

**APLIKASI EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) UNTUK PENGOBATAN IKAN MAS  
(*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**TESIS  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MAGISTER PASCASARJANA**

Oleh:

**SITTI KHAIRUL BARIYYAH  
NIM. 166080100011009**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



**APLIKASI EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) UNTUK PENGOBATAN IKAN MAS  
(*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**TESIS**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MAGISTER PASCASARJANA**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Magister Perikanan  
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**SITTI KHAIRUL BARIYYAH  
NIM. 166080100011009**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

TESIS

**APLIKASI EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) UNTUK PENGOBATAN IKAN MAS  
(*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

Oleh :

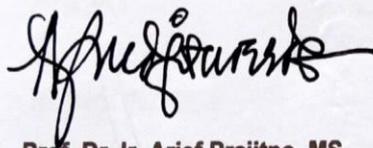
**SITTI KHAIRUL BARIYYAH**  
NIM. 166080100011009

Telah dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal 02 Juli 2019  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

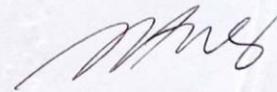
Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II



**Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS**  
NIP. 19550213 198403 1 001  
Tanggal: 16 JUL 2019



**Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua**  
NIP. 19750604 199903 2 002  
Tanggal: 16 JUL 2019

Mengetahui,

Dekan

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



**Prof. Dr. Ir. Happy Nusyam, MS**  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal: 16 JUL 2019

Ketua  
Program Magister

**Dr. I. Maftuch, M.Si**  
NIP. 19660825 199203 1 001  
Tanggal: 16 JUL 2019



**IDENTITAS TIM PENGUJI**

**JUDUL TESIS:**

**Aplikasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Untuk Pengobatan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila***

**Nama Mahasiswa : Sitti Khairul Bariyyah**

**NIM : 166080100011009**

**Program Studi : Budidaya Perairan**

**Minat Ilmu Studi : Penyakit dan Kesehatan Ikan**

**KOMISI PEMBIMBING**

**Ketua : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS**

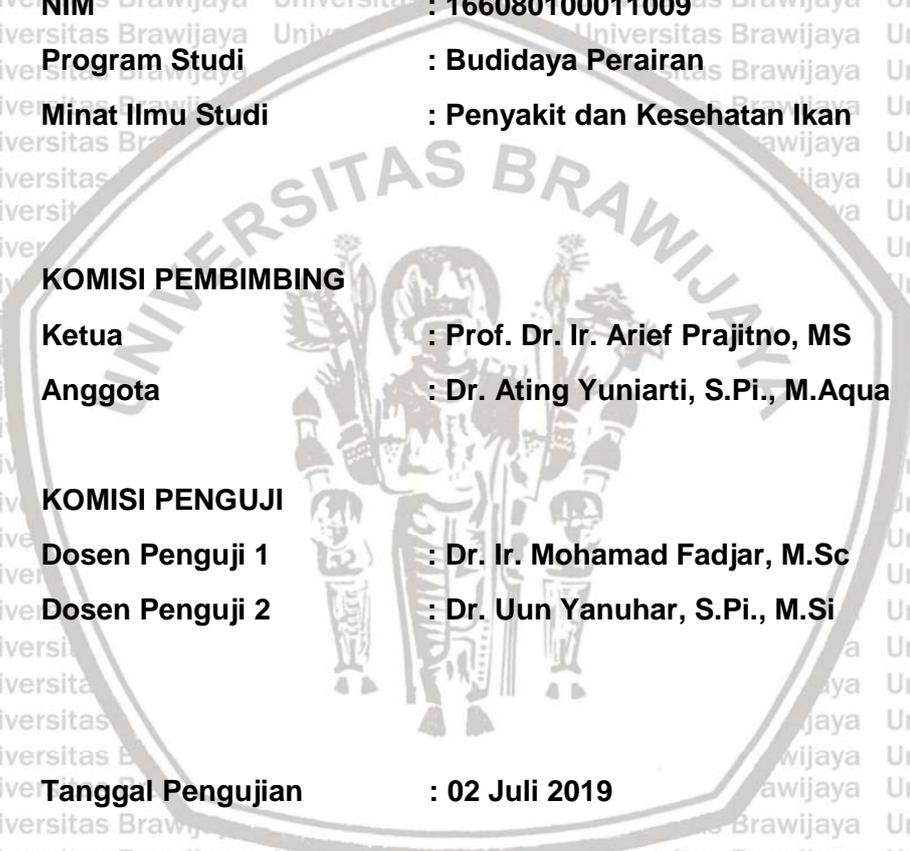
**Anggota : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua**

**KOMISI PENGUJI**

**Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**

**Dosen Penguji 2 : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si**

**Tanggal Pengujian : 02 Juli 2019**



### PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan Tesis ini terdapat unsur plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Juli 2019

Mahasiswa,



Sitti Khairul Bariyyah  
NIM.166080100011009

**RIWAYAT HIDUP**

**SITTI KHAIRUL BARIYYAH**, lahir di Jayapura pada tanggal 01 Juni 1989. Putri dari pasangan Bapak H. Husni Tayang (Alm) dan Ibu Hj. Hatidjah. Penulis menempuh pendidikan Sekolah Dasar di Madrasah Ibtidaiyah Nurul Huda Yapis Jayapura, Papua pada tahun 1995-2001 kemudian melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 5 Jayapura, Papua pada tahun 2001-2004 dan melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 2 Jayapura, Papua pada tahun 2004-2007. Penulis melanjutkan Pendidikan Strata 1 (S1/Sarjana) pada program studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Yapis Papua Jayapura, tahun 2007-2011. Pada tahun 2011, penulis mulai bekerja pada PT. Bank Danamon Indonesia Tbk Cabang Sentani, Papua sebagai Teller sampai dengan tahun 2013. Kemudian melanjutkan karir pada PT. Telekomunikasi Indonesia Witel Papua tahun 2013-2014 dan pada PT. Telkom Akses Area Papua 2014-2015. Tahun 2016 penulis mengikuti Program Pascasarjana (S2) Budidaya Perairan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Brawijaya, Malang.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT, karena kehendak dan ridha-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan tesis ini. Penulis sadari tesis ini tidak akan selesai tanpa doa, dukungan dan dorongan dari berbagai pihak. Adapun dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku Ketua Komisi Pembimbing atas segala arahan dan bimbingannya dari awal penyusunan proposal, selama pelaksanaan penelitian hingga akhir penyusunan laporan tesis ini.
2. Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua selaku Anggota Komisi Pembimbing yang telah memberikan masukan, arahan, nasehat dan bimbingan ilmu mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya laporan tesis ini.
3. Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.S, yang telah bersedia menjadi dosen penguji dan memberikan arahan serta masukan pada saat ujian proposal dan ujian tesis untuk kelengkapan tesis ini.
4. Kedua orang tua penulis ayahanda alm H. Husni Tayang dan ibunda Hj. Hatidjah serta segenap keluarga besar yang selalu mendukung, mendo'akan serta memberikan motivasi.
5. Annisa Farhana Dewi, Immaria Fransira dan Cucun Herlina selaku teman seperjuangan yang tanpa henti selalu memberikan dukungan, semangat dan sama-sama berjuang demi mendapatkan hasil yang terbaik dalam penulisan tesis.
6. Laboran Lab Parasit dan Kesehatan Ikan Universitas Brawijaya Malang dan Laboran Lab Kimia Organik UIN Malang yang selalu memberikan bantuan dan doa selama dalam pelaksanaan penelitian.
7. Rekan-rekan angkatan 2016 dan 2017 Program Magister Budidaya Perairan Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, atas dukungan, bantuan dan do'anya.

## RINGKASAN

**Sitti Khairul Bariyyah (166080100011009).** Aplikasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Untuk Pengobatan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua.**

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan ikan konsumsi air tawar yang cukup berkembang serta memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Untuk meningkatkan target produksi ikan mas (*C. carpio*) dilakukan berbagai sistem budidaya seperti dengan menerapkan sistem budidaya intensif. Pada proses budidaya intensif inilah mulai muncul beberapa masalah salah satunya adalah timbulnya penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) yang menyerang ikan mas karena disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penyakit ini dapat menimbulkan tingkat kematian ikan hingga mencapai 80-100% dalam waktu 1-2 minggu.

Salah satu alternatif yang dapat mengatasi serangan *A. hydrophila* adalah dengan penggunaan bahan alami yang dipercaya cukup efektif dan aman serta dapat menggantikan penggunaan antibiotik. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan kelopak bunga rosella yang memiliki aktivitas antibakteri. Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diketahui mengandung zat aktif antosianin dan flavonoid (*flavonol*, *cha-techin*, *proanthocyanidine*). Senyawa flavonoid tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri akibat dari terbentuknya kompleks flavonoid dengan struktur tertentu pada dinding sel bakteri, seperti adhesin, polipeptida dan enzim.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila* dan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap gambaran hematologi dan histopatologi insang ikan mas yang sehat, terinfeksi dan setelah diobati. Sehingga untuk mencapai tujuan tersebut 2 tahapan akan dilakukan, yaitu Tahap I ekstraksi dan isolasi senyawa pada kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang bersifat sebagai antibakteri *A. hydrophila* dan Tahap II, uji pemanfaatan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) pada pemeliharaan ikan mas skala laboratorium. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Parameter yang diamati yaitu karakterisasi senyawa ekstrak, hematologi, histopatologi insang, gejala klinis, kelulushidupan dan kualitas air.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada dosis 100,200,300,400 dan 500 mg/L masing – masing sebesar 7,12; 9,03;11,53; 13,25 dan 15,02 mm. Hasil uji fitokimia, FTIR dan UV – VIS menunjukkan ekstrak metanol kelopak bunga rosella memiliki kandungan senyawa fenolik yaitu golongan flavonoid (*flavonol*, antosianin) dan tanin. Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu memperbaiki eritrosit, hematokrit, hemoglobin, leukosit dan diferensial leukosit serta memperbaiki jaringan pada histopatologi insang ikan pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* secara signifikan ( $P<0,05$ ) dengan dosis terbaik pada perlakuan D (300 mg/L).

## SUMMARY

**Sitti Khairul Bariyyah (166080100011009).** Application of Rosella Petal Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) for the Treatment of Carp (*Cyprinus carpio*) Infected with *Aeromonas hydrophila*. Mentoring commission **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS** dan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua.**

---

Carp (*Cyprinus carpio*) is a freshwater consumption fish that is quite developed and has a high economic value. To increased the target of carp (*C. carpio*) production, various cultivation systems are carried out, such as by applying an intensive cultivation system. In this intensive cultivation process, several problems began to emerge, one of which was the emergence of MAS disease (*Motile Aeromonas Septicemia*) which attacked carp because *Aeromonas hydrophila* caused it. This disease can cause fish mortality to reach 80-100% within 1-2 weeks.

An alternative overcome the attack of *A. hydrophila* is by using natural ingredients that are believed to be quite effective and safe and can replace the use of antibiotics. One of the natural ingredients that can be used is rosella petals which have antibacterial activity. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower petals are known to contain anthocyanin and flavonoid active substances (*flavonol, catechin, proanthocyanidine*). These flavonoids can kill or inhibit bacterial growth due to the formation of flavonoid complexes with specific structures on bacterial cell walls, such as adhesin, polypeptides, and enzymes.

This study aims to determine the types of active compounds contained in extracts of rosella petals (*H. sabdariffa* L.) which are antibacterial against *A. hydrophila* and know the effect of giving rosella petals extract (*H. sabdariffa* L.) to hematological features and healthy, infected and after treatment of gill histopathology. So to achieve this goal two steps will be carried out, namely Phase I extraction and compound isolation on the rosella petals (*H. sabdariffa* L.) which are antibacterial *A. hydrophila* and Phase II, test the utilization of rosella petal extract (*H. sabdariffa* L.) on the maintenance of carp scale laboratory. The method used in this study was an experiment with a *Completely Randomized Design* (CRD). The parameters observed were the characterization of extract compounds, hematology, gill histopathology, clinical symptoms, survival, and water quality.

The results of this study indicate that rosella petal extract (*H. sabdariffa* L.) was able to inhibit the growth of *A. hydrophila* at doses of 100,200,300,400 and 500 mg/L each of 7.12; 9.03; 11.53; 13.25 and 15.02 mm. Phytochemical, FTIR and UV-VIS test results showed methanol extract of rosella flower petals containing phenolic compounds, namely flavonoids (flavonols, anthocyanins) and tannins. Rosella petal extract (*H. sabdariffa* L.) is able to improve erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, leukocytes and differential leukocytes and improve tissue in fish gill histopathology after *A. hydrophila* bacterial infection significantly ( $p < 0.05$ ) with the best dose of treatment D (300 mg/L).

**KATA PENGANTAR**

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Aplikasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Untuk Pengobatan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*". Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister (S2) pada Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih belum sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan. Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat dan menambah ilmu pengetahuan serta dapat memberikan informasi bagi berbagai pihak yang membutuhkan.

Penulis

DAFTAR ISI

|  |            |
|--|------------|
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....  | <b>i</b>   |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....  | <b>ii</b>  |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....   | <b>v</b>   |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....  | <b>vi</b>  |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....   | <b>vii</b> |
| <b>1. PENDAHULUAN</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 Latar Belakang .....   | 1          |
| 1.2 Rumusan Masalah .....  | 3          |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....  | 4          |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....   | 4          |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....   | <b>5</b>   |
| 2.1 Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                                    | 5          |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi .....                                      | 5          |
| 2.1.2 Habitat dan Penyebaran .....   | 6          |
| 2.1.3 Makan dan Kebiasaan Makan .....                                      | 6          |
| 2.2 Penyakit <i>Motile Aeromonas Septicemia</i> (MAS) .....                | 7          |
| 2.3 Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....                                     | 8          |
| 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi .....                                      | 8          |
| 2.3.2 Habitat dan Penyebaran .....   | 9          |
| 2.3.3 Mekanisme Invasi Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....                  | 9          |
| 2.3.4 Tingkat Virulensi .....  | 11         |
| 2.4 Tanaman Rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) .....                       | 12         |
| 2.4.1 Deskripsi Tanaman Rosella .....                                      | 12         |
| 2.4.2 Manfaat Tanaman Rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) .....             | 13         |
| 2.4.3 Bahan Aktif Tanaman Rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) .....         | 14         |
| 2.5 Ekstraksi Bahan Aktif .....  | 15         |
| 2.6 Metode Karakterisasi .....   | 16         |
| 2.6.1 Analisa Fitokimia .....  | 16         |
| 2.6.2 Analisa <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR) .....              | 16         |
| 2.6.3 Analisa Spektrofotometri <i>Ultraviolet – visible</i> (UV-VIS) ..... | 17         |
| 2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri .....                                      | 17         |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.8 Hematologi.....  | 19        |
| 2.8.1 Sel Darah Merah (Eritrosit).....                                 | 19        |
| 2.8.2 Hematokrit .....   | 20        |
| 2.8.3 Hemagloblin.....   | 21        |
| 2.8.4 Sel Darah Putih (Leukosit) .....                                 | 21        |
| 2.8.5 Diferensial Leukosit.....  | 22        |
| 2.9 Histopatologi Insang.....  | 24        |
| 2.10 Kualitas Air .....  | 25        |
| <b>3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>                              | <b>27</b> |
| 3.1 Landasan Teori.....  | 27        |
| 3.2 Kerangka Konsep .....  | 28        |
| 3.3 Hipotesis .....  | 29        |
| 3.4 Kerangka Operasional .....   | 29        |
| 3.5 Penelitian Terdahulu .....   | 31        |
| 3.6 Strategi Publikasi .....   | 32        |
| <b>4. METODE PENELITIAN.....</b>                                       | <b>33</b> |
| 4.1 Desain Penelitian .....  | 33        |
| 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....                                  | 33        |
| 4.3 Alat dan Bahan .....   | 34        |
| 4.3.1 Alat .....   | 34        |
| 4.3.2 Bahan .....  | 34        |
| 4.4 Metode Penelitian .....  | 36        |
| 4.5 Rancangan Penelitian .....   | 36        |
| 4.6 Parameter Uji .....  | 37        |
| 4.6.1 Parameter Utama.....   | 37        |
| 4.6.2 Parameter Penunjang .....  | 38        |
| 4.7 Tahapan Penelitian .....   | 38        |
| 4.7.1 Tahap I .....  | 38        |
| 4.7.2 Tahap II.....  | 43        |
| 4.8 Analisis Data .....  | 51        |
| <b>5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>                                    | <b>52</b> |
| 5.1 Penelitian Tahap I.....  | 52        |
| 5.1.1 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) ..... | 52        |
| 5.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri.....                                   | 53        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.1.3 Karakteristik Senyawa.....                                  | 55         |
| 5.1.4 Mekanisme Antibakteri Senyawa Aktif Metabolit Sekunder..... | 59         |
| 5.2 Penelitian Tahap II.....                                      | 59         |
| 5.2.1 Uji Toksisitas Ekstrak Kelopak Bunga Rosella.....           | 59         |
| 5.2.2 Uji Patogenitas <i>A. hydrophila</i> .....                  | 60         |
| 5.3 Hematologi.....   | 61         |
| 5.3.1 Sel Darah Merah (Eritrosit).....                            | 61         |
| 5.3.2 Hematokrit.....   | 64         |
| 5.3.3 Hemaglobin.....   | 67         |
| 5.3.4 Sel Darah Putih (Leukosit).....                             | 69         |
| 5.3.5 Diferensial Leukosit.....                                   | 71         |
| 5.4 Histopatologi Insang.....                                     | 79         |
| 5.5 Parameter Penunjang.....                                      | 84         |
| 5.5.1 Pengamatan Gejala Klinis.....                               | 84         |
| 5.5.2 Pengamatan Kualitas Air.....                                | 86         |
| 5.5.3 Kelulushidupan ( <i>Survival Rate</i> ).....                | 87         |
| <b>6. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>                               | <b>90</b>  |
| 6.1 Kesimpulan.....   | 90         |
| 6.2 Saran.....  | 90         |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>  | <b>91</b>  |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>105</b> |

DAFTAR GAMBAR

|  |    |
|--|----|
| <b>Gambar 1.</b> Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                                       | 5  |
| <b>Gambar 2.</b> Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....  | 8  |
| <b>Gambar 3.</b> Interaksi Bakteri dengan Sel Inang .....                                  | 10 |
| <b>Gambar 4.</b> Rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) .....                                  | 12 |
| <b>Gambar 5.</b> Target Senyawa Bioaktif .....   | 18 |
| <b>Gambar 6.</b> Kerangka Konseptual Penelitian .....                                      | 28 |
| <b>Gambar 7.</b> Kerangka Operasional Penelitian .....                                     | 30 |
| <b>Gambar 8.</b> Rancangan Penelitian .....  | 37 |
| <b>Gambar 9.</b> Pola Spektra FTIR .....   | 56 |
| <b>Gambar 10.</b> Hasil Analisis UV-VIS .....  | 58 |
| <b>Gambar 11.</b> Sel Eritrosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                        | 62 |
| <b>Gambar 12.</b> Histogram Perubahan Jumlah Rata-rata Eritrosit .....                     | 64 |
| <b>Gambar 13.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Hematokrit .....                     | 66 |
| <b>Gambar 14.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Hemaglobin .....                     | 69 |
| <b>Gambar 15.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Jumlah Sel Leukosit .....            | 71 |
| <b>Gambar 16.</b> Sel Neutrofil Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                        | 72 |
| <b>Gambar 17.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Neutrofil .....                      | 74 |
| <b>Gambar 18.</b> Sel Limfosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                         | 74 |
| <b>Gambar 19.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Limfosit .....                       | 77 |
| <b>Gambar 20.</b> Sel Monosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                          | 77 |
| <b>Gambar 21.</b> Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Monosit .....                        | 79 |
| <b>Gambar 22.</b> A. Insang Sehat; B. Insang terinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> ..... | 80 |
| <b>Gambar 23.</b> Histopatologi Insang Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....                 | 81 |
| <b>Gambar 24.</b> Histogram Kelulushidupan Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....             | 88 |



DAFTAR TABEL

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabel 1.</b> Penelitian terdahulu .....                               | 31 |
| <b>Tabel 2.</b> Desain Penelitian.....                                   | 33 |
| <b>Tabel 3.</b> Rendemen (gram) Ekstrak ( <i>H. sabdariffa</i> L.) ..... | 52 |
| <b>Tabel 4.</b> Hasil Uji <i>Co-culture</i> .....                        | 53 |
| <b>Tabel 5.</b> Hasil Uji Cakram.....                                    | 54 |
| <b>Tabel 6.</b> Hasil Uji Fitokimia .....                                | 55 |
| <b>Tabel 7.</b> Karakterisasi Panjang Gelombang Gugus .....              | 57 |
| <b>Tabel 8.</b> Spektrum UV Golongan Flavonoid Utama .....               | 58 |
| <b>Tabel 9.</b> Uji Toksisitas Ekstrak ( <i>H. sabdariffa</i> L.) .....  | 60 |
| <b>Tabel 10.</b> Uji Patogenitas Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....      | 61 |
| <b>Tabel 11.</b> Rata-rata Jumlah Sel Eritrosit .....                    | 63 |
| <b>Tabel 12.</b> Rata-rata Nilai Hematokrit.....                         | 65 |
| <b>Tabel 13.</b> Rata-rata Nilai Hemaglobin.....                         | 67 |
| <b>Tabel 14.</b> Rata-rata Jumlah Sel Leukosit.....                      | 69 |
| <b>Tabel 15.</b> Rata-rata Nilai Neutrofil .....                         | 73 |
| <b>Tabel 16.</b> Rata-rata Nilai Limfosit .....                          | 75 |
| <b>Tabel 17.</b> Rata-rata Nilai Monosit .....                           | 78 |
| <b>Tabel 18.</b> Hasil Scoring Kerusakan Insang.....                     | 82 |
| <b>Tabel 19.</b> Rata-rata Scoring Kerusakan Insang.....                 | 83 |
| <b>Tabel 20.</b> Pengamatan Gejala Klinis.....                           | 84 |
| <b>Tabel 21.</b> Parameter Kualitas Air.....                             | 86 |



**DAFTAR LAMPIRAN**

**Lampiran 1.** Foto Kegiatan Penelitian ..... 105

**Lampiran 2.** Sertifikat Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* ..... 106

**Lampiran 3.** Pengukuran Nilai OD dan Perhitungan Kepadatan Bakteri ..... 107

**Lampiran 4.** Surat Keterangan Identifikasi Kelopak Bunga Rosella ..... 108

**Lampiran 5.** Perhitungan Dosis Ekstrak Kelopak Bunga Rosella ..... 109

**Lampiran 6.** Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ..... 110

**Lampiran 7.** Hasil Uji Cakram ..... 111

**Lampiran 8.** Hasil Uji Fitokimia ..... 112

**Lampiran 9.** Hasil Uji Spektrofotometri *Ultraviolet – visible* (UV-VIS) ..... 113

**Lampiran 10.** EPA *Probhith Analysis* Toksisitas Ekstrak ..... 114

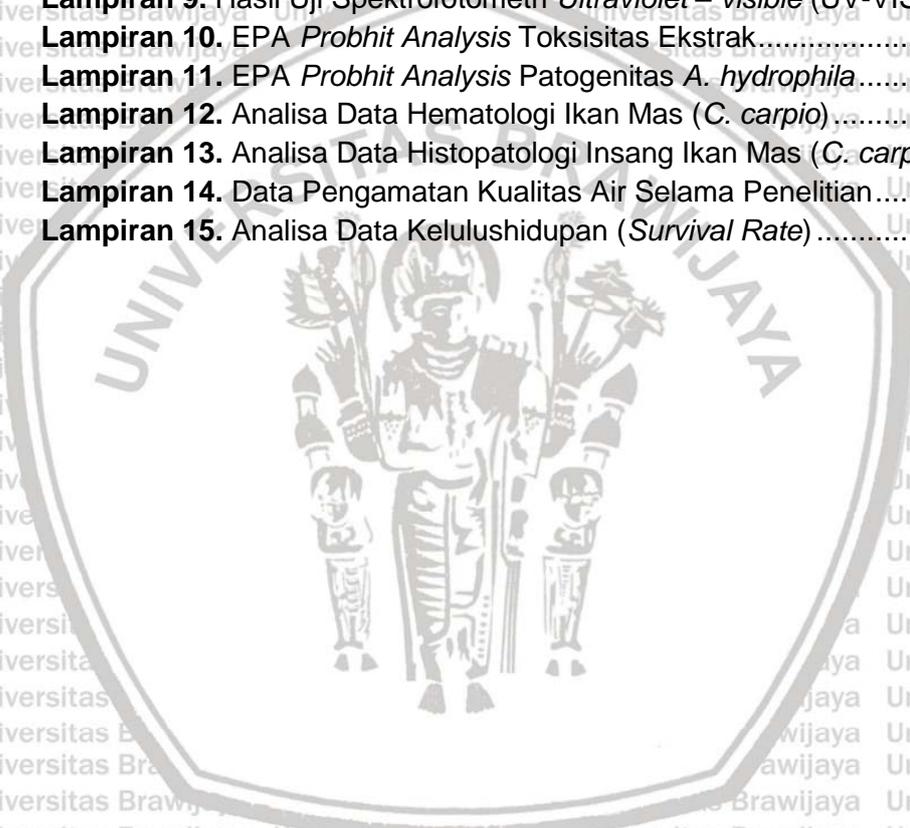
**Lampiran 11.** EPA *Probhith Analysis* Patogenitas *A. hydrophila* ..... 115

**Lampiran 12.** Analisa Data Hematologi Ikan Mas (*C. carpio*) ..... 116

**Lampiran 13.** Analisa Data Histopatologi Insang Ikan Mas (*C. carpio*) ..... 123

**Lampiran 14.** Data Pengamatan Kualitas Air Selama Penelitian ..... 125

**Lampiran 15.** Analisa Data Kelulushidupan (*Survival Rate*) ..... 127



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan mas (*C. carpio*) merupakan ikan konsumsi air tawar yang cukup berkembang, memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan berpotensi untuk dikembangkan lebih luas di Indonesia. Permintaan akan produk ikan mas segar cukup besar dan menjadi salah satu ikan favorit masyarakat Indonesia.

