

**PENGARUH SUPLEMENTASI *Bacillus firmus* PADA PAKAN TERHADAP
IMUNITAS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

SKRIPSI

Oleh:

**NAFIDATUL MUAWIYAH
NIM. 155080507111045**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH SUPLEMENTASI *Bacillus firmus* PADA PAKAN TERHADAP
IMUNITAS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

SKRIPSI

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

Oleh :

**NAFIDATUL MUAWIYAH
NIM. 155080507111045**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH SUPLEMENTASI *Bacillus firmus* PADA PAKAN TERHADAP
IMUNITAS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Oleh :

NAFIDATUL MUAWIYAH
NIM. 155080507111045

Telah di pertahankan di depan penguji
Pada tanggal 19 Juni 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II


Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua
NIP.197506 04199903 2 002
Tanggal: 12 JUL 2019


Nasrullah Bai Arifin S.Pi., M.Sc
NIK. 201605 840829 1 001
Tanggal: 12 JUL 2019

Mengetahui,
Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan



Dr. Ir. M. Firdaus, MP.
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: 12 JUL 2019



LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **PENGARUH SUPLEMENTASI *Bacillus firmus*
PADA PAKAN TERHADAP IMUNITAS IKAN
NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Nama Mahasiswa : Nafidatul Muawiyah

NIM : 155080507111045

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING :

Dosen Pembimbing 1 : Dr. Ating Yuniarti, S. Pi, M. Aqua

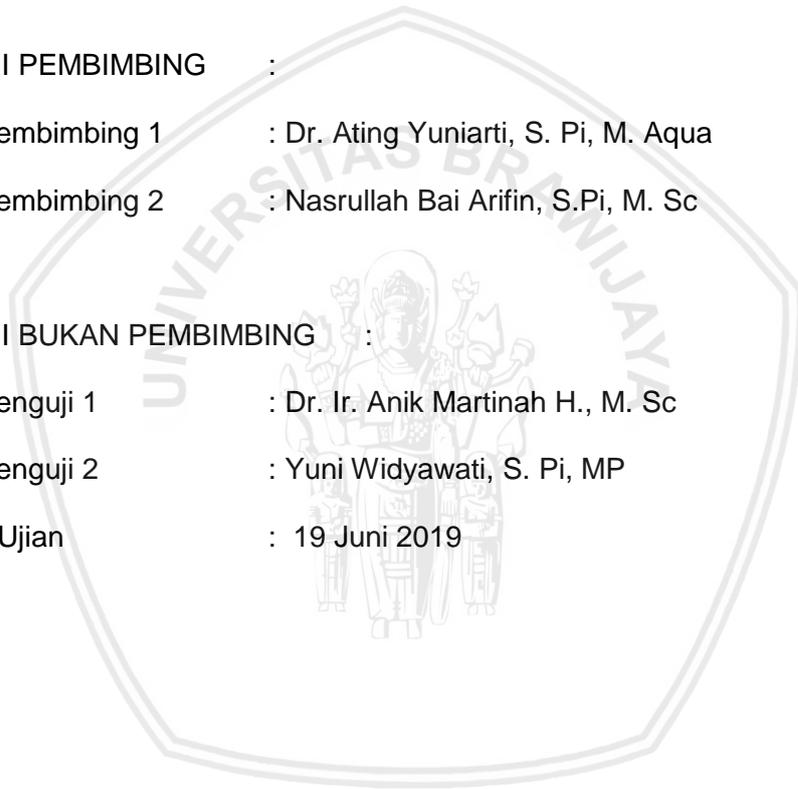
Dosen Pembimbing 2 : Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M. Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING :

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Anik Martinah H., M. Sc

Dosen Penguji 2 : Yuni Widyawati, S. Pi, MP

Tanggal Ujian : 19 Juni 2019



UCAPAN TRIMAKASIH

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga laporan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Melalui kesempatan ini, penulis mengucapkan trimakasih kepada;

1. Kepada orang tua kami (Amir Rohim dan Zuhrotun Nisak) beserta keluarga kami (Afdhlolul A`mal, Imron Rosyidi, Lilla Dianita, Linda Rini Rohmawati, Arya Nanda Teguh Pambudi dan Adhyastha Raffasya A`mal) yang telah mendoakan dan memberikan dukungan baik moral, motivasi, doa dan materi.
2. Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua dan Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam menyelesaikan Laporan Skripsi.
3. Kemristekdikti yang telah membantu serta mendanai jalanya penelitian skripsi ini.
4. Tim Skripsi "PROTEBAL Strong" Marlinda Nirvana, Kurnia Wisnu Nugroho, Ayu Desya Wardhani, Iftitah Laili Mahfuzhoh dan Tim Parasit Endar Riyani, Prive Widya, I Made Dedi Mahariawan atas semua kerja sama di Labolatorium Budidaya Ikan Devisi Penyakit dan Kesehatan Ikan.
5. Doggy dan teman-teman Program Studi Budidaya Perairan angkatan 2015, khususnya Ditta Awwinsya Fadap, Dina Ayu Nopita Sari, Naila Taslimah B. dan Nyi Ageng Dwi Linggasari, tim KWU HMP BP tahun 2016 dan 2018, Menying, Paknyak serta pihak-pihak terkait yang telah membantu memberikan motivasi untuk menyelesaikan Laporan Skripsi sampai selesai.
6. Akhirnya penulis memanjatkan do`a agar semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Laporan Skripsi ini, mendapatkan pahala dan balasan yang berlipat ganda. Amin.

RINGKASAN

Nafidatul Muawiyah. Pengaruh Suplementasi *Bacillus firmus* pada Pakan Terhadap Imunitas Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) (dibawah bimbingan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua dan Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc**)

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu ikan budidaya air tawar yang mempunyai nilai ekonomis. Salah satu kendala yang dihadapi dalam produksi ikan nila yaitu adanya serangan penyakit *Motil A. Septicemia* (MAS) sehingga menyebabkan kematian 10-85%. Penyakit yang menyerang dapat diatasi dengan pemberian antibiotik. Pemberian antibiotik yang tidak sesuai dapat menyebabkan resistensi terhadap antibiotik, sehingga dibutuhkan cara alternatif dengan pemberian bakteri probiotik. Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang memberikan keuntungan bagi kesehatan ikan. Penggunaan bakteri *B. firmus* sebagai probiotik dapat berupa sel vegetatif dan spora. Namun sel vegetatif tidak stabil dalam proses penyimpanan, sehingga diperlukan bakteri berupa spora karena tahan terhadap lingkungan yang ekstrim dan lebih stabil dalam proses penyimpanan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh suplementasi *B. firmus* pada pakan terhadap imunitas ikan nila (*O. niloticus*).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2018 sampai Maret 2019. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan A (suplementasi sel vegetatif *B. firmus*), perlakuan B (suplementasi spora *B. firmus*) dan perlakuan C adalah kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*). Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama suplementasi *B. firmus* selama 49 hari dan tahap kedua dilakukan infeksi dengan bakteri *A. hydrophilla* selama 7 hari setelah suplementasi *B. firmus* selama 49 hari. Parameter yang diamati adalah respon imun non spesifik dan kelulushidupan ikan nila.

Hasil yang diperoleh dalam penelitian setelah penambahan suplementasi *B. firmus* pada pakan mampu meningkatkan respon imun non spesifik ikan nila (*O. niloticus*). Hasil tertinggi ($p < 0,05$) diperoleh pada perlakuan suplementasi spora *B. firmus* dengan total leukosit, limfosit, hematokrit dan *respiratory burst* dari pada suplementasi sel vegetatif dan tanpa suplementasi (kontrol). Hasil tertinggi ($p < 0,05$) juga diperoleh pada perlakuan suplementasi spora dengan total neutrofil dan aktifitas fagositosis dari pada perlakuan kontrol, namun pada perlakuan suplementasi sel vegetatif dan spora hasil total neutrofil dan aktifitas fagositosis tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hasil total monosit tertinggi ($p < 0,05$) diperoleh pada perlakuan kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*) dari pada perlakuan suplementasi berupa sel vegetatif dan spora. Hasil kelulushidupan ikan nila tertinggi ($p < 0,05$) diperoleh pada perlakuan suplementasi berupa sel vegetatif dan spora dari pada perlakuan kontrol. Pada penelitian ini penambahan suplementasi *B. firmus* pada pakan memberikan pengaruh terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*) dan perlakuan terbaik diperoleh pada suplementasi spora *B. firmus*.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas berkah karunia serta ridhlo-Nya penulis dapat menyajikan dan menyelesaikan Laporan Skripsi yang berjudul “**Pengaruh Suplementasi *Bacillus firmus* pada Pakan Terhadap Imunitas Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**” sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Di bawah bimbingan:

1. Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua
2. Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc

Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan dan kesempurnaan laporan, sehingga tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 24 Juni 2019

Penulis

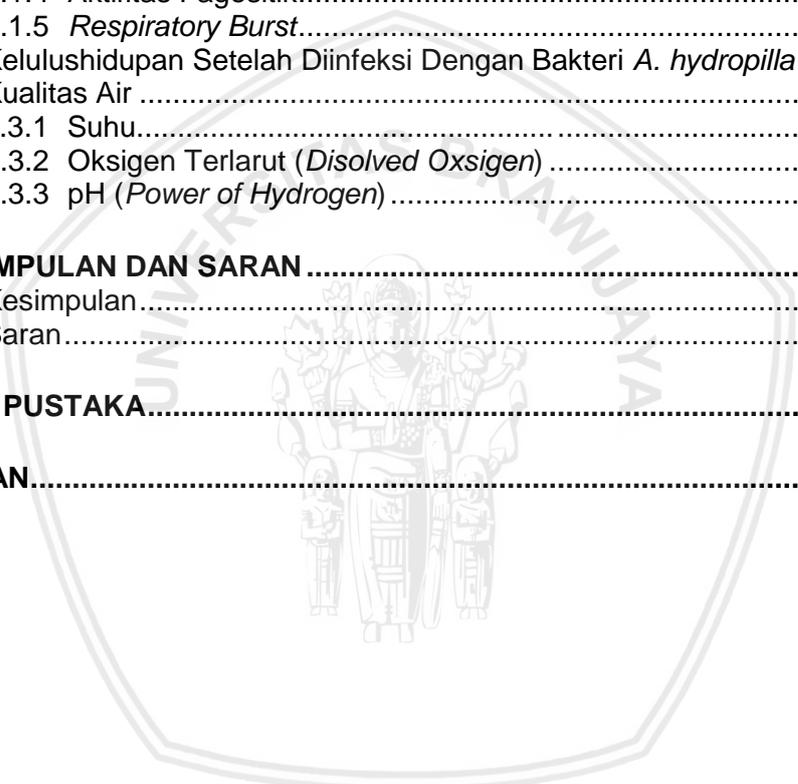
DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Kegunaan Penelitian.....	3
1.6 Waktu dan Tempat	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	4
2.1.1 Morfologi.....	4
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	4
2.1.3 Kebiasaan Makan dan Sifat.....	5
2.2 Biologi Bakteri <i>Bacillus firmus</i>	5
2.2.1 Morfologi.....	5
2.2.2 Spora dan Sporulasi.....	5
2.2.3 Manfaat <i>B. firmus</i> Sebagai Aplikasi Probiotik.....	7
2.3 Biologi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	9
2.3.1 Morfologi.....	9
2.3.2 Patogenitas Bakteri	9
2.3.3 Mekanisme Penyerangan, Pertumbuhan, Perkembangbiakan....	10
2.4 Sistem Imun.....	11
2.4.1 Total Leukosit	11
2.4.2 Difrensiasi Leukosit	12
2.4.3 Hematokrit.....	14
2.4.4 Aktivasi Fagositosis	15
2.4.5 <i>Respiratory Burst</i>	16
3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Materi Penelitian	17
3.1.1 Alat-Alat Penelitian	17
3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian	17
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	18
3.3 Prosedur Penelitian	19
3.3.1 Bakteri <i>B. firmus</i>	19



3.3.2	Pemeliharaan Hewan Uji	22
3.3.3	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	23
3.3.4	<i>Lethal Dosis 50% (LD₅₀)</i>	23
3.4	Pelaksanaan Penelitian	24
3.4.1	Uji Respon Imun Non Spesifik	24
3.4.2	Penginfeksi dengan Bakteri <i>A. hydrophila</i>	27
3.6	Analisa Data	28
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Respon Imun Non Spesifik	29
4.1.1	Total Leukosit	29
4.1.2	Diferensiasi Leukosit	31
4.1.3	Hematokrit	36
4.1.4	Aktifitas Fagositik.....	38
4.1.5	<i>Respiratory Burst</i>	39
4.2	Kelulushidupan Setelah Diinfeksi Dengan Bakteri <i>A. hydrophila</i>	41
4.3	Kualitas Air	43
4.3.1	Suhu.....	44
4.3.2	Oksigen Terlarut (<i>Disolved Oxsigen</i>)	44
4.3.3	pH (<i>Power of Hydrogen</i>)	45
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1	Kesimpulan.....	46
5.2	Saran.....	46
	DAFTAR PUSTAKA.....	47
	LAMPIRAN.....	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>B. firmus</i>	5
2. Letak Spora di dalam Sel Vegetatif.	6
3. Skema siklus sporulasi bakteri <i>Bacillus sp.</i>	7
4. <i>A. hydrophilla</i>	9
5. Limfosit (L); Monosit (M); Neutrofil (N) dan Eritrosit (E).....	14
6. Proses fagositosis.....	15
7. Denah Rancangan Percobaan Tahap 1.....	19
8. Denah Rancangan Percobaan Tahap 2.....	19
9. Total leukosit.....	29
10. Total limfosit.....	31
11. Total monosit.....	33
12. Total neutrofil.....	35
13. Total Hematokrit.....	37
14. Aktifitas fagositosis.....	38
15. <i>Respiratory Burst</i>	40
16. <i>Survival Rate</i>	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penggunaan Bakteri <i>Bacillus</i> sp. sebagai Probiotik	8
2. Hasil Pengamatan Kualitas Air Selama Pemeliharaan Hewan Uji	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Bahan.....	53
2. Data Perhitungan Kepadatan Bakteri.....	54
3. Data kualitas Air.....	60
4. Data Perhitungan Uji Respon Imun Non Spesifik.....	62
5. Data Hasil Anova Aplikasi SPSS	68



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu ikan budidaya ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomis, mudah berkembang biak dan toleran terhadap kondisi lingkungan yang kurang baik. Sehingga untuk memenuhi permintaan pasar di Indonesia perlu dilakukan peningkatan dan pengembangan usaha budidaya yang efektif dan efisien (Aniputri *et al.*, 2014). Hasil data produksi Direktorat Jendral Kementerian Perikanan Budidaya (DJPB) KKP menunjukkan produksi ikan nila di Indonesia sejak tahun 2013 meningkat dari 914,78 ribu ton menjadi 1,084 juta ton pada tahun 2015 (Koesharyani *et al.*, 2018).

Salah satu kendala yang dihadapi dalam produksi ikan nila (*O. niloticus*) adalah penyakit *Motil A. Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophilla* (Rahmahningsih, 2012). Bakteri ini mampu menyebabkan kematian sebanyak 10 hingga 85% (Soto *et al.*, 2013). Menurut Mauel (2007), bahwa bakteri *A. hydrophilla* dapat menyerang ikan nila pada fase *rearing* (1-10g), *juveniles* (500-750 g) dan *fattening* (>1000g).

Pada umumnya penyakit bakteri yang menyerang ikan dapat diatasi dengan pemberian antibiotik. Antibiotik merupakan salah satu penanggulangan secara kimia terhadap penyakit bakterial yang dapat menyebabkan penyebaran patogen akibat resistensi terhadap antibiotik karena tidak sesuai dengan dosis yang diberikan (Barbosa *et al.*, 2014). Kondisi tersebut membutuhkan cara alternatif yaitu dengan pemberian Bakteri probiotik. Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang memberikan keuntungan bagi kesehatan ikan yang diaplikasikan melalui pencampuran pakan atau kedalam media pemeliharaan (Qinghui *et al.*, 2011). Pemberian Bakteri *B. firmus* sebagai probiotik dapat

berupa sel vegetatif dan spora. Bakteri *B. firmus* berupa sel vegetatif tidak stabil dalam proses penyimpanan. Sehingga diperlukan suplementasi spora *B. firmus* karena lebih stabil dalam proses penyimpanan dan dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim (Wolken *et al.*, 2003).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan probiotik *Bacillus* sp. dengan dosis 10^9 cfu/ml dapat meningkatkan total limfosit (81%) dan aktivitas fagosit (60%). Sehingga tubuh ikan lele dumbo (*Clarias gariepenus*) menjadi kebal terhadap serangan bakteri patogen (Syakbani *et al.*, 2015; Lusiasuti *et al.* 2013). Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh suplementasi *B. firmus* pada pakan terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila yang diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah suplementasi *B. firmus* berpengaruh terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila?
2. Apakah suplementasi *B. firmus* yang berbeda pada pakan menghasilkan pengaruh yang berbeda juga terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, dapat diperoleh tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh suplementasi *B. firmus* pada pakan terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila.
2. Mendapatkan suplementasi *B. firmus* yang terbaik pada pakan terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila.

1.4 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka didapatkan hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

H_0 : Pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan kedalam media pemeliharaan tidak berpengaruh terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila.

H_1 : Pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan kedalam media pemeliharaan dapat berpengaruh terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai manfaat pengaruh suplementasi *B. firmus* pada pakan terhadap imunitas dan kelulushidupan ikan nila yang telah diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai Maret 2019, di Laboratorium Budidaya Ikan Devisi Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

2.1.1 Morfologi

Bentuk tubuh ikan nila panjang dan ramping dengan sisik berukuran besar, *linea lateralis* terputus pada bagian tengah badan kemudian berlanjut tetapi letaknya lebih ke bawah dari pada letak garis yang memanjang di atas sirip dada, jumlah sisik pada gurat sisi jumlahnya 34 buah dan sirip punggung, sirip perut dan sirip dubur mempunyai jari-jari lemah tetapi keras dan tajam seperti duri. Pada sirip punggung dan dadanya berwarna hitam dan bagian pinggir sirip punggung juga demikian (Amri dan Khairuman, 2013).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Suyanto (2010), ikan nila merupakan ikan yang sangat tahan terhadap perubahan lingkungan hidup. Ikan nila dapat hidup di lingkungan air tawar, payau dan laut. Nilai kualitas air ikan nila terdiri dari pH berkisar 7-9 untuk pertumbuhan optimumnya, kadar oksigen terlarut 4-7 ppm dan nilai suhu berkisar 24-33°C.

