{12}$

   = 50606,44

2. Jumlah Kuadrat (JK total) = $\sum x_{ij}^2$ – FK

   = ($A1^2 + A2^2 + A3^2 + \ldots + D3^2$) - FK

   = ($56,25^2 + 55,11^2 + 54,89^2 + \ldots + 74,21^2$)-50606,44

   = 473,64

Lampiran 7. (Lanjutan)

3. JK Perlakuan $= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$= \frac{(TA^2+TB^2+TC^2+TD^2)}{r}$ - FK

$= \frac{166,25^2+191,92^2+204,89^2+216,22^2}{3}$ - 50606,44 = 461,34

4. JK galat/acak = JK Total - JK Perlakuan

=473,64– 461,34

= 12,31

5. db Perlakuan = n -1

= 4 – 1

= 3

6. KT Perlakuan $= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}}$

$= \frac{461,34}{3}$

= 153,78

7. db Galat = n -1

= 11 – 3

= 8

8. KT Galat $= \frac{\text{JK Galat}}{\text{db Galat}}$

$= \frac{12,31}{8}$

= 1,53

9. db Total = db Total - db Perlakuan

= 14 - 3

= 11

10. F hitung $= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT Galat}}$

$= \frac{153,78}{1,54}$

= 99,99

➢ **Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel**

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	461,34	153,78	99,99**	4.07	7.59
Acak	8	12,31	1,53			
Total	11	472,65				

Keterangan : ** Sangat Berbeda Nyata

Lampiran 7. (Lanjutan)

Perhitungan Uji BNT:

SED $= \sqrt{\frac{2\ x\ KT\ acak}{ulangan\ \ (r)}} = \sqrt{\frac{2\ x\ 1{,}53}{3}} = 1{,}01$

BNT 5% = T tabel 5% (db Acak) x SED

= 2,31 x 1,01 = 2,34

BNT 1%= T tabel 1% (db Acak) x SED

= 3,36 x 1,01

= 3,34

➢ **Hasil Uji BNT Limfosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

		A	B	C	D	Notasi
Rerata perlakuan		55,42	63,97	68,30	72,07	
A	55,42	0.00^{ns}				a
B	63,97	8,56**	0.00^{ns}			b
C	68,30	12,88**	4,32**	0.00^{ns}		c
D	72,07	16,66**	8,10**	3,78**	0.00^{ns}	d

Keterangan : ** ➔ Sangat Berbeda Nyata

➢ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A	166,25	-3	1	-1
B	191,92	-1	-1	3
C	204,89	1	-1	-3
D	216,22	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		162,88	-14,34	11,06
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		442,16	17,13	2,03

Lampiran 7. (Lanjutan)

Perhitungan Sidik Ragam Regresi:

KT Linear $= \frac{\text{JK Linear}}{\text{db Linear}}$

$= \frac{442,16}{1}$

$= 442,16$

F Hitung Linear $= \frac{\text{KT Linear}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{17,14}{1,54}$

$= 287,39$

KT Kuadratik $= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}}$

$= \frac{17,14}{1}$

$= 17,14$

F Hitung Kuadratik $= \frac{\text{KT Kuadratik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{17,14}{1,54}$

$= 11,1$

KT Kubik $= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}}$

$= \frac{2,04}{1}$

$= 2,04$

F Hitung Kubik $= \frac{\text{KT Kubik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{2,04}{1,54}$

$= 1,32$

KT Acak $= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}}$

$= \frac{12,31}{8}$

$= 1,54$

- **Tabel Sidik Ragam Regresi Limfosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	461,34			4.07	7.59
Linear	1	442,16	442,16	287,39**		
Kuadratik	1	17,14	17,14	11,13**		
Kubik	1	2,04	2,04	0,69		
Acak	8	12,31	1,54			
Total	11	454,47				

Lampiran 7. (Lanjutan)

Perhitungan Regresi :

$\bar{y} = b\,\bar{x} + a$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{405928 - \frac{6000\,x\,779,28}{4}}{3600000 - \frac{36000000}{4}}$$