Pencapaian produksi ikan mas masih kurang dari target yang diharapkan dimana pada tahun 2016 target produksi 626.500 ton/tahun hanya terealisasi 498.297 ton/tahun, dan target sampai tahun 2019 adalah 785.800 ton/tahun (DJPB-KKP, 2017). Untuk memperoleh target produksi yang diharapkan maka dilakukan berbagai sistem budidaya seperti dengan menerapkan sistem budidaya intensif. Sistem ini menerapkan padat penebaran dan pemberian pakan yang tinggi sehingga berdampak pada menurunnya kualitas air budidaya akibatnya ikan lebih rentan terserang penyakit (Ronald, *et al.*, 2014).

Salah satu penyakit yang sering menyerang ikan mas (*C. carpio*) adalah penyakit *Motile aeromonas septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Adapun gejala-gejala penyakit ini antara lain nafsu makan yang berkurang, adanya luka-luka pada permukaan tubuh, terdapat pendarahan pada insang, perut membesar karena mengandung cairan, sisik lepas, sirip ekor rusak, dan jika dilakukan pembedahan maka akan terlihat adanya pembengkakan dan kerusakan pada jaringan hati, ginjal, dan limfa (Wahjuningrum, *et al.*, 2016).

Penyakit ini dapat menyebabkan kematian ikan hingga mencapai 80-100% dalam waktu 1-2 minggu (Maisyaroh, *et al.*, 2018). Telah dilaporkan bahwa wabah penyakit MAS terjadi di Pulau Sumatera, Pulau Kalimantan dan Pulau Jawa (Amanu, *et al.*, 2014).

Upaya umum yang dilakukan untuk menanggulangi penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* biasanya dilakukan pengobatan dengan bahan kimia seperti antibiotik, akan tetapi penggunaan antibiotik maupun bahan-bahan kimia dalam waktu yang lama dan secara terus menerus akan menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan munculnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang diberikan (Labh dan Shakya, 2014; Pratiwi, 2017). Anggraini, *et al.* (2017) menambahkan, pengaruh lain dari penggunaan bahan-bahan kimia/antibiotik ini dikhawatirkan akan menimbulkan residu dalam ikan dan membahayakan manusia yang mengkonsumsinya. Oleh karena itu, dibutuhkan bahan alternatif sebagai pengganti antibiotik dari bahan alami yang memiliki aktivitas antibakteri, aman digunakan, murah, dan tidak merugikan bagi pembudidaya dan konsumen ikan mas (*C. carpio*).

Salah satu bahan alami atau tanaman obat yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.). Tanaman ini memiliki potensi sebagai sumber bahan pangan fungsional, zat pewarna alami, antioksidan, dan sebagai agen antibakteri (Abdallah, 2016; Chang, *et al.*, 2014; Handarini, 2014). Kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) diketahui mengandung zat aktif antosianin dan flavonoid (*flavonol*, *cha-techin*, *proanthocyanidine*) (Faturrohan, 2012). Senyawa flavonoid tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri akibat dari terbentuknya kompleks flavonoid dengan struktur tertentu pada dinding sel bakteri, seperti adhesin, polipeptida dan enzim (Cowan, 1999). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) memiliki aktivitas antibakteri secara signifikan terhadap beberapa strain bakteri seperti *Micrococcus luteus*, *Serratia marseilles*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, dan *Bacillus cereus* (Abdallah, 2016; Olaleye, 2007).

Walaupun kajian tentang ekstrak kelopak bunga rosella sebagai antibakteri telah banyak dilakukan, namun pemanfaatannya dalam pengobatan ikan belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai senyawa aktif antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella dan aplikasinya terhadap bakteri *A. hydrophila* dilihat dari hematologi dan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*).

## 1.2 Rumusan Masalah

Permintaan pasar akan ikan mas (*C. carpio*) mengalami peningkatan yang cukup pesat, maka dilakukan sistem budidaya intensif untuk memenuhi permintaan tersebut. Adanya serangan penyakit menjadi hambatan dalam sistem budidaya. Selama ini upaya pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri dilakukan dengan cara menggunakan antibiotik yaitu obat-obatan yang memiliki bahan kimia. Penggunaan obat-obatan kimia menyebabkan efek samping bagi lingkungan dan juga bagi ikan mas (*C. carpio*). Oleh karena itu perlu dicari alternatif pengobatan penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* dengan menggunakan bahan alami yang lebih aman yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apa jenis senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila*?
2. Apakah pemberian senyawa aktif ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dapat mengobati hematologi dan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Menganalisis jenis senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila*.
2. Menganalisis pengaruh pemberian senyawa aktif ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap hematologi dan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* setelah diobati.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi bagi pembudidaya ikan mas khususnya tentang kemampuan kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) sehingga dapat membantu pembudidaya untuk meningkatkan produksinya. Penelitian ini juga diharapkan dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang pengobatan ikan.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*C. carpio*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan mas (*C. carpio*) menurut Saputra, (2011) adalah sebagai berikut:

Class : Osteichthyes

Sub Class : Actinopterygii

Ordo : Ostariophysi

Sub Ordo : Cyprinoidae

Family : Cyprinidae

Sub Family : Cyprininae

Genus : Cyprinus

Species : *Cyprinus carpio*



**Gambar 1.** Ikan Mas (*C. carpio*) (Saputra, 2011)

Ikan mas (*C. carpio*) seperti pada **Gambar 1**, mempunyai bentuk badan agak memanjang pipih ke samping (*compressed*), mulut berada di bagian tengah ujung kepala (terminal) serta dapat disembulkan. Bagian anterior mulut terdapat dua pasang sungut. Ujung dalam mulut memiliki gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) yang terbentuk atas tiga baris gigi geraham (Putri, *et al.*, 2014).

Secara umum hampir seluruh tubuh ikan mas (*C. carpio*) ditutupi sisik dan hanya sebagian kecil tidak ditutupi sisik. Sisik ikan mas berukuran relatif besar dan digolongkan ke dalam tipe sisik *cycloid* (lingkaran) dengan warna yang sangat beragam (Kordi, 2013). Sirip punggung (dorsal) berukuran relatif dengan bagian belakang berjari-jari keras dan di bagian akhir (sirip ketiga dan keempat) bergerigi. Sirip punggung ikan mas memanjang yang mana bagian permukaannya berada berseberangan dengan permukaan sirip perut (*ventral*).

Sirip dubur (anal) mempunyai ciri seperti sirip punggung, yaitu berjari keras dan

bagian akhirnya bergerigi (Mones, 2008). Garis rusuk atau gurat sisi (*linea lateralis*) ikan mas termasuk lengkap terletak di bagian tengah tubuh yang posisinya melintang dari tutup insang hingga ke ujung belakang pangkal ekornya (Amri dan Khairuman, 2008).

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Di alam ikan mas (*C. carpio*) merupakan salah satu ikan yang hidup di perairan tawar yang tidak terlalu dalam dan aliran air tidak terlalu deras, seperti di pinggiran sungai atau danau. Ikan mas (*C. carpio*) mampu hidup pada daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan air laut (dpl) dan pada suhu 25-30°C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas (*C. carpio*) terkadang masih dijumpai pada perairan payau atau di muara sungai yang mempunyai salinitas 25-30 ppt (Kardi, 2013).

Ikan mas (*C. carpio*) merupakan spesies yang akan tumbuh dengan baik pada tempat dengan ketinggian antara 150-1000 meter dpl dengan suhu antara 20-25°C. kemudian kondisi pH yang cocok untuk ikan mas adalah 7-8 (Anggraini 2008). Untuk penyebaran ikan mas (*C. carpio*) telah mencapai hampir seluruh dunia, walaupun produksi terbesar tetap di pegang cina yang merupakan asal dari ikan mas (Mantau dan Sudarty, 2011). Menurut Amri dan Khairuman, (2008) ikan mas (*C. carpio*) berasal dari Sungai Danube dan Laut Hitam namun ada juga yang mengatakan bahwa ikan mas berasal dari Cina dan Rusia.

### 2.1.3 Makan dan Kebiasaan Makan

Ikan mas (*C. carpio*) tergolong jenis omnivora, yakni ikan yang dapat memangsa berbagai jenis makanan, baik yang berasal dari tumbuhan maupun binatang renik, misalnya invertebrata air, udang-udangan renik, larva, serangga air, kerang-kerangan dan tanaman air. Ikan ini juga memakan berbagai jenis biji-bijian yang dicampurkan sebagai suplemen makanan buatan (*artificial foods*).

Sumber protein, vitamin, lemak, dan mineral sebagai sumber energi metabolisme tubuh dan pertumbuhan diperoleh dari makanan renek berupa plankton, yaitu plankton nabati (*phytoplankton*) dan plankton hewani (*zooplankton*). Karena ikan mas bersifat *filter feeder* maka ikan mas memakan hewan-hewan kecil yang bercampur lumpur kemudian menyaring makanan yang dapat dimanfaatkan dan mengeluarkan sisanya melalui mulut (Laili, 2007).

Ikan mas (*C. carpio*) memakan organisme benthik, seperti insekta air, larva insekta, cacing, moluska, dan *zooplankton*. Ikan mas biasanya menggali substrat dasar pada perairan yang keruh untuk mendapatkan makanannya. *Zooplankton* merupakan pakan alami ikan mas yang dominan terdapat di dalam kolam dimana kepadatan relatif tinggi. Ikan mas juga mampu memanfaatkan tangkai, daun-daunan, dan biji-bijian baik tanaman air maupun darat (Praseno, *et al.*, 2010)

## 2.2 Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS)

Menurut Lukistyowati dan Kurniasih (2011), penyakit yang biasanya menyerang ikan mas (*C. carpio*) adalah penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). Penyakit ini mengakibatkan pertumbuhan ikan mas mengalami gangguan dan bahkan menyebabkan kematian pada ikan mas. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* yang menyerang ikan mas.

Menurut Tambunan (2011), *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) merupakan penyakit pada ikan mas pada berbagai stadia yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Ikan yang terserang penyakit ini memiliki bercak merah pada insang, kulit dan organ bagian dalam. Penyakit ini umumnya tidak diobati kemudian menyebabkan penyebaran yang sangat luas dan kondisi yang sangat parah yaitu mengakibatkan kematian masal pada ikan mas.

## 2.3 Bakteri *A. hydrophila*

### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bakteri *A. hydrophila* menurut Efianda (2015), diklasifikasikan sebagai berikut:

Filum : Protophyta

Class : Schizomyecetes

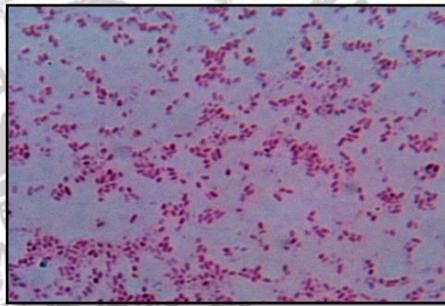
Ordo : Pseudomonodale

Sub Ordo : Pseudodineae

Family : Vibrionaceae

Genus : *Aeromonas*

Spesies : *Aeromonas hydrophila*



**Gambar 2.** Bakteri *A. hydrophila* (Dokumentasi Penelitian) Perbesaran 1000x

*A. hydrophila* pada **Gambar 2**, merupakan bakteri heterotrofik uniseluler, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan tidak adanya membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran 0,7 - 1,8 x 1,0 - 1,5  $\mu\text{m}$  dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel. Bakteri ini juga bersifat motil dengan flagella tunggal di salah satu ujungnya. Bakteri ini berbentuk batang sampai dengan kokus dengan ujung membulat, fakultatif anaerob, dan bersifat mesofilik dengan suhu optimum 20-30°C (Haryani, *et al.*, 2012). Prasetya, *et al.* (2017) menambahkan, morfologi koloni dari *A. hydrophila* yaitu: berwarna krem, elevasi cembung, dan tepiannya halus, sedangkan morfologi selnya berbentuk batang dan bersifat Gram negatif.

### 2.3.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *A. hydrophila* akan tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38°C-41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0°C-5°C dengan kisaran pH 5,5-9. Di daerah tropik dan subtropik penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya muncul pada musim kemarau pada saat kandungan bahan organik tinggi. Dikarenakan adanya bakteri *A. hydrophila* ini akan menimbulkan banyak kerugian yang sangat besar karena menyebabkan kematian ikan secara massal, suhu yang tinggi dan bahan organik yang tinggi dapat menimbulkan stress ikan sehingga mudah terserang penyakit (Afrianto dan Liviawaty, 2015).

*A. hydrophila* merupakan bakteri yang secara normal ditemukan dalam air tawar. Bakteri *A. hydrophila* dapat bertahan dalam lingkungan aerob maupun anaerob dan dapat mencerna material-material seperti gelatin dan hemoglobin. *A. hydrophila* resisten terhadap *chlorine* serta suhu yang dingin (faktanya dapat bertahan dalam temperatur rendah  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ), tetapi setidaknya hanya dalam waktu 1 bulan. Sebagian besar isolat *A. hydrophila* mampu tumbuh dan berkembang biak pada suhu 37°C dan tetap motil pada suhu tersebut. Disamping itu, bakteri *A. hydrophila* mampu tumbuh pada kisaran pH 4,7 - 11 (Haryani, *et al.*, 2012).

### 2.3.3 Mekanisme Invasi Bakteri *A. hydrophila*

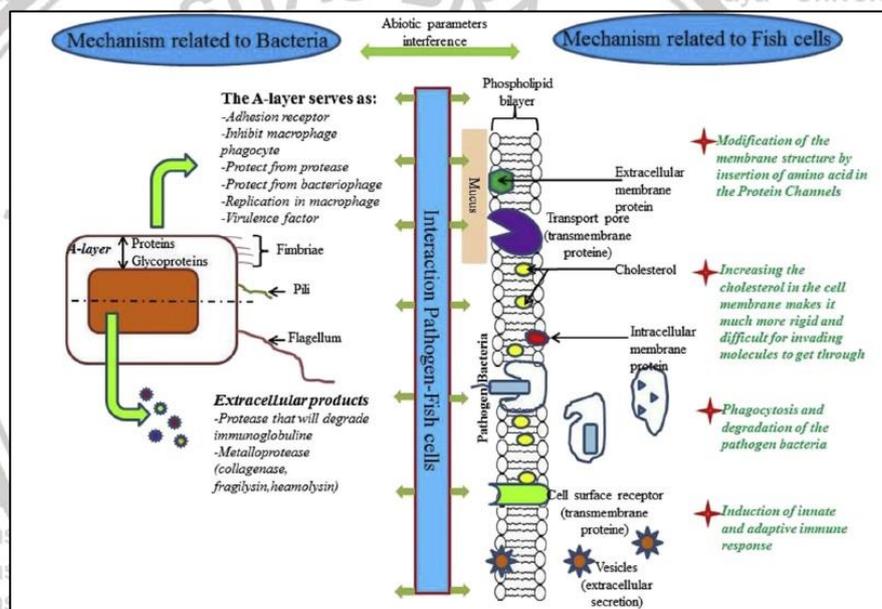
*A. hydrophila* sebelum melakukan infeksi, terlebih dahulu melakukan penempelan menggunakan flagel ke dalam *host cell*. Interaksi antara bakteri patogen dengan sel inang terjadi dalam suatu mekanisme yang disajikan pada

**Gambar 3.** Secara umum, bakteri akan masuk ke dalam sel inang dengan melibatkan beberapa komponen seperti *survace layer* (A-layer), fimbriae serta pili. *Survace layer* (A-layer) ini merupakan bagian lapisan eksternal yang berfungsi untuk penempelan atau adhesi pada inang, serta memberikan perlindungan terhadap fagositosis. Selain itu, tingkat patogenisitas dan virulensi

juga bergantung pada produk ekstraseluler (ECP). ECP terdiri dari protease yang akan memfasilitasi penyebaran bakteri, sehingga merusak protein inang untuk menyediakan nutrisi yang tersedia untuk pertumbuhan bakteri (Hamed, *et al.*, 2018).

Perlekatan bakteri pada permukaan kulit inang terjadi dalam dua tahap.

Tahap pertama, bakteri akan berdekatan untuk memungkinkan keterikatan awal terjadi. Tahap selanjutnya dalam proses adalah perlekatan sel yang tidak dapat diubah pada permukaan, dimana bakteri yang mengunci ke permukaan dengan memproduksi *exo-polysaccharides* (EPSs) atau ligan spesifik, seperti pili atau fimbriae yang rumit dengan permukaannya (Benhamed, *et al.*, 2014).



**Gambar 3.** Interaksi Bakteri dengan Sel Inang (Hamed, *et al.*, 2018)

Interaksi seluler dan sitotoksitas merupakan bagian dari proses infeksi.

Produksi enzim ekstraseluler oleh bakteri *A. hydrophila* akan meningkatkan produksi dari sel permukaan atau faktor ekstraseluler yang diperlukan untuk adhesi optimal pada sel inang. Selain itu juga memainkan peran penting dalam pertahanan terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) dengan mengatur enzim yang terlibat dalam detoksifikasi ROS (Zhou, *et al.*, 2015).

### 2.3.4 Tingkat Virulensi

Umumnya *A. hydrophila* menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh ikan disertai dengan pendarahan pada organ dalam. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi dan dapat mengakibatkan kematian ikan mencapai 80-100 % serta (Maisyaroh, *et al.*, 2018). Patogenisitas yang ditunjukkan cukup bervariasi, yaitu berkisar antara  $10^6$ - $10^8$  sel/ml (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010).

*A. hydrophila* yang pathogen memproduksi faktor-faktor eksotoksin dan endotoksin, yang sangat berpengaruh pada patogenitas bakteri ini. Eksotoksin merupakan hasil ekskresi bakteri *A. hydrophila* pada fase pertumbuhan yang berupa elemen protein terlarut, sedangkan endotoksin merupakan toksin yang terdapat pada dinding sel bakteri yang sangat erat kaitannya dengan lipopolisakarida/penyusun membran terluar bakteri gram negatif (Triyaningsih, *et al.*, 2014).

*A. hydrophila* menghasilkan toksin berupa *haemolysin* dan *aerolysin* yang bersifat berbahaya, *haemolysin* yaitu toksin yang mampu melisis sel-sel darah merah dan membebaskan hemoglobinnnya. *Aerolysin* merupakan bagian dari elemen protein terlarut ekstraseluler yang memiliki sifat hemolitik dan sitolitik. Toksin ini akan mengikat glikoprotein yang berada dipermukaan sel eukariot dan kemudian masuk kedalam lapisan lemak. Toksin tersebut kemudian membentuk sebuah lubang dan memasuki membran sebagai suatu preprotoksin yang memiliki kandungan peptida. *Aerolysin* ini akan menyebabkan gastroenteritis dan juga menyerang sel – sel epitel (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

## 2.4 Tanaman Rosella (*H. sabdariffa* L.)

### 2.4.1 Deskripsi Tanaman Rosella

Menurut Suwandi (2012), *H. sabdariffa* L. disebut dengan Rosella. Rosella di daerah Sunda dikenal dengan nama gamel walanda, di Ternate dengan nama kasturi rortha, di Jawa Tengah dengan nama mrambos ijo, di Padang dengan nama asam jarot dan di Sumatra Selatan dengan nama kasew jawe. Tanaman rosella merupakan tanaman semak tegak tinggi berakar tunggang yang mampu tumbuh mencapai 3-5 m baik di daerah tropis maupun subtropis. Tanaman rosella mempunyai habitat asli di daerah yang terbentang dari India hingga Malaysia namun sekarang telah tersebar luas di seluruh wilayah tropis dunia (Bakti Husada, 2001). Adapun taksonomi dan morfologi tanaman rosella menurut Mardiah, *et al.* (2009) disajikan pada **Gambar 4** berikut ini.

|         |                                 |
|---------|---------------------------------|
| Kingdom | : Plantae                       |
| Divisi  | : Spermatophyta                 |
| Class   | : Dicotyledoneae                |
| Ordo    | : Malvaceales                   |
| Family  | : Malvaceae                     |
| Genus   | : Hibiscus                      |
| Species | : <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. |



**Gambar 4.** Rosella (*H. sabdariffa* L.); (1) Batang, (2) Daun, (3) Kelopak Bunga (Lawren, 2014)

Tanaman rosella berkembang biak dengan biji serta dapat tumbuh di semua jenis tanah, tetapi paling cocok pada tanah yang subur dan gembur. Tumbuhan ini dapat tumbuh di daerah pantai sampai daerah dengan ketinggian 900 m di atas permukaan laut (Daryanto, 2008). Rosella memiliki batang berkayu bulat dan tegak dengan percabangan simpodial dan berwarna kemerahan. Daunnya tunggal berseling berbentuk bulat telur dengan ujung yang runcing, tepi berlinggit, pangkal berlekuk dengan pertulangan daun menjari. Daun rosella memiliki lebar 5-8 cm, panjang 5-15 cm dengan tangkai berukuran 4-7 cm, penampang bulat dan berwarna hijau (Bakti Husada, 2001).

Bagian dari tanaman rosella yang paling sering dimanfaatkan adalah kelopak bunganya. Rosella mulai berbunga pada umur 2-3 bulan, dan dapat dipanen setelah berumur 5-6 bulan (Daryanto, 2008). Bunganya berwarna merah terletak di ketiak daun dan tunggal, dengan kelopak terdiri dari 8-11 daun kelopak berukuran 1 cm, berbulu, dan pangkal berlekatan (Devi, 2009). Mahkota bunga rosella berbentuk corong dengan 5 daun mahkota berukuran 3-5 cm. Tangkai sari pendek dan tebal yang panjangnya  $\pm$  5 mm, sedangkan putik berbentuk tabung dengan warna merah atau kuning (Hidayat, 2007).

#### 2.4.2 Manfaat Tanaman Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Tanaman rosella merupakan salah satu tanaman obat tradisional, memiliki potensi sebagai sumber bahan pangan fungsional, antioksidan, antibakteri, zat pewarna alami serta pemanfaatan dalam bidang kesehatan (Abdallah 2016; Chang, *et al.*, 2014; Lin, *et al.*, 2007). Menurut Tina (2009), tanaman rosella berkhasiat sebagai diuretik (melancarkan air seni), antiseptik, menurunkan panas, meluruhkan dahak, antiradang, antihipertensi, antibakteri, anti kejang, anti kanker, dan memperlancar buang air besar (menstimulasi gerak peristaltik usus).

Alaga, *et al.* (2014) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak rosella memiliki aktivitas antimikroba yang ditunjukkan dengan aktivitasnya terhadap beberapa patogen uji seperti pada disentri, penyakit diare, serta infeksi mulut dan gigi. Selain itu, efek farmakologi dari rosella antara lain sebagai antimikroba, antihipertensi, antikanker, *Hypocholesterolemic* dan antioksidan (Alaga, *et al.*, 2014; Arellano, *et al.*, 2007; Hirunpanich, *et al.*, 2006; Garcia, *et al.*, 2008).

Penelitian lainnya dilakukan oleh Olaleye (2007) bahwa ekstrak air-metanol rosella herbal kering juga menunjukkan efek penghambatan *in vitro* terhadap beberapa strain bakteri, seperti *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia mascences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *K. pneumonia*, *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas fluorescense*.

#### 2.4.3 Bahan Aktif Tanaman Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Kandungan kimia kelopak bunga rosella terdiri dari asam organik, senyawa fenol, flavonoid dan antosianin (Maryani, 2005). Zat-zat tersebut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Sasmita, *et al.*, 2007). Ekstrak etanol kelopak bunga rosella terbukti memiliki kandungan kimia alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Rostinawati, 2009). Kandungan senyawa flavonoid yang dimiliki ekstrak kelopak bunga rosella berperan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri akibat dari terbentuknya kompleks flavonoid dengan struktur tertentu pada dinding sel bakteri, seperti adhesin, polipeptida dan enzim (Cowan, 1999). Mongole dan Chaturvedi (2011), menambahkan bahwa senyawa tanin juga berperan dalam aktivitas antibakteri dalam ekstrak rosella herbal, yaitu menurunkan proliferasi bakteri dengan menghambat aktivitas enzim pada metabolisme bakteri.

## 2.5 Ekstraksi Bahan Aktif

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Komponen yang dipisahkan dengan ekstraksi dapat berupa padatan atau cairan. Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada beberapa faktor antara lain; tujuan dilakukan ekstraksi, skala ekstraksi, sifat-sifat komponen yang akan diekstrak dan sifat-sifat pelarut yang akan digunakan. Ada beberapa metode umum ekstraksi yang dapat dilakukan yaitu ekstraksi dengan pelarut, distilasi, *supercritical fluid extraction* (SFE), pengepresan mekanik dan sublimasi. Di antara metode-metode yang telah diaplikasikan, metode yang banyak digunakan adalah distilasi dan ekstraksi menggunakan pelarut (Houghton dan Rahman, 1998; Prakosa, 2015).