Ikan nila (*O. niloticus*) berasal dari Afrika bagian tengah dan barat seperti Negara Chad dan Nigeria. Setelah itu, ikan nila bermigrasi ke daerah selatan melewati danau Raft dan Tanganyika seperti di benua Amerika, Eropa dan Asia. Dikawasan Asia, daerah penyebaran ikan nila pada mulanya terpusat di beberapa negara seperti Filipina dan Cina. Selanjutnya ikan nila meluas dibudidayakan diberbagai negara antara lain Taiwan, Thailand, Vietnam, Bangladesh dan Indonesia. Perkembangan ikan nila di Indonesia dimulai pada tahun 1969. (Rukmana, 1997).

2.1.3 Kebiasaan Makan dan Sifat

Menurut Amri dan Khairuman (2003), bahwa ikan nila (*O. niloticus*) tergolong ikan pemakan segala atau omnivora. Sehingga ikan nila sangat mudah untuk dibudidayakan. Ketika dalam kondisi benih makanan yang disukai ikan nila adalah zooplankton seperti *Rotifera* sp., *Moina* sp. atau *Daphnia* sp. Jika telah mencapai dewasa, ikan nila bisa diberi makan tambahan berupa pelet. Sedangkan menurut Suyanto (2010), ikan nila mampu tumbuh cepat dengan pakan pelet yang mengandung protein 20-25%.

2.2 Biologi Bakteri *Bacillus firmus*

2.2.1 Morfologi

Menurut Haditomo *et al.* (2016), bahwa *B. firmus* memiliki bentuk batang, elevasi koloni cembung dengan tepian halus. Karakteristik biokimia yang didapatkan, bahwa *B. firmus* bersifat motil, katalase positif, oksidasi negatif, sifat gram positif dan mempunyai sifat fakultatif aerob dan tidak bersifat patogen terhadap vertebrata maupun invertebrata.



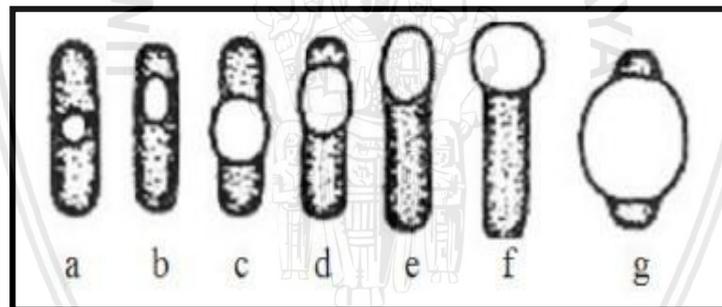
Gambar 1 *B. firmus* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi).

2.2.2 Spora dan Sporulasi

Bakteri gram positif seperti *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporobalobacter*, *Anaerobacter*, dan *Helicobacterium* merupakan contoh yang mampu membentuk spora. Spora merupakan struktur tambahan dari bakteri, karena tidak semua bakteri dapat membentuk spora. Spora terbentuk sebagai respon terhadap

lingkungan yang tidak menguntungkan. Setiap sel bakteri membentuk satu spora, yang dilepaskan setelah sel mengalami autolisis (Muwarni, 2015). Spora akan berwarna hijau dengan pewarnaan menggunakan *malachite green* dan sel vegetatif berwarna merah. Spora berbentuk elips dengan posisi berada di tengah sel atau di dekat ujung sel (Arwiyanto *et al.*, 2007).

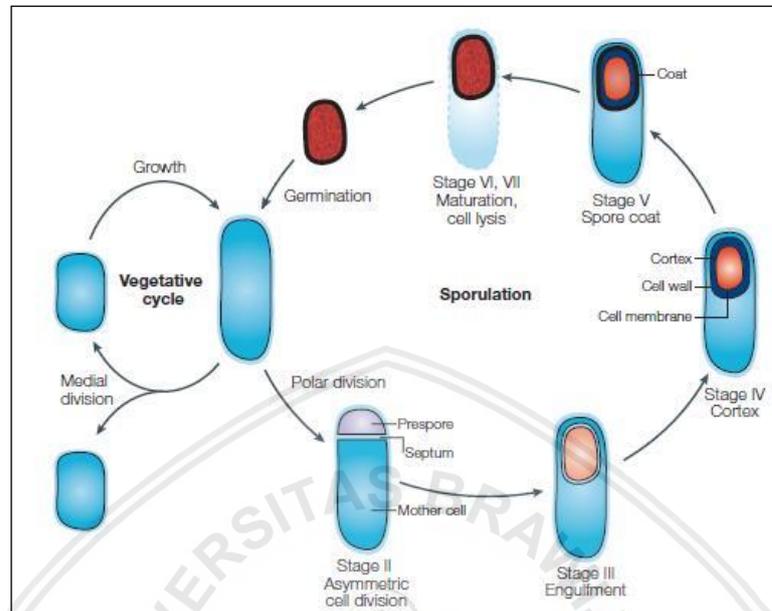
Spora mempunyai inti di sitoplasma yang mengandung DNA dan ribosom, dikelilingi oleh lapisan korteks dan dilindungi oleh pembungkus yang bersifat *impermeable* dan kaku. Spora mengandung sedikit air, banyak kalsium dan asam dipikolinik (*dipicolinic acid*) disebut kalsium dipikolinat. Asam dipikolinik merupakan bahan kimiawi 5-15% dari berat kering spora, dan bertanggung jawab dalam resistensi spora terhadap panas. Pada sebagian besar spesies, spora mempunyai dinding halus, berbentuk bulat atau oval.



Gambar 2. Letak Spora di dalam Sel Vegetatif Bakterial a, c, g: Spora Terletak di Sentral; b,d: Spora Terletak di Subterminal; e,f: Spora Terletak di Terminal (Guo *et al.*, 2014).

Gambaran umum bakteri *Bacilli* pembentuk spora adalah kemampuannya membedakan bentuk sel yang khas, yaitu endospora (spora). Pembentukan spora dimulai ketika pertumbuhan vegetatif tidak dapat lagi terjadi karena kekurangan makanan atau kondisi non-fisiologis lainnya di lingkungan. Spora adalah bentuk sel diam yang ditandai dengan beberapa lapisan pelindung di sekitar sitoplasma yang terdehidrasi dan mengandung nukleoid (Henriques dan Moran, 2007). Menurut Brown (2000), bahwa bakteri dalam bentuk spora lebih

resisten terhadap panas, bahan-bahan kimia, iradiasi dan desikasi dibandingkan bakteri dalam berupa sel vegetatif.



Gambar 3. Skema siklus sporulasi bakteri *Bacillus sp.* (Errington, 2003).

Menurut Errington (2003), bahwa bakteri endospora merupakan bakteri yang penting dalam industri dan obat-obatan, genus *Bacillus* merupakan bakteri yang memiliki produksi dengan proporsi yang besar di pasar dunia dan kebutuhan sebagai agen biokontrol dalam bidang agrikultur. Menurut Moir (2006), bahwa spora tersebut, jika terhidrasi dan diberikan nutrisi yang tepat akan melalui proses germinasi, sebuah proses yang terjadi beberapa menit, dimana air dapat masuk ke dalam spora, merusak dan memindahkan tutup spora dan bertumbuh digantikan dengan sel vegetatif. Sedangkan bakteri yang dapat membentuk spora. Menurut Cutting (2011), bahwa spora yang terbentuk dari bakteri hanya terdapat pada dua genera, *Bacillus* dan bakteri anaerobik *Clostridia*.

2.2.3 Manfaat *B. firmus* Sebagai Aplikasi Probiotik

Menurut Lusiastuti *et al.* (2013), bahwa *B. firmus* merupakan bakteri probiotik yang mampu bekerja dengan cara berkompetisi dengan bakteri patogen,

baik dalam memperoleh energi maupun tempat perlekatan di dalam saluran pencernaan sehingga dapat mencegah terjadinya kolonisasi bakteri patogen *A. hydrophila*. Kemampuan untuk melekat atau menempel pada mucus dan permukaan dinding saluran cerna merupakan kriteria utama supaya bakteri probiotik dapat tetap hidup dalam saluran cerna. Selain itu, *B. firmus* dapat merangsang untuk memproduksi interleukin sehingga memacu antibodi dan dapat berperan sebagai imonostimulator (Haditomo *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja probiotik meliputi sebagai berikut; dapat berkompetisi untuk senyawa atau sumber energi yang tersedia, dapat memperbaiki kualitas air dan dapat berkontribusi berupa enzim sebagai pencernaan (Verschuere *et al.*, 2000). Jumlah kepadatan untuk mendapatkan probiotik yang efisien dengan pengaruh positif bagi inangnya berkisar 10^7 cfu/ml - 10^9 cfu/ml (Sukmawati, 2017).

Suplementasi probiotik pada pakan udang *P. monodon* dengan menggunakan bakteri *B. firmus* mampu memberikan pengaruh positif, yaitu melindungi udang melawan infeksi bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*, serta dapat diaplikasikan sebagai probiotik yang baik dalam budidaya (Raghu *et al.*, 2016). Hal ini sesuai pendapat Ran *et al.* (2012), bahwa pemberian bakteri *Bacillus* sp. mampu melindungi ikan lele melawan infeksi bakteri *A. hydrophila*. Beberapa penelitian yang memaparkan tentang penggunaan bakteri *Bacillus* sebagai probiotik dapat dilihat pada Tabel 1 antara lain:

Tabel 1. Penggunaan Bakteri *Bacillus* sp. sebagai Probiotik

No	Jenis Bakteri	Spesies	Metode Aplikasi	Refrensi
1.	<i>B. firmus</i>	Ikan lele dumbo (<i>Clarias gariepenus</i>)	Media pemeliharaan	Lusiastuti <i>et al.</i> , (2013)
2.	<i>Bacillus</i> sp.	Ikan lele (<i>C. gariepenus</i>)	Patogenitas <i>A. hydrophila</i>	Ran <i>et al.</i> , (2012)
3.	<i>B. coagulans</i> dan <i>B. firmus</i>	(<i>Penaeus monodon</i>)	Suplementasi pakan	Raghu <i>et al.</i> , (2016)
4.	<i>B. firmus</i>	Ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	Media pemeliharaan	Haditomo (2016)
5.	<i>Bacillus</i> sp.	Udang (<i>Litopenaeus</i>	Identifikasis	Sukmawati

No	Jenis Bakteri	Spesies	Metode Aplikasi	Referensi
	dan <i>Vagococcus</i> sp.	<i>vanamei</i>)	bakteri	(2017)

2.3 Biologi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.3.1 Morfologi

Menurut Lukistyowati dan Kurniasih (2012), bahwa *A. hydrophila* termasuk gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak bespora, mempunyai satu flagel dan hidup pada kisaran suhu 25-30°C. Bakteri *A. hydrophila* dikenal sebagai *Motile A. Septicaemia* (MAS) (Mustahal dan Waqiah 2012).



Gambar 4. *A. hydrophila* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi).

2.3.2 Patogenitas Bakteri

Menurut Triyaningsih *et al.* (2014), bahwa patogenitas merupakan kemampuan suatu organisme untuk menimbulkan penyakit. Penyebab timbulnya penyakit adalah adanya bakteri patogen yang memiliki kemampuan untuk merusak jaringan (*invasiveness*) dan menghasilkan toksin (*toxigenesis*). Patogenitas bakteri terhadap inang berbeda-beda, dipengaruhi oleh faktor pertahanan inang dalam melawan patogen, maupun faktor patogenesitas bakteri yang berkaitan dengan kemampuan memproduksi enzim dan mengatasi pertahanan inang serta kecepatan berkembangbiak.

Bakteri ini merupakan bakteri septisemia yang merupakan bakteri yang mampu memperbanyak diri dengan menyebar melalui pembuluh darah.

Kemampuan adaptasi yang tinggi pada berbagai jenis inang dan lingkungan baik alami maupun buatan menyebabkan bakteri patogen seperti *A. hydrophila* disebut patogen dengan patogenisitas tinggi (Yulianto *et al.*, 2013). Bakteri *A. hydrophilla* mampu menurunkan tingkat pertumbuhan dan mematikan ikan sampai dengan 80%-100% dalam waktu 1-2 minggu (Arindita *et al.*, 2014).

Menurut Hardi *et al.* (2014), bahwa infeksi bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan perubahan pada organ luar ikan yaitu pendarahan dan luka pada permukaan tubuh seperti sirip gripis, sisik lepas, luka/borok dan warna tubuh menghitam. Selain itu, gejala abnormalitas yang ditimbulkan ikan yaitu nafsu makan menurun, ikan berenang gasping (ikan berenang tegak dengan posisi mulut tepat dibawah permukaan air).

2.3.3 Mekanisme Penyerangan, Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Mekanisme penyerangan infeksi bakteri *A. hydrophila* dapat terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau masuk melalui insang, kemudian masuk ke pembuluh darah dan selanjutnya akan menyebar pada organ dalam lainnya. Infeksi bakteri gram negatif tersebut bersifat laten (berkepanjangan). Organ yang dapat diserang seperti ginjal, insang, pankreas dan limfa bahkan otot tulang (Kabata, 1985).

Menurut Harikrishnan *et al.* (2005), bahwa *A. hydrophila* merupakan patogen yang bersifat fakultatif anaerob dan umumnya akan mudah tumbuh di setiap perairan. Berbahaya atau tidaknya bergantung pada kondisi budidaya, jika kondisi budidaya baik maka akan baik tetapi bila kondisi budidaya buruk seperti adanya perubahan lingkungan yang menyebabkan tingkat stres ikan meningkat, akan dapat menyebabkan kematian massal, baik pada ukuran benih maupun induk dalam waktu yang relatif singkat sehingga mengakibatkan kerugian yang cukup besar. *A. hydrophilla* termasuk kelompok bakteri gram negatif yang dapat

tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38⁰C-41⁰C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0⁰C-5⁰C dengan kisaran pH 5,5-9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.4 Sistem Imun

Menurut Dotta *et al.* (2010), bahwa imunostimulan merupakan pemberian bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen dengan meningkatkan mekanisme respon imun non spesifik. Imunostimulan biasanya diidentifikasi oleh kemampuan untuk mengaktifkan leukosit. Penggunaan imunostimulan sebagai suplemen pakan dapat meningkatkan pertahanan bawaan terhadap patogen selama masa stres yang tinggi seperti perubahan kondisi lingkungan, grading reproduksi dan proses transportasi.

Rombout *et al.* (2005), bahwa sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh dalam melawan invansi patogen maupun benda asing yang mekanismenya melibatkan beberapa komponen. Sistem imun ikan terdiri atas sistem imun non spesifik (alami atau bawaan) dan spesifik (adaptif). Sistem imun non spesifik merupakan sistem kekebalan yang berfungsi terlebih dahulu pada awal kehidupan. Sistem imun non spesifik merupakan sistem imun yang pertama kerja saat terjadi invansi patogen yang bersifat *barrier* mekanik dan kimiawi (kulit, sisik, insang dan lendir) serta pertahanan seluler (leukosit, diferensiasi leukosit, hematokrit, aktifitas fagositosis dan *respiratory burst*).

Menurut Playfair dan Chain (2009), bahwa non spesifik disebut karena bersifat tidak ditujukan pada jenis mikroba tertentu dan telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Adapun respon imun non spesifik antara lain adalah sebagai berikut:

2.4.1 Total Leukosit

Menurut putri *et al.* (2013), bahwa leukosit merupakan suatu unit sistem pertahanan tubuh paling aktif dan beredar dalam sirkulasi darah. Jumlah leukosit

lebih sedikit dibandingkan dengan sel darah merah. Fungsi utama leukosit adalah untuk merusak bahan-bahan infeksius dan toksik melalui proses fagositosis dengan membentuk antibodi.

Jumlah leukosit ikan normal secara umum berkisar antara 20.000-150.000 sel/mm³ (Royan *et al.*, 2014). Ketika ikan sedang terkena infeksi maka jumlah leukosit akan mengalami peningkatan karena merupakan unit aktif dalam sistem pertahanan tubuh dan leukosit berperan dalam melawan penyakit infeksi. Kemudian jumlah leukosit akan mengalami penurunan bila kondisi tubuh dalam keadaan stres. Jumlah leukosit normal harus dikendalikan selama pemeliharaan ikan agar ikan tidak terserang penyakit dengan memperhatikan faktor-faktor tersebut (Yanto *et al.*, 2015).

2.4.2 Difrensiasi Leukosit

Difrensiasi leukosit bertujuan mengetahui perbedaan persentase komponen sel leukosit. Adapun difrensiasi leukosit meliputi berbagai jenis sel darah di antaranya sebagai berikut;

a. Limfosit

Menurut Fajriyani (2017), bahwa limfosit merupakan sel darah putih yang memiliki peranan penting dalam pembentukan antibodi. Sedangkan menurut Svobodova dan Vyukusova (1991), kisaran limfosit adalah 76-97,5% dari total leukosit. Limfosit merupakan sel-sel respon sebagai pertahanan tubuh.

Limfosit berfungsi sebagai sel penghasil antibodi, berbentuk bulat dengan jumlah kecil sitoplasma tidak bergranula dan inti sel hampir memenuhi seluruh sel. Fungsi utama limfosit adalah membentuk sel memori terhadap antigen. Jumlah monosit akan meningkat ketika terjadi radang. Sel monosit dalam aliran darah akan berkembang menjadi makrofag. Ketika mengalami aktivasi, makrofag memiliki kapasitas fagosit lebih kuat dari pada neutrofil meskipun granulosit mempunyai jumlah lebih besar. Neutrofil merupakan sel fagosit sistem

polimorfonuklear yaitu sel yang bekerja cepat dalam melakukan fagosit tetapi tidak mampu bertahan lama. Sel ini berupa sel bulat dengan sitoplasma bergranula halus. Fungsi utama neutrofil adalah menghancurkan bahan asing melalui proses fagositik yaitu kemotaksis dengan jalan sel bermigrasi menuju partikel atau pelekatan partikel pada sel, aktivitas membran dan penghancuran partikel oleh enzim lisosom didalam fagolisosom. Neutrofil dalam darah akan meningkat jika terjadi infeksi dan berperan sebagai pertahanan pertama dalam tubuh (Suhermanto *et al.*, 2011).

b. Monosit

Menurut Pratiwi *et al.* (2016), bahwa monosit merupakan salah satu leukosit yang berinti besar dengan ukuran 2x lebih besar dari eritrosit. Sedangkan menurut Fajariyani *et al.* (2017), bahwa monosit merupakan sel darah putih yang berperan dalam fagositosis antigen yang masuk dalam tubuh. Nilai monosit ikan dalam kondisi normal berkisar antara 7.75%-29.20%.