$= 0,79$

$a = \bar{y} - 0,79\,\bar{x}$
$= 64,94 - 0,79 \times 500$
$= -330,06$

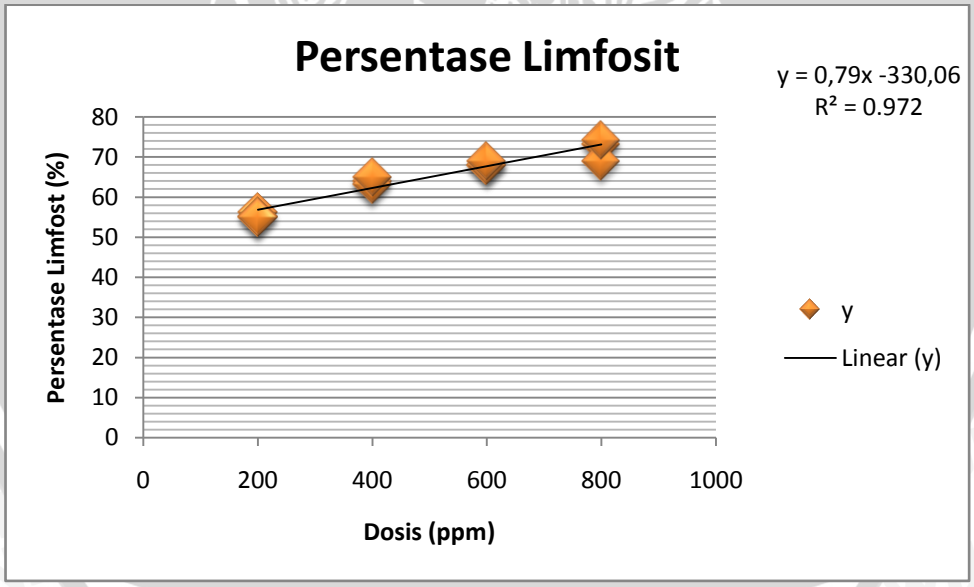
$$R^2 = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Total}}$$

$$= \frac{442,16}{454,47}$$

$= 0,972$

$\bar{y} = 0,79x - 330,06$

Grafik Persentase Limfosit Ikan Koi (*C. Carpio*)



Lampiran 8. Perhitungan Total Monosit

Perhitungan :

Total A = 29,53 + 29,82 + 30,81
= 90,16

A rata-rata = $\frac{90,16}{3}$
= 30,05

Total B = 24,97 + 23,5 + 23,75
= 72,22

B rata-rata = $\frac{72,22}{3}$
= 24,07

Total C = 22,83 + 22,7 + 21,78
= 67,31

C rata-rata = $\frac{67,31}{3}$
= 22,44

Total D = 20,59 + 22,26 + 19,06
= 61,91

D rata-rata = $\frac{61,91}{3}$
= 20,64

- **Tabel Total Monosit Ikan Koi (*C. carpio*)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata rata
	1	2	3		
A	29,53	29,82	30,81	90,16	30,05
B	24,97	23,5	23,75	72,22	24,07
C	22,83	22,7	21,78	67,31	22,44
D	20,59	22,26	19,06	61,91	20,64
				291,6	

Perhitungan Sidik Ragam**:**

1. Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
= $\frac{291,6^2}{12}$
= 7085,88

2. Jumlah Kuadrat (JK total) =$\sum x_{ij}^2$ – FK
= ($A1^2 + A2^2 + A3^2 + \ldots + D3^2$) - FK
= ($29,53^2 + 29,82^2 + 30,81^2 + ... + 19,06^2$)-7085,88
= 158,045

Lampiran 9. (Lanjutan)

3. JK Perlakuan $= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$= \frac{(TA^2+TB^2+TC^2+TD^2)}{r} - FK$

$= \frac{90{,}16^2+72{,}22^2+67{,}31^2+61{,}91^2}{3} - 7085{,}88 = 150{,}13$

4. JK galat/acak = JK Total - JK Perlakuan

=158,045– 150,13

= 7,92

5. db Perlakuan = n -1

= 4 – 1

= 3

6. KT Perlakuan $= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}}$

$= \frac{150{,}13}{3}$

= 50,04

7. db Galat = n -1

= 11 – 3

= 8

8. KT Galat $= \frac{\text{JK Galat}}{\text{db Galat}}$

$= \frac{7{,}92}{8}$

= 0,99

9. db Total = db Total - db Perlakuan

= 14 - 3

= 11

10. F hitung $= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT Galat}}$

$= \frac{50{,}04}{0{,}99}$

= 50,57

- **Analisa Sidik Ragam Persentase Monosit dengan Uji F tabel**

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	150,13	50,04	50,57**	4.07	7.59
Acak	8	7,92	0,99			
Total	11	158,05				