Prinsip metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu, kemudian diikuti dengan pemisahan dari bahan yang telah diekstrak (Houghton dan Rahman, 1998; Prakosa, 2015). Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Hasil ekstraksi yang diperoleh akan tergantung pada kandungan komponen yang terdapat pada sampel dan jenis pelarut yang dipakai. Prinsip kelarutan yang dipakai dalam metode ekstraksi ini adalah *like dissolve like* artinya suatu senyawa akan larut dalam pelarut yang sama tingkat kepolarannya. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah selektifitas, kemampuan untuk mengestrak, toksisitas, kemudahan untuk diupkan dan harga pelarut (Ahmad, 2006). Jenis dan mutu pelarut yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Metode ekstraksi yang paling

sederhana adalah maserasi. Maserasi merupakan perendaman bahan dalam suatu pelarut yang dapat menghasilkan ekstrak dalam jumlah banyak serta terhindar dari perubahan kimia senyawa-senyawa tertentu karena pemanasan (Pratiwi, 2009). Pelarut yang biasa digunakan untuk ekstraksi senyawa bioaktif dari bunga, daun, biji, akar, dan bagian lain dari tanaman adalah etil asetat, heksana, kloroform, eter, benzena, toluena, etanol, metanol, isopropanol, aseton, dan air (Mukhopadhyay, 2002).

## **2.6 Metode Karakterisasi**

### **2.6.1 Analisa Fitokimia**

Uji fitokimia merupakan suatu pemeriksaan golongan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia tumbuhan. Uji tersebut dapat digunakan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu dalam tumbuhan untuk dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya sehingga dapat membantu langkah-langkah fitofarmakologi (Farnsworth, 1966).

Uji fitokimia penting dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam suatu tanaman yang sedang diteliti. Faktor yang berperan penting dalam uji fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Uji fitokimia dilakukan dengan melihat pengujian reaksi warna yang terjadi menggunakan suatu pereaksi warna (Kristanti, *et al.*, 2008).

### **2.6.2 Analisa Fourier Transform Infra Red (FTIR)**

FTIR merupakan salah satu instrumen yang menggunakan prinsip spektroskopi. Spektroskopi adalah spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Prosedur analisis menggunakan FTIR seperti dilakukan dengan cara mengambil sejumlah ekstrak yang telah dikeringkan kemudian dicampurkan secara seragam dengan KBr membentuk pelet. Spektrum FTIR dibuat menggunakan

spektrofotometer FTIR Tensor 37 (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Jerman) dengan detektor DTGS (deuterated triglycine sulphate) di daerah inframerah tengah ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) pada resolusi  $4 \text{ cm}^{-1}$  dengan jumlah payar 32 yang dioperasikan dengan peranti lunak OPUS versi 4.2 (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Jerman). Spektrum FTIR dalam format OPUS disimpan dalam format Data Point Table (DPT) (Purwakusumah, *et al.*, 2014).

### 2.6.3 Analisa Spektrofotometri Ultraviolet – visible (UV-VIS)

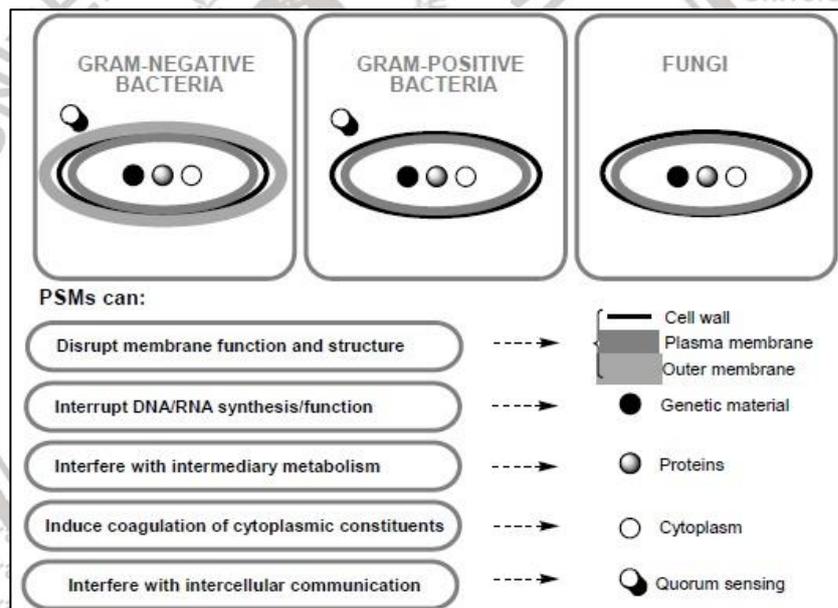
Spektrofotometri merupakan salah satu cabang analisis instrumental yang mempelajari interaksi antara atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik. Salah satu penggunaan spektrofotometri UV-VIS yakni dapat menentukan kandungan kimiawi suatu bahan dengan mengukur transmittan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang (Abdullah, 2005).

Radiasi ultraviolet dan sinar tampak diabsorpsi oleh molekul organik aromatik, molekul yang mengandung electron  $\pi$  terkonjugasi dan atau atom yang mengandung electron  $n$ , menyebabkan transisi elektron di orbital terluarnya dari tingkat energi elektron dasar ke tingkat energi elektron tereksitasi lebih tinggi sehingga terbentuk pipa spektrum (Satiadarma, 2002). Ditambahkan oleh Ginandjar, *et al.* (2011) bahwa panjang gelombang sinar UV berkisar antara 200 hingga 400 nm. Sinar tampak (UV-VIS) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Besarnya serapan radiasi sebanding dengan banyaknya molekul analit yang mengabsorpsi sehingga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

### 2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri

Senyawa bioaktif pada tanaman yang bersifat antibakteri dapat mempengaruhi sel mikroba dengan cara yang berbeda-beda. Menurut Wu, *et al.* (2016) interaksi beberapa kelompok senyawa di bilayer lipid sel bakteri, dapat mengganggu interaksi lipid-protein dan meningkatkan permeabilitas membran,

yang selanjutnya menyebabkan perubahan dalam struktur membran dan mempercepat kebocoran intraseluler. Kemudian senyawa tersebut berdifusi ke dalam yang diduga berinteraksi dengan membran sel sitoplasma luar dan dalam, dan mengakibatkan peningkatan permeabilitas atau disintegrasi sel bakteri. Interaksi lainnya juga menyebabkan adanya interupsi seperti yang disajikan pada **Gambar 5**, yaitu interupsi sintesis ATP, dimana senyawa tertentu dapat mengganggu translokasi proton yang melintasi membran. Hilangnya ATP menyebabkan penurunan transpor aktif dan sebagai konsekuensi tambahan yaitu penghambatan respirasi. Selain itu juga akan mengganggu fungsi DNA / RNA, induksi koagulasi konstituen sitoplasma dan gangguan komunikasi sel normal (*quorum sensing*, QS) (Radulovic, *et al.*, 2013).



**Gambar 5.** Target Senyawa Bioaktif (Radulovic, *et al.*, 2013)

Pada sistem QS, senyawa antibakteri akan mengganggu *autoinducer* dari dan pembentukan biofilm tanpa menghambat pertumbuhan bakteri. Dimana terjadi penurunan signifikan dalam pembentukan yang diamati biofilm diamati. Hal ini dikarenakan terjadi penghambatan sintesis selulosa, pembentukan dan fungsi flagela, dan pensinyalan sel-ke-sel (Vasconcelos, *et al.*, 2018).

## 2.8 Hematologi

Hematologi adalah cabang ilmu fisiologi yang mempelajari struktur, fungsi dan penyakit darah, serta mempelajari jaringan tubuh dan organ yang membentuk bagian-bagian darah (Rifai, 2002). Hematologi membahas hal-hal seperti sel-sel darah merah sebagai pengangkut oksigen, sel-sel darah putih untuk memerangi kuman, trombosit untuk penggumpalan darah dan banyak unsur lainnya. Ada ratusan pemeriksaan mikroskopik dan tes kimiawi terhadap darah, tergantung pada penyakit yang dicurigai.

Darah ikan tersusun atas cairan plasma dan sel-sel darah yang terdiri dari sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan keping darah (trombosit). Di dalam plasma darah terkandung garam-garam anorganik (natrium klorida, natrium bikarbonat dan natrium fosfat), protein (dalam bentuk albumin, globulin dan fibrinogen), lemak (dalam bentuk lesitin dan kolesterol) serta zat-zat lain misalnya hormon, vitamin, enzim dan nutrient. Darah ikan tersusun dari sari sel-sel darah yang tersuspensi di dalam plasma dan diedarkan ke seluruh jaringan tubuh (Utami, *et al.*, 2013).

### 2.8.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Eritrosit adalah sel darah yang sangat berlimpah pada vertebrata dengan pengecualian pada mamalia, tetap ternukleasi sepanjang siklus hidup. Fungsi utama yang terkait dengan sel darah merah ini adalah pertukaran gas (pernafasan) dan sebagai kekebalan tubuh (Monera dan Simon, 2011).

Eritrosit merupakan sel dengan jumlah yang paling banyak mencapai  $4 \times 10^6$ , jumlah eritrosit dipengaruhi oleh stress dan suhu lingkungan. Berkurangnya jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit juga disebabkan terjadinya anemia pada ikan. Anemia berdampak pada terhambatnya pertumbuhan ikan, karena rendahnya jumlah eritrosit menyebabkan suplai

makanan ke sel, jaringan dan organ akan berkurang sehingga proses metabolisme ikan menjadi terhambat (Farouq, 2011).

Fungsi utama eritrosit adalah untuk mentransport oksigen yang terikat oleh hemoglobin dan berfungsi sebagai pengkatalis reaksi dengan karbondioksida karena mengandung asam karbonat dalam jumlah banyak dan mentransport CO<sub>2</sub> dari jaringan ke insang (Bijanti, 2005). Sel darah merah ikan dewasa biasanya berbentuk oval dengan diameter 7-46  $\mu$ . Jumlah eritrosit ikan teleostei berkisar antara  $1.05 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> dan  $3 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> (Matofani, *et al.*, 2013). Menurut Moyle dan Cech (2004) jumlah eritrosit ikan mas (*C. carpio*) adalah  $1.43 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Sedangkan menurut Alifuddin (1993), jumlah eritrosit ikan mas (*C. carpio*) berkisar antara  $2 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>.

### 2.8.2 Hematokrit

Hematokrit adalah perbandingan volume sel darah dengan plasma darah yang dapat digunakan untuk menunjukkan tingkat kesehatan dari ikan yang diamati. Putra, *et al.* (2015), memaparkan bahwa nilai hematokrit ikan mas (*C. carpio*) yang normal berkisar antara 28 – 40 %. Jika nilai hematokrit dibawah 20 % ikan ini menunjukkan terjadinya ketidak normalan yaitu bisa disebabkan karena defisiensi vitamin, rendahnya kandungan protein pakan dan infeksi oleh pathogen (Tsuzuki, *et al.*, 2001).

Ikan yang terserang penyakit dapat menurunkan kadar hematokrit dikarenakan ikan yang terinfeksi pathogen kemungkinan mengalami luka yang mengakibatkan darah keluar dari permukaan pembuluh darah, selain itu menurunnya nafsu makan ikan akan menghambat kinerja organ penghasil darah yang mengakibatkan menurunnya jumlah sel darah merah sehingga kadar hematokrit akan menurun (Larger, *et al.*, 1977).

### 2.8.3 Hemagloblin

Menurut Mutaqqin (2008), komponen utama sel darah merah adalah hemoglobin. Fungsi utama hemoglobin adalah transport oksigen dan karbondioksida. Menurut Alamanda (2007), hemoglobin berfungsi untuk mengikat oksigen yang kemudian akan digunakan untuk proses katabolisme sehingga dihasilkan energi. Kemampuan mengikat oksigen dalam darah tergantung pada jumlah hemoglobin yang terdapat dalam sel darah merah. Terjadinya penurunan nilai kadar hemoglobin maka ketersediaan oksigen di jaringan akan berkurang atau jaringan mengalami kekurangan oksigen (hipoksia), sehingga proses metabolisme terganggu.

Kisaran normal nilai hemoglobin pada ikan mas (*C. carpio*) adalah 5,50 – 8,59 g% (Celik dan Bircan, 2004). Kadar hemoglobin pada ikan dapat disebabkan aktivitas flavonoid dalam kandungan senyawa aktif. Aktivitas flavonoid dapat meningkatkan kerja organ-organ penghasil darah sehingga produksi darah meningkat. Kadar hemoglobin dalam darah ikan berkaitan dengan jumlah sel darah merah. Penurunan jumlah sel darah merah dikarenakan adanya luka sehingga darah yang mengalir keluar dari pembuluh darah dan menyebabkan kadar hemoglobin ikut rendah. Oleh karena itu, kadar hemoglobin berkaitan dengan jumlah eritrosit, semakin tinggi kadar hemoglobin, semakin tinggi jumlah eritrosit (Wahjuningrum, 2008).

### 2.8.4 Sel Darah Putih (Leukosit)

Leukosit merupakan komponen penting, mempunyai peran dalam sistem kekebalan tubuh ikan. Peningkatan jumlah sel darah putih ini merupakan respon dalam bentuk proteksi terhadap adanya sel asing termasuk adanya infeksi bakteri yang masuk ke tubuh ikan. Hasil produksi leukosit akan diarahkan menuju daerah terinfeksi sebagai pertahanan ikan. Naiknya jumlah leukosit merupakan

indikator adanya infeksi yang mengakibatkan terjadinya inflamasi (Suhermanto, *et al.*, 2011).

Leukosit merupakan salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai pertahanan non-spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminir patogen melalui proses fagositosis. Leukosit berfungsi sebagai pertahanan dalam tubuh, yang bereaksi dengan cepat terhadap masuknya antigen ke dalam tubuh ikan (Utami, *et al.*, 2013). Secara umum, jumlah total leukosit pada ikan yaitu  $2 - 15 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Jumlah leukosit pada ikan mas sehat berkisar  $3,2 - 14,6 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup> (Hartika, *et al.*, 2014; Harikrishnan, *et al.*, 2003). Leukosit dikerahkan untuk menghadang benda asing yang masuk ke dalam tubuhnya melalui aliran darah. Apabila ada benda asing masuk ke dalam tubuh maka leukosit akan memberikan respon dengan meningkatnya jumlahnya sebagai bentuk pertahanan tubuh (Mas'ud, 2013).

### 2.8.5 Diferensial Leukosit

Menurut Bijanti (2005) leukosit ikan dibagi menjadi 2 bagian besar yaitu granulosit (neutrofil, eosinofil dan basofil) dan agranulosit (limfosit dan monosit).

#### a. Neutrofil

Neutrofil memiliki fungsi sebagai penghancur bahan asing melalui proses fagositik yaitu kemotaksis dengan jalan sel bermigrasi menuju partikel atau perlekatan partikel pada sel, penelanan partikel oleh sel dan penghancuran partikel oleh enzim lisosom di dalam fagolisosom. Neutrofil dalam darah akan meningkat bila terjadi infeksi dan berperan sebagai pertahanan pertama dalam tubuh (Alamanda, *et al.*, 2007). Menurut Andayani, *et al.* (2006) menyatakan bahwa meningkatnya kadar neutrofil menunjukkan aktifitas fagositik yang menyerang atau membunuh benda-benda asing yang masuk kedalam tubuh ikan. Kisaran normal neutrofil pada ikan air tawar adalah  $3,25 - 8,40 \%$

sedangkan pada ikan mas (*C. carpio*) 2 - 10 % (Lusiastuti dan Hardi, 2004; Maswan, 2009). Menurut Utami, *et al.* (2013) setelah proses infeksi jumlah sel neutrofil dapat ditekan, sel-sel mati dan jaringan nekrotik yang salah satunya mengandung neutrofil yang telah mati secara bertahap akan mengalami lisis dalam beberapa hari.

#### **b. Limfosit**

Limfosit merupakan sel darah yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Pada ikan teleost, limfosit diproduksi di organ timus, limpa dan ginjal. Inti sel limfosit hampir memenuhi ruangan sel, berwarna gelap dengan sedikit sitoplasma yang mengelilingi inti, dan tidak bergranula (Mones, 2008).

Limfosit tidak bersifat fagositik tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit (Fujaya, 2004). Secara umum persentase limfosit ikan normal adalah 71,12 – 82,88 % dan pada ikan mas (*C. carpio*) 82,7 – 89,5 % (Chandra, *et al.*, 2018; Witeska, *et al.*, 2016).

#### **c. Monosit**

Monosit ikan berasal dari jaringan hemopoietik ginjal. Secara morfologi bentuk monosit ikan serupa dengan monosit mamalia. Persentase monosit pada ikan sebanyak 0.1 % dari populasi leukosit total yang bersirkulasi. Namun demikian, jumlahnya akan bertambah dalam waktu singkat ( $\pm$  48 jam) setelah disuntik dengan benda asing seperti karbon (Bijanti, 2005).

Monosit pada ikan normal secara umum berkisar antara 7,75 – 29,20 %, dan pada ikan mas (*C. carpio*) yaitu 3 - 5 % (Chandra, *et al.*, 2018; Mones, 2008). Fungsi monosit itu sendiri yaitu sebagai makrofag, dimana monosit tidak terlalu banyak dibutuhkan untuk memfagositosis, dikarenakan belum ada infeksi yang masuk ke dalam tubuh yang merangsang produksi monosit. Selain itu, fungsi lain dari monosit adalah sebagai agen makrofag yang memfagosit benda

asing yang masuk ke dalam tubuh. Andayani, *et al.* (2006) menyatakan bahwa fagosit monosit hampir sama dengan neutrofil akan tetapi memiliki aktivitas fagosit yang lebih tahan lama.

Menurut Alamanda, *et al.* (2007) pada saat 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.

## 2.9 Histopatologi Insang

Insang ikan merupakan organ respirasi utama yang bekerja dengan mekanisme difusi permukaan dari gas-gas respirasi (oksigen dan karbondioksida) antara darah dan air. Oksigen yang terlarut dalam air akan diabsorbsikan ke dalam kapiler-kapiler insang dan difiksasi oleh hemoglobin untuk selanjutnya di distribusikan ke seluruh tubuh. Sedangkan karbondioksida dikeluarkan dari sel dan jaringan untuk dilepaskan ke air disekitar insang. Insang memiliki fungsi sebagai pengatur osmose. Oleh sebab itu, apapun perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan perairan akan secara langsung berdampak kepada struktur dan fungsi insang serta hemoglobinnya (Saputra, 2013).

Insang merupakan organ yang rentan terhadap pengaruh zat kimia dan menjadi organ sasaran dari efek racun zat kimia atau toksikan. Insang berperan pada proses respirasi, keseimbangan asam basa, regulasi ionik dan osmotik karena adanya jaringan epitelium branchial yang menjadi tempat berlangsungnya transport aktif antara organisme dan lingkungan. Insang organ pertama tempat penyaringan air yang masuk ke dalam tubuh ikan (Nofyan, 2011).

Menurut Indrayani (2014), tingkat kerusakan pada insang yang paling banyak ditemukan adalah hiperplasia dan fusi lamela. Hiperplasia merupakan

kondisi dimana lamela sekunder pada insang tampak menebal tetapi tidak menyatu dengan lamela yang lain. Terjadinya hiperplasia yang semakin terus menerus dapat menyebabkan terjadinya fusi lamela. Dimana, bagian lamella primer atau sekunder bergabung dengan lamella yang lain, adanya pelekatan menyebabkan luas permukaan insang untuk melakukan proses respirasi menjadi berkurang.

## 2.10 Kualitas Air

Suhu adalah kapasitas panas. Pengukuran suhu sebaiknya secara siklus harian dengan termometer, sehingga suhu yang terukur benar-benar akurat tanpa banyak dipengaruhi oleh suhu sekitarnya (Sutisna dan Ratno, 1995).

Menurut Mantau dan Sudarty (2011), suhu air yang baik untuk pemeliharaan dan pertumbuhan ikan mas berkisar 20-30°C. Menurut Holmes, *et al.* (1996), bakteri *A. hydrophila* tidak dapat hidup lama tanpa inangnya. Suhu optimal bagi pertumbuhannya adalah 22–28°C, pada suhu 35°C pertumbuhannya terhambat. Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar.

Derajat keasaman lebih dikenal dengan istilah pH. Singkatan dari *puissance negative de H*, yaitu kepekatan ion-ion H (*hydrogen*) yang terlepas dalam suatu cairan (Ghufran, *et al.*, 2007). Faktor yang mempengaruhi penurunan pH air umumnya disebabkan oleh limbah yang mengandung asam-asam mineral bebas dan asam karbonat. Menurut Susanti, *et al.* (2015), bakteri *Aeromonas* akan tumbuh baik pada pH 5,5-9,0. Ikan mas akan tumbuh dengan baik pada kisaran pH 6,5-9 (Goran, *et al.*, 2016).

Oksigen (O<sub>2</sub>) adalah satu jenis gas terlarut dalam air dengan jumlah yang sangat banyak, yaitu menempati urutan kedua setelah nitrogen. Namun jika dilihat dari segi kepentingan untuk budidaya perairan oksigen menempati urutan teratas (Ghufran, *et al.*, 2007). Menurut Christian, *et al.* (2001), *Aeromonas* dapat



### 3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1 Landasan Teori

Kementerian Kelautan dan Perikanan telah mencanangkan target produksi ikan tahun 2018 sebesar 24,08 juta ton. Angka tersebut terdiri dari budidaya perikanan sebesar 7,91 juta ton. Untuk mencapai target tersebut diperlukan pendukung kegiatan produksi terutama faktor teknis yaitu komoditas produksi yang sehat dan bebas dari penyakit yang dapat menimbulkan kegagalan produksi (DJPB-KKP, 2018). Namun pada budidaya ikan air tawar khususnya ikan mas (*C. carpio*) terdapat kendala berupa serangan penyakit salah satunya *A. hydrophila* bisa muncul pada musim kemarau, menurut Sutjiati (2004) ini disebabkan karena kandungan oksigen yang rendah, suhu tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan dan padat tebar tinggi.

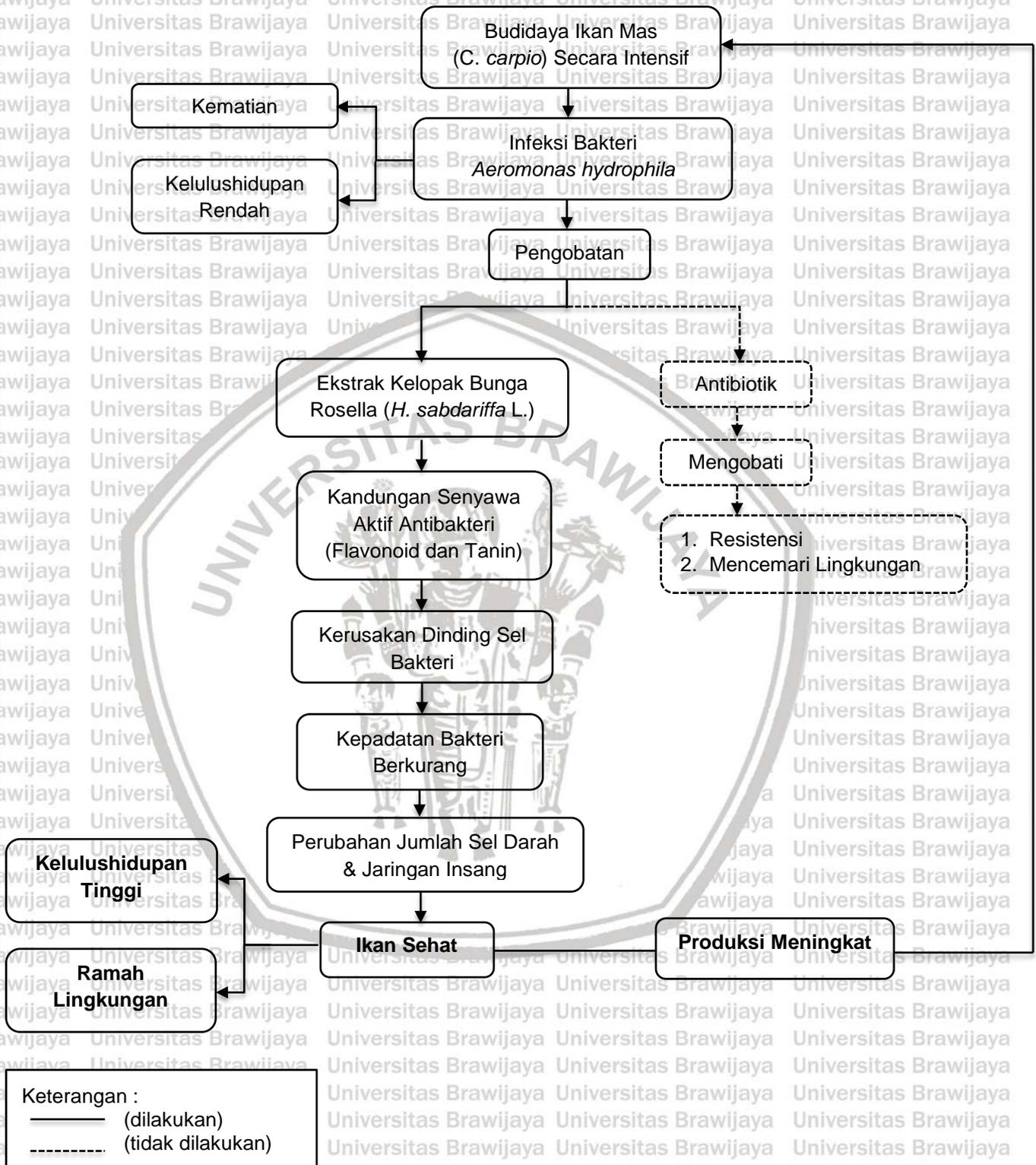
Penggunaan bahan-bahan kimia dapat menimbulkan masalah baru yaitu dapat meningkatkan pencemaran lingkungan (Rairakhwada, *et al.*, 2007).