Menurut Utami *et al.* (2013), bahwa monosit berperan penting untuk memakan zat-zat asing yang masuk kedalam tubuh dan memberikan informasi tentang serangan penyakit kepada leukosit. Selain itu, monosit juga berfungsi sebagai agen makrofag yang memfagosit benda asing yang masuk kedalam tubuh. Pada saat sel darah terjadi infeksi oleh benda asing, maka monosit akan bergerak cepat meninggalkan pembuluh darah menuju daerah yang terinfeksi untuk melakukan fagositosis. Monosit memiliki kemampuan menembus dinding pembuluh kapiler, kemudian masuk ke jaringan dan berdiferensiasi menjadi makrofag.

c. Neutrofil

Menurut Pratiwi *et al.* (2016), bahwa neutrofil merupakan sel-sel pertama yang meninggalkan pembuluh darah yang penting karena mengandung vakuola yang berisi enzim lisosom di dalam fagolisosom untuk membantu menyerang

organisme yang merugikan. Sedangkan menurut Nursanti *et al.* (2006), bahwa fungsi utama sel neutrofil adalah menghancurkan bahan asing melalui proses fagositosis. Neutrofil akan mengalami peningkatan jumlah sebagai bentuk respon imun terhadap hadirnya suatu antigen atau protein asing.

Menurut Utami *et al.* (2013), bahwa neutrofil merupakan jenis sel darah putih yang juga berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh. Persentase normal neutrofil ikan nila berkisar antara 10%-18.%. Fungsi utama neutrofil adalah membantu menghancurkan bahan asing melalui proses fagositosis yang dibantu oleh enzim lisosim di dalam fagolisosom. Peningkatan jumlah sel neutrofil menunjukkan adanya peningkatan proses penggumpalan makrofag di tempat terjadinya infeksi, sehingga partikel akan lebih mudah untuk menghancurkan partikel asing.



Gambar 5. Limfosit (L); Monosit (M); Neutrofil (N) dan Eritrosit (E) Perbesaran 1000x (Hasil Dokumentasi, 2019).

2.4.3 Hematokrit

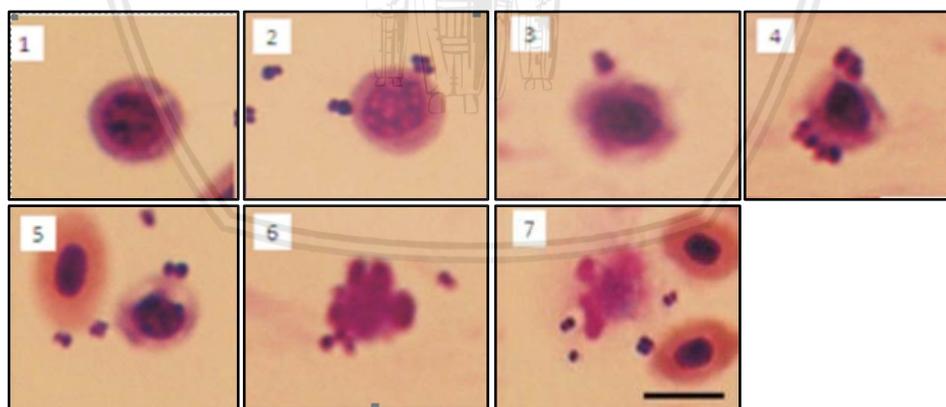
Menurut Fujaya (2004), bahwa kadar hematokrit merupakan perbandingan antara komposisi plasma darah dengan sel darah. Ada korelasi yang kuat antara hematokrit dengan jumlah hemoglobin, semakin rendah jumlah sel-sel darah merah maka akan semakin rendah pula kandungan hemoglobin dalam darah. Sehingga nilai hematokrit dipengaruhi jumlah eritrosit dalam darah. Hal ini sesuai pendapat Bastiawan *et al.* (2001), bahwa ikan yang terkena

penyakit akan mengalami penurunan nafsu makan, sehingga nilai hematokrit menjadi tidak normal. Jika nilai hematokrit rendah maka nilai eritrosit juga rendah.

Menurut Fauzan *et al.* (2017), bahwa nilai normal hematokrit pada ikan nila berkisar antara 21.00%-22.67%. Nilai hematokrit yang berada di atas kadar normal tersebut menunjukkan bahwa proses hematopoiesis pada ikan nila mulai terganggu. Sehingga nilai hematokrit menunjukkan jumlah oksigen yang membawa daya muat dalam darah. Rendahnya nilai hematokrit dapat disebabkan karena adanya kerusakan pada insang atau proses osmoregulasi yang terhambat. Namun nilai hematokrit yang tinggi menunjukkan naiknya kebutuhan oksigen dalam darah. Jika ikan terkena infeksi dapat menyebabkan nafsu makan akan menurun dan nilai hematokrit dalam darah juga akan menurun.

2.4.4 Aktivasi Fagositosis

Menurut Hardi *et al.* (2013), bahwa fagositosis dapat membantu tubuh untuk menghancurkan bakteri penyebab infeksi. Adapun proses fagositosis dapat dilihat pada gambar sebagai berikut;



Gambar 6. Proses fagositosis (Hardi *et al.*, 2013).

Proses fagositosis dan penghancuran partikel bakteri pada ikan dimulai dari sel monosit (1), terjadi pelekatan (2), aktivitas membran (3), permulaan proses fagositosis (4), proses penghancuran (5 dan 6) dan selanjutnya terjadi proses pelepasan dan pengeluaran hasil fagositosis.

Fagositosis merupakan proses penyerapan dan eliminasi mikroba atau partikel lain oleh sel-sel khusus yang disebut fagosit. Fagosit adalah sel-sel darah putih yang berasal dari sel-sel darah putih, yang terdapat di dalam aliran darah. Proses penghancuran bakteri atau kuman, fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau virus berada. Peningkatan kekebalan tubuh dapat diketahui dari aktivitas sel fagosit. Sel (Amrullah, 2004).

2.4.5 Respiratory Burst

Menurut Inoguchi *et al.* (2003), bahwa *Respiratory Burst* (RB) yang biasa disebut dengan oksidatif burst merupakan penggunaan oksigen reaktif dari berbagai jenis sel untuk melakukan aktifitas penghancuran partikel asing. Biasanya pelepasan bahan kimia terjadi dari sel-sel imun misalnya neutrofil dan monosit, hal ini terjadi karena adanya kontak dengan bakteri. Sehingga *Respiratory Burst* memiliki peran penting dalam sistem kekebalan tubuh utamanya untuk aktifitas fagositik dalam kaitanya dengan penghancuran partikel termasuk bakteri dan jenis patogen lainnya. Aktivasi penghancuran yang menggunakan oksigen biasanya melibatkan enzim NADPH oksidase yang menghasilkan superoksida dan secara spontan bersama molekul lain seperti NO untuk merubah menjadi radikal bebas reaktif.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut; cawan petri, jarum ose, Bunsen, sprayer, nampan, autoklaf, timbangan analitik, timbangan digital, *laminary air flow* (LAF), kulkas, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 250 ml, erlenmeyer 500 ml, hot plate, spektrofotometer, mikroskop binokuler, *washing bottle*, *cover glass*, *object glass*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, valcon 40 ml, bola hisap, pipet tetes, pipet volum, mikropipet 100 ul, *thermometer*, *handtally counter*, *incubator*, spatula, sendok bahan, akuarium, oven, *colony counter*, destruktur, aerator set, *vortex mixer*, *beaker glass* 1000 ml, blender, saringan, bunsen, *washing bottle*, pH meter, DO meter dan akuarium.

3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut; akuades, alkohol 96%, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), GSP (*Glutamat Strach Phenol*), Na-fisiologis, NaCl, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glukosa, yeast ekstrak, EDTA (*Ethylene Dinitriloteraacetic Acid*), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), natt-herrick's stain, methanol, giemsa, buffer ph 6.6, NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) merk TCI, KOH (*Potassium Hydroxide*), DMSO (*dimethyl sulphoxide*), cristal violet, iodin, safranin, kertas label, tisu, alumunium foil, kapas, masker, lateks, spirtus, sampel darah ikan nila, plastik wrap, bakteri *Bacillus firmus*, bakteri *A. hydrophilla* dan kertas saring whattman no 41.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini merupakan metode eksperimen pendekatan secara kuantitatif. Menurut Hamdi (2014), metode eksperimen merupakan metode penelitian yang bersifat validation atau menguji, yaitu menguji pengaruh suatu atau lebih variabel terhadap variabel lain. Hal ini juga sesuai pendapat Yusuf (2017), bahwa metode penelitian eksperimen merupakan satu-satunya penelitian yang lebih akurat/teliti dibandingkan dengan tipe penelitian yang lain, dalam menentukan relasi hubungan sebab akibat. Sehingga melalui penelitian menggunakan metode eksperimen ini peneliti dapat pula mengontrol kondisi kelompok eksperimen dan kelompok kontrol.

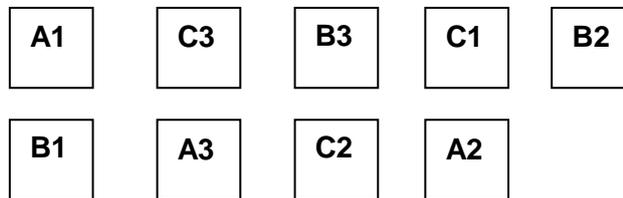
Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan Rancangan Acak Lengkap. RAL digunakan karena percobaan penelitian dilakukan pada skala laboratorium sehingga kondisi lingkungan lebih terkontrol. Rancangan acak lengkap merupakan rancangan percobaan yang paling sederhana diantara rancangan percobaan standar lainnya. Beberapa keuntungan menggunakan rancangan acak lengkap antara lain denah rancangan percobaan lebih mudah, analisis statistik terhadap objek percobaan sederhana, fleksibel dalam jumlah penggunaan perlakuan dan ulangan (Pratisto, 2004). Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan dan tiga kali ulangan;

- A : Perlakuan suplementasi sel vegetatif *B. firmus*
- B : Perlakuan suplementasi spora *B. firmus*
- C : Perlakuan kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*)

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama yaitu suplementasi *B. firmus* selama 49 hari dan diamati respon imun non spesifik. Tahap kedua yaitu dilakukan penginfeksi dengan bakteri *A. hydrophilla* selama

7 hari setelah dilakukan penambahan suplementasi selama 49 hari dan diamati *survival rate*.

a. Suplementasi Bakteri *B. firmus*

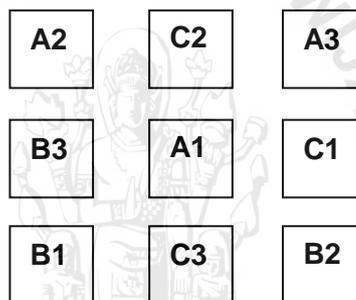


Gambar 7. Denah Rancangan Percobaan Tahap 1.

Keterangan:

A, B, C : Perlakuan
1, 2, 3 : Ulangan

b. Diinfeksi dengan Bakteri *A. hydrophilla*



Gambar 8. Denah Rancangan Percobaan Tahap 2.

Keterangan:

A, B, C : Perlakuan
1, 2, 3 : Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Bakteri *B. firmus*

a. Peremajaan *B. firmus*

Koloni bakteri *B. firmus* didapatkan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan stok isolat murni *B. firmus* dilakukan dengan penanaman bakteri *B. firmus* ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) steril dengan metode *streak plate* kuadran 4. Koloni bakteri yang tumbuh diambil menggunakan jarum ose dan ditumbuhkan kedalam tabung reaksi yang

telah diisi dengan media *Nutrient Agar* (NA) miring. Hasilnya dari agar miring diinkubasi selama 24 jam dan disimpan sebagai isolat bakteri di *refrigerator*. Selanjutnya pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui keseragaman sel bakteri.

b. Persiapan Inokulan *B. firmus*

Tahap persiapan inokulan *B. firmus* dilakukan dengan media cair yaitu *Nutrient Broth* (NB). Media NB dilarutkan dalam akuades sebanyak 200 ml menggunakan erlenmeyer 250 ml dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Peremajaan isolat *B. firmus* dilakukan dengan cara mengambil sampel menggunakan jarum ose dari isolat *B. firmus* pada media agar miring dan diinokulasikan ke dalam media NB 200 ml. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 100 rpm, suhu 30°C selama 24 jam. Hasil kepadatan bakteri sebesar $6,2 \times 10^7$ sel/mL.

c. Persiapan Media Fermentasi *B. firmus*

Pembuatan media fermentasi sebanyak 1000 ml *B. firmus* dengan rasio C:N (4:1) untuk produksi sel vegetatif dan spora *B. firmus*. Ekstrak yeast dapat digunakan sebagai sumber N, glukosa sebagai sumber C dan dicampurkan dengan bahan gram-gram mineral (Lampiran 1). Bahan media fermentasi dimasukkan kedalam erlenmeyer ukuran 500 ml. Media fermentasi bakteri disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C.

d. Kultur *B. firmus* pada Media Fermentasi

Inokulum *B. firmus* yang telah disiapkan sebelumnya diinokulasikan kedalam media fermentasi sebanyak 20% dari inokulum $6,2 \times 10^7$ sel/mL menjadi $12,4 \times 10^5$ sel/mL. Media fermentasi tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan diinkubasi di dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 30°C dilakukan selama 24 jam untuk sel vegetatif, sedangkan untuk spora

selama 70 jam. Hasil kepadatan bakteri sebesar $8,9 \times 10^7$ Spora/mL dan $9,05 \times 10^7$ sel/mL untuk sel vegetatif. Hasil kultur ke media fermentasi selanjutnya dimasukkan ke dalam falcon berukuran 50 ml dan dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan supernatan dengan endapan bakteri *B. firmus*. Hasil sentrifuge supernatan dibuang dan endapan semua sampel dijadikan 1 kedalam falcon. Hasil kepadatan bakteri sebesar $2,6 \times 10^9$ spora/mL dan $9,7 \times 10^9$ sel/mL untuk sel vegetatif.

Inokulum *B. firmus* pada media NB dan media Fermentasi dilakukan perhitungan. Menurut Mather dan Roberts (1998), bahwa rumus perhitungan menggunakan *haemocytometer* adalah sebagai berikut;

$$\text{Jumlah (Sel/mL)} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times 25 \times 10^4 \times \text{faktor pengencer}$$

Keterangan:

n : Jumlah sel pada 5 bidang pandang
 25 : jumlah seluruh bidang pandang pada *haemocytometer*
 10^4 : volume *haemocytometer*

e. Pencampuran Suplementasi *B. firmus* pada Pakan

Pencampuran suplementasi *B. firmus* pada pakan dilakukan mulai dari hasil endapan yang telah didapatkan dilakukan pencampuran. Menurut Rans *et al.* (2012), bahwa ketentuan perhitungan untuk pencampuran suplementasi pada pakan adalah 80 mL/1000 gr pakan dan dilakukan penambahan PBS dengan konsentrasi 10% dari jumlah pakan. Tahap pencampuran pakan dilakukan dengan cara pakan pelet dihaluskan terlebih dahulu, selanjutnya dilakukan pencampuran bakteri secara *repelleting* berupa sel vegetatif, spora dan kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*). Setelah itu, dilakukan pencetakan pakan (2 mm) dengan menggunakan alat saringan dan dilakukan inkubasi dalam suhu ruang selama 48 jam. Perhitungan dilakukan dengan metode *pour plate*. Menurut

Pambudi *et al.* (2016), bahwa koloni yang tumbuh pada rentang 25-250 dan nilai TPC (*total plate count*) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut;

$$TPC (CFU/gr) = \frac{\sum n}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2)..] \times d}$$

Keterangan;

TPC : Jumlah koloni (/gr atau /ml)

$\sum n$: Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung

n1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d : Faktor pengencer pertama yang dihitung

Perhitungan kepadatan bakteri didapatkan hasil sebesar $2,5 \times 10^9$ spora/gr pakan dan $1,8 \times 10^9$ CFU/gr pakan untuk sel vegetatif, cara perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.2 Pemeliharaan Hewan Uji

Ikan nila (*O. niloticus*) yang digunakan pada penelitian ini adalah Ikan nila dengan berat 23 ± 27 gram/ekor yang berasal dari petani pembudidaya ikan Pasuruan. Tempat pemeliharaan ikan sebanyak 9 akuarium yang berukuran 60 x 30 x 30 cm.

Persiapan tempat pemeliharaan dengan membersihkan akuarium terlebih dahulu menggunakan deterjen, kemudian dibilas dan didesinfeksi menggunakan kaporit 30 ppm selama 24 jam dan dinetralkan dengan Na-Thiosulfat 10 ppm. Setelah itu, akuarium dibilas menggunakan air bersih dan diisi air sebanyak 40 liter/akuarium. Setelah dilakukan pengondisian air akuarium maka dilakukan aerasi selama 24 jam untuk meningkatkan oksigen terlarut dan menghilangkan bahan kimia yang tidak diinginkan.

Pemeliharaan dilakukan selama 49 hari dengan kepadatan 10 ekor/40 liter air. Ikan nila diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 hari. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali sehari yaitu pada pukul 09.00 dan 16.00 WIB dengan dosis pemberian pakan sebanyak 5% dari berat tubuhnya dan dilakukan pengamatan parameter kualitas air yang terdiri dari suhu, pH (*Power of*

Hidrogen) dan DO (oksigen terlarut). Proses penyifonan dilakukan setiap 2 hari sekali untuk membersihkan sisa pakan dan feses, sedangkan proses sampling dilakukan setiap satu minggu sekali guna mengetahui penambahan bobot tubuh ikan dan jumlah pakan.

3.3.3 Bakteri *A. hydrophila*

a. Peremajaan *A. hydrophila*

Koloni bakteri *A. hydrophila* didapatkan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan stok isolate murni bakteri *A. hydrophila* yaitu menggunakan media selektif berupa GSP (*Glutamat Strach Phenol*) dengan metode *streak plate* kuadran 4. Koloni bakteri yang tumbuh diambil dengan menggunakan jarum ose dan ditumbuhkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media selektif berupa GSP miring. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 31°C dan disimpan sebagai stok isolat bakteri di *refrigerator*. Selanjutnya pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui keseragaman sel bakteri.

b. Persiapan inokulan *A. hydrophila*

Persiapan inokulan *A. hydrophila* dilakukan dengan pembuatan media cair yaitu *Nutrient Broth* (NB). Media NB sebanyak 1600 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 250 mL. Media tersebut kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Proses penanaman bakteri dilakukan dengan cara menggunakan jarum ose dari media miring GSP dan diinokulasikan ke dalam media NB sebanyak 200 mL. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi dalam *incubator* dengan suhu 31°C selama 24 jam, hasil kepadatan bakteri sebesar $2,34 \times 10^{10}$ sel/mL (Lampiran 2).