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

Lampiran 8. (Lanjutan)

Perhitungan Uji BNT:

SED $= \sqrt{\frac{2\ x\ KT\ acak}{ulangan\ \ (r)}} = \sqrt{\frac{2\ x\ 0{,}99}{3}} = 0{,}81$

BNT 5% = T tabel 5% (db Acak) x SED

= 2,31 x 0,81 = 1,87

BNT 1%= T tabel 1% (db Acak) x SED

= 3,36 x 0,81

= 2,72

➢ **Hasil Uji BNT Monosit Ikan Koi (*C. Carpio*)**

		D	C	B	A	Notasi
Rerata perlakuan		20,64	22,44	24,07	30,05	
D	20,64	0.00^{ns}				a
C	22,44	1,80^{ns}	0.00^{ns}			ab
B	24,07	3,44**	1,64^{ns}	0.00^{ns}		bc
A	30,05	9,42**	7,62**	5,98**	0.00^{ns}	d

Keterangan : ** ➔ Sangat Berbeda Nyata

➢ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A	90,16	-3	1	-1
B	72,22	-1	-1	3
C	67,31	1	-1	-3
D	61,91	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		-89,66	12,54	-13,52
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		133,98	13,10	3,046

Lampiran 8. (Lanjutan)

Perhitungan Sidik Ragam Regresi:

KT Linear $= \frac{\text{JK Linear}}{\text{db Linear}}$

$= \frac{133,98}{1}$

$= 133,98$

F Hitung Linear $= \frac{\text{KT Linear}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{133,98}{0,99}$

$= 135,39$

KT Kuadratik $= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}}$

$= \frac{13,10}{1}$

$= 13,10$

F Hitung Kuadratik $= \frac{\text{KT Kuadratik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{13,10}{0,99}$

$= 13,24$

KT Kubik $= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}}$

$= \frac{3,04}{1}$

$= 3,04$

F Hitung Kubik $= \frac{\text{KT Kubik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{3,04}{0,99}$

$= 3,07$

KT Acak $= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}}$

$= \frac{7,92}{8}$

$= 0,99$

- **Tabel Sidik Ragam Regresi Monoait Ikan Koi (*C. Carpio*)**

sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	150,13			4.07	7.59
Linear	1	133,98	133,98	135,39**		
Kuadratik	1	13,10	13,10	13,24**		
Kubik	1	3,04	3,04	3,07		
Acak	8	7,92	0,99			
Total	11	141,9				

Lmpiran 8. (Lanjutan)

Perhitungan Regresi :

$\bar{y} = b\,\bar{x} + a$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{136834 - \frac{6000\,x\,291,6}{4}}{3600000 - \frac{36000000}{4}}$$

$= 0,55$

$a = \bar{y} - 0,55\,\bar{x}$
$= 24,3 - 0,55 \times 500$
$= -250,7$

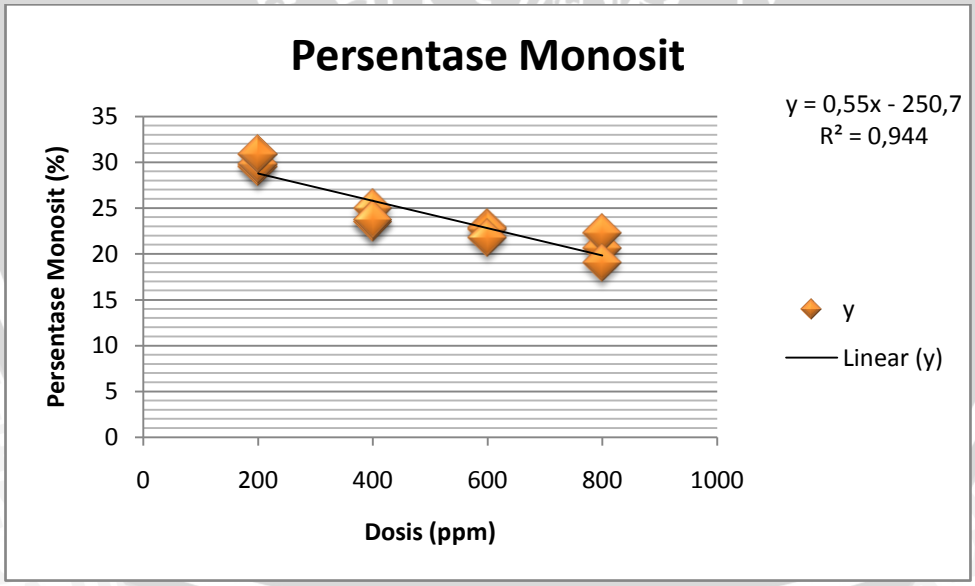
$$R^2 = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Total}}$$

$$= \frac{133,98}{141,9}$$

$= 0,944$

$\bar{y} = 0,55x - 250,7$

Grafik Persentase Monosit Ikan Koi (*C. Carpio*)