Adanya akumulasi residu antibiotik dalam jaringan ikan akan mempengaruhi pertumbuhannya dan resistensi terhadap obat-obatan (Maqsood, *et al.*, 2009).

Oleh karena itu, dibutuhkan bahan alternatif lain untuk mengendalikan penyakit infeksi pada budidaya ikan mas dengan memanfaatkan bahan alami yang memiliki senyawa aktif antibakteri, salah satunya adalah dengan menggunakan kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.). Senyawa aktif yang terdapat dalam kelopak bunga rosella dapat mematikan bakteri *A. hydrophila* pada tubuh ikan.

Dengan menurunnya populasi bakteri dalam tubuh ikan maka akan terjadi proses pemulihan dalam tubuh ikan sehingga akan memperbaiki atau menormalkan kembali jaringan ikan, dengan demikian kematian dapat dicegah dan sintasan dapat ditingkatkan.

### 3.2 Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konseptual Penelitian

### 3.3 Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

H<sub>0</sub>: Diduga pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)

yang memiliki senyawa aktif antibakteri tidak memberikan pengaruh terhadap hematologi dan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) setelah diobati.

H<sub>1</sub>: Diduga pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)

yang memiliki senyawa aktif antibakteri memberikan pengaruh terhadap hematologi dan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) setelah diobati.

### 3.4 Kerangka Operasional

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan metode deskriptif. Kerangka operasional penelitian disajikan pada **Gambar**

**8.** Berdasarkan tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini, maka penelitian ini akan dilaksanakan dalam dua tahapan penelitian, yaitu:

➤ **Tahap I, yaitu Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Pada Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Yang Bersifat Sebagai Antibakteri *A. hydrophila*.**

1. Ekstraksi kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan jenis pelarut yang berbeda.

2. Uji *Co-culture* dan uji Cakram

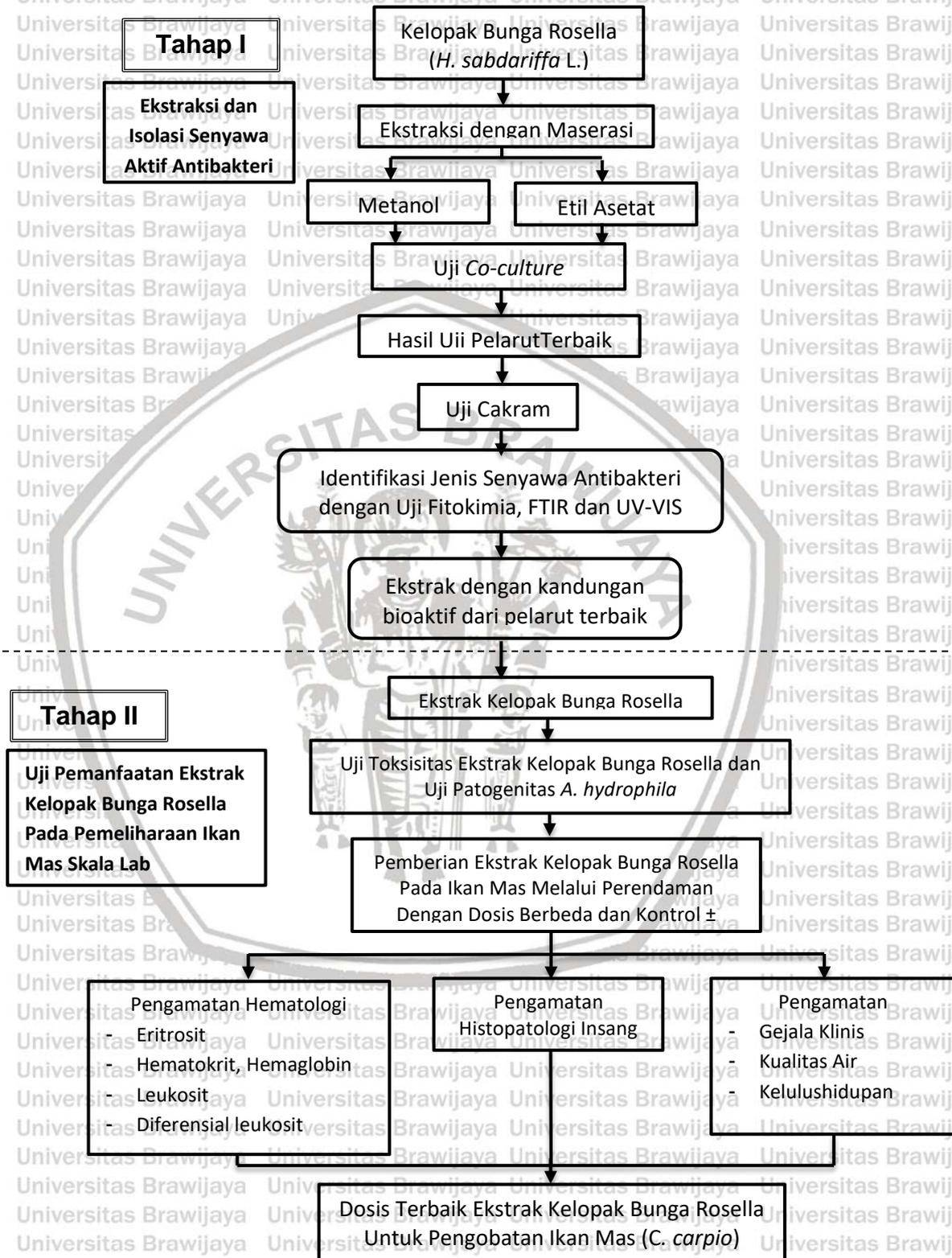
3. Karakterisasi senyawa aktif ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)

➤ **Tahap II, yaitu Uji Pemanfaatan Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Pada Pemeliharaan Ikan Mas Skala Laboratorium.**

1. Uji toksisitas ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)

2. Uji patogenitas bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan mas (*C. carpio*)

3. Uji pemanfaatan *H. sabdariffa* L. dalam pengobatan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*.



**Gambar 7.** Kerangka Operasional Penelitian

### 3.5 Penelitian Terdahulu

Penelitian yang pernah menggunakan bahan *H. sabdariffa* L. disajikan pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Penelitian terdahulu yang menggunakan ekstrak tanaman rosella (*H. sabdariffa* L.).

| No | Penulis  | Judul   | Bahan                   |
|----|--|---|-------------------------|
| 1  | Emad Mohamed Abdallah (2016)   | Antibacterial activity of <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>   | <i>H. sabdariffa</i> L. |
| 2  | Kristen L. Higginbotham, Kellie P. Burris, Svetlana Zivanovic, P. Michael Davidson, and C. Neal Stewart, JR (2014) | Antimicrobial Activity of <i>Hibiscus sabdariffa</i> Aqueous Extracts against <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Staphylococcus aureus</i> in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations   | <i>H. sabdariffa</i> L. |
| 3  | Hisham A. Abbas, Islam M. Abdo, and Mahmoud Z. Moustafa (2014)   | In vitro Antibacterial and Antibiofilm Activities of <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. Extract and Apple Vinegar against Bacteria Isolated from Diabetic Foot Infections  | <i>H. sabdariffa</i> L. |
| 4  | Muhammad Ali Faturrohman dan Peni Indrayudha (2012)  | Aktivitas Antibakteri Ekstrak n-heksan Kelopak Rosella ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn) Terhadap <i>Propionibacterium acne</i> Sensitif, <i>Escherichia coli</i> , dan <i>Staphylococcus aureus</i> Multiresisten | <i>H. sabdariffa</i> L. |
| 5  | Yoo Soo Ji, Nova Dian Lestari dan Tristia Rinanda (2012)   | Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) Terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i> Secara In Vitro  | <i>H. sabdariffa</i> L. |

Berdasarkan beberapa penelitian mengenai tanaman rosella (*H. sabdariffa* L.) di atas menunjukkan bahwa penggunaan rosella dapat digunakan sebagai bahan antibakteri. Namun pemanfaatannya pada ikan budidaya belum pernah dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan berkaitan dengan pemanfaatan kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sebagai bahan pengobatan ikan mas (*C. carpio*) terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* masih tergolong penelitian yang baru.

### 3.6 Strategi Publikasi

Hasil penelitian mengenai Aplikasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Untuk Pengobatan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dipublikasi di Journal of Experimental Life Science. Publikasi jurnal sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.



#### 4. METODE PENELITIAN

##### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan disajikan pada **Tabel 2** di bawah ini.

**Tabel 2.** Desain Penelitian

| Pokok Pembahasan              | Hasil   |
|-------------------------------|---|
| Masalah Penelitian            | Bagaimana efek pemberian ekstrak kelopak bunga rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) terhadap hematologi dan histopatologi insang ikan mas ( <i>C. carpio</i> ) yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> .      |
| Tujuan Penelitian             | Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kelopak bunga rosella ( <i>H. sabdariffa</i> L.) terhadap hematologi dan histopatologi insang ikan mas ( <i>C. carpio</i> ) yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> . |
| Variabel Data dan Sumber Data | <ul style="list-style-type: none"> <li>• variabel bebas adalah dosis ekstrak kelopak bunga rosella (<i>H. sabdariffa</i> L.)</li> <li>• variabel terikat adalah organ pengamatan dan uji pengamatan.</li> </ul> |
| Metode Penelitian             | Eksperimental   |
| Metode Uji Analisis           | Uji Fitokimia, FTIR, UV-VIS, Uji Toksisitas Ekstrak, Uji Patogenitas Bakteri, Uji Hematologi dan Uji Histopatologi.   |
| Metode Analisis data          | RAL (Rancangan acak lengkap)  |

##### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 – Maret 2019 di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Malang.

### 4.3 Alat dan Bahan

#### 4.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi DO meter, pH meter, thermometer, akuarium, aerator, coolbox, blender, lemari pendingin, satu set alat bedah, *rotary evaporator vacuum*, tabung falcon, *hot plate*, mikropipet, timbangan digital, timbangan analitik, gelas minum 250 ml, gelas ukur (10 ml, 50 ml dan 500 ml), corong, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, jarum oose, bunsen, pembakar bunsen, pipet volume, pipet tetes, *spektrofotometer*, *erlenmeyer* (250 ml, 500 ml dan 1000 ml), beaker glass (500 ml dan 1000 ml), incubator, autoclave, tabung effendorf, spuit, pipet thoma eritrosit, pipet thoma leukosit, objek glass, cover glass, *haemocytometer*, mikroskop cahaya, *handtally counter*, aerator), vortex, ayakan, nampan, pinset, heater akuarium, *waterbath*, lampu *Ultra violet* (UV), alat *Spektrofotometer Ultra violet – visible* (UV-VIS), dan alat *FTIR*.

#### 4.3.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian yang berjudul aplikasi ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) untuk pengobatan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, antara lain adalah:

##### a. Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah ikan mas (*C. carpio*) dengan ukuran 7 – 10 cm dengan berat ikan kisaran 8-10 gr/ekor sebanyak 15 ekor/akuarium pemeliharaan, ikan mas diperoleh dari Pasar Ikan Punten, Kota Batu.

##### b. Pakan Ikan

Pakan yang diberikan pada hewan uji berupa pellet sebanyak 5% dari berat tubuh ikan yang diberikan 2 kali hari pada pagi dan sore.

**c. Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)**

Kelopak bunga rosella diperoleh dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur.

**d. Kegiatan Ekstraksi**

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.), pelarut maserasi metanol (PA), etil asetat (PA), kertas saring dengan merk dagang whatman No.42, aluminium foil.

**e. Kultur Bakteri**

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam kegiatan kultur bakteri dan peremajaan bakteri antara lain ; bakteri kultur murni *A. hydrophila* didapat dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, bahan kultur menggunakan media *Tryptone Soya Agar* (TSA), *Tryptone Soya Broth* (TSB), Aquades, Alkohol dan Na-fis 0,9%

**f. Pengamatan Hematologi**

Bahan yang digunakan untuk pengamatan hematologi (eritrosit, hematokrit, hemoglobin, leukosit dan diferensial leukosit) untuk ikan mas (*C. carpio*) adalah aquades steril, tissue, larutan turk, larutan giemsa, anti koagulan (Na-sitrat 10%), metanol, larutan giemsa 10% dan sampel darah ikan mas.

**g. Pengamatan Histopatologi**

Bahan yang digunakan untuk pengamatan histopatologi pada ikan mas (*C. carpio*) adalah formalin 10 %, acetone, xylol, paraffin cair, paraffin blok, alkohol 96%, pewarna *haemotoksilin*, eosin, aquades dan sampel jaringan insang ikan mas.

#### 4.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental, dimana metode ini bertujuan untuk meneliti hubungan (biasa berupa hubungan sebab akibat atau bentuk hubungan lainnya) antar dua variabel atau lebih pada satu atau lebih kelompok eksperimental, serta membandingkan hasilnya dengan kelompok yang tidak mengalami manipulasi, yakni yang disebut dengan kelompok kontrol (Darmawan, 2016).

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

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang seragam atau homogen. Sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2002).

Perlakuan pada penelitian ini adalah perbedaan dosis dengan kisaran berbeda, kontrol positif dan kontrol negatif yang diulang sebanyak 3 kali. Adapun perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

Perlakuan A = pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella 75 mg/L

Perlakuan B = pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella 150 mg/L

Perlakuan C = pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella 225 mg/L

- Perlakuan D = pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella 300 mg/L
- Perlakuan E = pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella 375 mg/L
- Perlakuan K- = kontrol infeksi (dilakukan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.))
- Perlakuan K+ = kontrol normal (tanpa penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dan tanpa pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.))

Berikut ini adalah denah penelitian setelah pengacakan yang disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Rancangan Penelitian

Keterangan:

- A,B,C,D,E = Perlakuan      K (+) = Kontrol normal  
K (-) = Kontrol negatif      1,2,3 = Ulangan

#### 4.6 Parameter Uji

##### 4.6.1 Parameter Utama

- Uji *Co-culture* dan uji Cakram
- Karakterisasi senyawa ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)
- Pengamatan hematologi (eritrosit, hematokrit, hemoglobin, leukosit, diferensial leukosit), pengamatan histopatologi insang ikan mas sehat, terinfeksi dan setelah diobati.

#### 4.6.2 Parameter Penunjang

- Gejala Klinis (tingkah laku, nafsu makan dan kerusakan ikan yang terlihat dari luar)
- Kualitas Air; meliputi suhu, pH, DO (Oksigen terlarut)
- Kelulushidupan Ikan Mas

#### 4.7 Tahapan Penelitian

##### 4.7.1 Tahap I: Ekstraksi Dan Isolasi Senyawa Pada *H. sabdariffa* L. Yang Bersifat Sebagai Antibakteri *A. hydrophila*

Kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) diperoleh dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur. Pada tahapan I akan dilaksanakan ekstraksi kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan menggunakan pelarut polar dan semi polar untuk mengetahui jenis pelarut mana yang paling baik digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif *H. sabdariffa* L. Selanjutnya diuji antibakteri untuk menghambat bakteri *A. hydrophila*. Setelah itu dikarakterisasi menggunakan uji fitokimia, FTIR dan spektrofotometri *Ultraviolet – visible* (UV-VIS).

##### 4.7.1.1 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Kelopak bunga rosella dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel yang yang tak terlihat secara kasat mata dan dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai bersih, dan ditiriskan. Kelopak bunga rosella dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan sampai kering (kadar air  $\pm 10\%$ ) selama 7 hari, kemudian digiling dan diayak sehingga diperoleh serbuk halus. Berdasarkan Abdallah, *et al.* (2016), sebanyak 100 gram serbuk bunga rosella dimaserasi dengan cara simplisia direndam dengan berbagai pelarut sebanyak 500 ml (perbandingan 1:5) selama 3x24 jam pada suhu ruang. Ekstrak

disaring menggunakan kertas saring kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator vacuum pada suhu 40°C (Hayati, *et al.*, 2012).

#### 4.7.1.2 Kultur Bakteri *A. hydrophila* dan Uji Antibakteri Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

##### a. Kultur Bakteri *A. hydrophila*

Biakan murni bakteri diperoleh dari dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Sebelum digunakan uji antibakteri, bakteri tersebut dikultur pada media cair. Prosedur kultur yang digunakan adalah metode modifikasi menurut Maftuch, *et al.* (2018), dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- Media TSB disiapkan dalam erlenmeyer sebanyak 5 ml
- Kultur murni bakteri *A. hydrophila* diambil satu ose secara aseptis, kemudian dimasukkan ke dalam media TSB yang telah disiapkan.
- Larutan TSB yang telah berisi bakteri, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.
- Setelah 24 jam, bakteri yang tumbuh siap digunakan untuk uji antibakteri.

##### b. Uji Antibakteri Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Dengan Pelarut Yang Berbeda

###### ❖ Uji Co-Culture

Dilusi perbenihan cair terdiri dari makrodilusi dan mikrodilusi. Uji daya hambat bakteri dilakukan dengan penentuan MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal concentration*), prosedur mengacu Sayed, (2014). Pada uji MIC, persiapan pengujian dilakukan dengan menyiapkan tabung reaksi steril sebanyak 7 buah dan telah diberi label konsentrasi 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L serta kontrol positif menggunakan antibiotik *chloramphenicol* dan kontrol negatif menggunakan bakteri *A. hydrophila*. Media cair yang digunakan untuk setiap percobaan adalah

media cair TSB. Ekstrak yang telah dilarutkan DMSO 10% pada konsentrasi yang telah ditentukan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media pada perlakuan masing-masing konsentrasi sebesar 1 ml. Dimasukkan 1 ml suspensi bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml ke dalam tabung reaksi perlakuan dan kontrol, selanjutnya divortex hingga homogen. Semua tabung diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, diamati dan dicatat kekeruhan pada semua tabung dengan alat spektrofotometer.

Penghitungan jumlah koloni dilakukan dengan inokulasi dari uji *co-culture*. Pengenceran dengan NaFis 0,9 % dilakukan untuk memudahkan penghitungan koloni. Pengenceran terakhir, 3 terakhir, dan 5 terakhir adalah konsentrasi yang akan ditanam untuk uji MBC. Penanaman bakteri dilakukan menggunakan metode tuang (*pour plate*) dengan suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml dari tabung pengenceran. Pengenceran terakhir, 3 terakhir, dan 5 terakhir. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C. Media yang telah diinkubasi selanjutnya dihitung jumlah koloninya. Nilai MBC ditentukan dari konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada cawan petri.

#### ❖ Uji Cakram

Uji cakram dilakukan sebagai pengujian antimikroba dengan mengukur diameter zona hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah diberi ekstrak *H. sabdariffa* L. Prosedur yang digunakan menggunakan metode modifikasi menurut Roihanah, *et al.* (2013). Adapun langkah-langkah dalam pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut:

- Siapkan cawan petri yang sudah steril
- Tuangkan media TSA yang sudah steril di atas permukaan cawan petri sampai merata.
- Tunggu media yang telah disiapkan sampai dingin.

- Bakteri dalam media TSB dituangkan 0,1 ml dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml menggunakan mikropipet dan ditebar di media TSA kemudian diratakan dengan menggunakan *Trianggle*.

- Disiapkan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan berbagai dosis menggunakan DMSO 10% serta kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Dosis yang digunakan dalam uji cakram mengacu dari hasil uji *co-culture* sebelumnya.

- Kertas cakram steril direndam ke dalam larutan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) selama 15 menit berdasarkan dosis yang telah ditentukan, ditiriskan dan diletakkan di permukaan lempeng media TSA yang telah ditumbuhi *A. hydrophila*.

- Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 36°C dengan mengamati ada tidaknya zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Diukur zona bening yang terbentuk dari masing-masing dosis ekstrak kelopak bunga rosella menggunakan jangka sorong digital.

### c. Karakteristik Senyawa

Uji untuk mengetahui karakterisasi senyawa aktif kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang diuji menggunakan fitokimia, FTIR dan spektrofotometer ultraviolet.

#### ❖ Uji Fitokimia

Identifikasi fitokimia dilakukan terhadap ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang menghasilkan daya hambat terbaik terhadap bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan metode Lumbessy, *et al.* (2015) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

### 1. Uji Alkaloid

Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 ml HCL 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung.

Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendroff, tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

### 2. Uji Flavonoid

Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 ml metanol panas 50%. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCL pekat. Larutan berwarna jingga atau merah yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid.

### 3. Uji Saponin

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCL 1 N. Jika busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka menunjukkan adanya golongan senyawa saponin.

### 4. Uji Triterpenoid/Steroid

Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Campuran ini kemudian ditambah lagi dengan 1-2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat pada dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

## 5. Uji Tanin

Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) ditambahkan dengan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta, maka mengandung tanin.

### ❖ Spektrofotometer Ultraviolet dan FTIR

Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dikonfirmasi dengan mengukur spektra panjang gelombang absorbansi radiasi ultraviolet dengan spektrofotometer. Sebelum digunakan spektrofotometer discanning pada panjang gelombang pada resolusi 1 nm (dari 200-550 nm) dan dikalibrasi menggunakan aseton. Metode mengacu Purwakusumah, *et al.* (2014) yaitu dengan memasukkan cuvet yang telah berisi kandidat ekstrak ke dalam spektrofotometer dengan scanning pada panjang gelombang 200 – 500 nm.

#### 4.7.2 Tahap II: Uji Pemanfaatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Yang Bersifat Antibakteri Pada Pemeliharaan Ikan Mas (*C. carpio*) Skala Laboratorium

Pada tahap ini, akan dilakukan uji pemanfaatan bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang bersifat antibakteri pada pemeliharaan ikan mas skala laboratorium sebelumnya dilakukan perbanyakkan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.), pembuatan media dan kultur bakteri *A. hydrophila* seperti yang dilakukan pada penelitian tahap I. Bakteri dan ekstrak yang telah siap dipergunakan untuk penginfeksian dan pengobatan ikan mas.

##### 4.7.2.1 Uji Patogenitas *A. hydrophila*

Uji patogenitas digunakan untuk mengetahui pada kepadatan berapa dan berapa lama, bakteri *A. hydrophila* dapat membunuh ikan uji sebanyak 50% dari populasi awal. Dimana bakteri *A. hydrophila* awal dengan kepadatan  $10^{10}$  CFU/ml (media TSB) diencerkan ke dalam media air sebanyak 10 liter/perlakuan, sehingga menjadi kepadatan  $10^8$  CFU/ml,  $10^7$  CFU/ml,  $10^6$  CFU/ml, dan  $10^5$

CFU/ml. Konsentrasi diukur berdasarkan kepadatan optikal (*optical density*)

Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus Cappucino dan Sherman (1988),

sebagai berikut:

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

Keterangan :

N1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media TSB (sel/ml)

N2 : Kepadatan populasi bakteri yang dicari (sel/ml)

V1 : Volume bakteri dalam TSB yang dibutuhkan

V2 : Volume media air dalam wadah perendaman

Kemudian ikan mas (*C. carpio*) diinfeksi bakteri dengan cara perendaman pada masing-masing kepadatan bakteri yang sudah ditentukan masing-masing 10 ekor/wadah dan diamati setiap 4 jam. Kematian ikan dihitung hingga jangka waktu 24 jam s.d 48 jam, setelah itu diamati perubahan tingkah laku dan dicatat waktu serta jumlah ikan yang mati hingga 50%. Kemudian data dianalisa menggunakan EPA *Probit Analysis* SPSS.

#### 4.7.2.2 Uji Toksisitas Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Uji toksisitas ekstrak kelopak bunga rosella dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak dengan mortalitas ikan mas sebanyak 50% selama 48 jam. Ikan mas dimasukkan ke dalam wadah perlakuan berupa akuarium dengan padat penebaran 10 ekor/wadah. Sebelum dilakukan uji toksisitas ikan mas terlebih dahulu diaklimatisasi selama 7 hari dan diberi pakan pelet. Setelah itu dilakukan perendaman ekstrak pada dosis 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/L. Dosis diambil dari hasil tahap satu in vitro pada uji cakram dengan mengamati zona hambat. Setelah perlakuan perendaman ekstrak, diamati perubahan tingkah laku dan dicatat waktu serta jumlah ikan yang mati hingga 50%. Data kemudian dianalisa dengan menggunakan EPA *Probit Analysis* SPSS.

#### 4.7.2.3 Uji Pemanfaatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Dalam Pengobatan Ikan Mas Yang Terinfeksi *A. hydrophila*

Pada uji pemanfaatan ini disiapkan wadah sebanyak 21 akuarium sesuai jumlah perlakuan. Setiap wadah diisi dengan air tawar. Ikan mas diadaptasikan selama 7 hari dan sebelum penginfeksi ikan dipuasakan selama 1 hari, kemudian dilakukan penginfeksi. Bakteri yang sudah disiapkan pada media TSB diinfeksi langsung ke dalam media hidup ikan mas dengan kepadatan bakteri sesuai dari hasil uji patogenitas bakteri, setelah menunjukkan tanda-tanda terinfeksi kemudian diambil darah dan organ insang untuk diamati.