3.3.4 Lethal Dosis 50% (LD₅₀)

Uji LD₅₀ menggunakan Ikan nila berukuran 5±6 gram/ekor yang berasal dari petani pembudidaya ikan Pasuruan. Tempat pemeliharaan ikan sebanyak 9

akuarium yang berukuran 30 x 30 x 30 cm. Pemeliharaan dilakukan selama 7 hari dengan kepadatan 4 ekor per 10 liter air dengan teknik perendaman. LD₅₀ digunakan untuk mengetahui kepadatan konsentrasi bakteri yang dapat mematikan 50% ikan uji. Jumlah kepadatan bakteri *A. hydrophilla* yang digunakan untuk mencari LD₅₀ yaitu 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ sel/mL. Hasil LD₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan rumus. Menurut Thomshon dan Weil (1952), metode perhitungan LD₅₀ dapat dihitung menggunakan metode Thomshon dan Weil tahun 1952, dengan rumus sebagai berikut:

$$\log LD_{50} = \log D + \log d (f + 1)$$

Keterangan:

- D : Dosis terkecil yang digunakan
 d : Logaritma kelipatan
 f : suatu faktor pada daftar perhitungan LD₅₀ dimana;
 r : jumlah kematian ikan dalam satu kelompok uji (Lampiran 2)
 n : jumlah ikan percobaan setiap akuarium

Hasil perhitungan didapatkan kepadatan bakteri *A. hydrophilla* sebesar 10⁸ sel/mL. Perhitungan LD₅₀ dapat disajikan pada Lampiran 2.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Uji Respon Imun Non Spesifik

Uji respon imun non spesifik pada ikan nila dilakukan setelah 49 hari masa pemeliharaan, antara lain;

- **Total Leukosit (sel darah putih)**

Menurut Noga (2000), bahwa pengukuran total leukosit dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut; pertama darah yang sudah didapatkan dicampur dengan larutan Natt-Herric`s Stain sebanyak 1:200 (komposisi bahan Natt-Herric`s Stain dapat disajikan pada Lampiran 1). Prosedur pencampuran dapat dilakukan dengan darah diambil sebanyak 20 µl dan ditambahkan 4 ml larutan Natt-Herric`s Stain kedalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Selanjutnya didiamkan selama 5 menit, setelah 5 menit diambil menggunakan

mikropipet dan diteteskan pada kotak *haemocytometer* yang sudah ditutup dengan *cover glass*, kemudian diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Proses perhitungan dilakukan dengan menggunakan 4 kotak tengah pada bagian 1 bidang pandang terdapat 16 kotak. Perhitungan jumlah total leukosit dapat menggunakan rumus sebagai berikut;

$$WBC = \frac{\text{Jumlah Total Leukosit}}{4} \times 2000$$

Keterangan:

2000 : Jumlah pengenceran

4 : Jumlah kotak yang diamati

- **Diferensiasi Leukosit**

Menurut Noga (2000), bahwa pengukuran difrensiasi leukosit dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut; darah yang diambil selanjutnya diteteskan pada objek glass dan dibuat preparat dengan menggunakan metode smear, dikeringkan. Setelah kering, dibilas dengan menggunakan methanol dan dibiarkan selama 10 menit. Sampel yang kering direndam menggunakan giemsa selama 5 menit dan dibilas menggunakan buffer pH 6,7 sampai menutup preparat dan dibiarkan selama 5 menit, dibilas dengan menggunakan air dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Menurut Santoso (2013), bahwa perhitungan diferensiasi leukosit dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut;

$$\text{Limfosit} = \frac{\text{Jumlah Limfosit}}{\text{Jumlah Total Leukosit}} \times 100\%$$

$$\text{Monosit} = \frac{\text{Jumlah Monosit}}{\text{Jumlah Total Leukosit}} \times 100\%$$

$$\text{Neutrofil} = \frac{\text{Jumlah Neutrofil}}{\text{Jumlah Total Leukosit}} \times 100\%$$

- **Hematokrit**

Menurut Anderson dan Siwicki (1993), bahwa pengukuran hematokrit dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut; Darah diambil dengan menggunakan tabung pipet hematokrit sebanyak $\frac{3}{4}$ bagian tabung. Pada sisa ujung tabung di tutup dengan menggunakan malem/cristoseal sampai terjadi penyumbatan pada kedua sisi tabung. Tabung hematokrit dihaemofuge dengan kecepatan putaran 12000 rpm selama 4 menit dan hasil volume darah yang didapat dicocokkan dengan paper standar hematokrit.

- **Aktivitas Fagositik**

Menurut Zahran *et al.* (2014), bahwa pengukuran aktivitas fagositik dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut; Darah diambil 0.1 ml dimasukkan appendoff. 0.1 mL PBS dan 0,1 mL bakteri *A. hydrophilla* hasil kultur dengan kepadatan 10^8 sel/mL dicampurkan. Setelah tercampur, diambil 0.1 ml dimasukkan kedalam tube 2 ml yang sudah berisi darah dan dihomogenkan. Sampel diinkubasi selama 45 menit dalam suhu ruang, setelah itu diteteskan ke objek glass dan dibuat preparat dengan metode smear dan dikeringkan. Preparat dibilas alkohol 95% selama 3 menit dan dibilas dengan menggunakan air dan dikeringkan. Pewarnaan dilakukan menggunakan giemsa selama 20 menit dan setelah itu dibilas akuades, dikeringkan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dan dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{\text{Jumlah Sel Terfagosit}}{\text{Jumlah Total Sel}} \times 100\%$$

- **Respiratory Burst**

Menurut Choundury *et al.* (2005), bahwa prosedur *Respiratory Burst* dapat menggunakan prosedur sebagai berikut; darah diambil 50 μ l ditempatkan

dalam *microtitre plates* dan diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, diambil supernatan dan dibuang. Sampel yang ada di *microtitre plates* dicuci dengan menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 3 kali. Setelah itu, ditambahkan 0,2% NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) dan dinkubasi selama 1 jam. Sampel difiksasi menggunakan methanol 100% selama 2-3 menit dan dicuci menggunakan methanol 30% sebanyak 3 kali. Setelah itu, dikeringkan dan ditambahkan 60 µl 2N KOH (*Potassium Hydroxide*) dan ditambahkan 70 µl DMSO (*Dimethyl Sulphoxide*). Pembacaan dilakukan dengan menggunakan *Microplate Reader* dengan kecepatan 540 nm dan dicatat hasilnya.

3.4.2 Penginfeksi dengan Bakteri *A. hydrophila*

Persiapan penginfeksi menggunakan bakteri *A. hydrophila*, pertama dilakukan dengan membersihkan akuarium yang berukuran 30 x 30 x 30 cm sebanyak 9 akuarium dan diisi air sebanyak 10 L/akuarium. Setelah itu, diambil 3 ekor ikan nila (*O. niloticus*) yang berukuran 60±75 gram/ekor dari hasil pemeliharaan selama 49 hari dan dimasukkan kedalam akuarium.

Proses penginfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* (10^8 sel/mL) dilakukan selama 7 hari dengan metode perendaman dan dilakukan pengamatan kelulushidupan ikan. Menurut Royan *et al.* (2014), bahwa kelulushidupan ikan digunakan untuk mengetahui tingkat kelulushidupan ikan dengan membandingkan antara jumlah ikan pada awal pemeliharaan dengan jumlah ikan pada akhir pemeliharaan. Kelulushidupan ikan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan:

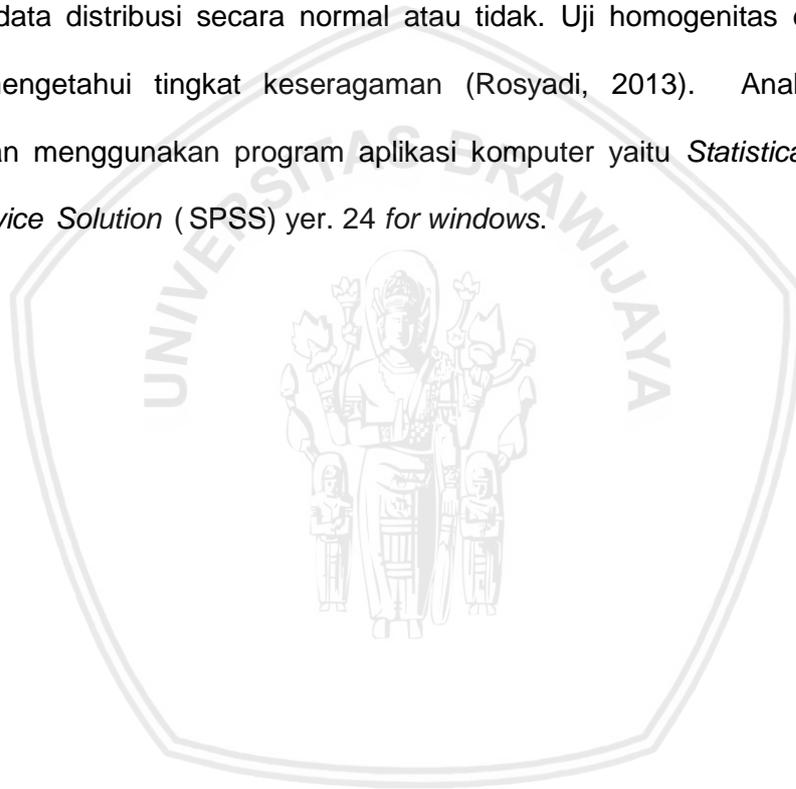
SR : Kelulushidupan (%)

Nt : Jumlah ikan hidup pada akhir pemeliharaan (ekor)

No : Jumlah ikan pada awal pemeliharaan (ekor)

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, analisa keragaman *analysis of variance* (ANOVA) dengan derajat signifikansi 5% sesuai dengan rancangan perlakuan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) dan dilanjutkan dengan uji BNT menggunakan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) untuk mengetahui beda antar perlakuan. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data distribusi secara normal atau tidak. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui tingkat keseragaman (Rosyadi, 2013). Analisis yang digunakan menggunakan program aplikasi komputer yaitu *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) yer. 24 for windows.



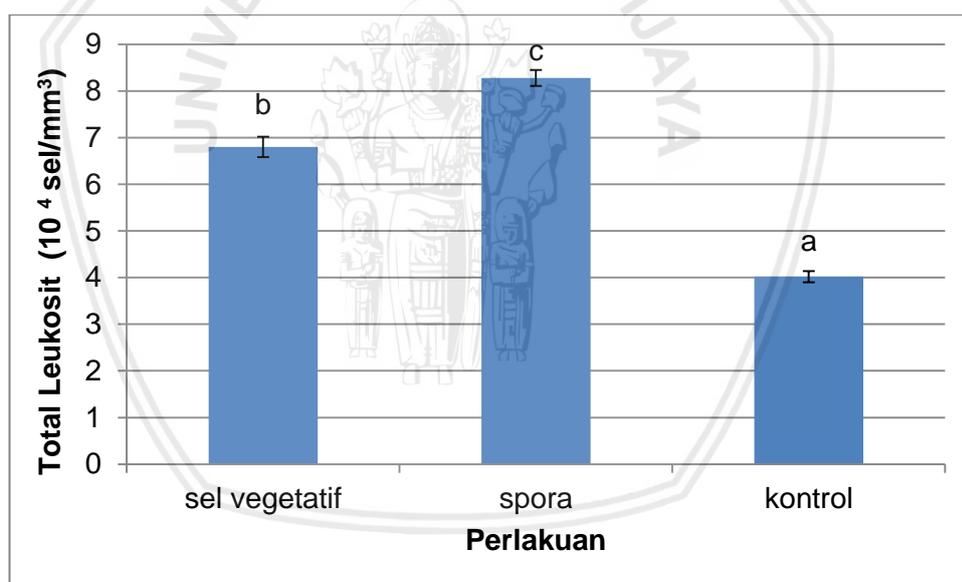
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Respon Imun Non Spesifik

Respon imun non spesifik pada ikan nila (*O. niloticus*) yang telah diberi suplementasi *B. firmus* pada pakan berupa sel vegetatif, spora dan kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*) selama 49 hari menunjukkan adanya peningkatan terhadap hasil imunitas pada perlakuan suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

4.1.1 Total Leukosit

Data perhitungan rerata total leukosit ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 9.



Gambar 9. Total leukosit ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil total leukosit yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai rerata total leukosit tertinggi pada perlakuan spora sebesar $8,28 \times 10^4$ sel/ mm^3 sedangkan nilai rerata total leukosit terendah pada perlakuan kontrol sebesar $4,02 \times 10^4$ sel/ mm^3 . Pada hasil pengambilan sampel sel darah total leukosit yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai rerata perlakuan spora lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan

kontrol, namun tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai total leukosit. Hal ini sesuai pendapat Hartika *et al.* (2014), bahwa nilai normal sel darah putih pada ikan nila berkisar antara 2×10^4 sel/mm³ sampai 15×10^4 sel/mm³.

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai total leukosit dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa hasil total leukosit berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan terbaik yaitu menggunakan suplementasi spora *B. firmus* setelah dilakukan pemberian selama 49 hari. Hal tersebut dikarenakan bahwa jumlah kepadatan sel vegetatif lebih banyak mengalami kematian sebesar 81,44% dari pada spora hanya sebesar 7,41% setelah ditambahkan pada pakan. Hal ini sesuai pendapat Wangka-orm *et al.* (2014), bahwa penambahan probiotik berupa sel vegetatif pada pakan menyebabkan penurunan atau kematian karena berkurangnya viabilitas didalam pakan. Keuntungan menggunakan spora *Bacillus sp.* adalah dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim dan memiliki jumlah kepadatan yang lebih stabil di bandingkan sel vegetatif (Wolken *et al.*, 2003).

Penggunaan suplementasi *B. firmus* sebagai bakteri probiotik mampu memberikan manfaat dalam proses budidaya. Pemberian bakteri probiotik mampu meningkatkan respon imun non spesifik (bawaan) sebagai sistem pertahanan tubuh (Zhou *et al.*, 2010). Pemberian *B. coagulans* menunjukkan terjadinya peningkatan respon imun seluler seperti total leukosit (Shelby *et al.*, 2006). Meningkatnya total leukosit menyebabkan adanya peningkatan ketahanan tubuh setelah pemberian imunostimulan, sehingga penambahan probiotik *Bacillus sp.* dapat merangsang respon imun seluler pada ikan yang berfungsi

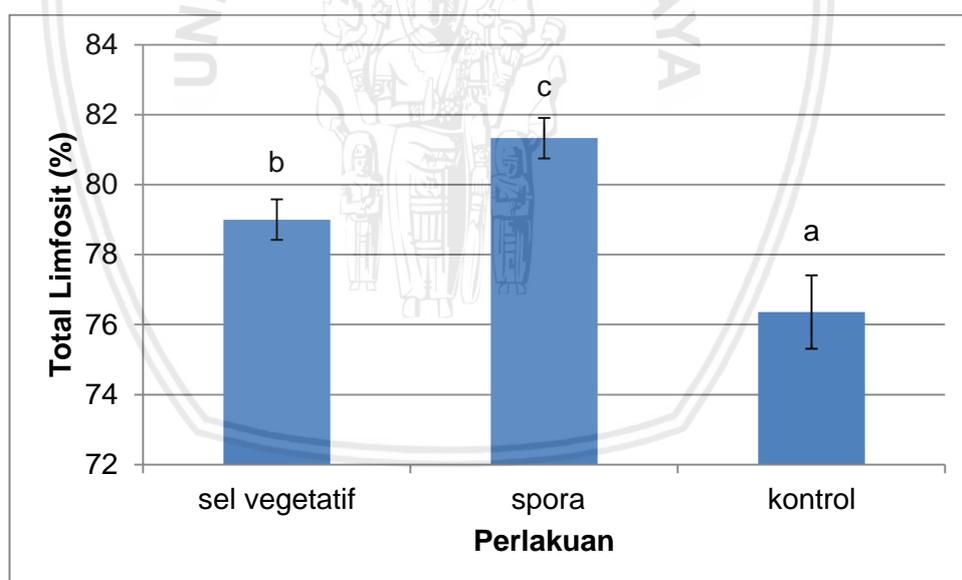
sebagai sistem pertahanan tubuh (Kamgar dan Ghane, 2014). Perbedaan total leukosit pada tiap perlakuan menunjukkan adanya perbedaan pertahanan tubuh pada ikan (Wahjuningrum *et al.*, 2008).

4.1.2 Diferensiasi Leukosit

Leukosit terdiri atas dua bagian yaitu agranulosit dan granulosit. Agranulosit terdiri dari limfosit, trombosit dan monosit. Sedangkan granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil dan basofil. Diferensial leukosit merupakan data yang menunjukkan kinerja sel leukosit pada ikan. Pengamatan hasil diferensial leukosit meliputi pengamatan sebagai berikut;

a. Limfosit

Data perhitungan limfosit ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 10.



Gambar 10. Total limfosit ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil limfosit yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai rerata limfosit tertinggi pada perlakuan spora sebesar 81,33% sedangkan nilai rerata limfosit terendah pada perlakuan kontrol sebesar 75,75%. Pada hasil pengambilan sampel sel darah limfosit yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai rerata perlakuan spora dan sel

vegetatif lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol. namun tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai limfosit. Hal ini sesuai pendapat Wulandari *et al.* (2018), bahwa kisaran normal limfosit ikan nila adalah 71,12-82,88%.

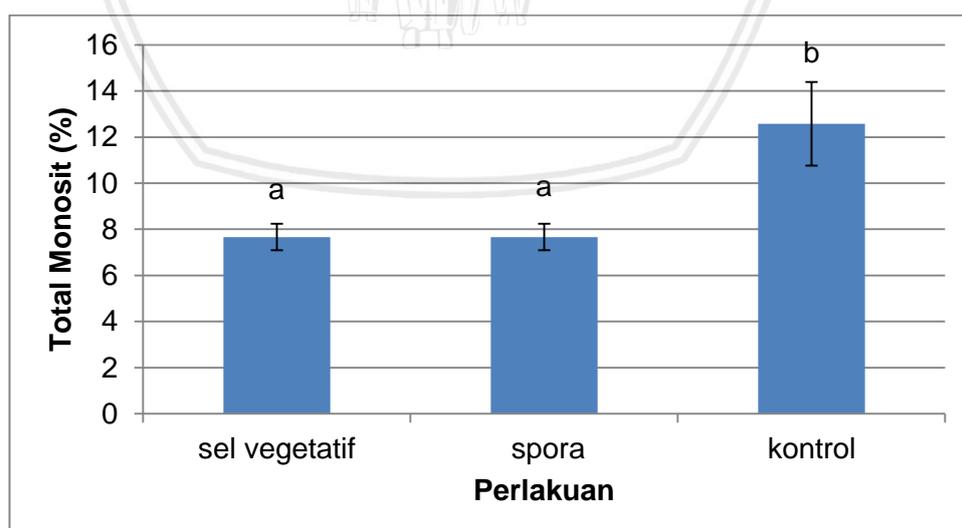
Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai limfosit dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa total limfosit setelah pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif, spora dan kontrol selama 49 hari menunjukkan perbedaan pada setiap perlakuan. Perlakuan terbaik pada suplementasi spora *B. firmus*. Total limfosit pada perlakuan spora terjadi kenaikan sebesar 6,86% dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hal tersebut dikarenakan bahwa spora *B. firmus* memiliki kemampuan poliferasi, ditunjukkan bahwa hasil perhitungan *Total plate count* (Lampiran 2) pada pakan menunjukkan jumlah kepadatan suplementasi spora lebih tinggi sebesar 28% dibandingkan dengan sel vegetatif. Hal ini sesuai pendapat Nimrat dan Vuthiphandchai (2011), bahwa probiotik yang mengandung bakteri berupa sel vegetatif memiliki kelemahan pada stabilitas sebagai produk probiotik. Hal ini dibuktikan bahwa penambahan suplementasi spora *Bacillus* sp. pada pakan memiliki kemampuan bertahan hidup pada saluran pencernaan (usus) lebih tinggi dibandingkan sel vegetatif (Wangka-orm *et al.*, 2014).