Lampiran 9. Perhitungan Total Neutrofil

Perhitungan :

Total A = 14,22 + 15,07 + 14,3
= 43,59

A rata-rata = $\frac{43,59}{3}$
= 14,53

Total B = 11,1 + 13,39 + 11,37
= 35,86

B rata-rata = $\frac{35,86}{3}$
= 11,95

Total C = 9,18 + 9,3 + 9,92
= 28,4

C rata-rata = $\frac{28,4}{3}$
= 9,47

Total D = 6,3 + 4,42 + 6,73
= 17,45

D rata-rata = $\frac{17,45}{3}$
= 5,82

- **Tabel Total Neutrofil Ikan Koi (*C. carpio*)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata rata
	1	2	3		
A	14,22	15,07	14,3	43,59	14,53
B	11,1	13,39	11,37	35,86	11,95
C	9,81	9,3	9,92	28,4	9,47
D	6,3	4,42	6,73	17,45	5,82
				125,3	

Perhitungan Sidik Ragam**:**

1. Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
= $\frac{125,3^2}{12}$
= 1308,34

2. Jumlah Kuadrat (JK total)=$\sum x_{ij}^2$ – FK
= ($A1^2 + A2^2 + A3^2 + \ldots + D3^2$) - FK
= ($14,22^2 + 15,07^2 + 14,3^2 + \ldots + 6,73^2$) – 1308,34
= 145,57

Lampiran 9. (Lanjutan)

3. JK Perlakuan $= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$= \frac{(TA^2+TB^2+TC^2+TD^2)}{r} - FK$

$= \frac{43,59^2+35,86^2+28,4^2+17,45^2}{3} - 1308,34 = 124,022$

4. JK galat/acak = JK Total - JK Perlakuan

=145,57 – 124,022

= 21,55

5. db Perlakuan = n -1

= 4 – 1

= 3

6. KT Perlakuan $= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}}$

$= \frac{124,022}{3}$

= 41,34

7. db Galat = n -1

= 11 – 3

= 8

8. KT Galat $= \frac{\text{JK Galat}}{\text{db Galat}}$

$= \frac{21,55}{8}$

= 2,69

9. db Total = db Total - db Perlakuan

= 14 - 3

= 11

10. F hitung $= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT Galat}}$

$= \frac{41,34}{2,69}$

= 15,34

➢ **Analisa Sidik Ragam Persentase Neutrofil dengan Uji F tabel**

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	124,022	41,34	15,34**	4.07	7.59
Acak	8	21,55	2,69			
Total	11	145,57				

Keterangan : ** Sangat Berbeda Nyata)

Lampiran 9. (Lanjutan)

Perhitungan Uji BNT:

SED $= \sqrt{\frac{2\ x\ KT\ acak}{ulangan\ \ (r)}} = \sqrt{\frac{2\ x\ 2{,}69}{3}} = 1{,}34$

BNT 5% = T tabel 5% (db Acak) x SED

= 2,31 x 1,34 = 3,09

BNT 1%= T tabel 1% (db Acak) x SED

= 3,36 x 9,01,3408

= 4,49

➢ **Hasil Uji BNT Neutrofil Ikan Koi (*C. Carpio*)**

		D	C	B	A	Notasi
Rerata perlakuan		5,82	9,47	11,95	14,53	
D	5,82	0.00^{ns}				a
C	9,47	3,65*	0.00^{ns}			b
B	11,95	6,14**	2,49^{ns}	0.00^{ns}		bc
A	14,53	8,71**	5,06**	2,58^{ns}	0.00^{ns}	cd

Keterangan : ns → Non Signifikan

* → Berbeda Nyata

** → Sangat Berbeda Nyata

➢ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A	43,59	-3	1	-1
B	35,86	-1	-1	3
C	28,4	1	-1	-3
D	17,45	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		-85,88	-3,22	-3,67
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		122,92	0,86	0,23