Pada proses pengobatan, ikan mas yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* direndam pada wadah yang telah terisi ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sesuai dosis perlakuan. Pada masa pemeliharaan ikan dipelihara diamati hematologi, histopatologi, gejala klinis dan tingkat kelulushidupannya pasca infeksi dan pasca pengobatan. Gejala klinis yang diamati berupa tingkah laku ikan, nafsu makan dan kerusakan ikan yang terlihat dari luar.

Pemberian pakan dilakukan setiap pagi dan sore, sedangkan pembersihan wadah/akuarium dilakukan setiap 2 hari. Pengamatan kualitas air dilakukan setiap pagi dan sore dengan parameter yang diamati berupa pH, suhu dan DO.

#### 4.7.2.4 Pengamatan Hematologi

Setelah dilakukan proses infeksi bakteri dan pemeliharaan selama 7 hari pada ikan selanjutnya dilakukan pengamatan hematologi dengan pengambilan darah ikan kemudian dilakukan perhitungan sel darah.

##### a) Eritrosit

Menurut Bijanti (2005), prosedur yang dapat dilakukan untuk mengetahui total eritrosit adalah darah ikan yang telah dicampur antikoagulan

diambil menggunakan pipet eritrosit sebanyak 0,5  $\mu\text{L}$ . Kemudian diencerkan dengan larutan hayem dalam pipet eritrosit hingga menunjukkan angka 101  $\mu\text{L}$ .

Darah yang telah tercampur selanjutnya dikocok hingga homogen dalam pipet kemudian campuran tersebut diambil sedikit (20  $\mu\text{L}$ ) dan dimasukkan dalam kamar hitung *Improved Neubauer*, ditutup dengan dengan cover glass. Sebelum memasukkan ke dalam *Improved Neubauer* terlebih dahulu dibuang sebanyak 2 tetes, dimasukkan agar larutan yang diambil benar-benar homogen. Jumlah eritrosit diamati dan dihitung menggunakan mikroskop cahaya pada semua kotak eritrosit. Selanjutnya jumlah eritrosit dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah eritrosit (sel/mm}^3\text{)} = N \times \frac{1}{5 \text{ area} \times 1/250(\text{volume})} \times 200 \text{ (pengenceran)}$$

#### b) Hematokrit

Menurut Lusiasuti, *et al.* (2017) pengukuran hematokrit dilakukan sebagai berikut :

- a. Darah dihisap menggunakan tabung mikrohematokrit sebanyak  $\frac{3}{4}$  bagian tabung;
- b. Sisi ujung tabung ditutup dengan menggunakan cristoseal/malam kira-kira 1 cm sampai terjadi penyumbatan pada kedua sisi tabung;
- c. Kemudian tabung disentrifuge dengan kecepatan putaran 3000 rpm selama 5 menit;
- d. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan volume benda darah terhadap volume seluruh darah menggunakan skala hematokrit.

#### c) Hemoglobin

Perhitungan kadar hemoglobin dijelaskan oleh Zuhrawati, *et al.* (2015) adalah sebagai berikut :

- Tabung sahlinometer diisi dengan larutan HCl 0,1% sampai angka 10 (garis skala paling bawah pada tabung sahlinometer);

- tabung sahlinometer tersebut diletakkan diantara 2 tabung dengan warna standar;
- Sampel darah ikan diambil dengan pipet sahli sebanyak 0,02 ml, masukkan darah ke dalam tabung sahli lalu diaduk dan diamkan 5 menit;
- Tambahkan akuades dengan pipet tetes sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan gelas pengaduk sampai warnanya tepat sama dengan warna standar.

Kadar hemoglobin dinyatakan dalam g%.

#### d) Leukosit

Menurut Bijanti (2005) prosedur kerja dari perhitungan total leukosit sebagai berikut: diambil darah ikan yang telah ditambahkan antikoagulan sebanyak 0,5  $\mu$ L dengan menggunakan pipet leukosit. Kemudian diencerkan dengan larutan Turk dalam pipet leukosit hingga 11  $\mu$ L. Darah yang telah tercampur larutan Turk dikocok hingga homogen. Dua tetes pertama dari hasil campuran tersebut buang, tetesan ketiga diletakkan pada kotak *haemocytometer* kemudian ditutup dengan cover glass dan diamati dengan mikroskop cahaya yakni dengan cara menghitung total leukosit pada semua total leukosit.

Menghitung leukosit dengan cara mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor diturunkan atau diafragma dkecilkan. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan di bawah lensa objektif dan focus mikroskop diarahkan pada garis-garis tersebut. Leukosit dihitung pada keempat bidang besar dimana kotak tersebut berwarna hijau. Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri selanjutnya metode ini diulang pada keempat bidang besar. Menurut Svobodova and Vykusova (1991), perhitungan total leukosit yaitu:

$$\text{SDP} = (A/N) \times (1/V) \times F_p$$

Dimana :

SDP = jumlah leukosit

A = jumlah sel leukosit terhitung

N = jumlah kotak *haemocytometer* yang diamati

V = volume kotak *haemocytometer* yang diamati

Fp = faktor pengenceran

#### e) Diferensial Leukosit

Menurut Bijanti (2005) prosedur kerja perhitungan diferensial leukosit

adalah sebagai berikut : darah ikan yang telah diberi antikoagulan diambil

dengan pipet kapiler dan ditetaskan pada ujung gelas objek untuk membuat

hapusan darah yakni dengan cara meletakkan gelas objek lain pada ujung gelas

objek yang telah ditetesi darah sehingga membentuk lapisan tipis pada gelas

objek lalu dikeringkan. Setelah kering, gelas objek difiksasi dengan

menggunakan metanol selama 1-2 menit. Dilakukan pengecatan dengan

pengecatan giemsa pada hapusan darah yang telah difiksasi dan ditunggu

selama  $\pm$  15 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan

kembali. Hasil dari perlakuan tersebut kemudian diamati dengan menggunakan

miskroskop cahaya.

Pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali untuk

menentukan jenis leukosit yakni neutrofil, monosit dan limfosit. Perhitungan

diferensial leukosit optimalnya adalah 100 sek. Adapun rumus perhitungan

diferensial leukosit sebagai berikut :

$$\sum \text{diferensial leukosit (\%)} = (\text{komponen sel leukosit} : 100) \times 100\%$$

#### 4.7.2.5 Pengamatan Histopatologi

Setelah proses penginfeksi dengan bakteri dan proses pemeliharaan

selama 7 hari, dilakukan pengambilan organ insang ikan untuk pengamatan

histopatologi. Organ insang dari masing-masing individu diambil dengan cara

dilakukan pembedahan pada tubuh ikan. Organ tersebut kemudian dimasukkan

ke dalam botol kecil yang berisi 10% larutan formalin. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi yang kemudian akan digunakan untuk pengamatan histopatologi (Valon, *et al.*, 2013).

Pembuatan preparat organ insang untuk histopatologi dilakukan dengan modifikasi metode menurut Gupta dan Kaur, (2016), dimana jaringan yang sudah dibedah, direndam dalam larutan Bouin selama 24 jam. Jaringan kemudian didehidrasi dalam seri etanol bergradasi (30%, 50%, 70%, 90% dan 100%), dibersihkan dalam *xylene* dan diproses untuk pembuatan blok lilin parafin. Bahan dicelupkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56 - 60°C selama 2 jam.

Selanjutnya jaringan dipotong dengan ketebalan 4 - 5  $\mu$ m menggunakan mikrotom rotasi dan diwarnai secara rutin dengan *haematoxylin* dan *eosin* (HE) untuk pengamatan histopatologi. Preparat tersebut diamati di bawah mikroskop Olympus pada pembesaran tinggi dan pembesaran rendah, untuk dilihat kerusakan yang terjadi pada jaringan.

Analisa kerusakan histopatologi organ insang ikan mas (*C. carpio*) dilakukan dengan cara skoring. Skoring merupakan cara untuk mengetahui tahap kerusakan dari setiap perlakuan yang terjadi pada organ insang ikan mas (*C. carpio*). Kemudian perhitungan dilakukan dengan menggunakan Microsoft Excel.

Kerusakan yang terjadi meliputi:

- a). Hiperplasia yaitu pembentukan jaringan secara berlebih karena bertambahnya jumlah sel (Setyawan, 2013).
- b). Fusi atau *fusion* yaitu pendempetan atau penempelan antar lamella sekunder yang satu dengan yang lainnya (Asnita, 2011).

#### 4.7.2.6 Pengamatan Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan setelah ikan mas (*C. carpio*) diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* dan setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang kemudian dipelihara selama 7 hari. Pengamatan gejala klinis dilakukan secara visual untuk mengamati tingkah laku, nafsu makan dan kerusakan ikan yang terlihat dari luar pada ikan mas (*C. carpio*). Hasil pengamatan dilakukan skoring yang mengacu pada modifikasi dari

Khaerani, *et al.* (2018), dimana skor yang diberikan adalah sebagai berikut:

- (a) : ikan megap-megap di permukaan air, nafsu makan menurun dan berenang tidak beraturan/mendekati aerasi
- (b) : tubuh berwarna pucat, kondisi lendir berlebih, mata agak menonjol
- (c) : sisik mengelupas, sirip rusak, operkulum terbuka
- (d) : luka borok, peradangan, kemerahan pada punggung, pembengkakan di bagian perut
- (e) : berenang mulai aktif, nafsu makan kembali normal
- (f) : warna tubuh mulai kembali normal, operkulum mulai membaik
- (g) : luka mulai memulih, peradangan dan pembengkakan mulai hilang
- (h) : ikan normal

#### 4.7.2.7 Pengamatan Kualitas Air

Pengamatan kualitas air dilakukan selama 7 hari dari awal hingga akhir masa pemeliharaan. Adapun parameter yang diamati meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO) yang diukur 2 kali sehari yaitu pagi dan sore hari.

#### 4.7.2.8 Pengamatan Kelulushidupan (*Survival Rate*)

Kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) digunakan untuk mengetahui tingkat kelulushidupan ikan yang diuji dengan membandingkan antara jumlah

ikan yang diuji pada awal dengan ikan uji yang masih hidup pada akhir penelitian. Kelulushidupan dapat dihitung dengan rumus Royan, *et al.* (2014) sebagai berikut:

$$\text{Survival Rate (SR)} = \frac{\text{Jumlah ikan di akhir penelitian}}{\text{Jumlah ikan di awal penelitian}} \times 100 \%$$

#### 4.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan analisis kuantitatif dimana data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA), analisis ini digunakan untuk menguji adanya pengaruh perlakuan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap hematologi dan histopatologi insang pada ikan mas (*C. carpio*) yang ditantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya data diolah dan dianalisis menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Apabila terdapat pengaruh perlakuan ( $P < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji Duncan dan polinomial orthogonal untuk mengetahui uji responnya.

## 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Penelitian Tahap I

#### 5.1.1 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Proses ekstraksi kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) diawali dengan menimbang serbuk kelopak bunga rosella sebanyak 200 gram kemudian dilakukan metode maserasi atau perendaman yaitu dengan merendam serbuk kelopak bunga rosella menggunakan pelarut metanol p.a (polar) dan etil asetat p.a (semi polar) masing-masing sebanyak 1 L selama 3x24 jam dan dilakukan pengadukan setiap 4 jam. Larutan hasil rendaman kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman No.42 dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator vacuum pada suhu 40°C. Hasil rendemen ekstrak dengan pelarut metanol dan etil asetat disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Rendemen (gram) Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

| Pelarut     | Berat Awal (gram) | Berat Akhir (gram) | Rendemen (%) |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------|
| Metanol     | 200               | 32,6               | 16,03        |
| Etil asetat | 200               | 3,32               | 1,66         |

Berdasarkan hasil uji rendemen diketahui pelarut metanol memiliki nilai rendemen rata-rata tertinggi, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada kelopak bunga rosella cenderung larut pada pelarut metanol yang bersifat polar. Komponen bioaktif semi polar terhitung sedikit sehingga rendemen ekstrak kasar etil asetat yang dihasilkan bernilai kecil.

Metanol diketahui merupakan pelarut universal dan termasuk golongan alkohol.

## 5.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri

### 5.1.2.1 Uji Co-culture

Pengujian *co-culture* dilakukan dengan menggunakan 5 perlakuan ekstrak dengan konsentrasi berbeda dan 2 kontrol. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L dan 1000 mg/L.

Sedangkan kontrol yang digunakan adalah kontrol positif dan kontrol negatif.

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik *chloramphenicol* (5 mg/L) dan kontrol negatif berupa pemberian bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Co-culture

| Konsentrasi (mg/L) | Metanol        |                           | Etil Asetat    |                           |
|--------------------|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
|                    | Absorbansi (Å) | ∑ Koloni Bakteri (CFU/ml) | Absorbansi (Å) | ∑ Koloni Bakteri (CFU/ml) |
| Kontrol (-)        | 1,047          | 2,70.10 <sup>18</sup>     | 1,073          | 3,88.10 <sup>19</sup>     |
| 1                  | 1,018          | 2,66.10 <sup>18</sup>     | 1,024          | 3,73.10 <sup>19</sup>     |
| 10                 | 0,142          | 1,85.10 <sup>14</sup>     | 0,298          | 1,96.10 <sup>15</sup>     |
| 100                | 0,128          | 5,3.10 <sup>8</sup>       | 0,280          | 1,65.10 <sup>11</sup>     |
| 500                | 0,136          | 1,08.10 <sup>9</sup>      | 0,222          | 1,62.10 <sup>9</sup>      |
| 1000               | 0,130          | 8,6.10 <sup>8</sup>       | 0,276          | 2,19.10 <sup>9</sup>      |
| Kontrol (+)        | 0,084          | 0                         | 0,090          | 0                         |

Berdasarkan data tabel di atas perbandingan antara pelarut metanol dan etil asetat didapatkan pengaruh ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)

yang efektif untuk menghambat bakteri terdapat pada pelarut metanol pada konsentrasi 100 mg/L. Pada konsentrasi tersebut, dapat dilihat nilai absorbansinya terendah yaitu 0,128 Å dengan jumlah koloni bakteri 5,3.10<sup>8</sup> CFU/ml yang mengindikasikan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat.

Sedangkan pengujian dengan pelarut etil asetat nilai absorbansi dan jumlah koloninya lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut metanol.

Hasil uji *co-culture* ini menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila*. Beberapa penelitian juga mengungkapkan aktivitas antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap beberapa strain bakteri seperti *Micrococcus luteus*, *Serratia marseilles*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, dan *Bacillus cereus* (Abdallah, 2016; Olaleye, 2007). Kemudian dari hasil uji *co-culture* dengan pelarut metanol ini digunakan untuk uji lanjut aktivitas antibakteri dengan melakukan uji cakram.

### 5.1.2.2 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan dengan cara mengukur diameter (mm) zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram dari berbagai konsentrasi perlakuan. Dosis yang digunakan dalam uji cakram mengacu dari hasil uji *co-culture* sebelumnya yaitu pada konsentrasi 100 mg/L dapat menghambat bakteri *A. hydrophila*. Sehingga konsentrasi yang dipakai untuk uji cakram adalah konsentrasi 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, serta kontrol (positif dan negatif). Hasil uji cakram ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan pelarut metanol disajikan pada **Tabel 5**.

**Tabel 5.** Hasil Uji Cakram Ekstrak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Terhadap *A. hydrophila*

| Konsentrasi (mg/L) | Diameter Zona Hambat (mm) | Klasifikasi Respon Zona Hambat |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------|
| (-)                | 0±0,0 <sup>a</sup>        | Lemah                          |
| 100                | 7,12±0,0 <sup>b</sup>     | Sedang                         |
| 200                | 9,03±0,2 <sup>c</sup>     | Sedang                         |
| 300                | 11,53±0,8 <sup>d</sup>    | Kuat                           |
| 400                | 13,25±0,5 <sup>e</sup>    | Kuat                           |
| 500                | 15,02±0,3 <sup>f</sup>    | Kuat                           |
| (+)                | 21,47±0,7 <sup>g</sup>    | Kuat                           |

Keterangan :

≤5mm =lemah, 5-10 mm= sedang 10-20 mm= kuat,

(Greenwood and Slack, 1995)

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of variance*) menunjukkan penggunaan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) berpengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ) terhadap diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Diameter zona hambat tertinggi terdapat pada konsentrasi 500 mg/L yaitu 15,02 mm kemudian untuk konsentrasi 400 mg/L sebesar 13,25 mm, 300 mg/L sebesar 11,53 mm, 200 mg/L sebesar 9,03 mm, dan 100 mg/L sebesar 7,12 mm. Nilai diameter zona hambat tersebut memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.), semakin tinggi pula aktivitas daya hambat terhadap *A. hydrophila*. Hal tersebut sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Dwidjoseputro (2005), bahwa konsentrasi antimikroba mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, semakin tinggi konsentrasi antimikroba maka semakin besar pula jumlah mikroba yang dihambat pertumbuhannya.

### 5.1.3 Karakteristik Senyawa

#### 5.1.3.1 Uji Fitokimia Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Uji fitokimia pada ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) menggunakan pelarut metanol dilakukan menggunakan 6 jenis parameter uji yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, steroid dan tanin. Hasil uji fitokimia untuk lebih jelasnya disajikan pada **Tabel 6**.

**Tabel 6.** Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

| Jenis Senyawa          | Hasil | Keterangan                       |
|------------------------|-------|----------------------------------|
| Alkaloid - Dragendorff | +     | Terbentuk endapan jingga         |
| - Mayer                | ++    | Terbentuk endapan putih          |
| Flavonoid              | +++   | Terbentuk warna merah muda       |
| Saponin                | +     | Terbentuk busa permanen          |
| Triterpenoid           | +     | Terbentuk warna hijau kebiruan   |
| Steroid                | +     | Terbentuk wana jingga kecoklatan |
| Tanin                  | +     | Terbentuk wana coklat kehitaman  |

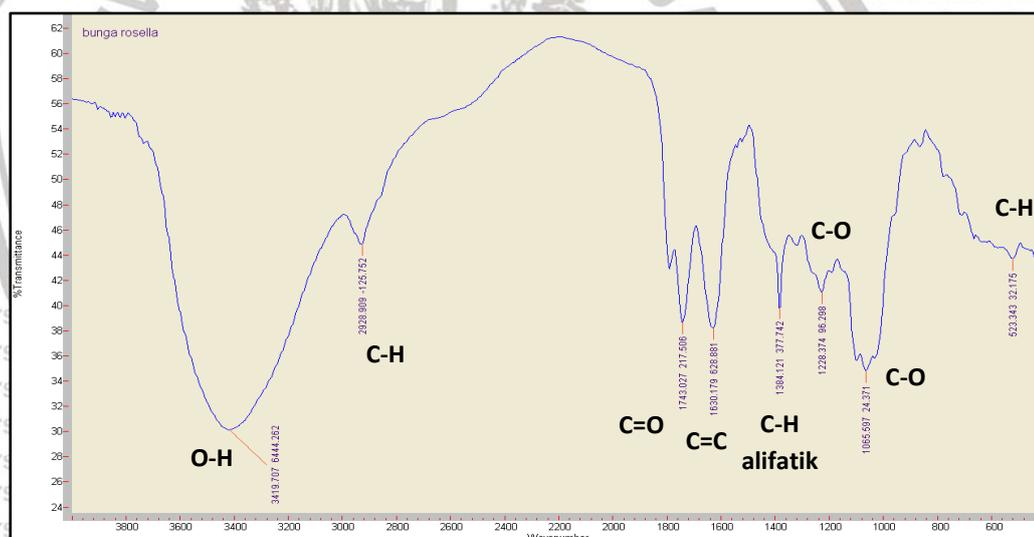
Keterangan: (+) = uji positif; (++) = uji positif kuat; (+++) = uji positif sangat kuat

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua senyawa yang diuji terdapat dalam ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan pelarut metanol.

Hal ini disebabkan karena metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH<sub>3</sub>) sehingga dapat menarik analit-analit yang bersifat polar dan nonpolar. Hal ini didukung oleh penelitian Lestari, *et al.* (2014) yang juga menemukan keberadaan senyawa-senyawa metabolit sekunder tersebut terdapat pada kelopak bunga rosella.

### 5.1.3.2 Analisis Spektrofometri *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Hasil analisis Spektrofometri FTIR ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) menunjukkan 8 daerah frekuensi jenis ikatan dalam suatu senyawa dengan pola spectra FTIR.



**Gambar 9.** Pola Spektra FTIR Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Hasil analisis spektrofotometri infra merah (**Gambar 9 dan Tabel 7**), dapat diketahui beberapa senyawa yang terdapat dalam ekstrak bunga rosella Rosella (*H. sabdariffa* L.) antara lain serapan pada daerah 3419,71 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus hidroksil (OH), 2928,91 cm<sup>-1</sup> merupakan gugus fungsi C-H strech, serapan pada 1743,03 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus C=O,

serapan pada  $1630,18\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan ikatan rangkap C=C, serapan pada  $1384,12\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus C-H alifatik, serapan pada  $1228,37\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus C-O, serapan pada  $1065,59\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus C-O alkohol dan munculnya serapan  $523,34\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan ikatan C-H aromatik.

**Tabel 7.** Karakterisasi Panjang Gelombang Gugus Fungsi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

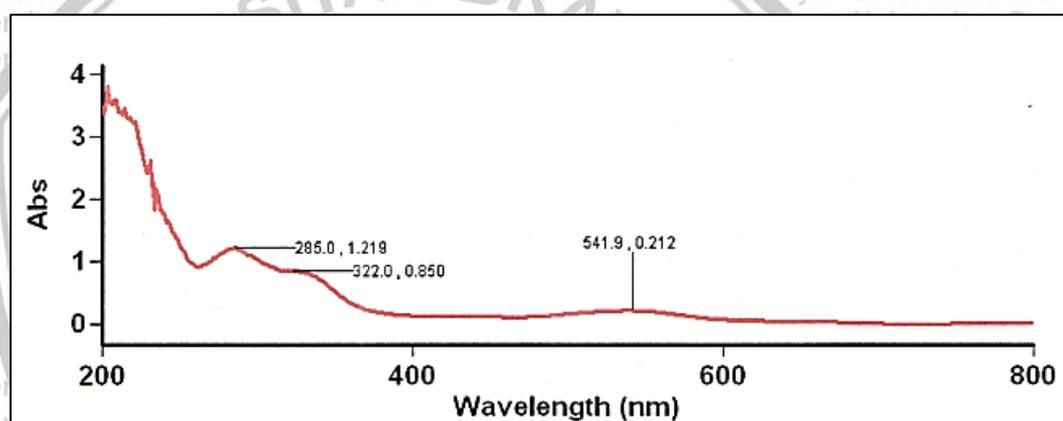
| Frekuensi Pita Serapan Isolat ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Gugus Fungsi   | Kelompok Fungsional                     |
|--|----------------|---|
| 3419.71  | O – H          | Alkohol, Fenol                          |
| 2928.91  | C – H stretch  | Alkana                                  |
| 1743.03  | C = O          | Aldehid, Keton, Asam Karboksilat, Ester |
| 1630.18  | C = C          | Aromatik                                |
| 1384.12  | C – H alifatik | Alkana                                  |
| 1228.37  | C – O          | Alkohol, Eter, Ester                    |
| 1065.59  | C – O alkohol  | Alkohol, Eter, Ester                    |
| 523.34   | C – H          | Aromatik                                |

Berdasarkan data tersebut diduga bahwa hasil isolat merupakan senyawa fenolik dimana gugus benzen mengikat satu gugus OH dengan insentitas melebar dan tajam dengan serapan pada daerah bilangan gelombang  $3419,71\text{ cm}^{-1}$  dan  $1384,12\text{ cm}^{-1}$ . Dan diperkuat gugus fungsi OH, C=C, C=O, C-H aromatik (Ardila, *et al.*, 2017; Hastuti, 2012; Irsyad, *et al.*, 2017). Senyawa fenolik di alam terdapat sangat luas, mempunyai variasi struktur yang luas serta mudah ditemukan di semua tanaman, daun, bunga dan buah (Tiwari, *et al.*, 2011).

### 5.1.3.3 Analisis Spektrofotometri *Ultraviolet – visible* (UV-VIS)

Berdasarkan hasil analisis spektrofotometri UV-VIS ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) menggunakan pelarut metanol menghasilkan 14 puncak panjang gelombang maksimum absorbansi (**Lampiran 9**). Hasil uji UV-VIS ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) menunjukkan panjang gelombang maksimum terdapat pada 285 nm dan 322 nm dengan nilai absorbansi 1,219 dan 0,850. Kedua nilai tersebut diduga kuat terdapat senyawa

flavonoid jenis flavonol yang merupakan golongan fenol terbesar. Kemudian pada panjang gelombang selanjutnya yang tertinggi terdapat pada 541.9 nm dengan nilai absorbansi 0,212. Nilai ini diduga masih masuk dalam golongan flavonoid jenis antosianin. Antosianin ini merupakan pigmen alami dari kelopak bunga rosella yang berwarna merah (Hastuti, 2012). Hal ini sesuai dengan pernyataan Sam, *et al.* (2016) bahwa kandungan senyawa kelopak bunga rosella berupa flavonoid yang terdiri dari flavonol dan pigmen antosianin. Dugaan hasil spektrum UV-VIS pada ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mengacu pernyataan Harbone (2006) pada **Tabel 8** dan hasil analisis UV-VIS disajikan pada **Gambar 10**.