Aplikasi penggunaan suplementasi *B. firmus* sebagai probiotik dilakukan untuk membuktikan adanya aktifitas pertahanan seluler, yang ditunjukkan melalui peningkatan total limfosit. Limfosit berfungsi sebagai pelindung terhadap agen mikroba. Hal ini sesuai pendapat Sugiani *et al.* (2018), peningkatan limfosit

menunjukkan adanya aktifitas pertahanan seluler melalui pembentukan antibodi. Menurut Kamgar dan Ghane (2014), bahwa *Bacillus* sp. menyebabkan peningkatan persentase limfosit dan neutrofil, sedangkan monosit mengalami penurunan persentase. Hal tersebut dikarenakan bahwa limfosit merupakan salah satu faktor sebagai perlindungan ikan terhadap agen mikroba, sehingga dengan meningkatnya jumlah limfosit akan mengalami pembelahan atau difrensiasi menjadi sel plasma, dan sel plasma akan memproduksi dan melepaskan antibodi yang nantinya akan memasuki peredaran darah yang siap untuk menempel pada antigen (Pratiwi *et al.*, 2016). Berkurangnya jumlah limfosit dalam darah dapat menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit oleh bakteri patogen tertentu, sehingga akan mengakibatkan adanya pengurangan jumlah sel agen penyedia zat kebal tubuh yaitu limfosit (Azhar, 2013).

b. Monosit

Data perhitungan monosit ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 11.



Gambar 11. Total monosit dengan nilai rerata \pm sd. Grafik dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil monosit yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai rerata monosit tertinggi pada perlakuan kontrol sebesar 10,90% sedangkan nilai rerata monosit terendah pada perlakuan spora dan sel vegetatif sebesar 7,67%. Pada hasil pengambilan sampel sel darah monosit yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai rerata perlakuan kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan spora dan sel vegetatif, namun tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai monosit. Hal tersebut sesuai pendapat Fajariyani *et al.* (2017), bahwa nilai normal monosit ikan nila berkisar antara 7,65%-29,20%.

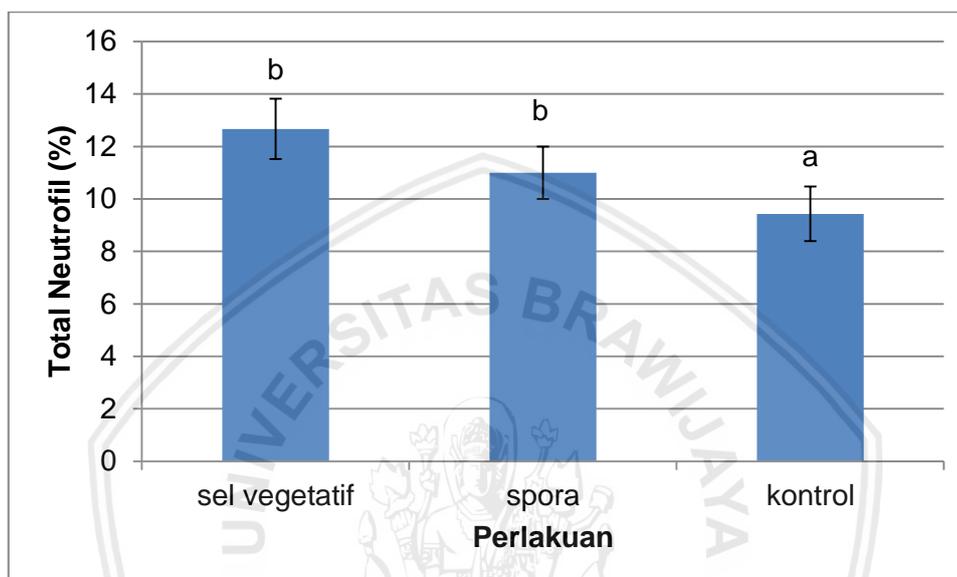
Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora tidak dapat meningkatkan monosit dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rerata monosit setelah pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif, spora dan kontrol selama 49 hari menunjukkan perbedaan pada setiap perlakuan. Perlakuan suplementasi *B. firmus* menyebabkan penurunan sebesar 29,63% dari pada perlakuan kontrol. Hal tersebut dikarenakan bahwa persentase monosit hanya diperlukan sedikit ketika tidak terjadi serangan bakteri patogen, karena monosit berfungsi sebagai penghancuran mikroba.

Hal ini sesuai Kamgar dan Ghane (2014), bahwa pemberian probiotik *Bacillus* sp. juga menyebabkan pengurangan persentase monosit. Hal tersebut dikarenakan bahwa monosit akan berperan sebagai penghancuran atau perlawanan ketika ada benda asing yang masuk yaitu bakteri patogen (Azhar, 2013). Proporsi monosit dalam leukosit hanya $>0,1\%$ dan meningkat sekitar 38% dalam waktu singkat apabila terjadi infeksi akibat bakteri patogen, sehingga

persentase monosit hanya diperlukan sedikit ketika tidak terinfeksi bakteri patogen (Lusiastuti *et al.*, 2013).

c. Neutrofil

Data perhitungan neutrofil ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 12.



Gambar 12. Total neutrofil ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil neutrofil yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai rerata neutrofil tertinggi pada perlakuan sel vegetatif sebesar 12,67% sedangkan nilai rerata neutrofil terendah pada perlakuan kontrol sebesar 9,69%. Pada hasil pengambilan sampel sel darah neutrofil yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai rerata perlakuan sel vegetatif dan spora lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol, namun tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai neutrofil. Hal ini sesuai pendapat Utami *et al.* (2013), bahwa persentase normal neutrofil ikan nila berkisar antara 9%-18%.

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai neutrofil, namun pada perlakuan

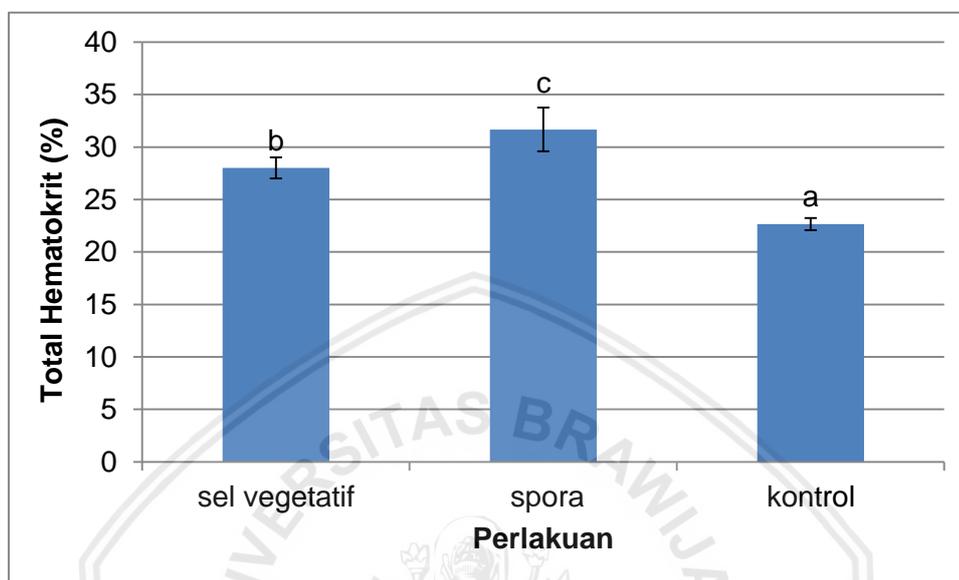
kontrol lebih rendah ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rerata neutrofil setelah pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif, spora dan kontrol selama 49 hari menunjukkan perbedaan pada setiap perlakuan. Perlakuan terbaik didapatkan pada suplementasi sel vegetatif *B. firmus* dengan kenaikan sebesar 23,52% dari pada perlakuan kontrol, namun suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hal tersebut dikarenakan bahwa suplementasi *B. firmus* pada pakan digunakan untuk mengetahui adanya respon imun non spesifik melalui aktifitas pertahanan seluler, sehingga terjadi peningkatan hasil neutrofil yang berfungsi sebagai pelindung utama.

Hal ini sesuai pendapat Aniputri *et al.* (2006), bahwa pemberian probiotik mampu meningkatkan hasil neutrofil sebagai bentuk respon imun terhadap hadirnya suatu antigen atau protein asing. Neutrofil merupakan sel-sel pertama yang meninggalkan pembuluh darah akibat mengandung vakuola yang berisi enzim untuk menghancurkan organisme yang bersifat patogen (Pratiwi *et al.*, 2016).

4.1.3 Hematokrit

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata hematokrit tertinggi pada perlakuan spora sebesar 31,67% sedangkan nilai rerata hematokrit terendah pada perlakuan kontrol sebesar 22,67%. Hasil pengambilan sampel sel darah hematokrit yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai rerata perlakuan sel vegetatif dan spora lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol, namun tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai hematokrit. Hal ini sesuai pendapat Fauzan *et al.* (2017), bahwa nilai normal hematokrit pada ikan nila berkisar antara 21,00%-22,67%. Namun sedikit berbeda dengan pernyataan Utami *et al.* (2013), bahwa nilai rata-rata hematokrit ikan nila normal berkisar

27,3%-37,8%. Sehingga hasil total hematokrit tetap menunjukkan dalam kisaran normal dari nilai rata-rata hematocrit. Data perhitungan hematokrit ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 13.



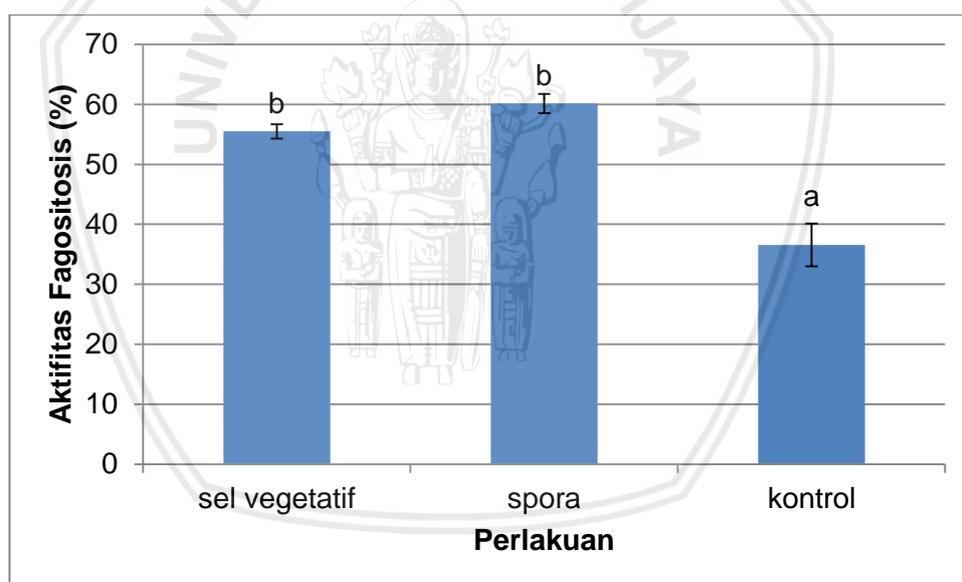
Gambar 13. Total Hematokrit ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil hematokrit yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai hematokrit dibandingkan dengan perlakuan kontrol. ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rerata neutrofil setelah pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif, spora dan kontrol selama 49 hari menunjukkan perbedaan pada setiap perlakuan. Perlakuan terbaik menggunakan suplementasi berupa spora *B. firmus*. Perlakuan suplementasi spora *B. firmus* mengalami kenaikan sebesar 28,42% dibandingkan dengan perlakuan kontrol, sehingga pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan mampu meningkatkan hasil total hematokrit ikan nila. Hal tersebut sesuai pendapat Kurniawan *et al.* (2019),

bahwa kenaikan kadar hematokrit pada ikan dapat diduga akibat pengaruh pemberian bakteri probiotik. Pemberian probiotik mampu menstabilkan kadar hematokrit pada ikan dengan adanya peningkatan respon imun non spesifik (Sukenda *et al.*, 2016). Sehingga dengan meningkatnya kadar hematokrit mengindikasikan bahwa probiotik yang digunakan efektif dalam meningkatkan status kesehatan ikan karena bakteri probiotik mampu memberikan efek imunostimulan, sehingga mampu menstimulasi sistem imun (Setyaningsih *et al.*, 2017).

4.1.4 Aktifitas Fagositosis

Data perhitungan aktifitas fagositosis ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 14.



Gambar 14. Aktifitas fagositosis ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil aktifitas fagositosis yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

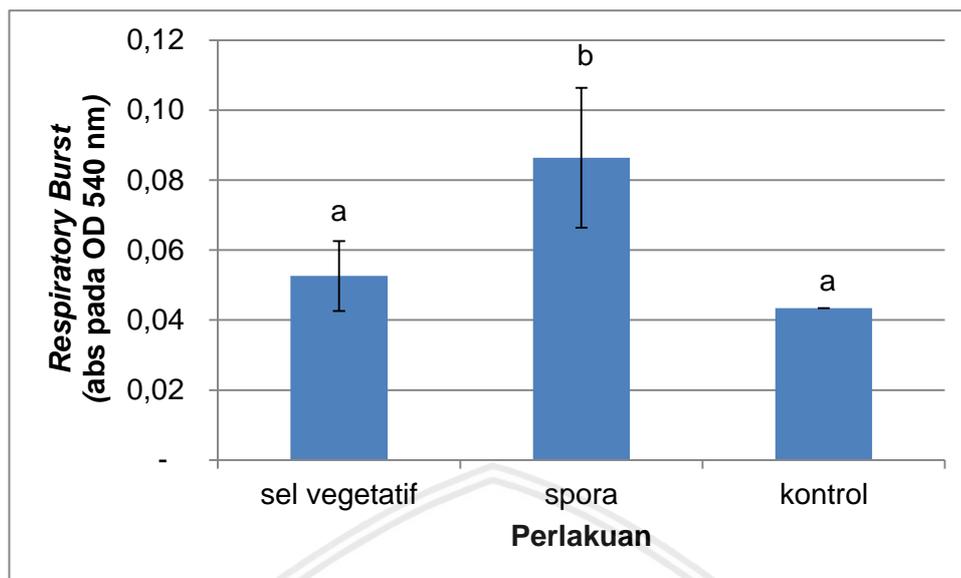
Hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai rerata aktifitas fagositosis tertinggi didapatkan pada perlakuan spora sebesar 60,16% sedangkan nilai rerata aktifitas fagositosis terendah pada perlakuan kontrol sebesar 36,56%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktifitas fagositosis ikan nila akan mengalami

peningkatan setelah pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan sebesar 2,55% dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai aktifitas fagositosis dibandingkan dengan perlakuan kontrol. ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa hasil nilai aktifitas fagositosis berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan yang terbaik adalah menggunakan suplementasi spora *B. firmus* setelah dilakukan pemberian selama 49 hari. Meningkatnya hasil aktifitas fagositosis menunjukkan terjadinya peningkatan sistem kekebalan tubuh pada ikan. Hal ini sesuai pendapat Hastuti *et al.* (2012), bahwa meningkatnya aktivitas fagositosis menunjukkan adanya peningkatan kekebalan tubuh, karena sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Aktifitas fagositosis merupakan perlawanan awal sebagai respon inflamasi sebelum mereduksi antibody (Setyaningsih *et al.*, 2017). Hal tersebut diperantarai sel fagosit seperti neutrofil, monosit dan makrofag. Hal ini sesuai pendapat Pope *et al.* (2011), bahwa perubahan nilai aktifitas fagositosis berkaitan dengan adanya pemberian imunostimulan karena neutrofil memiliki aktivitas perlawanan terhadap benda asing secara alami.

4.1.5 Respiratory Burst

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata *respiratory burst* tertinggi didapatkan pada perlakuan spora sebesar 0,09 sedangkan nilai rerata *respiratory burst* terendah pada perlakuan kontrol sebesar 0,04. Data perhitungan *respiratory burst* ikan nila selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 15.



Gambar 15. *Respiratory Burst* ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan hasil *respiratory burst* yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai *respiratory burst* dibandingkan dengan perlakuan kontrol. ($p < 0,05$) untuk mengetahui respon terbaik dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa hasil nilai *respiratory burst* berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan yang terbaik adalah menggunakan suplementasi spora *B. firmus*, karena mengalami peningkatan sebesar 55,55% dibandingkan dengan perlakuan kontrol setelah dilakukan pemberian selama 49 hari. Peningkatan *respiratory burst* menunjukkan bahwa pemberian suplementasi *B. firmus* dapat meningkatkan hasil respon imun non spesifik.