Lampiran 9. (Lanjutan)

Perhitungan Sidik Ragam Regresi:

KT Linear $= \frac{\text{JK Linear}}{\text{db Linear}}$

$= \frac{122,92}{1}$

$= 122,92$

F Hitung Linear $= \frac{\text{KT Linear}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{122,92}{2,69}$

$= 45,63$

KT Kuadratik $= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}}$

$= \frac{0,86}{1}$

$=0,86$

F Hitung Kuadratik $= \frac{\text{KT Kuadratik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{0,86}{2,69}$

$= 0,32$

KT Kubik $= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}}$

$= \frac{0,23}{1}$

$= 0,23$

F Hitung Kubik $= \frac{\text{KT Kubik}}{\text{KT Acak}}$

$= \frac{0,23}{2,69}$

$= 0,08$

KT Acak $= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}}$

$= \frac{21,55}{8}$

$= 2,69$

- **Tabel Sidik Ragam Regresi Neutrofil Ikan Koi (*C. Carpio*)**

sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	124,022			4.07	7.59
Linear	1	122,92	122,92	45,63**		
Kuadratik	1	0,86	0,86	0,32		
Kubik	1	0,23	0,23	0,08		
Acak	8	21,55	2,69			
Total	11	143,92				

Lampiran 9. (Lanjutan)

Perhitungan Regresi :

$\bar{y} = b\,\bar{x} + a$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{10169550 - \frac{6000\,x\,1866}{4}}{3600000 - \frac{36000000}{4}}$$

$= -0.024$

$a = \bar{y} - (-0{,}024)\,\bar{x}$
$= 10{,}41 + 0{,}024 \times 500$
$= 22{,}41$

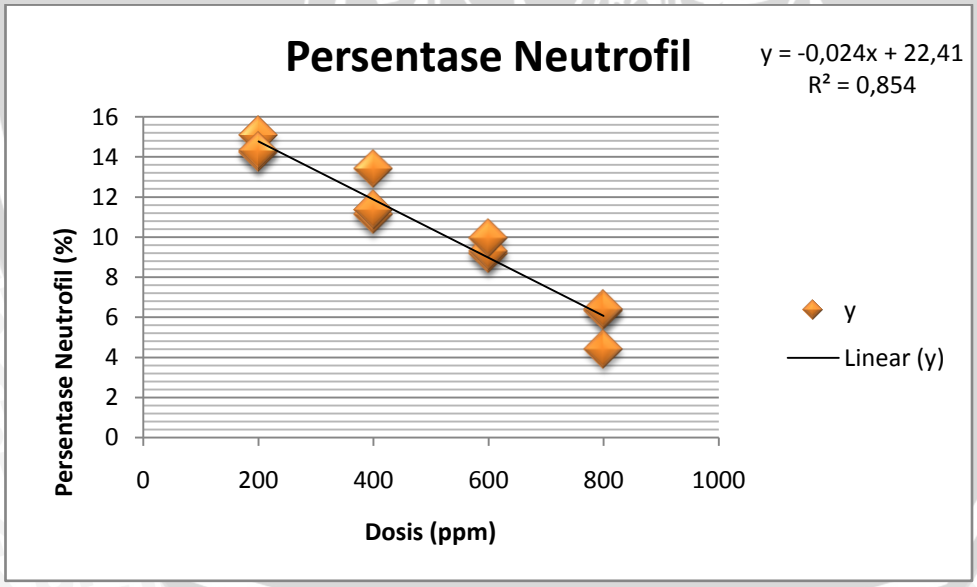
$$R^2 = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Total}}$$

$$= \frac{122{,}92}{143{,}92}$$

$= 0{,}854$

$\bar{y} = -0{,}024x + 22{,}41$

Grafik Persentase Neutrofil Ikan Koi (*C. Carpio*)



Lampiran 10. Tabel Pengamatan Kualitas Air

Perlakuan	Pagi			Sore		
	pH	Suhu (°C)	DO (mg/l)	pH	Suhu	DO
A	8,3	25,1	3,05	8,15	26,48	3,20
B	8,10	25	2,97	7,93	25,5	2,99
C	8,40	25,3	3,02	8,22	25,49	3,09
D	8,28	25	3,12	8,14	25,73	3,07
K-	8,25	25,3	3,5	8,1	26,1	3,15
K+	8,4	25,6	2,93	8,06	25,3	3,17