**Gambar 10.** Hasil Analisis UV-VIS Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

**Tabel 8.** Spektrum UV Golongan Flavonoid Utama (Harbone, 2006)

| Lamda Maksimum Utama (nm) | Jenis Flavonoid     |
|---------------------------|---------------------|
| 475-560                   | Antosianin          |
| 390-430                   | Auron               |
| 365-390                   | Khalkon             |
| 250-270, 350-390          | Flavonol            |
| 250-270, 330-350          | Flavon dan Biflavol |
| ±225, 275-290             | Flavon dan Flavonol |
| 255-265                   | Isoflavon           |

#### 5.1.4 Mekanisme Antibakteri Senyawa Aktif Metabolit Sekunder

Berdasarkan analisis karakteristik senyawa berupa uji fitokimia, FTIR dan UV-VIS pada ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) telah ditemukan mengandung senyawa fenolik berupa flavonoid (flavonol, antosianin) serta tanin. Keberadaan senyawa-senyawa ini diduga mampu bekerja menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk membentuk struktur kompleks tertentu pada dinding sel bakteri. Selanjutnya, dengan jumlah gugus hidroksil yang berada pada cincin fenolik akan ada peningkatan hidroksilasi, dan dengan peningkatan hidroksilasi, aktivitas antibakteri akan meningkat (Cowan, 1999).

Senyawa metabolit sekunder lainnya yang juga ditemukan pada ekstrak metanol kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) berupa senyawa alkaloid, saponin, steroid, dan triterpenoid ikut berperan memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak struktur dinding sel, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sel (Dzulkarnain, *et al.*, 1996; Cavaliere, *et al.*, 2005). Perubahan dan kerusakan membran sitoplasma akan menyebabkan kebocoran bahan intraseluler dan gangguan metabolisme sel (Ayu, *et al.*, 2016). Menurut Rempe, *et al.* (2017) mekanisme antibakteri antar satu senyawa dengan lainnya yang dikombinasikan menjadi satu akan bekerja secara sinergis dan lebih efektif dalam memerangi bakteri.

### 5.2 Penelitian Tahap II

#### 5.2.1 Uji Toksisitas Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

Uji toksisitas ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dilakukan untuk mengetahui dosis lethal yang dapat membunuh 50% populasi ikan uji. Kisaran dosis yang dipakai adalah 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, dan 500 mg/L. Konsentrasi ini dipakai untuk menentukan toksisitas ekstrak kelopak

bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap ikan mas (*C. carpio*) sebagai ikan uji melalui parameter mortalitas ikan selama 48 jam yang dimana hasil uji toksisitas yang diperoleh pada dosis 300 mg/L (**Tabel 9**) dan berdasarkan analisa EPA *Prohibit Analysis* (**Lampiran 10**) didapatkan nilai 308 mg/L sehingga dosis ekstrak yang akan digunakan pada penelitian tahap 2 yaitu pada dosis 375 mg/L, 300 mg/L, 225 mg/L, 150 mg/L, dan 75 mg/L. Mortalitas ikan yang terjadi terlihat semakin meningkat seiring dengan meningkatnya dosis dan waktu pemaparan. Connell, *et al.* (2016) menjelaskan bahwa pemberian suatu bahan kimia toksisitasnya akan semakin tinggi terhadap organisme seiring dengan penambahan dosis dan waktu pemaparan.

**Tabel 9.** Uji Toksisitas Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)

| Jam                   | Dosis (mg/L) |     |     |     |     |
|-----------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
|                       | 100          | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 12                    | -            | -   | -   | 2   | 2   |
| 24                    | -            | -   | 1   | 1   | 2   |
| 36                    | -            | 1   | 2   | 2   | 3   |
| 48                    | 1            | 2   | 2   | 2   | 1   |
| Jumlah Mortalitas (%) | 10           | 30  | 50  | 70  | 80  |

### 5.2.2 Uji Patogenitas *A. hydrophila*

Uji patogenitas *A. hydrophila* dilakukan untuk mengetahui dosis lethal bakteri *A. hydrophila* yang dapat membunuh 50% dari populasi ikan uji. Total kepadatan bakteri yang dipakai pada uji ini adalah  $10^5$  CFU/ml,  $10^6$  CFU/ml,  $10^7$  CFU/ml dan  $10^8$  CFU/ml. Hasil data mortalitas ikan selama pengujian patogenitas bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan mas (*C. carpio*) ditunjukkan pada pemaparan bakteri *A. hydrophila* pada kepadatan  $10^7$  CFU/ml yang disajikan pada **Tabel 10** dan data EPA *Prohibit Analysis* ( $1,0 \times 10^7$  CFU/ml) pada **Lampiran 11**.

Tabel 10. Uji Patogenitas Bakteri *A. hydrophila*

| Jam                   | Kepadatan Bakteri (cfu/ml) |        |        |        |
|-----------------------|----------------------------|--------|--------|--------|
|                       | $10^5$                     | $10^6$ | $10^7$ | $10^8$ |
| 12                    | -                          | -      | -      | 1      |
| 24                    | -                          | 1      | 1      | 2      |
| 36                    | 1                          | 1      | 2      | 2      |
| 48                    | -                          | 1      | 2      | 2      |
| Jumlah Mortalitas (%) | 10                         | 30     | 50     | 70     |

Ikan mas sebagai media uji virulensi dan juga merupakan salah satu sel inang *A. hydrophila* karena di dalam tubuh ikan bakteri mendapatkan lingkungan dengan pH, suhu, serta nutrisi yang cukup serta dapat memperbanyak diri. Peningkatan virulensi bakteri *A. hydrophila* dilakukan bertujuan untuk meningkatkan kembali patogenitas dan virulensi bakteri, sehingga infeksi *A. hydrophila* pada ikan uji menjadi optimal. Semakin tinggi dosis bakteri *A. hydrophila* yang digunakan, maka tingkat mortalitas ikan juga akan semakin tinggi (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010; Putra, *et al.*, 2015).

### 5.3 Hematologi

Pengamatan hematologi pada ikan dapat digunakan untuk mengetahui kondisi atau status kesehatan ikan. Pengamatan hematologi yang diamati pada penelitian ini dilakukan untuk melihat perbedaan sel darah berupa jumlah sel darah merah (eritrosit), hematokrit, hemoglobin, jumlah sel darah putih (leukosit), dan total sel diferensial leukosit (neutrofil, limfosit dan monosit) pada ikan mas sehat, terinfeksi dan setelah diobati.

#### 5.3.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Eritrosit merupakan sel darah yang memiliki jumlah paling banyak mencapai  $4 \times 10^6$  sel/ml<sup>3</sup>. Eritrosit berfungsi untuk mendistribusikan gas-gas terutama oksigen ke seluruh bagian tubuh. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan pada penelitian ini, didapatkan sel darah pada ikan mas berbentuk

bulat oval, lonjong, membran sel berbatas jelas dan memiliki inti sel di bagian tengahnya seperti disajikan pada **Gambar 11**.



**Gambar 11.** Sel Eritrosit Ikan Mas (*C. carpio*) diambil dengan foto mikroskop perbesaran 1000x

Berdasarkan data hasil pengamatan pada **Tabel 11**, dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah eritrosit ikan mas sehat berkisar  $1,46 - 1,66 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan.

Kemudian untuk ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* diketahui jumlah rata-rata eritrosit pada kisaran  $0,85 - 0,90 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>, nilai tersebut mengalami penurunan yang drastis walaupun tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Penurunan jumlah eritrosit yang terjadi diduga diakibatkan oleh patogenitas *A. hydrophila*. Bakteri ini menghasilkan enzim hemolisin yang dapat melisis sel darah merah, sehingga jumlah sel darah merah pada pembuluh darah dapat berkurang (Kamaludin, 2011). Prasetio, *et al.* (2018) menambahkan, berkurangnya nilai eritrosit pada ikan juga dapat disebabkan oleh pendarahan yang diakibatkan oleh bakteri *A. hydrophila* yang merusak organ luar dan menimbulkan luka.

**Tabel 11.** Rata-rata Jumlah Sel Eritrosit Ikan Mas Selama Penelitian ( $\times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ )

| Perlakuan (mg/L) | Sehat             | Setelah Terinfeksi | Setelah Diobati   |
|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 0 (K-)           | $1,58 \pm 0,03^a$ | $0,88 \pm 0,01^a$  | $0,80 \pm 0,02^a$ |
| 75               | $1,65 \pm 0,14^a$ | $0,85 \pm 0,02^a$  | $1,06 \pm 0,03^b$ |
| 150              | $1,59 \pm 0,12^a$ | $0,87 \pm 0,05^a$  | $1,22 \pm 0,05^c$ |
| 225              | $1,66 \pm 0,14^a$ | $0,89 \pm 0,03^a$  | $1,34 \pm 0,04^d$ |
| 300              | $1,57 \pm 0,12^a$ | $0,90 \pm 0,06^a$  | $1,49 \pm 0,05^e$ |
| 375              | $1,46 \pm 0,11^a$ | $0,90 \pm 0,05^a$  | $1,60 \pm 0,01^f$ |
| 0 (K+)           | $1,60 \pm 0,01^a$ | $1,55 \pm 0,03^b$  | $1,61 \pm 0,06^f$ |

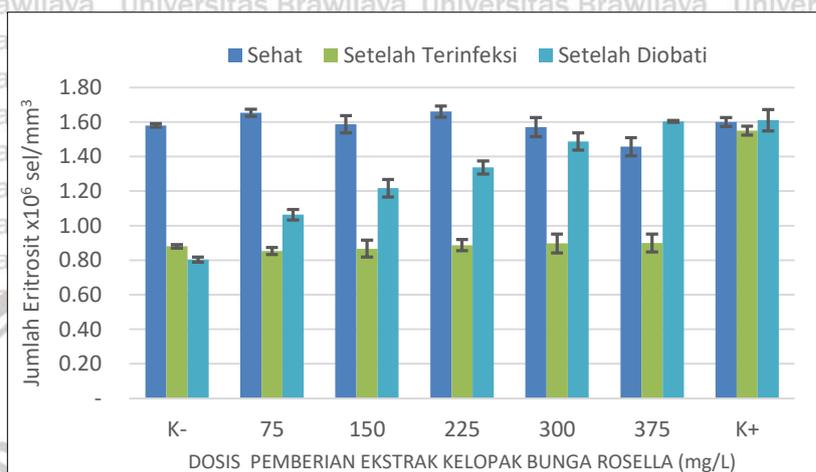
Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Dari hasil penelitian rata-rata jumlah eritrosit ikan mas setelah diobati telah menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $P < 0,05$ ). Jumlah eritrosit ikan mas yang diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) cenderung naik berkisar dari  $1,06 - 1,60 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ . Peningkatan yang terjadi masih dalam kisaran normal dan menandakan adanya upaya homeostatis pada tubuh ikan akibat infeksi patogen sehingga tubuh memproduksi sel darah lebih banyak untuk mengganti eritrosit yang mengalami lisis akibat adanya infeksi (Hardi, *et al.*, 2011). Adapun jumlah normal eritrosit pada ikan teleostei antara  $1,05 - 3,0 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$  (Matofani, *et al.*, 2013).

Untuk perlakuan Kontrol (+) mengalami nilai yang stabil dari  $1,55 \times 10^6 - 1,61 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ . Berbeda halnya dengan perlakuan K (-) yaitu mengalami penurunan jumlah eritrosit yaitu dari  $0,88 \times 10^6 - 0,80 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ . Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu meningkatkan jumlah eritrosit pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai tertinggi pada perlakuan dosis 375 mg/L yaitu  $1,60 \times 10^6$  sel/ $\text{mm}^3$ .

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap eritrosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ )

sebesar 0,9716 yang berarti pemberian dosis berpengaruh 97%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) memberikan pengaruh terhadap eritrosit ikan mas (*C. carpio*). Hasil analisis data eritrosit disajikan pada **Lampiran 12**. Untuk melihat pola perubahan jumlah eritrosit pada ikan mas disajikan pada **Gambar 12** berikut ini.



**Gambar 12.** Histogram Perubahan Jumlah Rata-rata Eritrosit Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

### 5.3.2 Hematokrit

Hematokrit merupakan persentase volume eritrosit dalam darah dan hasil pemeriksaannya dapat digunakan untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan (Purwanti, *et al.*, 2014). Menurunnya kadar hematokrit dapat dijadikan petunjuk mengenai rendahnya protein dalam pakan, defisiensi vitamin atau ikan mendapatkan infeksi, sedangkan meningkatnya kadar hematokrit dibatas normal menunjukkan ikan dalam keadaan stress (Mudjiutami, *et al.*, 2007; Anderson & Siwick, 1993). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan data hematokrit selama penelitian disajikan pada **Tabel 12**.

**Tabel 12.** Rata-rata Nilai Hematokrit Ikan Mas Selama Penelitian (%)

| Perlakuan<br>(mg/L) | Sehat                     | Setelah Terinfeksi        | Setelah Diobati            |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0 (K-)              | 28,47 ± 0,55 <sup>a</sup> | 16,07 ± 1,11 <sup>a</sup> | 15,67 ± 0,61 <sup>a</sup>  |
| 75                  | 28,88 ± 1,08 <sup>a</sup> | 16,67 ± 2,08 <sup>a</sup> | 17,77 ± 0,69 <sup>b</sup>  |
| 150                 | 28,73 ± 0,36 <sup>a</sup> | 16,86 ± 1,03 <sup>a</sup> | 22,11 ± 0,95 <sup>c</sup>  |
| 225                 | 29,20 ± 1,00 <sup>a</sup> | 16,33 ± 2,08 <sup>a</sup> | 25,52 ± 0,50 <sup>d</sup>  |
| 300                 | 28,28 ± 0,22 <sup>a</sup> | 16,73 ± 0,53 <sup>a</sup> | 27,22 ± 0,19 <sup>e</sup>  |
| 375                 | 29,10 ± 0,38 <sup>a</sup> | 16,33 ± 1,53 <sup>a</sup> | 26,12 ± 0,18 <sup>de</sup> |
| 0 (K+)              | 28,28 ± 0,10 <sup>a</sup> | 28,30 ± 0,50 <sup>b</sup> | 28,40 ± 0,43 <sup>f</sup>  |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ )

Berdasarkan tabel di atas, perlakuan pada ikan sehat tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan, sama halnya dengan ikan yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* ( $P>0,05$ ). Sedangkan untuk ikan yang setelah diobati terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Nilai hematokrit pada perlakuan ikan sehat berkisar antara 28,28 – 29,20 %. Kemudian pada ikan yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* terjadi penurunan dengan kisaran 16,07 – 16,86 %. Nirmala, *et al.* (2012) menjelaskan bahwa penurunan nilai hematokrit mengindikasikan ketidaknyamanan kondisi suatu organisme dan dapat menyebabkan anemia. Sari, *et al.* (2017) menambahkan bahwa ikan mengalami defisiensi eritrosit apabila memiliki nilai hematokrit dibawah 20%. Tsuzuki, *et al.* (2001) menjelaskan rendahnya hematokrit juga dapat menunjukkan terjadinya indikasi stress karena faktor lingkungan, pananganan maupun kondisi ikan yang terinfeksi penyakit, tingginya nilai hematokrit dalam darah berbanding lurus dengan nilai hemoglobin.

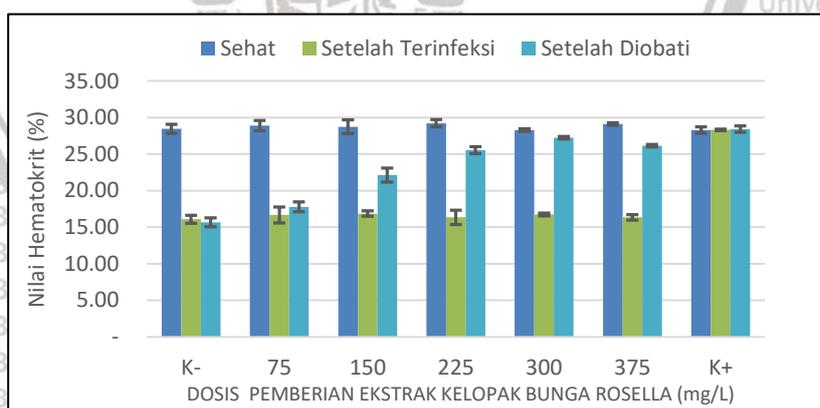
Adapun kisaran nilai hematokrit ikan yang setelah diobati pada perlakuan dosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan yaitu 17,77 % - 27,22 %. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian dosis ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) berpengaruh nyata secara signifikan terhadap nilai hematokrit. Putra, *et al.* (2015), memaparkan bahwa nilai

hematokrit ikan mas yang normal berkisar antara 24 – 40%. Kadar hematokrit ini bervariasi tergantung pada faktor nutrisi, ukuran tubuh, jenis kelamin, umur ikan dan masa pemijahan.

Hematokrit pada perlakuan K (+) menunjukkan nilai hematokrit yang stabil bila dibandingkan dengan perlakuan K (-) yang cenderung menurun selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu meningkatkan nilai hematokrit pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai tertinggi pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu 27,22 %.

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan hematokrit ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9641 dan persamaan  $y = -0,0002x^2 + 0,101x + 10,91$ . Berdasarkan nilai persamaan tersebut diperoleh dosis 252 mg/L mampu memberikan pengaruh hematokrit tertinggi sebesar 25,98% (**Lampiran 12**).

Untuk melihat pola perubahan nilai hematokrit ikan mas disajikan pada **Gambar 13** berikut ini.



**Gambar 13.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Hematokrit Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

### 5.3.3 Hemaglobin

Hemaglobin merupakan bagian terpenting dalam eritrosit dan berfungsi untuk mengikat serta mengangkut oksigen dari insang ke seluruh jaringan tubuh dan melepaskan oksigen dalam jaringan pembuluh kapiler. Hemaglobin yang mengikat oksigen atau disebut dengan oksihemoglobin inilah yang menyebabkan eritrosit berwarna merah (Safitri, 2014). Kondisi keadaan stress atau sakit pada ikan akan mengakibatkan peningkatan metabolisme tubuh terutama pada otot-otot, peningkatan metabolisme ini bertujuan meningkatkan produksi energi (ATP) untuk memenuhi kebutuhan energi untuk aktivitas tersebut (Safitri, *et al.*, 2013).

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan data hemaglobin selama penelitian disajikan pada **Tabel 13**.

**Tabel 13.** Rata-rata Nilai Hemaglobin Ikan Mas Selama Penelitian (g %)

| Perlakuan (mg/L) | Sehat                    | Setelah Terinfeksi       | Setelah Diobati          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 (K-)           | 5,70 ± 0,10 <sup>a</sup> | 2,73 ± 0,15 <sup>a</sup> | 2,63 ± 0,15 <sup>a</sup> |
| 75               | 5,63 ± 0,21 <sup>a</sup> | 2,63 ± 0,21 <sup>a</sup> | 3,17 ± 0,15 <sup>b</sup> |
| 150              | 5,57 ± 0,21 <sup>a</sup> | 2,50 ± 0,10 <sup>a</sup> | 3,80 ± 0,10 <sup>c</sup> |
| 225              | 5,80 ± 0,10 <sup>a</sup> | 2,57 ± 0,31 <sup>a</sup> | 4,67 ± 0,15 <sup>d</sup> |
| 300              | 5,70 ± 0,17 <sup>a</sup> | 2,43 ± 0,38 <sup>a</sup> | 4,83 ± 0,31 <sup>d</sup> |
| 375              | 5,53 ± 0,21 <sup>a</sup> | 2,47 ± 0,15 <sup>a</sup> | 5,60 ± 0,10 <sup>e</sup> |
| 0 (K+)           | 5,77 ± 0,15 <sup>a</sup> | 5,67 ± 0,12 <sup>b</sup> | 5,77 ± 0,15 <sup>e</sup> |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ )

Berdasarkan tabel tersebut, perlakuan pada ikan sehat tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan sama halnya dengan ikan yang telah terinfeksi bakteri ( $P>0,05$ ). Sedangkan untuk ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Rata-rata nilai hemoglobin ikan mas sehat berkisar 5,53 – 5,80 g%, kemudian setelah diberi perlakuan infeksi bakteri *A. hydrophila* terjadi penurunan yaitu dengan kisaran 2,43 – 2,73 g%. Penurunan hemoglobin yang terjadi mengindikasikan kondisi stress sehingga meningkatkan metabolisme

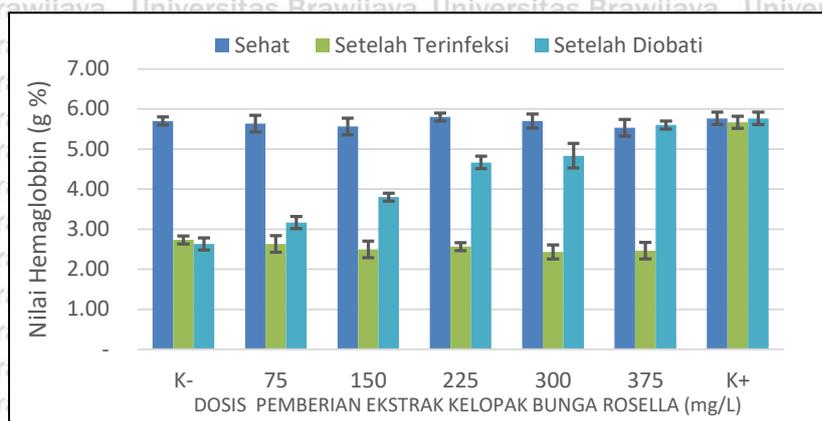
dalam tubuh ikan yang mengakibatkan terjadinya kekurangan oksigen (hipoksia) (Matofani, *et al.*, 2013). Wahjuningrum, *et al.* (2013) menambahkan bahwa ikan yang sakit/terinfeksi jumlah hemoglobin dalam darah akan rendah sedangkan kenaikan hemoglobin dibatas normal mengindikasikan ikan dalam keadaan stress.

Pada perlakuan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terjadi peningkatan yang signifikan seiring dengan penambahan dosis dengan nilai kisaran (3,17 – 5,60 g%). Nilai tersebut masih dalam kisaran normal.

Menurut Celik dan Bircan, (2004) menyatakan kisaran normal nilai hemoglobin pada ikan mas adalah 5,50 – 8,59 g%. Hemoglobin pada K (+) menunjukkan nilai hemoglobin yang stabil jika dibandingkan dengan K (-) yang menunjukkan nilai hemoglobin cenderung menurun selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu meningkatkan nilai hemoglobin pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai tertinggi pada perlakuan dosis 375 mg/L yaitu 5,60 g%.

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan hemoglobin ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9718 yang berarti pemberian dosis berpengaruh 97%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) memberikan pengaruh terhadap hemoglobin ikan mas (*C. carpio*).

Hasil analisis data hemoglobin disajikan pada **Lampiran 12**. Untuk melihat pola perubahan nilai hemoglobin ikan mas disajikan pada **Gambar 14** berikut ini.



**Gambar 14.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Hemaglobin Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

#### 5.3.4 Sel Darah Putih (Leukosit)

Leukosit merupakan sel darah putih yang diproduksi pada jaringan hemopoetik dan berfungsi sebagai pertahanan dalam tubuh, yang bereaksi dengan cepat terhadap masuknya benda asing ke dalam tubuh ikan. Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah leukosit adalah kondisi dan kesehatan tubuh ikan. Jumlah total leukosit merupakan salah satu indikator adanya infeksi tertentu pada ikan. (Utami, *et al.*, 2013). Hasil pengamatan jumlah leukosit ikan mas selama penelitian disajikan **Tabel 14**.

**Tabel 14.** Rata-rata Jumlah Sel Leukosit Ikan Mas Selama Penelitian ( $\times 10^4$  sel/ $\text{mm}^3$ )

| Perlakuan (mg/L) | Sehat                         | Setelah Terinfeksi            | Setelah Diobati               |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 (K-)           | 11,47 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup> | 16,91 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup> | 16,93 $\pm$ 0,54 <sup>f</sup> |
| 75               | 11,21 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> | 17,24 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup> | 15,21 $\pm$ 0,18 <sup>e</sup> |
| 150              | 11,48 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup> | 16,92 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup> | 14,54 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup> |
| 225              | 11,56 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup> | 16,79 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup> | 13,32 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> |
| 300              | 11,39 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup> | 17,04 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup> | 12,29 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> |
| 375              | 11,29 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> | 17,01 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup> | 13,01 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> |
| 0 (K+)           | 11,49 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup> | 11,29 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> | 11,33 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup> |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Berdasarkan tabel tersebut, diketahui bahwa perlakuan pada ikan sehat tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan, sama halnya dengan ikan

yan telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* ( $P>0,05$ ). Sedangkan untuk ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) diketahui pada perlakuan dosis 75 mg/L 150 mg/L dan 300 mg/L menunjukkan perbedaan yang signifikan. Untuk perlakuan dosis 225 mg/L dan 375 mg/L menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan, namun signifikan terhadap perlakuan lainnya.

Adapun rata-rata jumlah leukosit ikan mas sehat berkisar 11,21 – 11,56  $\times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>, kemudian setelah diberi perlakuan infeksi bakteri *A. hydrophila* terjadi peningkatan yaitu dengan kisaran 16,91 – 17,24  $\times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>.