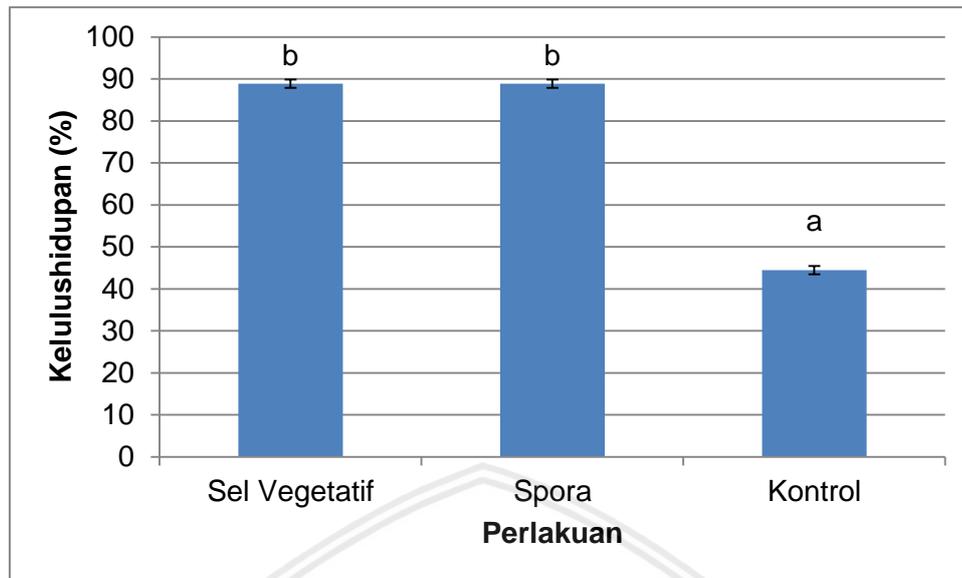
NBT (*Nitroblue Tetrazolium*) dapat digunakan untuk mengetahui *respiratory burst activity* (Zhou et al., 2010). *Respiratory burst activity* menunjukkan kemampuan neutrofil mereduksi larutan NBT melalui pembentukan oksigen (Danaparamita et al. 2017). Peningkatan hasil *respiratory burst* ditunjukkan pada perlakuan suplementasi *B. firmus* sel vegetatif dan spora

dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Perlakuan yang diberi suplementasi *B. firmus* menunjukkan bahwa suplementasi *B. firmus* dapat meningkatkan respon imun non spesifik. Menurut Salinas *et al.* (2006), bahwa *respiratory burst activity* meningkat setelah penambahan *Lactobacillus* sp.. Hasil serupa menunjukkan bahwa penambahan *L. rhamnosus* selama 2 minggu menunjukkan peningkatan hasil *respiratory burst* dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Nikokelainen *et al.*, 2003). Hal tersebut dikarenakan bahwa kandungan antibakteri yang terdapat dalam *B. firmus* dapat merusak total membran protoplasma dengan mekanisme melisis dinding sel dan menghentikan sintesa protein. Kandungan antibakteri mengakibatkan terhambatnya aktivitas bakteri sehingga neutrofil dapat aktif merespon NBT (Sya`bani *et al.*, 2015).

Hasil respon imun non spesifik dapat disimpulkan bahwa pemberian suplementasi *B. firmus* mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan kesehatan setelah pemberian suplementasi *B. firmus*, sehingga dapat meningkatkan imunitas dan kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*).

4.2 Kelulushidupan Ikan Nila Setelah Diinfeksi Dengan Bakteri *A. hydrophila*

Kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*) setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* selama 7 hari yang telah diberi suplementasi *B. firmus* pada pakan berupa sel vegetatif, spora dan kontrol (tanpa suplementasi *B. firmus*) selama 49 hari. Hasil kelulushidupan ikan nila menunjukkan adanya peningkatan pada perlakuan suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Nilai rerata kelulushidupan tertinggi didapatkan pada perlakuan sel vegetatif dan spora sebesar 88,89% sedangkan nilai rerata terendah pada perlakuan kontrol sebesar 44,44%. Hasil kelulushidupan ikan nila dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. *Survival Rate* ditunjukkan dengan nilai rerata \pm sd. Grafik yang sama ditunjukkan dengan notasi yang berbeda sehingga menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Dari hasil One Way ANOVA (Lampiran 5) pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian suplementasi *B. firmus* berupa sel vegetatif dan spora mampu meningkatkan nilai kelulushidupan dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Secara umum hasil uji Duncan menunjukkan bahwa hasil kelulushidupan berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan yang terbaik adalah menggunakan suplementasi berupa sel vegetatif dan spora *B. firmus*. Pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan menunjukkan peningkatan hasil kelulushidupan ikan nila sebesar 50,01% dibandingkan dengan perlakuan kontrol, setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophilla* selama 7 hari. Penambahan suplementasi *B. firmus* mampu meningkatkan hasil respon imun non spesifik, sehingga terjadi peningkatan sistem pertahanan tubuh dalam tubuh ikan.

Hal ini sesuai pendapat Danaparamita *et al.* (2017), bahwa pemberian suplementasi pada pakan yang dapat dicerna oleh ikan mampu meningkatkan

respon imun dan mengurangi tingkat kematian akibat terinfeksi bakteri patogen. Pemberian bakteri probiotik apabila masuk ke dalam tubuh ikan dapat berfungsi sebagai *imunostimulan* yang dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap serangan bakteri patogen (Sya`bani *et al.*, 2015). Selain itu, probiotik yang diberikan diduga mampu meningkatkan populasi *Bacillus* sp. dalam usus melalui kemampuan dalam memecah rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak dengan bantuan enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroba sehingga dapat merubah molekul kompleks menjadi molekul sederhana yang akan mempermudah proses penyerapan oleh saluran cerna (Hendrianto *et al.*, 2009). Enzim-enzim yang memiliki kemampuan dalam meekresikan adalah enzim protease, lipase dan amilase. Enzim tersebut digunakan untuk menghidrolisis nutrisi pakan sehingga terjadi peningkatan ketersediaan nutrisi yang dapat diserap oleh saluran cerna untuk masuk ke pembuluh darah sebagai proses metabolisme (Sukenda *et al.*, 2016). Sementara itu pendapat Lusastuti *et al.* (2013), bahwa *B. firmus* merupakan bakteri probiotik yang mampu bekerja dengan cara berkompetisi dengan bakteri patogen, baik dalam memperoleh energi maupun tempat perlekatan di dalam saluran pencernaan sehingga dapat mencegah terjadinya kolonisasi bakteri patogen *A. hydrophila*.

4.3 Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam proses pemeliharaan hewan uji. Faktor kualitas air memiliki peran penting dalam proses pertumbuhan dan kesehatan ikan. Sehingga harus dilakukan monitoring untuk menjaga kondisi media pemeliharaan tetap pada kondisi optimal. Pada penelitian ini nilai kualitas air pada media pemeliharaan dikondisikan dalam kisaran yang layak bagi kelangsungan hidup ikan nila. Berdasarkan hasil pengamatan data kualitas air didapatkan kisaran hasil nilai suhu, pH (*power of hydrogen*) dan DO (*dissolved oxygen*) pada Tabel 2.

Tabel 2. Kisaran Hasil Pengamatan Kualitas Air Selama Pemeliharaan Hewan Uji

Perlakuan	Kualitas Air					
	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)		DO (ppm)		pH	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
A (sel vegetatif)	24,6-26,0	24,9-27,3	4,2-7,9	4,4-7,9	5,67-8,6	6,8-8,7
B (sel spora)	24,4-26,1	24,9-27,6	4,0-7,8	4,2-7,7	5,37-8,5	6,3-8,9
C (kontrol)	24,1-26,8	25,3-27,6	4,5-7,7	4,6-7,6	5,66-8,7	6,9-8,6

4.3.1 Suhu

Berdasarkan data yang didapatkan, suhu air dalam wadah pemeliharaan selama masa pemeliharaan masih dalam batas kisaran normal suhu pada ikan nila yaitu antara $24,1^{\circ}\text{C}$ – $27,6^{\circ}\text{C}$. Hal ini sesuai pendapat Karimah *et al.* (2018), bahwa kisaran suhu optimum yang baik untuk pertumbuhan ikan nila berkisar antara $24-32^{\circ}\text{C}$. pertumbuhan ikan nila biasanya akan terganggu apabila suhu habitatnya lebih rendah dari 14°C atau pada suhu tinggi 38°C . ikan nila akan mengalami kematian pada suhu 6°C atau 42°C . Oleh karena itu berdasarkan nilai kisaran suhu selama penelitian, dapat dikatakan nilai suhu berada didalam kadar optimum untuk pemeliharaan ikan nila yang dilakukan selama penelitian.

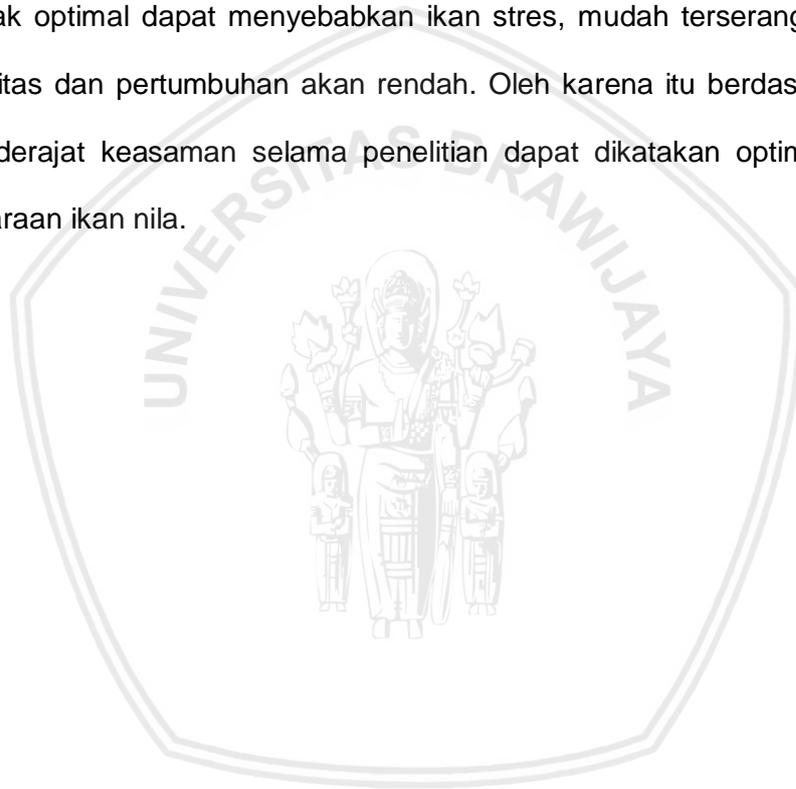
4.3.2 Oksigen Terlarut (*Disolved Oxsigen*)

Berdasarkan data yang didapatkan, oksigen terlarut dalam wadah pemeliharaan selama masa pemeliharaan masih dalam batas kisaran normal oksigen terlarut pada ikan nila yaitu antara 4,0 ppm sampai 7,9 ppm. Menurut Aryani *et al.* (2010), bahwa kisaran DO optimum yang baik untuk pertumbuhan ikan nila berkisar antara 4 ppm sampai 8,56 ppm. Sedangkan Menurut Anam *et al.* (2017), bahwa debit air yang tinggi menghasilkan oksigen terlarut yang lebih tinggi pula, semakin tinggi oksigen terlarut yang ada dalam perairan nafsu makan ikan akan meningkat sehingga kondisi fisiologis dan proses metabolisme akan berjalan dengan lancar tanpa adanya gangguan. Ikan yang memperoleh oksigen yang rendah akan mengakibatkan nafsu makan dari ikan menurun dan tingkat pernafasanya rendah sehingga akan berpengaruh pada tingkah laku dan

proses fisiologisnya. Oleh karena itu berdasarkan nilai kisaran suhu selama penelitian dapat dikatakan optimum untuk pemeliharaan ikan nila.

4.3.3 pH (*Power of Hydrogen*)

Berdasarkan data yang didapatkan, pH dalam wadah pemeliharaan selama masa pemeliharaan masih dalam batas normal. pH pada ikan nila yaitu antara 5,7-8,9. Menurut karimah *et al.* (2018), bahwa kisaran pH optimum yang baik untuk pertumbuhan ikan nila berkisar antara 5-10. Jika derajat keasaman yang tidak optimal dapat menyebabkan ikan stres, mudah terserang penyakit, produktifitas dan pertumbuhan akan rendah. Oleh karena itu berdasarkan nilai kisaran derajat keasaman selama penelitian dapat dikatakan optimum untuk pemeliharaan ikan nila.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan pada penelitian tentang Pengaruh Pemberian Suplementasi *B. firmus* Pada Pakan Terhadap Imunitas Ikan Nila (*O. niloticus*) adalah sebagai berikut;

- a. Pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan berpengaruh terhadap hasil imunitas dan kelulushidupan ikan nila.
- b. Pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan yang berbeda menghasilkan uji respon imun non spesifik yang terbaik pada perlakuan suplementasi spora setelah pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan selama 49 hari. Namun pada hasil kelulushidupan ikan nila setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophilla* didapatkan perlakuan yang terbaik adalah perlakuan suplementasi berupa sel vegetatif dan spora *B. firmus*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil penelitian yang berbeda nyata terhadap uji respon imun non spesifik dan kelulushidupan ikan nila setelah pemberian suplementasi *B. firmus* pada pakan selama 49 hari, namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penentuan jumlah dosis suplementasi spora *B. firmus* guna mendapatkan dosis yang terbaik pada spora *B. firmus*

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto dan Liviawaty. 1992. Fisiologi Hewan. Gramedia. Jakarta. 97 hlm.
- Amri, K. dan Khairuman. 2003. Budidaya Ikan Nila Secara Intensif. PT. AgroMedia Pustaka: Jakarta. 18-22 hlm.
- Anam, M. K., F. Basuki dan L. L. Widyowati. 2017. Performa pertumbuhan, kelulushidupan dan produksi biomassa ikan nila (*O. niloticus*) dengan debit air yang berbeda pada sistem budidaya minapadi di Dusun Kandangan, Sleman, Yogyakarta. *Jurnal Sains Akuakulture Tropis*. **1** (1): 52-61.
- Anderson, D. P. dan Siwicki. 1993. Disease of fish. Book 4: Fish Immunology. TFH Publication Ltd. Neptune City.
- Aniputri, F. D., J. Hutabrata dan Subandiyono. 2014. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap tingkat pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* dan kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2): 1-10.
- Arindita, C. Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Penambahan serbuk lidah buaya (*Aloe vera*) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan profil darah ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri "*A. hydrophila*". *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (3): 66-75.
- Arwiyanto, T., Y. M. S. Maryudani dan A. E. Prasetyo. 2007. Karakterisasi dan uji aktivitas *Bacillus* spp. sebagai agensia pengendalian hayati penyakit lancat pada tembakau temanggung. *Berk. Penel. Hayati*. **12**: 93-98.
- Azhar, F. 2013. Pengaruh pemberian probiotik dan prebiotik terhadap performan juvenile ikan kerapu bebek (*Comileptes altivelis*). *Buletin Veteriner Udayana*. **6** (1): 1-9.
- Barbosa, O., C. Ortiz, A. B. Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues dan R. F. Lafuente. 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advance*. **4**:1583-1600.
- Bastiawan, D., A. Wahid, M. Alifudin dan I. Agustiawan. 2001. Gambaran Darah Lele dumbo (*Clarias* spp.) yang Diinfeksi Cendawan *Aphanomyces* sp. pada pH yang Berbeda. *Jurnal Penelitian Indonesia*. **7** (3): 44-47.
- Brown, A. C. dan V. Ana. 2004. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 2000, **56** (1): 158-171.
- Choudhury, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, S. Kumar, S. S. Das dan S.C. Mukherjee. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduce LPs mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *ELSEVIER*. **19**: 281-291.

- Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. **28** (11): 214-220.
- Danaparamita, E. D., Mulyana dan A. M. Lusiastuti. 2017. Efektifitas pemberian ekstrak kipahit (*Tithonia diversifolia*) sebagai imunostimulan untuk pencegahan *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) pada ikan patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Jurnal Mina Sains*. **1** (3): 19-29
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *B. subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. **1**(1): 10-38
- Fajriyani, A., S. Hastuti dan Sarjito. 2017. Pengaruh serbuk jahe pada pakan terhadap profil darah, pertumbuhan dan kelulushidupan ikan patin (*Pangasius* sp.). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **4** (6): 39-48.
- Fauzan, M., Rosmaidar, Sugito, Zuhrawati, Muttaqien dan Azhar. 2017. Pengaruh paparan timbal (Pb) terhadap profil darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *JIMVET*. **1** (4): 702-708.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan. PT Rineka Cipta, Jakarta. 179 hlm.
- Haditomo, A. H. C., A. Mariana dan L. Widanarni. 2016. Studi *Bacillus firmus* Sebagai Kandidat Probiotik Dalam Menghadapi *Aeromonas hydrophila* Pada Media Budidaya. *Jurnal Saintek Perikanan*. **11** (2): 111-114.
- Hardi, E. H., C. A. Pebrianto, T. Hidayanti dan R. T. Handayani. 2014. Infeksi *A. Hydrophila* melalui jalur yang berbeda pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Loa Kulu Kutai Katanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. **2** (8): 130-133.
- Harikrishnan, R. dan C. Balasundaram. 2005. Modern Trends in *Aeromonas hydrophila* Disease Management with Fish. *ProQuest Biology Journals*. **13** (4): 281.
- Harstuti, D. S. 2012. Suplementasi B-glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam pakan terhadap aktifitas fagositosis, aktivitas NBT, protein plasma dan aktifitas aglutinasi darah ikan nila (*O. niloticus*). *Depik*. **1** (3): 149-155.
- Henriques, A. O. dan C. P. Moran. 2007. Structure, assembly and function of the spore surface layers. *The Annual Review of Microbiology*. **66** (12): 5241-5247.
- Inoguchi, T., T. Sonta, H. Tsubouchi, T. Etoh, M. Kakimoto, N. Sonada, N. Sato, N. Sekiguchi, K. Kobayashi, H. Sumimoto, H. Utsumi dan H. Nawata. 2003. Protein kinase C-Dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes role of vascular NADPH oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology*. **14**: 227-232.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics*. London and Philadelphia: Taylor and Fancis Press. 318 hlm.



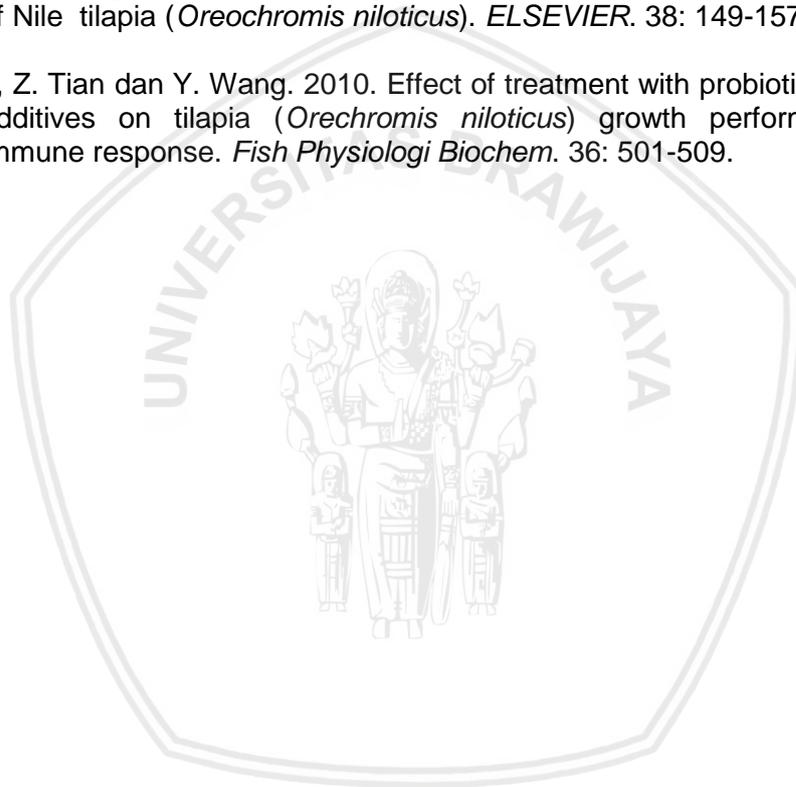
- Kamgar, M. dan M. Ghane. 2014. Studies on *Bacillus subtilis* as potential probiotics, on the hematological and biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. **2** (5): 203-207.
- Karimah, U., I. Samidjan dan Pinandoyo. 2018. Performa pertumbuhan kelulushidupan ikan nila gift (*O. niloticus*) yang diberi jumlah pakan yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **7** (1): 128-135.
- Koesharyani, I., L. Gardenia, Z. Widowati, Khumaira dan D. Rustianti. 2018. Studi kasus infeksi *Tilapia Lake Virus* (TiLV) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*. **13** (1): 85-92.
- Lukistyowati, I. dan Kurniasih. 2012. Pelacakan gen aerolysin dari *A. Hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan ekstrak bawang putih. *Jurnal Veteriner*. **13** (1): 43-50.
- Lusiastuti, A. M., T. Sumiati dan W. Hadie. 2013. Probiotik *Bacillus firmus* Untuk Pengendalian Penyakit *Aeromonas hydrophila* Pada Budidaya Ikan Lele Dumbo, *Clarias gariepinus*. *Jurnal Riset Akuakultur*. **8** (2): 253-264.
- Mauel, M.J., Soto E., Moralis J. A., Hawke J. 2007. A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella spp.* as the pathogenic agent. *J. Aquat Anim Health* 19: 27-34.
- Moir, A. 2006. How do Spore Germinate. *Journal of Applied Microbiology*. **11** (2): 1364-5072.
- Mustahal dan A. Waqiah. 2012. Identifikasi bakteri yang menginfeksi ikan garra rufa (*Cyprinion macrostarmus*) di Balai Besar Karantina Ikan Soekarno Hatta. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **2** (2): 83-88.
- Murwani, S. 2015. Dasar-dasar Mikrobiologi Veteriner. Malang. UB Press. 356 hlm.
- Noga, E. J. 2000. The clinical work-up. In *fish disease; diagnosis and treatment* (pp. 10-29). Iowa: Iowa state press, blackwell publishing company.
- Pambudi, A., N. Noriko dan E. P. Sari. 2016. Isolasi dan karakterisasi bakteri tanah sawah di Kecamatan Medan Satria dan Bekasi Utara, Kota Bekasi, Jawa Barat. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*. **3** (4): 187-195.
- Pananjung, A. M. S., U. U. Evi, S. Kartika dan A. Sattya. 2015. Karakterisasi isolate bakteri fibrinolitik WU 021055 asal perairan Pantai Papuma, Jember. *Jurnal Bioteknologi Biosains Indonesia*. **2** (1): 1-8.
- Playfair, J. H dan B. M. Chain. (2009). Major histocompatibility complex, in immunology at glance. *9ed*. 30-31.
- Pratiwi, W., L. T. Suwanti dan W. H. Satyantini. 2016. Perendaman ekstrak *Spirulina plantesis* terhadap Ig-M, jaringan limpa dan difrensiasi leukosit

- ikan mas setelah diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. **3** (18):1-13.
- Pope, E. C., Powell, A. Roberts, E. C. Shields, R. J. Wardle and A. F. Rowley. 2011. Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after vaccination. *Plos One*. 6
- Putri, R. R., F. Basuki dan S. Hastuti. 2013. Profil darah dan kelulus hidupan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan kepadatan berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **2** (2): 47-56.
- Qinghui Ai, Houguo Xu, Kangsen Mai, Wei Xu, Jun Wang dan Weinbing Zhang. 2011. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*. 317: 155-161.
- Ran, C., A. Carrles, M. A. William, N. Capps, C. T. Bui, J. C. Newton, J. W. Kloepper, E. L. Ooi, C. L. Browdy, J. S. Terhune and M. R. Liles. 2012. Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *POLOS ONE*. **7**: 1-8.
- Rahmaningsih, S. 2012. Pengaruh ekstrak sidawayah dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengatasi infeksi *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan*. **1** (1): 1-8.
- Raghu, P., M. Rahjikkanmu, R. Baburajan, A. Deva, R. Nandakumar, V. Masilamni dan K. Prabahakaran. 2016. Effect of *Bacillus coagulans* and *B. firmus* incorporated probiotic diet on superoxide dismutase activity and catalase activity on *Penaeus monodon*. *World Scientific News*. 44: 224-235.
- Rukmana, R. 1997. Budidaya dan Prospek Agribisnis Ikan Nila. Kanisius: Yogyakarta. 18-19 hlm.
- Rosyadi, I. 2013. Keefektifan model pembelajaran *course review horay* terhadap aktivitas dan hasil belajar PKN. *Journal of Elementary Education*. **2** (2): 604-613.
- Royan, F., S. Rejeki dan A. H. C. Haditomo. 2014. Pengaruh salinitas yang berbeda terhadap profil darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **2** (3): 109-117.
- Santoso, B. B., F. Basuki dan S. Hastuti. 2013. Analisa ketahanan tubuh benih hibrida nila larasati (*Oreochromis niloticus*) generasi 5 (F5) yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan konsentrasi yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3**(2): 64-75.
- Salinas I., P. Diaz-Rosales and P. A. Cuesta. 2006. Effect of heat-inactivated fish and non fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol*. 111: 279-286.

- Setyaningsih, L., Widanarni, A. M. Lusiastuti dan M. Yuhana. 2017. Pengaruh pemberian mikrokapsul probiotik *Bacillus cereus* P22 dan *Staphylococcus lentus* L1k pada pakan terhadap kinerja pertumbuhan, respon imun dan resistensi ikan lele (*Clarias gariepinus*) Burchell 1822 yang diinfeksi *A. hydrophila*. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*. **17** (2): 143-154.
- Shelby, R., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy and M. A. 2006. Effect of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Appl Aquac*. 18: 49-60.
- Sya'bani, N., Ayi Y., Ike R., A.M. Lusiastuti. 2015. Frekuensi Penambahan Probiotik *Bacillus sp.* Dan *Staphylococcus sp.* Pada Media Pemeliharaan Benih Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Perikanan Kelautan*. **2** (1): 130-140.
- Sugiani, D., Tauhid, U. Purwaningsih dan A. M. Lusiastuti. 2018. Vaksin kering beku sel utuh bakteri *A. hydrophila* untuk pencegahan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* pada ikan lele, nila dan gurame. *Jurnal Riset Akuakultur*. **13** (2): 159-167.
- Sukenda, M. M. Rasyanzani, Rahman dan D. Hidayatullah. 2016. Kinerja probiotik *Bacillus sp.* pada pendederan benih ikan lele (*Clarias sp.*) yang diinfeksi *A. hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **15**(2): 162-170.
- Sukmawati. 2017. Identifikasi bakteri flokulasi pada tambak udang di kabupaten pangkep. *Bioscience*. **2** (1): 13-20.
- Suyanto, R. S. 2010. Pembenihan dan Pembesaran Nila. Penebar Swadaya. Jakarta. 124 hlm.
- Thomson dan C. S. Weil. 1952. Tables for convenient calculation of median effective dose (LD₅₀ or ED₅₀) and instruction in their use. *Biometric*. **8**: 249-263.
- Triyaningsih, Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Patogenitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2): 11-17.
- Utami, D. T., S. B. Prayitno, S. Hastuti dan A. Santika. 2013. Gambaran parameter hematologis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan dosis yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **4** (2): 7-20.
- Verschuere, L., Rombout, G. Sorgeloos dan P. W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. *Microbiol Mo Biol*. **64**: 655-671.
- Volk, W. A. dan M. F. Wheeler. 1998. Mikrobiologi Dasar Jilid I. Jakarta : Erlangga.
- Wolken, W.A.M., J. Tramper and M.J van der Werf. 2003. What can spores can do for us?. *Trends in Biotechnology*. **21**(8):338-345.



- Wangka-orm, C., Deesenthum and V. Levatcharamas. 2014. Low Cost Medium for spore Production of *Bacillus* KKU02 and KKU03 and the effect of the produced spores on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* deMan). *Pakistan Journal of Biological Science*. **17** (8): 1015-1022.
- Yulianto, R., Y. T. Adiputra, Wardiyanto dan A. Setyawan. 2013. Perubahan jaringan organ ikan komet (*Carrasius auratus*) yang di infeksi dengan *A. hydrophila*. *E-jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **2** (1): 197-203.
- Zahran, E., E. Risha, F. A. Hamid, H. A. Mahgoub dan J. Ibrahim. 2014. Effects of dietary Astragalus polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ELSEVIER*. **38**: 149-157.
- Zhou, X., Z. Tian dan Y. Wang. 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiologi Biochem*. **36**: 501-509.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Bahan

a. Media Fermentasi

No	Nama Bahan	Jumlah
1.	CaCO ₃	0.3 gram
2.	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.00033 gram
3.	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.09 gram
4.	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.084 gram
5.	MnSO ₄ 2H ₂ O	0.12 gram
6.	Glukosa	10 gram
7.	Ekstrak yeast	14 gram
8.	Akuades	1 liter

b. Larutan Natt-Herric`s Stain

No	Bahan	Jumlah
1.	NaCl	3.88 gr
2.	Na ₂ SO ₄	2.50 gr
3.	Na ₂ HPO ₄	1.74 gr
4.	KH ₂ PO ₄	0.25 gr
5.	Formalin 40%	7.50 ml
6.	Cristal violet	0.10 gr

Sumber: Noga (2000).

Lampiran 2. Data Perhitungan Kepadatan Bakteri

a. Bakteri *B. firmus*

- Sel vegetatif

No	Media	Jumlah Kepadatan
1.	NB	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{125}{5} \times (25 \times 10^4) \times 10$ $\text{Jumlah Sel} = 6,2 \times 10^7 \text{ sel/mL}$
2.	Fermentasi	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{181}{5} \times (25 \times 10^4) \times 10$ $\text{Jumlah Sel} = 9,05 \times 10^7 \text{ sel/mL}$
3.	Hasil sentrifus	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{194}{5} \times (25 \times 10^4) \times 1000$ $\text{Jumlah Sel} = 9,7 \times 10^9 \text{ sel/mL}$
4.	Pakan	$\text{TPC} (n) = \frac{\sum C}{(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \dots} \times \text{Faktor Pengencer}$ $\text{TPC} (n) = \frac{205}{(1 \times n1) + (0,1 \times n2) + (0,01 \times n3) + (0,001 \times n4)} \times 10^7$ $\text{TPC} (n) = \frac{205}{1,111} \times 10^7$ $\text{TPC} (n) = 1,8 \times 10^9 \text{ CFU/gr}$

- Sel Spora

No	Media	Jumlah Kepadatan
1.	NB	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{125}{5} \times (25 \times 10^4) \times 10$ $\text{Jumlah Sel} = 6,2 \times 10^7 \text{ spora/mL}$
2.	Fermentasi	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{178}{5} \times (25 \times 10^4) \times 10$ $\text{Jumlah Sel} = 8,9 \times 10^7 \text{ spora/mL}$
3.	Hasil sentrifus	$\text{Jumlah Sel} = \frac{n}{\text{Jumlah Bidang Pandang}} \times (25 \times 10^4)$ $\text{Jumlah Sel} = \frac{54}{5} \times (25 \times 10^4) \times 1000$ $\text{Jumlah Sel} = 2,7 \times 10^9 \text{ spora/mL}$
4.	Pakan	$\text{TPC} (n) = \frac{\sum C}{(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \dots} \times \text{Faktor Pengencer}$ $\text{TPC} (n) = \frac{283}{(1 \times n1) + (0,1 \times n2) + (0,01 \times n3) + (0,001 \times n4)} \times 10^7$ $\text{TPC} (n) = \frac{283}{1,111} \times 10^7$ $\text{TPC} (n) = 2,5 \times 10^9 \text{ CFU/gr pakan}$



Lampiran 2. (Lanjutan)

b. Bakteri *A. hydrophilla*

- Hasil pengukuran nilai OD dan pengukuran jumlah koloni (TPC)

Ulangan (n)	Optical (nm) (x)	TPC (y)	x ²	y ²	xy
1	0,972	299	0,9448	89401	290,628
2	0,475	149,5	0,2256	22350,25	71,0125
3	0,388	74,75	0,1505	5587,5625	29,003
4	0,279	37,37	0,0778	1396,5169	10,4262
5	0,222	18,69	0,0493	349,3161	4,1492
6	0,144	9,34	0,0207	87,2356	1,345
Total	2,480	588,65	1,4688	119171,8811	406,5639
Rata-Rata	0,4133	98,1083	0,2448	19861,9802	67,7606

Mencari nilai b1;

$$b1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$b1 = \frac{406,5639 - \frac{2,480 \cdot 588,65}{6}}{1,4688 - \frac{(2,480)^2}{6}}$$

$$b1 = 367,9107$$

Mencari nilai b0;

$$b0 = \bar{y} - (b1 \cdot \bar{x})$$

$$b0 = 98,1083 - 367,9107 \cdot (0,4133)$$

$$b0 = -53,8352$$

Persamaan regresi linier yaitu $y = b1 \cdot x + b0$ sehingga didapatkan persamaan

$$y = 367,9107x - 53,8352.$$

Mencari nilai koefisien determinasi (R²)

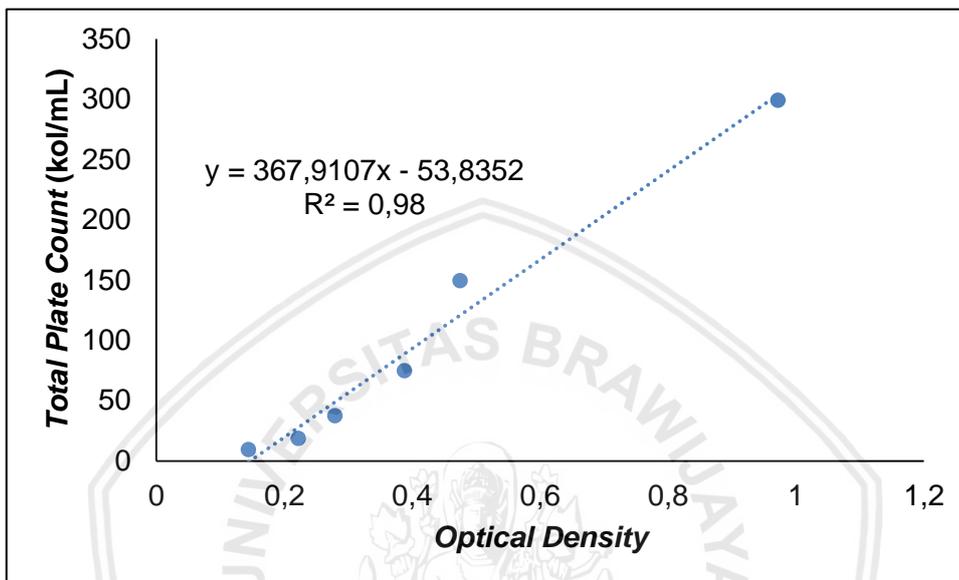
Yestimasi (b1.x + b0)	e (residual) (Yaktual – Yestimasi)	e ²
303,7740	-4,7740	22,7911
120,9224	28,5776	816,6802
88,9142	-14,1642	200,6232
48,8119	-11,4419	130,9167
27,8410	-9,1510	83,7404
-0,8561	10,1961	103,9596
TOTAL		1358,7112

$$R^2 = 1 - \frac{\sum e^2}{\sum (y_i - y_{\text{rerata}})^2}$$

$$R^2 = 1 - \frac{1358,7112}{[(299 - 98,1083) + (149,5 - 98,1083) + \dots + (9,34 - 98,1083)^2]}$$

$$R^2 = 0,98$$

- Hasil Kurva regresi bakteri *A. hydrophilla*



Keterangan;

Hasil korelasi (R^2) menunjukkan bahwa 98% adanya hubungan antara 2 variabel yang dibandingkan yaitu antara data OD dan data TPC.

$$y = 377,25(x) - 60,389$$

$$y = 377,25 (0,782) - 60,389$$

$$y = 234,6205 \times 10^8$$

$$y = 2,35 \times 10^{10}$$

Pengenceran $V1 \times N1 = V2 \times N2$

$$10^6 = \frac{10^6 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$$

$$10^6 = \frac{1}{2,35}$$

$$10^6 = 0,43 \text{ mL}$$

$$10^7 = \frac{10^7 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$$

$$10^7 = \frac{10}{2,35}$$

$$10^7 = 4,3 \text{ mL}$$

$$10^8 = \frac{10^8 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$$

$$10^8 = \frac{100}{2,35}$$

$$10^8 = 43 \text{ mL}$$

$$10^9 = \frac{10^9 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$$

$$10^9 = \frac{1000}{2,35}$$

$$10^9 = 430 \text{ mL}$$

- Perhitungan Hasil LD_{50}

$$\begin{aligned}\log LD_{50} &= \log D + \log d (f + 1) \\ \log LD_{50} &= \log 10^6 + \log 10 (0,75000 + 1) \\ \log LD_{50} &= 6 + 0 (0,75000 + 1) \\ \log LD_{50} &= 7,75 \\ LD_{50} &= 10^8 \text{ sel/mL}\end{aligned}$$



Lampiran 2. (Lanjutan)

- Tabel Untuk Menentukan Nilai “f” Dari Nilai “r” (jumlah hewan yang mati)

No	Nilai r	F	Delta f	Nilai r	f	Delta f
1.	0,0,2,4	1,00000	0,28868	0,1,3,3	0,66667	0,52116
2.	0,0,3,4	0,75000	0,25000	0,1,4,3	0,33333	0,35136
3.	0,0,4,4	0,50000	0,00000	0,2,2,3	0,66667	0,58794
4.	0,1,1,4	1,00000	0,35355	0,2,3,3	0,33333	0,52116
5.	0,1,2,4	0,75000	0,38188	0,2,4,3	0,00000	0,38490
6.	0,1,3,4	0,50000	0,35355	0,3,3,3	0,00000	0,47140
7.	0,1,4,4	0,25000	0,25000	1,0,3,3	1,00000	0,70711
8.	0,2,2,4	0,50000	0,40825	1,0,4,3	0,50000	0,35355
9.	0,2,3,4	0,25000	0,38188	1,1,2,3	1,00000	0,91287
10.	0,2,4,4	0,00000	0,28868	1,1,3,3	0,50000	0,79057
11.	0,3,3,4	0,00000	0,35355	1,1,4,3	0,00000	0,70711
12.	1,0,2,4	1,00000	0,38490	1,2,2,3	0,50000	0,88976
13.	1,0,3,4	0,66667	0,35136	1,2,3,3	0,00000	0,91287
14.	1,0,4,4	0,33333	0,22222	2,0,3,3	1,00000	1,41421
15.	1,1,1,4	1,00000	0,47140	2,0,4,3	0,00000	1,15470
16.	1,1,2,4	0,66667	0,52116	2,1,2,3	1,00000	1,82574
17.	1,1,3,4	0,33333	0,52116	2,1,3,3	0,00000	1,82574
18.	1,1,4,4	0,00000	0,47140	2,2,2,3	0,00000	2,00000
19.	1,2,2,4	0,33333	0,58794	0,0,4,2	1,00000	0,57735
20.	1,2,3,4	0,00000	0,60854	0,1,3,2	1,00000	0,91287
21.	2,0,2,4	1,00000	0,57735	0,1,4,2	0,50000	0,57735
22.	2,0,3,4	0,50000	0,57735	0,2,2,2	1,00000	1,00000
23.	2,0,4,4	0,00000	0,57735	0,2,3,2	0,50000	0,81650
24.	2,1,1,4	1,00000	0,70711	0,2,4,2	0,00000	0,57735
25.	2,1,2,4	0,50000	0,81650	0,3,3,2	0,00000	0,70711
26.	2,1,3,4	0,00000	0,91287	1,0,4,2	1,00000	1,15470
27.	2,2,2,4	0,00000	1,00000	1,1,3,2	1,00000	1,82574
28.	3,0,2,4	1,00000	1,15470	1,1,4,2	0,00000	1,41421
29.	3,0,3,4	0,00000	1,42421	1,2,2,2	1,00000	2,00000
30.	3,1,1,4	1,00000	1,41421	1,2,3,2	0,00000	1,82574
31.	3,1,2,4	0,00000	1,82574	0,2,3,1	1,00000	1,82574
32.	0,0,3,3	1,00000	0,47140	0,2,4,1	0,00000	1,15470
33.	0,0,4,3	0,66667	0,22222	0,3,3,1	0,00000	1,41421
34.	0,1,2,3	1,00000	0,60858	0,1,4,1	1,00000	1,41421

Sumber: Yulianto dan amaliyah (2017).