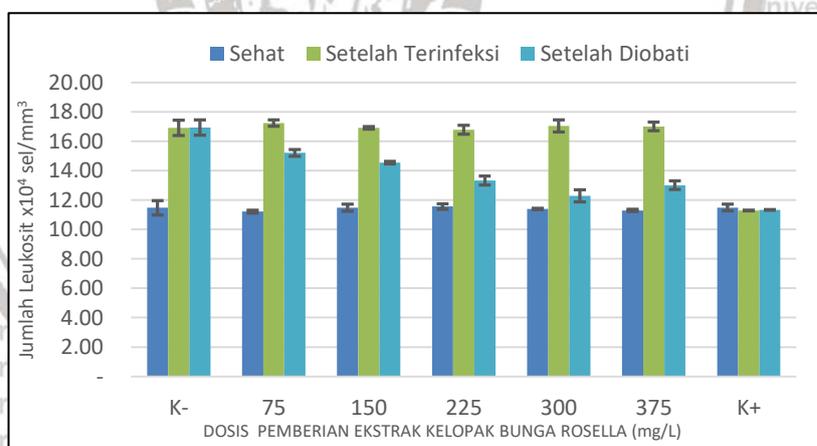
Peningkatan jumlah leukosit dapat memberikan petunjuk adanya fase pertama infeksi, stres maupun leukemia (Prayatna, *et al.*, 2018). Menurut Zou, *et al.* (2000) peningkatan jumlah leukosit disebabkan oleh peningkatan aktivitas pembelahan sel, karena leukosit berperan dalam mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam tubuh. Lengka, *et al.* (2013) menambahkan bahwa jumlah leukosit pada jenis ikan tertentu bisa berubah sesuai dengan tingkat kesehatan ikan tersebut. Apabila ikan terinfeksi oleh bakteri patogen, maka akan terjadi peningkatan jumlah total leukosit atau jumlah leukosit menjauhi batas normalnya dan akan menderita leucopenia.

Sedangkan pada perlakuan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terjadi penurunan jumlah leukosit yaitu berkisar dari 15,21 – 12,29  $\times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Jumlah leukosit tersebut masih dalam kisaran normal. Secara umum, jumlah total leukosit pada ikan yaitu 2 - 15  $\times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Jumlah leukosit pada ikan mas sehat berkisar 3,2 – 14,6  $\times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup> (Hartika, *et al.*, 2014; Harikrishnan, *et al.*, 2003). Penurunan jumlah leukosit yang terjadi diduga karena aktivitas dari ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) membuat bakteri mati dan infeksi menjadi terhenti, selain itu ikan tidak dalam kondisi stress. Ketika

infeksi berhenti maka leukosit sebagai fagosit tidak diperlukan lagi sehingga jumlah leukosit kembali mendekati normal.

Perlakuan K (+) menunjukkan jumlah leukosit yang stabil jika dibandingkan dengan K (-) yang menunjukkan jumlah leukosit cenderung meningkat selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menurunkan jumlah leukosit pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai terendah pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu  $12,29 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>.

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan leukosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9037 dan persamaan  $y = 4E-05x^2 - 0,0258x + 17,154$ . Berdasarkan persamaan tersebut dosis 322,5 mg/L dapat menghasilkan pengaruh leukosit tertinggi sebesar 11,40 sel/mm<sup>4</sup> (**Lampiran 12**). Untuk melihat pola perubahan jumlah leukosit ikan mas disajikan pada **Gambar 15** berikut ini.



**Gambar 15.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Jumlah Sel Leukosit Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

### 5.3.5 Diferensial Leukosit

Pengamatan diferensial leukosit bertujuan untuk mengetahui perbedaan persentase komponen sel leukosit. Adapun yang diamati dari diferensial leukosit meliputi sel neutrofil, limfosit dan monosit.

### 5.3.5.1 Neutrofil

Neutrofil pada ikan berbentuk bulat, terdapat granula dalam sitoplasmanya dan memiliki inti memenuhi sebagian ruang sitoplasma (**Gambar 16**). Neutrofil berperan dalam respon nonspesifik dengan melakukan fagositosis untuk melawan mikroorganisme penyerang (Maswan, 2009).



**Gambar 16.** Sel Neutrofil Ikan Mas (*C. carpio*) diambil dengan foto mikroskop perbesaran 1000x

Berdasarkan data hasil pengamatan nilai neutrofil selama penelitian disajikan pada **Tabel 15** diketahui bahwa pada perlakuan ikan sehat rata-rata nilainya berkisar 8 – 9 % menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $P > 0,05$ ), sama halnya juga dengan perlakuan ikan yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan kisaran 21 – 22 %. Nilai tersebut mengalami peningkatan yang drastis. Peningkatan nilai neutrofil pada perlakuan ikan yang terinfeksi bakteri diduga karena akibat infeksi bakteri *A. hydrophila* yang semakin virulen yang mengakibatkan penurunan kondisi tubuh sehingga terjadi infeksi sekunder oleh bakteri.

Kemudian untuk perlakuan ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mengalami penurunan yaitu dari 17 – 8 % ( $P < 0,05$ ). Hal ini diduga karena efek dari kemampuan aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh ekstrak bunga rosella dalam menghadapi serangan bakteri. Ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mengandung senyawa fitokimia (flavonoid dan alkaloid) yang berpengaruh terhadap sel neutrofil yang berkerja aktif pada daerah terjadinya luka sehingga neutrofil yang terdapat pada sirkulasi

darah menjadi sedikit (Chandra, et al., 2018). Selain itu, Kiron (2012) menambahkan, penurunan neutrofil dalam darah disebabkan karena neutrofil sudah melakukan aktivitas fagositik di dalam sel dan neutrofil hanya berada dalam sirkulasi darah kurang dari 48 jam karena neutrofil cenderung merusak diri sendiri ketika sudah melakukan penyerangan terhadap benda asing. Kisaran normal neutrofil pada ikan air tawar adalah 3,25 – 8,40 % sedangkan pada ikan mas 2 - 10 % (Lusiastuti dan Esti, 2004; Maswan, 2009).

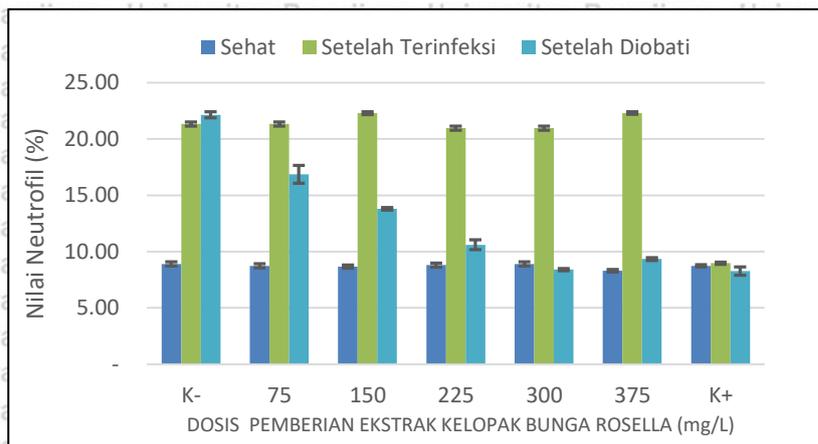
**Tabel 15.** Rata-rata Nilai Neutrofil Ikan Mas Selama Penelitian (%)

| Perlakuan (mg/L) | Sehat                 | Setelah Terinfeksi     | Setelah Diobati        |
|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 0 (K-)           | 9 ± 0,95 <sup>a</sup> | 21 ± 0,15 <sup>b</sup> | 22 ± 0,28 <sup>e</sup> |
| 75               | 9 ± 0,47 <sup>a</sup> | 21 ± 0,58 <sup>b</sup> | 17 ± 0,79 <sup>d</sup> |
| 150              | 9 ± 0,38 <sup>a</sup> | 22 ± 0,17 <sup>b</sup> | 14 ± 0,06 <sup>c</sup> |
| 225              | 9 ± 0,46 <sup>a</sup> | 21 ± 0,16 <sup>b</sup> | 11 ± 0,44 <sup>b</sup> |
| 300              | 9 ± 0,44 <sup>a</sup> | 21 ± 0,16 <sup>b</sup> | 8 ± 0,10 <sup>a</sup>  |
| 375              | 8 ± 0,20 <sup>a</sup> | 22 ± 0,17 <sup>b</sup> | 9 ± 0,12 <sup>a</sup>  |
| 0 (K+)           | 9 ± 0,12 <sup>a</sup> | 9 ± 0,12 <sup>a</sup>  | 8 ± 0,38 <sup>a</sup>  |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Perlakuan K (+) menunjukkan nilai neutrofil yang stabil jika dibandingkan dengan K (-) yang menunjukkan nilai neutrofil cenderung meningkat selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menurunkan nilai neutrofil pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai terendah pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu 8 %.

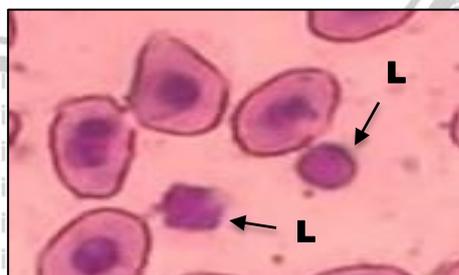
Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan neutrofil ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9776 dan persamaan  $y = 0,0001x^2 - 0,0785x + 22,408$ . Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 392,5 mg/L dapat memberikan pengaruh neutrofil tertinggi sebesar 12,84% (**Lampiran 12**). Untuk melihat pola perubahan neutrofil ikan mas disajikan pada **Gambar 17**.



**Gambar 17.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Neutrofil Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

### 5.3.5.2 Limfosit

Limfosit merupakan sel darah kecil bernukleus besar (menempati bagian terbesar dari sel) dikelilingi sejumlah kecil sitoplasma, tidak bergranula dan merupakan proporsi sel darah putih terbanyak (Mones, 2009). Menurut Baratawidjaja dan Rengganis, (2012), limfosit sangatlah penting dalam respon pertahanan tubuh, sel ini diklasifikasi menjadi 2 sub kelas yaitu sel B yang berfungsi untuk bertransformasi menjadi sel plasma untuk memproduksi antibodi, dan sel T yang berfungsi untuk mengontrol respon imun. Adapun bentuk limfosit disajikan pada **Gambar 18** dan untuk data pengamatan selama penelitian terdapat pada **Tabel 16**.



**Gambar 18.** Sel Limfosit Ikan Mas (*C. carpio*) diambil dengan foto mikroskop perbesaran 1000x

**Tabel 16.** Rata-rata Nilai Limfosit Ikan Mas Selama Penelitian (%)

| Perlakuan (mg/L) | Sehat                  | Setelah Terinfeksi     | Setelah Diobati         |
|------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 (K-)           | 86 ± 0,49 <sup>a</sup> | 66 ± 1,54 <sup>a</sup> | 63 ± 0,20 <sup>a</sup>  |
| 75               | 86 ± 0,96 <sup>a</sup> | 65 ± 1,16 <sup>a</sup> | 74 ± 1,47 <sup>b</sup>  |
| 150              | 87 ± 0,64 <sup>a</sup> | 65 ± 0,48 <sup>a</sup> | 78 ± 1,31 <sup>c</sup>  |
| 225              | 86 ± 1,50 <sup>a</sup> | 65 ± 0,52 <sup>a</sup> | 82 ± 0,49 <sup>d</sup>  |
| 300              | 86 ± 1,54 <sup>a</sup> | 64 ± 0,07 <sup>a</sup> | 87 ± 0,75 <sup>ef</sup> |
| 375              | 87 ± 1,67 <sup>a</sup> | 65 ± 1,84 <sup>a</sup> | 86 ± 0,06 <sup>e</sup>  |
| 0 (K+)           | 87 ± 0,91 <sup>a</sup> | 87 ± 0,53 <sup>b</sup> | 88 ± 1,36 <sup>f</sup>  |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Berdasarkan tabel tersebut, perlakuan pada ikan sehat tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan sama halnya dengan ikan yang telah terinfeksi bakteri ( $P > 0,05$ ). Sedangkan untuk ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Rata-rata nilai limfosit ikan mas sehat berkisar 86 – 87 %, kemudian setelah diberi perlakuan infeksi bakteri *A. hydrophila* terjadi penurunan yaitu dengan kisaran 64 – 66 %. Penurunan nilai limfosit ini menunjukkan bahwa virulensi bakteri *A. hydrophila* pengaruhnya lebih dominan dibanding sistem pertahanan tubuh ikan mas pada setiap perlakuan.

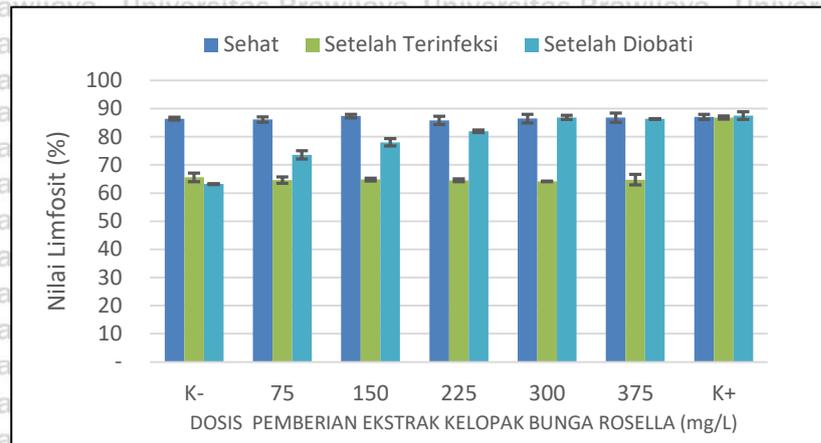
Namun setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terjadi peningkatan yang signifikan dengan nilai kisaran (74 – 87 %). Nilai ini masih dalam batas kisaran normal. Secara umum persentase limfosit ikan normal adalah 71,12 – 82,88 % dan pada ikan mas 82,7 – 89,5 % (Chandra, *et al.*, 2018; Wietsaka, 2016). Peningkatan yang terjadi diduga karena efek dari ekstrak kelopak bunga rosella yang memiliki aktivitas antibakteri karena kandungan senyawa yang dimilikinya berupa flavonoid yang berfungsi untuk meningkatkan kekebalan tubuh dengan cara mengganggu fungsi mikroorganisme patogen (Nugrahani, *et al.*, 2016).

Selain itu, peran dari limfosit itu sendiri sebagai sel pertahanan tubuh. Sel limfosit terdiri dari sel T sebagai kekebalan berperantara sel (sel T sitotoksik) dan mengontrol respon imun (sel T supresor). Setelah terjadi pengikatan antigen dengan reseptor antigen sel limfosit, maka sel limfosit akan membelah kemudian berdiferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori (Kresno, 2001). Meningkatnya jumlah limfosit akan menyebabkan peningkatan pembentukan antibodi, 2-3 hari setelah injeksi antigen. Jumlah limfosit akan menjadi tinggi hal ini biasanya disebabkan oleh adanya infeksi viral atau bakteri ke tubuh ikan atau gangguan kesehatan (Moyle dan Cech, 2004).

Limfosit pada K (+) menunjukkan nilai limfosit yang stabil jika dibandingkan dengan K (-) yang menunjukkan nilai limfosit cenderung menurun selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu meningkatkan nilai limfosit pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai tertinggi pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu 87 %.

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan limfosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9621 dan persamaan  $y = -0,0002x^2 + 0,1598x + 67$ .

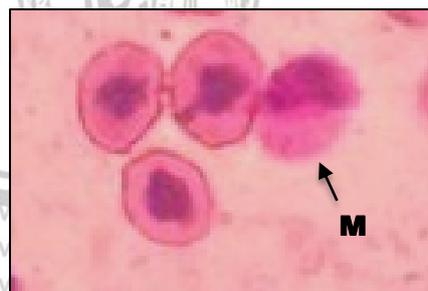
Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 399,5 mg/L mampu memberikan pengaruh limfosit terbaik sebesar 73,70% (**Lampiran 12**). Pola perubahan limfosit ikan mas disajikan pada **Gambar 19** berikut ini.



**Gambar 19.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Limfosit Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

### 5.3.5.3 Monosit

Monosit diproduksi dari jaringan hemopoetik dalam ginjal. Bentuknya bulat oval, inti terletak pada bagian tengah sel, dan sitoplasmanya tidak bergranula (Takashima dan Hibiya, 1995). Tampilan bentuk sel monosit disajikan pada **Gambar 20**. Kresno, (2001) menjelaskan bahwa monosit merupakan sel fagosit utama yang sangat penting dalam menghancurkan patogen penyerang dan juga berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC) yang berfungsi untuk menyajikan antigen kepada sel limfosit.



**Gambar 20.** Sel Monosit Ikan Mas (*C. carpio*) pada arah panah diambil dengan foto mikroskop perbesaran 1000x

Hasil pengamatan nilai monosit pada **Tabel 17**, diketahui bahwa pada perlakuan ikan sehat rata-rata nilainya berkisar 4 – 6 % yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $P > 0,05$ ), sama halnya juga

dengan perlakuan ikan yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan kisaran 13 – 14 %. Nilai tersebut mengalami peningkatan. Hal ini diduga karena ikan mas mengalami infeksi. Suhermanto, *et al.* (2013) menjelaskan bahwa monosit berperan sebagai makrofag yaitu sel fagosit utama untuk menghancurkan partikel dan jaringan mati, serta mengolah bahan asing demikian rupa untuk mengaktifkan tanggap kebal. Jumlah monosit dapat meningkatkan dalam waktu singkat  $\pm$  48 jam setelah masuknya benda asing. Pada saat terjadi infeksi, monosit menggandakan diri dengan cepat pada daerah inflamasi dan memakan agen penyebab luka (Robert, 2001; Affandi & Tang, 2002).

**Tabel 17.** Rata-rata Nilai Monosit Ikan Mas Selama Penelitian (%)

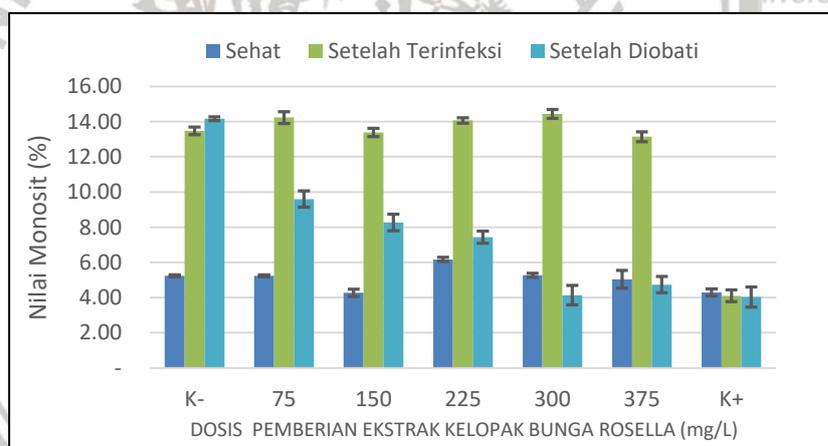
| Perlakuan (mg/L) | Sehat                     | Setelah Terinfeksi         | Setelah Diobati            |
|------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 (K-)           | 5 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> | 13 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup> | 14 $\pm$ 0,20 <sup>e</sup> |
| 75               | 5 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> | 14 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup> | 10 $\pm$ 0,46 <sup>d</sup> |
| 150              | 4 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> | 13 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup> | 8 $\pm$ 0,47 <sup>c</sup>  |
| 225              | 6 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> | 14 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup> | 7 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>  |
| 300              | 5 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> | 14 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup> | 4 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>  |
| 375              | 5 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup> | 13 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup> | 5 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>  |
| 0 (K+)           | 4 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> | 4 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>  | 4 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>  |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Kemudian untuk perlakuan ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mengalami penurunan yaitu dari 10 – 4 %. Penurunan monosit terjadi diduga karena monosit meninggalkan pembuluh darah karena paruh dan masa hidup monosit sangat cepat yaitu berkisar 10 - 20 jam setelah di produksi (Widyaningrum, *et al.*, 2017). Selain itu, efek dari ekstrak kelopak bunga rosella juga ikut berperan karena mengandung senyawa aktif berupa flavonoid yang berfungsi sebagai zat antibakteri yaitu dapat menghambat pertumbuhan bakteri serta menghambat produksi enterotoksin, sehingga organ yang menghasilkan sel darah mampu kembali pada kondisi normal (Septiana, 2011).

Perlakuan K (+) menunjukkan nilai monosit yang stabil jika dibandingkan dengan K (-) yang menunjukkan nilai monosit cenderung meningkat selama penelitian. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menurunkan nilai monosit pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai terendah pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu 4 %.

Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap dengan perubahan monosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,8899 dan persamaan  $y = 3E-05x^2 - 0,023x + 11,696$ . Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 383,33 mg/L memberikan pengaruh monosit terbaik sebesar 6,9% (**Lampiran 12**). Untuk melihat pola perubahan monosit ikan mas disajikan pada **Gambar 21**.



**Gambar 21.** Histogram Perubahan Nilai Rata-rata Monosit Setelah Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Pada Ikan Mas

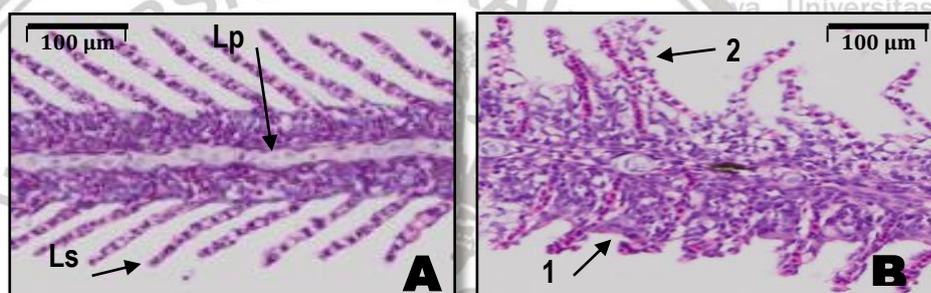
#### 5.4 Histopatologi Insang

Pengamatan histopatologi pada insang dapat memberikan gambaran yang terjadi pada insang ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Diagnosa penyakit merupakan langkah awal yang penting dalam penentuan penyakit pada ikan. Hal yang perlu diperhatikan dalam diagnosa penyakit adalah gejala klinis yang meliputi ciri-ciri eksternal dan internal, tingkah laku serta pengamatan

perubahan histopatologi (Insivitawati, *et al.*, 2015). Perubahan histopatologi pada insang ikan merupakan salah satu indikator kunci masuknya penyakit atau benda asing ke dalam tubuh ikan (Parameswari, *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian, gambaran histopatologi insang ikan mas sehat dan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* pada **Gambar 22** dengan pembesaran 400 kali, menunjukkan bahwa kondisi insang ikan mas yang sehat (A) memperlihatkan jaringan yang masih utuh dengan penampakan lamella sekunder yang terlihat jelas dan teratur, permukaan lamella dilapisi sel epitelium.

Di bagian tengah lamella primer terdapat pembuluh kapiler yang bercabang ke lamella sekunder.

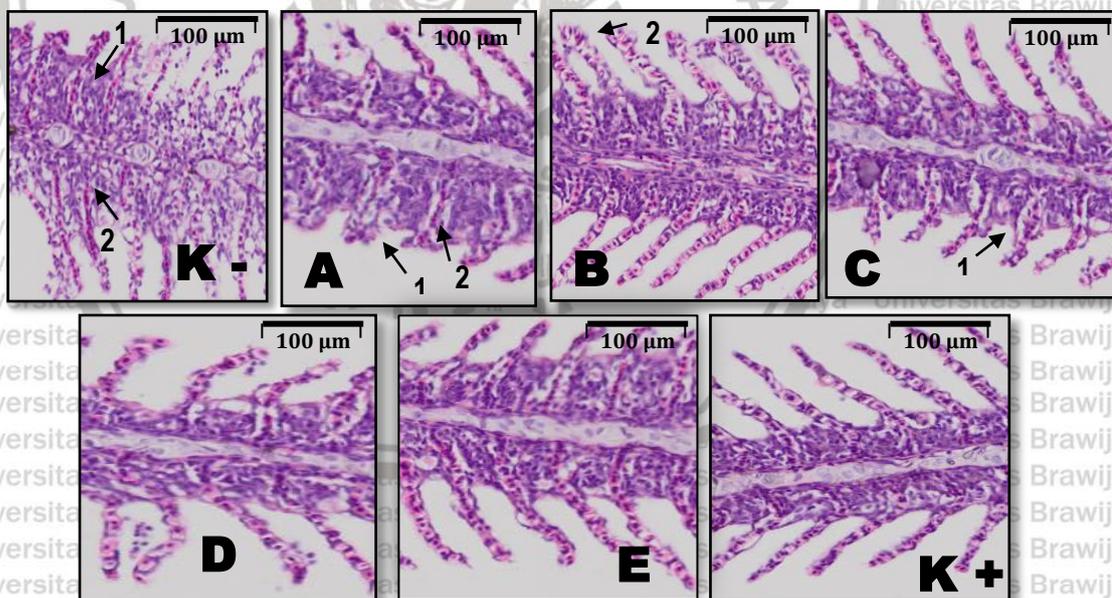


**Gambar 22.** A. Insang Sehat: (Lp) Lamella Primer, (Ls) Lamella sekunder, B. Insang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*: (1) Hiperplasia, (2) Fusi (Dokumentasi Penelitian). Perbesaran 400x

Sedangkan pada insang yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* (B) terlihat banyak kerusakan, kerusakan yang terjadi antara lain hiperplasia yaitu pembentukan jaringan secara berlebih karena bertambahnya jumlah sel. Lamella yang mengalami hiperplasia menyebabkan penebalan jaringan epitel di ujung filamen dan juga di dekat dasar lamella yang membengkak pada bagian epiteliumnya (Setyawan, 2013). Kerusakan hiperplasia pada insang ikan mas (*C. carpio*) diduga diakibatkan oleh adanya bakteri *A. hydrophila*. Infeksi yang terjadi dapat mengakibatkan organ insang mengalami iritasi dan mengeluarkan lendir (mucus) sebagai perlindungan terhadap serangan bakteri. Namun, mucus yang

dihasilkan justru menutup permukaan lamella insang sehingga pertukaran oksigen ( $O_2$ ) dan karbondioksida ( $CO_2$ ) menjadi terhambat. Sehingga, tidak terjadi pengikatan oksigen oleh hemoglobin darah dan berdampak pada transportasi oksigen ke seluruh tubuh (Maftuch, *et al.*, 2012).