Lampiran 3. Data kualitas Air

No	Tanggal	Data	Suhu ($^{\circ}$ C)		Oksigen		pH	
			Terlarut (ppm)					
			Pagi	sore	pagi	Sore	Pagi	Sore
1.	9 Januari 2019	A1	25,7	26,8	5,3	5,4	5,67	8,3
		A2	25,7	26,6	4,2	4,6	5,74	8,3
		A3	25,0	26,5	4,2	4,4	5,86	8,3
		B1	24,7	26,4	4,6	4,9	5,92	8,3
		B2	24,9	26,1	4,2	4,4	6,09	8,2
		B3	25,1	25,7	4,0	4,2	5,37	8,3
		C1	24,9	25,6	4,8	5,9	5,66	8,4
		C2	25,0	25,5	4,6	5,7	5,96	8,3
		C3	25,0	25,6	4,5	4,6	5,74	8,4
2.	16 Januari 2019	A1	24,8	27,4	5,2	5,5	8,5	8,1
		A2	24,7	27,2	5,3	4,1	8,4	8,1
		A3	24,8	27,8	5,6	4,8	8,3	8,0
		B1	24,6	27,7	5,1	5,9	8,4	8,1
		B2	24,6	27,8	5,0	6,1	8,4	8,1
		B3	24,8	27,2	4,9	5,7	8,4	8,1
		C1	25,0	28,1	4,6	5,4	8,5	8,2
		C2	25,0	27,8	5,3	5,4	8,4	8,2
		C3	24,9	27,8	5,4	5,5	8,5	8,2
3.	23 Januari 2019	A1	25,0	27,0	4,9	5,5	7,3	7,7
		A2	25,0	26,8	5,9	6,2	7,3	7,5
		A3	25,5	27,0	4,5	5,4	7,2	7,3
		B1	25,3	26,9	5,5	5,1	7,4	7,5
		B2	25,3	26,8	4,9	4,7	7,2	7,3
		B3	25,2	26,9	4,9	4,5	7,3	7,4
		C1	25,4	26,9	5,0	4,4	7,5	7,6
		C2	25,3	26,7	5,0	4,3	7,1	7,4
		C3	25,3	26,7	4,8	4,5	7,0	7,3
4.	30 Januari 2019	A1	8,5	8,5	4,2	4,6	6,7	7,8
		A2	8,6	8,5	4,8	4,0	6,5	7,5
		A3	8,5	8,5	4,5	4,2	6,4	7,3

No	Tanggal	Data	Suhu (°C)		Oksigen		pH	
			Terlarut (ppm)					
			Pagi	sore	pagi	Sore	Pagi	Sore
		B1	8,6	8,4	4,3	5,0	7,5	6,4
		B2	8,5	8,2	4,5	5,7	7,3	6,5
		B3	8,5	8,4	4,3	5,7	6,4	6,3
		C1	8,5	8,6	5,0	5,8	6,3	7,3
		C2	8,5	8,5	5,0	5,4	6,2	7,2
		C3	8,4	8,4	4,7	5,4	6,2	7,2
5.	6 Februari 2019	A1	24,7	27,3	4,6	5,8	8,7	8,6
		A2	25,0	27,0	5,3	4,9	8,6	8,4
		A3	25,0	26,7	5,2	5,3	8,6	8,5
		B1	25,0	26,8	5,2	5,3	8,6	8,4
		B2	25,2	26,9	5,4	5,1	8,5	8,4
		B3	25,1	26,7	5,9	4,9	8,5	8,4
		C1	25,2	26,6	5,6	5,5	8,5	8,5
		C2	25,1	26,5	5,9	5,7	8,5	8,5
		C3	25,1	26,7	5,6	5,3	8,5	8,4
6.	13 Februari 2019	A1	24,4	27,5	6,6	7,2	8,7	8,3
		A2	25,1	27,0	5,5	7,2	8,6	8,3
		A3	25,0	26,7	5,8	5,9	8,7	8,4
		B1	24,8	26,7	6,3	6,3	8,6	8,3
		B2	24,8	26,7	6,3	5,9	8,6	8,3
		B3	24,5	27,0	6,3	6,3	8,5	8,3
		C1	24,7	26,9	6,3	5,9	8,5	8,2
		C2	24,7	26,7	5,8	6,1	8,5	8,3
		C3	24,6	26,7	6,2	6,0	8,5	8,2
7.	20 Februari 2019	A1	24,7	27,2	6,2	6,7	8,4	8,4
		A2	25,2	27,2	6,6	5,4	8,5	8,1
		A3	25,0	26,9	6,6	5,4	8,5	8,3
		B1	25,1	27,1	6,6	5,7	8,5	8,3
		B2	25,0	27,6	6,6	5,6	8,5	8,3
		B3	24,9	27,3	6,6	5,6	8,5	8,2
		C1	25,1	27,6	6,0	5,6	8,5	8,1



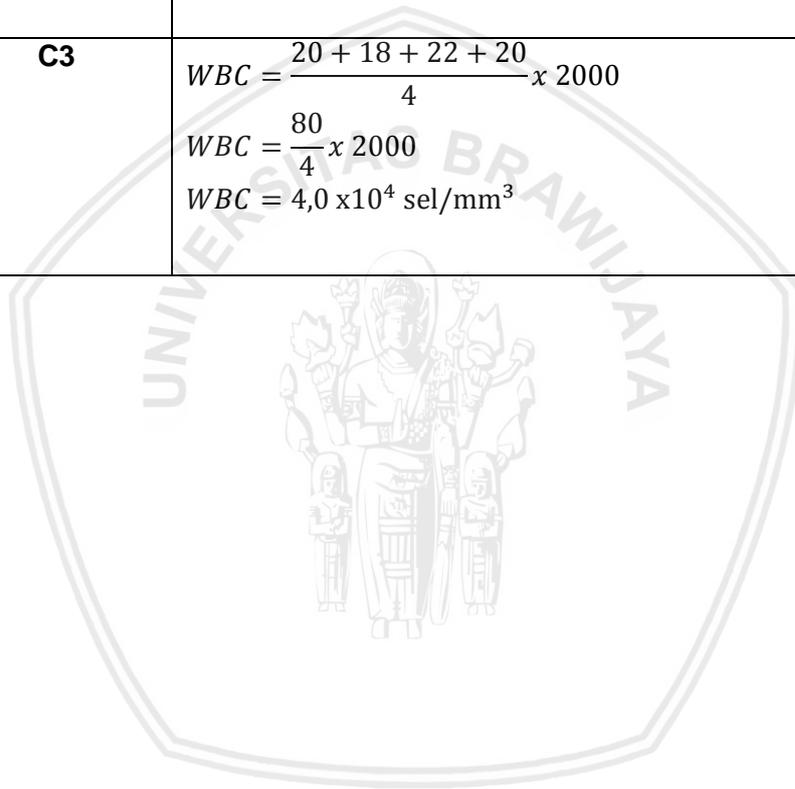
Lampiran 4. Data Perhitungan Uji Respon Imun Non Spesifik

a. Total Leukosit

No	Perlakuan	Hasil
1.	A1	$WBC = \frac{34 + 39 + 29 + 34}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{136}{4} \times 2000$ $WBC = 6,8 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
2.	A2	$WBC = \frac{35 + 39 + 32 + 35}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{141}{4} \times 2000$ $WBC = 7,05 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
3.	A3	$WBC = \frac{33 + 38 + 40 + 21}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{132}{4} \times 2000$ $WBC = 6,6 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
4.	B1	$WBC = \frac{40 + 45 + 39 + 38}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{162}{4} \times 2000$ $WBC = 8,1 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
5.	B2	$WBC = \frac{42 + 49 + 38 + 40}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{169}{4} \times 2000$ $WBC = 8,45 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
6.	B3	$WBC = \frac{41 + 39 + 40 + 46}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{166}{4} \times 2000$ $WBC = 8,3 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$



No	Perlakuan	Hasil
7.	C1	$WBC = \frac{19 + 20 + 22 + 17}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{78}{4} \times 2000$ $WBC = 3,9 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
8.	C2	$WBC = \frac{20 + 22 + 25 + 16}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{83}{4} \times 2000$ $WBC = 4,15 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$
9.	C3	$WBC = \frac{20 + 18 + 22 + 20}{4} \times 2000$ $WBC = \frac{80}{4} \times 2000$ $WBC = 4,0 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$



Lampiran 3. (Lanjutan)

b. Diferensiasi Leukosit

No	Perlakuan	Hasil
1.	A1	$Limfosit = \frac{80}{100} \times 100\%$
		$Limfosit = 79 \%$
		$Monosit = \frac{8}{100} \times 100\%$
		$Monosit = 8\%$
2.	A2	$Neutrofil = \frac{12}{100} \times 100\%$
		$Neutrofil = 12 \%$
		$Limfosit = \frac{80}{100} \times 100\%$
		$Limfosit = 80 \%$
3.	A3	$Monosit = \frac{8}{100} \times 100\%$
		$Monosit = 8 \%$
		$Neutrofil = \frac{12}{100} \times 100\%$
		$Neutrofil = 12 \%$
4.	B1	$Limfosit = \frac{79}{100} \times 100\%$
		$Limfosit = 79 \%$
		$Monosit = \frac{7}{100} \times 100\%$
		$Monosit = 7 \%$
4.	B1	$Neutrofil = \frac{14}{100} \times 100\%$
		$Neutrofil = 14 \%$
		$Limfosit = \frac{81}{100} \times 100\%$
		$Limfosit = 81 \%$
4.	B1	$Monosit = \frac{8}{100} \times 100\%$
		$Monosit = 8 \%$
		$Neutrofil = \frac{11}{100} \times 100\%$
		$Neutrofil = 11 \%$

No	Perlakuan	Hasil
		Neutrofil = 11 %
5.	B2	$Limfosit = \frac{81}{100} \times 100\%$
		Limfosit = 81 %
		$Monosit = \frac{7}{100} \times 100\%$
		Monosit = 7%
		Neutrofil = $\frac{12}{100} \times 100\%$
		Neutrofil = 12 %
6.	B3	$Limfosit = \frac{82}{100} \times 100\%$
		Limfosit = 82 %
		$Monosit = \frac{8}{100} \times 100\%$
		Monosit = 8 %
		Neutrofil = $\frac{10}{100} \times 100\%$
		Neutrofil = 10 %
7.	C1	$Limfosit = \frac{42}{55} \times 100\%$
		Limfosit = 76,36 %
		$Monosit = \frac{6}{55} \times 100\%$
		Monosit = 10,90 %
		Neutrofil = $\frac{5}{55} \times 100\%$
		Neutrofil = 9,09 %
8.	C2	$Limfosit = \frac{42}{55} \times 100\%$
		Limfosit = 76,36 %
		$Monosit = \frac{5}{55} \times 100\%$
		Monosit = 9,09 %
		Neutrofil = $\frac{6}{55} \times 100\%$
		Neutrofil = 10,90 %



No	Perlakuan	Hasil
9.	C3	$Limfosit = \frac{41}{55} \times 100\%$
		$Limfosit = 77,36\%$
		$Monosit = \frac{7}{55} \times 100\%$
		$Monosit = 12,72 \%$
		$Neutrofil = \frac{5}{55} \times 100\%$
		$Neutrofil = 9,09 \%$

c. Hematokrit

No	Perlakuan	Hasil
1.	A1	28%
2.	A2	29%
3.	A3	27%
4.	B1	30%
5.	B2	34%
6.	B3	31%
7.	C1	22%
8.	C2	23%
9.	C3	23%

d. Aktivitas Fagositosis

No	Perlakuan	Hasil
1.	A1	$Aktivitas Fagositik = \frac{80}{145} \times 100\%$
		$Aktivitas Fagositik = 55,17\%$
2.	A2	$Aktivitas Fagositik = \frac{150}{264} \times 100\%$
		$Aktivitas Fagositik = 56,81\%$

No	Perlakuan	Hasil
3.	A3	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{79}{145} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 54,48\%$
4.	B1	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{150}{256} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 58,59\%$
5.	B2	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{170}{275} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 61,81\%$
6.	B3	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{152}{253} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 60,07 \%$
7.	C1	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{49}{151} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 32,45 \%$
8.	C2	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{58}{152} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 38,16 \%$
9.	C3	$\text{Aktivitas Fagositik} = \frac{59}{151} \times 100\%$ $\text{Aktivitas Fagositik} = 39,07 \%$

Lampiran 5. Data Hasil Anova Aplikasi SPSS

- **Total Leukosit**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
		Perlakuan	WBC
N		9	
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	637 2.222
	Std. Deviation	.86603	18838.31055
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.15
	Positive	.209	.214
	Negative	-.209	-.215
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.644
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.801

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Total Leukosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.371	2	6	.705

ANOVA

Total Leukosit	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2819555555.556	2	1409777777.778	433.778	.000
Within Groups	19500000.000	6	3250000.000		
Total	2839055555.556	8			

Total Leukosit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	3.00	3	40166.6667		
	1.00	3		68166.6667	
	2.00	3			82833.3333
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Lampiran 5. (Lanjutan)

- **Limfosit**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Limfosit
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	78.9178
	Std. Deviation	.86603	2.56832
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.219
	Positive	.209	.174
	Negative	-.209	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.656
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.782

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Limfosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.025	2	6	.213

ANOVA

Limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	49.228	2	24.614	41.700	.000
Within Groups	3.542	6	.590		
Total	52.770	8			

Limfosit

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	3.00	3	75.7533		
	1.00	3		79.6667	
	2.00	3			81.3333
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- **Monosit**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Monosit
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	8.7478
	Std. Deviation	.86603	1.85396
	Absolute		
Most Extreme Differences	Positive	.209	.386
	Negative	.209	.386
		-.209	-.281
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	1.158
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.137

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Monosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.022	2	6	.078

ANOVA

Monosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.909	2	10.454	9.521	.014
Within Groups	6.588	6	1.098		
Total	27.497	8			

Monosit

	perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	1.00	3	7.6700	
	2.00	3	7.6700	
	3.00	3		10.9033
	Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- **Neutrofil**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Neutrofil
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	11.1200
	Std. Deviation	.86603	1.58810
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.179
	Positive	.209	.179
	Negative	-.209	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.536
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.936

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Neutrofil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.188	2	6	.833

ANOVA

Neutrofil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.326	2	6.663	5.836	.039
Within Groups	6.851	6	1.142		
Total	20.177	8			

Neutrofil

	perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	3.00	3	9.6933	
	2.00	3	11.0000	11.0000
	1.00	3		12.6667
	Sig.		.185	.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- Hematokrit

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Hematokrit
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	27.4444
	Std. Deviation	.86603	4.09607
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.194
	Positive	.209	.194
	Negative	-.209	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.583
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.886

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Hematokrit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.897	2	6	.132

ANOVA

Hematokrit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	122.889	2	61.444	32.529	.001
Within Groups	11.333	6	1.889		
Total	134.222	8			

Hematokrit

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3.00	3	22.6667		
1.00	3		28.0000	
2.00	3			31.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- **Aktifitas Fagositosis**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Aktifitas Fagositosis
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	50.7378
	Std. Deviation	.86603	11.01801
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.300
	Positive	.209	.189
	Negative	-.209	-.300
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.899
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.394

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Aktifitas Fagositosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.466	2	6	.100

ANOVA

Aktifitas Fagositosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	937.302	2	468.651	83.019	.000
Within Groups	33.870	6	5.645		
Total	971.173	8			

Aktifitas Fagositosis

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	3.00	3	36.5600	
	1.00	3		55.4900
	2.00	3		60.1633
	Sig.		1.000	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- **Respiratory Burst**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Respiratory Burst
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	.0589
	Std. Deviation	.86603	.02336
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.209
	Positive	.209	.208
	Negative	-.209	-.209
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.628
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.825

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Respiratory Burst

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.170	2	6	.051

ANOVA

Respiratory Burst

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	2	.002	7.692	.022
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.004	8			

Respiratory Burst

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	3	.0400	
1.00	3	.0523	
2.00	3		.0843
Sig.		.331	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. (Lanjutan)

- Kelulushidupan Ikan Nila

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Kelulushidupan
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	74.0744
	Std. Deviation	.86603	27.77867
	Absolute	.209	.269
Most Extreme Differences	Positive	.209	.175
	Negative	-.209	-.269
	Kolmogorov-Smirnov Z	.628	.807
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.532

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Kelulushidupan				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
.000	2	6	1.000	

ANOVA

Kelulushidupan					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3951.012	2	1975.506	5.334	.047
Within Groups	2222.222	6	370.370		
Total	6173.235	8			

Kelulushidupan

	perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	3.00	3	44.4433	
	1.00	3		88.8900
	2.00	3		88.8900
	Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