Kemudian ditemukan kerusakan lainnya berupa fusi atau *fusion*, yaitu pendempetan atau penempelan antar lamella sekunder yang satu dengan yang lainnya (Asnita, 2011). Fusi terjadi karena lamella mengalami hiperplasia atau pembengkakan sehingga proses pernapasan menjadi terganggu dan kemudian merangsang organisme untuk mengikat sel darah merah serta merangsang hemoglobin dan hematokrit untuk meningkatkan mekanisme transfer oksigen di dalam tubuh. Keadaan ini yang mengakibatkan ukuran rongga (kapiler lumen) menjadi menyempit dan sel yang berada di tengah lamella sekunder bergeser ke ujung lamella sekunder lainnya (Andayani, *et al.*, 2017; Maftuch, *et al.*, 2012)



**Gambar 23.** Histopatologi Insang Ikan Mas (*C. carpio*), A. Dosis 75 mg/L, B. Dosis 150 mg/L, C. Dosis 225 mg/L, D. Dosis 300 mg/L, E. Dosis 375 serta K (-) dan K (+); (1) Hiperplasia, (2) Fusi (Dokumentasi Penelitian). Perbesaran 400x

Setelah pengamatan histopatologi insang ikan sehat dan ikan yang telah terinfeksi bakteri kemudian dilakukan pengamatan insang ikan yang telah diobati

dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan dosis 75 mg/L, 150 mg/L, 225 mg/L, 300 mg/L, dan 375 mg/L sebagai pembanding K (-) dan K (+) (**Gambar 23**). Histopatologi insang ikan mas dengan perlakuan dosis ekstrak dapat dilihat bahwa sudah mulai terjadi proses penyembuhan baik perlakuan mulai dari dosis 75 mg/L hingga 375 mg/L. Hal ini ditunjukkan dengan semakin sedikitnya jumlah kerusakan pada histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*). Untuk data hasil skoring kerusakan hiperlasia dan fusi disajikan pada **Tabel 18**.

**Tabel 18.** Hasil *Scoring* Kerusakan Insang Ikan Mas (*C. carpio*)

| Perlakuan<br>(mg/L) | Jenis Kerusakan (%) |              | Total<br>Kerusakan | Tingkat<br>Kerusakan |
|---------------------|---------------------|--------------|--------------------|----------------------|
|                     | Hiperlasia          | Fusi         |                    |                      |
| 0 (K -)             | 32,22               | 31,26        | 63,48              | Berat                |
|                     | 35,98               | 32,53        | 68,51              |                      |
|                     | 34,03               | 34,84        | 68,87              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>34,08</b>        | <b>32,88</b> | <b>66,95</b>       |                      |
| 75                  | 25,82               | 11,33        | 37,15              | Sedang               |
|                     | 24,44               | 11,17        | 35,61              |                      |
|                     | 24,49               | 11,67        | 36,16              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>24,92</b>        | <b>11,39</b> | <b>36,31</b>       |                      |
| 150                 | 22,49               | 9,49         | 31,98              | Sedang               |
|                     | 21,59               | 9,82         | 31,41              |                      |
|                     | 20,66               | 10           | 30,66              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>21,58</b>        | <b>9,77</b>  | <b>31,35</b>       |                      |
| 225                 | 18,28               | 7,26         | 25,54              | Sedang               |
|                     | 18,46               | 7,73         | 26,19              |                      |
|                     | 19,03               | 7,89         | 26,92              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>18,59</b>        | <b>7,63</b>  | <b>26,22</b>       |                      |
| 300                 | 14,28               | 4,54         | 18,82              | Ringan               |
|                     | 15,59               | 4,91         | 20,5               |                      |
|                     | 16,03               | 4,34         | 20,37              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>15,30</b>        | <b>4,60</b>  | <b>19,90</b>       |                      |
| 375                 | 17,28               | 5,26         | 22,54              | Ringan               |
|                     | 17,16               | 5,73         | 22,89              |                      |
|                     | 17,03               | 5,89         | 22,92              |                      |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>17,16</b>        | <b>5,63</b>  | <b>22,78</b>       |                      |
| 0 (K +)             | 1                   | 1            | 2                  | Normal               |
| <b>Rata-rata</b>    | <b>1,00</b>         | <b>1,00</b>  | <b>2,00</b>        |                      |

Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa kerusakan sedang terdapat perlakuan dosis 75 mg/L (36.31%), 150 mg/L (31.35%), dan 225 mg/L (26.22%) kemudian untuk kerusakan ringan yaitu pada dosis 300 mg/L (19.90%) dan 375 mg/L (22.78%), K<sup>-</sup> (66,95 %) termasuk dalam kerusakan berat dan Kontrol + masih dalam taraf normal (2%). Hasil skoring kerusakan histopatologi ikan mas (*C. carpio*) diklasifikasikan berdasarkan Alifia (2013), yaitu 0 - 5% normal, kerusakan ringan dengan nilai 5 - 25%, kerusakan kerusakan sedang dengan nilai 26 - 50%, kerusakan berat dengan nilai 51 - 75% dan kerusakan sangat berat dengan nilai sebesar 76%.

**Tabel 19.** Rata-rata Scoring Kerusakan Insang Ikan Mas (*C. carpio*)

| Perlakuan (mg/L) | Hiperplasia               | Fusi                      |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 (K-)           | 34,08 ± 1,88 <sup>f</sup> | 32,88 ± 1,82 <sup>f</sup> |
| 75               | 24,92 ± 0,78 <sup>e</sup> | 11,39 ± 0,26 <sup>e</sup> |
| 150              | 21,58 ± 0,92 <sup>d</sup> | 9,77 ± 0,26 <sup>d</sup>  |
| 225              | 18,59 ± 0,39 <sup>c</sup> | 7,63 ± 0,33 <sup>c</sup>  |
| 300              | 15,30 ± 0,91 <sup>b</sup> | 4,60 ± 0,29 <sup>b</sup>  |
| 375              | 17,16 ± 0,13 <sup>c</sup> | 5,63 ± 0,33 <sup>b</sup>  |
| 0 (K+)           | 1,00 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 1,00 ± 0,00 <sup>a</sup>  |

Keterangan : Nilai dengan *Superscript* yang sama pada baris menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ )

Berdasarkan hasil uji *one way anova* pada taraf kepercayaan 5% pada

**Tabel 19** didapatkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan insang yaitu hiperplasia dan fusi menunjukkan hasil yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menurunkan nilai kerusakan histopatologi insang pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan nilai terendah pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu untuk kerusakan hiperplasia (15,30 %) dan fusi (4,60 %).

Penurunan nilai kerusakan histopatologi insang ikan mas yang terjadi diduga akibat dari kandungan senyawa fenolik seperti flavonoid dan tannin yang

dimiliki oleh ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang berfungsi sebagai antibakteri. Sesuai dengan pernyataan Cowan, (1999), senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk membentuk struktur kompleks tertentu pada dinding sel bakteri. Selanjutnya, dengan jumlah gugus hidroksil yang berada pada cincin fenolik akan ada peningkatan hidroksilasi, dan dengan peningkatan hidroksilasi, aktivitas antibakteri akan meningkat. Hubungan antara ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan kerusakan histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) pada kerusakan hiperplasia sebesar 0,9246 dan untuk kerusakan fusi sebesar 0,913 (Lampiran 13).

## 5.5 Parameter Penunjang

### 5.5.1 Pengamatan Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan secara visual untuk mengamati tingkah laku, nafsu makan dan kerusakan ikan yang terlihat dari luar pada ikan mas yang telah terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan setelah diberi perlakuan pengobatan dengan perendaman ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.). Hasil pengamatan visual abnormalitas disajikan pada **Tabel 20** berikut ini.

**Tabel 20.** Pengamatan Gejala Klinis Ikan Mas Selama Penelitian

| Perlakuan<br>(mg/L) | Waktu              | Ulangan |      |      |
|---------------------|--------------------|---------|------|------|
|                     |                    | 1       | 2    | 3    |
| 0 (K -)             | Setelah Terinfeksi | ab      | ac   | acd  |
|                     | Setelah Diobati    | abc     | cd   | acd  |
| 75                  | Setelah Terinfeksi | a       | abc  | bcd  |
|                     | Setelah Diobati    | e       | ef   | fg   |
| 150                 | Setelah Terinfeksi | bc      | b    | abd  |
|                     | Setelah Diobati    | fg      | f    | ef   |
| 225                 | Setelah Terinfeksi | ad      | ab   | abc  |
|                     | Setelah Diobati    | eg      | ef   | efg  |
| 300                 | Setelah Terinfeksi | ac      | ad   | c    |
|                     | Setelah Diobati    | efgh    | efgh | efgh |
| 375                 | Setelah Terinfeksi | acd     | d    | Ad   |
|                     | Setelah Diobati    | efgh    | efgh | efgh |

| 0 (K +) | Setelah Terinfeksi | h | h | h |
|---------|--------------------|---|---|---|
|         | Setelah Diobati    | h | h | h |

Keterangan:

- |  |  |
|--|--|
| (a) : ikan megap-megap di permukaan air, nafsu makan menurun dan berenang tidak beraturan/mendekati aerasi | (e) : berenang mulai aktif, nafsu makan kembali normal             |
| (b) : tubuh berwarna pucat, kondisi lendir berlebih, mata agak menonjol                                    | (f) : warna tubuh mulai kembali normal, operkulum mulai membaik    |
| (c) : sisik mengelupas, sirip rusak, operkulum terbuka   | (g) : luka mulai memulih, peradangan dan pembengkakan mulai hilang |
| (d) : luka borok, peradangan, kemerahan pada punggung, pembengkakan di bagian perut                        | (h) : ikan normal  |

Gejala klinis yang ditemukan pada pemeliharaan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* meliputi nafsu makan yang menurun, pergerakan lambat dan tidak beraturan, tubuh berwarna pucat, sisik mengelupas, operkulum terbuka, munculnya luka borok, peradangan (*inflamasi*), dan pembengkakan pada perut. Hal ini sesuai yang dinyatakan oleh Olga, (2012) dan Pratama, *et al.* (2017) bahwa gejala klinis yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* menunjukkan kulit tampak pucat, kemudian munculnya luka (bercak merah) pada permukaan tubuh, sirip geripis, pendarahan pada insang dan perut buncit. Menurut Sartika (2011) munculnya luka dan kemerahan/pendarahan pada tubuh ikan disebabkan oleh toksin yaitu hemolisin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* yang berperan untuk memecah sel eritrosit sehingga sel tersebut keluar dari pembuluh darah dan menimbulkan kemerahan pada permukaan kulit.

Pada pengamatan ikan yang setelah diobati dengan ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) menunjukkan terjadinya penyembuhan pada ikan mas seperti perubahan nafsu makan, tingkah laku, pergerakan ikan serta penyembuhan luka pada tubuh. Hal ini diduga karena metode pengobatan yang dilakukan yaitu dengan cara perendaman. Sesuai dengan pernyataan Maisyaroh, *et al.* (2018) menjelaskan sistem perendaman dalam pengobatan ikan merupakan cara yang aplikatif bila dibandingkan dengan pemberian makan maupun penyuntikan karena hal tersebut dapat mempermudah proses pengobatan terutama untuk ikan yang berukuran kecil dalam skala yang banyak.

### 5.5.2 Pengamatan Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu kunci utama yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*). Oleh sebab itu, perlunya dilakukan monitoring agar parameter kualitas air tetap terjaga dan terkontrol. Pengamatan kualitas air dilakukan selama 7 hari dari awal hingga akhir masa pemeliharaan. Adapun parameter yang diamati meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO) yang diukur 2 kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Untuk mempertahankan kualitas air dilakukan pergantian air setiap harinya sebanyak 30% dari volume. Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian disajikan pada **Tabel 21** dan **Lampiran 14**.

**Tabel 21.** Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Mas (*C. carpio*)

| Parameter | Hasil pengamatan | Kisaran Optimal                             |
|-----------|------------------|---|
| Suhu (°C) | 24 - 27          | 20 - 30 (Mantau dan Sudarty, 2011)          |
| pH        | 7 - 7,5          | 6,5 - 9 (Goran, <i>et al.</i> , 2016)       |
| DO (mg/L) | 6 - 7,7          | 2,5 - 7,1 (Sulawesty, <i>et al.</i> , 2014) |

Pada tabel diatas dapat dilihat bahwa hasil nilai kualitas air selama pemeliharaan menunjukkan nilai yang memenuhi syarat bagi kehidupan ikan mas (*C. carpio*) yaitu dengan suhu berkisar 24-27°C, pH 7-7,5 dan DO 6-7,7 mg/L. Suhu air sangatlah berpengaruh terhadap proses kimia dan biologis ikan. Pada saat fluktuasi suhu air terlalu tinggi akan mengakibatkan ikan mudah menjadi stress dan rentan terhadap penyakit dan pada saat suhu yang relatif tinggi tersebut bakteri *A. hydrophila* banyak ditemukan di perairan. Suhu optimum infeksi bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan adalah 22–28°C, biasanya bakteri ini akan lebih mudah menyerang ikan dengan kondisi temperatur yang tinggi sehingga ikan akan mengalami stress dan daya tahannya menjadi menurun (Wahyuningrum, *et al.*, 2013; Holmes, *et al.*, 1996).

Derajat keasaman dapat menyebabkan timbulnya suatu penyakit pada ikan karena pada pH air tertentu ikan akan mengalami stres dan di lain pihak beberapa organisme patogen yang mampu hidup pada pH tersebut akan mudah menyerang ikan. Nilai pH yang rendah secara tidak langsung dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada kulit sehingga memudahkan infeksi.

Bakteri *A. hydrophila* dapat tumbuh subur pada air dengan kisaran pH 5-5,9 (Susanti, 2015).

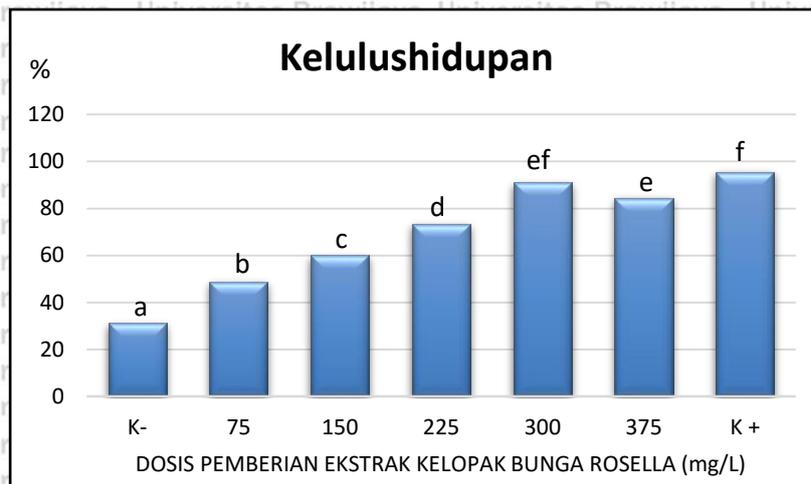
Oksigen terlarut merupakan kebutuhan yang sangat penting bagi kelangsungan hidup ikan. Menurut Octaviana, *et al.* (2015) kandungan oksigen terlarut kurang dari 1 mg/l akan mematikan ikan dan pada kandungan 1-5 mg/l cukup mendukung kehidupan ikan tetapi pertumbuhan ikan lambat. Sedangkan pada kandungan oksigen lebih dari 5 mg/l pertumbuhan ikan berjalan normal.

Bakteri *A. hydrophila* dapat menyerang ikan dengan kondisi air dengan kadar oksigen terlarut yang rendah (Napitupulu, *et al.*, 2017).

### 5.5.3 Kelulushidupan (*Survival Rate*)

Kelulushidupan merupakan perbandingan antara jumlah individu yang hidup pada akhir penelitian dengan jumlah individu pada awal penelitian atau peluang hidup dalam suatu saat tertentu. Sintasan ikan sangat dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik meliputi parasit, kompetitor, umur, predasi, kemampuan adaptasi, penanganan manusia dan juga kepadatan populasi.

Sedangkan faktor abiotik terdiri dari sifat fisika dan kimia dari suatu lingkungan air. Untuk hasil pengamatan kelulushidupan disajikan pada **Gambar 24** dan **Lampiran 15**.



**Gambar 24.** Histogram Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Berdasarkan dari hasil pengamatan kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) menunjukkan bahwa pada akhir masa pemeliharaan pada perlakuan K (+) memiliki kelulushidupan tertinggi, hal ini disebabkan oleh karena perlakuan tidak diberikan penginfeksi bakteri *A. hydrophila*. Sedangkan pada perlakuan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) telah menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) ( $P < 0,05$ ) dengan nilai tertinggi pada perlakuan dosis 300 mg/L yaitu sebesar 91 %. Pada akhir pengamatan perlakuan K (-) menunjukkan hasil yang paling rendah dengan kelulushidupan sebesar 31 %.

Tingginya kelulushidupan yang terjadi pada perlakuan diduga karena berkaitan dengan kualitas air sebagai media pemeliharaan, karena kualitas air yang optimum akan menghasilkan tingkat kelulushidupan yang baik pula.

Gusman dan Muhammad, (2014) menyatakan bahwa kelulushidupan pada ikan banyak dipengaruhi oleh faktor lingkungan, misalnya penanganan dan kualitas air. Penanganan yang salah dapat menyebabkan ikan stres, sehingga kondisi kesehatan ikan menurun dan dapat menyebabkan kematian.

Rendahnya kelulushidupan yang terjadi pada perlakuan K (-) diduga disebabkan oleh serangan akut dari bakteri *A. hydrophila*. Ikan tidak maksimal dalam melakukan perlindungan terhadap infeksi sehingga menyebabkan rendahnya tingkat kelulushidupan selama pemeliharaan setelah uji tantang dengan meningkatnya persentase kematian (Sumiati, *et al.*, 2014).



## 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Berdasarkan identifikasi menggunakan analisis fitokimia, FTIR, dan UV-VIS ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L) mengandung senyawa fenolik yaitu flavonoid (flavonol, antosianin) dan tanin.
2. Pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L) pada ikan mas (*C. carpio*) pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* memberikan pengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ) baik pada eritrosit, hemoglobin, hematokrit, leukosit, limfosit, monosit, neutrofil maupun pada histopatologi insang ikan mas (*C. carpio*) dengan dosis terbaik pada perlakuan D sebesar 300 mg/L.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, maka disarankan perlu adanya penelitian selanjutnya dalam menguji karakteristik senyawa aktif dalam bentuk fraksi pada kelopak bunga rosella (*H. sabdariffa* L).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, H. A., Abdo, I. M., & Moustafa, M. Z. 2014. In vitro antibacterial and antibiofilm activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extract and apple vinegar against bacteria isolated from diabetic foot infections. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 7 (2), 131–136.
- Abdallah, E. M. 2016a. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Acute Disease*, 5 (6), 512–516. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.024>
- Abdallah, E. M. 2016b. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5 (2), 186. doi: <https://10.5455/jice.20160320022623>
- Abdullah, 2005. Analysis of Quantitative Spectrophotometer UV-VIS and Using Fuzzy Subtractive Clustering as an Alternantive Method to Identify Milk Quality. Disertasi. Pascasarjana. Jurusan Fisika. ITB. Bandung. 187 Hal.
- Affandi R dan Tang UM. 2002. Fisiologi Hewan Air. Riau: Uni press. 172 Hal.
- Afrianto, E. dan Liviawaty, E. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 154 Hal.
- Afrianto, E. dan Liviawaty, E. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 136 Hal.
- Ahmad, M.M. 2006. Anti Inflammatory Activities of *Nigella sativa* Linn (Kalongi, black seed). *Sci. Int.* 8. 179-180.
- Alaga, TO, Edema, MO., Atayese, AO., & Bankole, M. 2014. Phytochemical and in vitro anti-bacterial properties of *Hibiscus sabdariffa* L (Roselle) juice. *J of Med Plants Research*, 8 (7), 339–344.
- Alamanda, I.E., N.S. Handajani dan A. Budihardjo. 2007. Penggunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah untuk Penetapan Kesehatan Ikan Leke Dumbo (*Clarias gariepinus*) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Biodiversitas* 8 (1): 34-38.
- Alifia, F. 2013. Histopatologi Insang Ikan Bandeng (*Chanos chanos Forskall*) Yang Tercemar Logam Timbal (Pb), *J. Balik Diwa* 4 (1). 38-45.
- Alifuddin M. 1993. Diagnose Penyakit Ikan (Cara Pemeriksaan Penyakit Ikan). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 89 Hal.
- Amanu, S., Kurniasih and Indaryulianto, S. 2014. Identifikasi Penyakit Aeromonad pada Budi Daya Ikan Air Tawar di Bali. *Jurnal Veteriner*, 15 (4). 474–486.
- Amri, K. dan Khairuman. 2008. Ciri Morfologi Ikan Mas. Jakarta. AgroMedia Pustaka. 358 Hal.
- Andayani S, Marsoedi, Sanoesi E, Wilujeng AE, H Suprastiani. 2009. Profil Hematologi Beberapa Spesies Ikan Air Tawar Budidaya. Malang: UB Press. 166 Hal.

Andayani, Sri, Heny Suprastyani, Galih Dandung Akbar Gumala, Uswanul Oktafa, Nela Maulina Fatikah, Maulana Wahyudi, Anisatul Farida, dan Randi Pratama. 2017. Pengaruh Pemberian Bakteri *Lactobacillus plantarum* Terhadap Histopatologi dan Hematologi Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal*) Yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Fisheries and Marine Science* 1(1): 31-38.

Anderson DP dan Siwicki AK. 1993. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment". Phuket Thailand. 17 pp.

Anggraini, S. 2008. Analisis Kelayakan Finansial Usaha Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Dengan Cara Pemberokan (Kasus: Desa Selajambe, Kecamatan Cisaat, Kabupaten Sukabumi, Propinsi Jawa Barat). Ekonomi Pertanian dan Sumberdaya. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 126 Hal.

Anggraini, S. P., Sasanti, A. D. and Wijayanti, M. 2017. Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Menggunakan Tepung Paci-Paci (*Leucas lavandulaefolia*) Dengan Dosis Yang Berbeda, *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 5 (1): 109–119.

Ardila, A. et al. 2017. Herbal Nanoparticles Fabrication In Effervescent Tablet Using Solvent Methodemulsification Diffusion Combination High Speed Homogenizer, National Seminar on Science and Technology, Faculty of Engineering, University of Muhammadiyah Jakarta, (November). 2 (1): 1–2. Available at: [jurnal.umj.ac.id/index.php/semnastek](http://jurnal.umj.ac.id/index.php/semnastek).

Ariaty, L. 1991. Morfologi Darah Ikan Mas (*Cyprinus carpio*), Nila Merah (*Oreochromis sp*), dan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) dari Sukabumi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 125 Hal.

Arellano, A. H., et al. 2007. Clinical Effect Produced By a Standardized Herbal Medicine Product Of Hibiscus sabdariffa On Patients With Hypertension: a randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Journal of Planta Medicine*. 73 (1): 6-12. doi: 10.1055/s-2006-957065.

Asniatih, Muhammad, I. dan S. Kadir. 2013. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. 3 (12): 12-21.

Asnita. 2011. Identifikasi cacing parasitik dan perubahan histopatologi pada ikan bunglon batik jepara (*Cryptocentrus leptocephalus*) dari kepulauan seribu. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 53 Hal.

Ayu, Putu, Chintia Devi, Elok Zubaidah, and Feronika Heppy Sriherfyna. 2016. Physical-Chemistry Characteristics and Antibacterial Activity of Bilimbi (*Averrhoa Bilimbi L.*) Leaves Extract. *Food Journal and Agroindustry* 4 (1): 400–409.

Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. 2012. Imunologi Dasar. Badan Penerbit FKUI. Jakarta. 259-282.

Bakti Husada. 2001. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 2. Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial Republik Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta. 17-18, 37-38.

- Benhamed, F. Guardiola, M. Mars, dan M. Esteban. 2014. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*. 171 (1-2): 1-12.
- Bijanti, R. 2005. Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Buku Ajar. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 195 Hal.
- Burhanuddin, A. Iqbal. 2013. Ikhtiologi, Ikan dan Segala Aspek Kehidupannya. Deepublish. Yogyakarta. 430 Hal.
- Cappuccino dan Sherman. 1988. *Microbiology a Laboratory Manual*. Benjamin Kerning Science Publishing Merlo Park. California : 477 pp.
- Cavalieri, Stephen J., Ronald J. Harbeck, Yvette S. McCarter, José H. Ortez, Ivonne D. Rankin, Robert L. Sautter, Susan E. Sharp, and Carol A. Spiege. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. edited by M. B. Coyle. Seattle, Washington: American Society for Microbiology. University of Washington. 241 pp.
- Celik ES and Bircan R. 2004. Determination of Haematological Parameters of the lak Scorpion Fish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) in Dardanelles. F. U. Fen ve Muhendislik Bilimleri Dergisi 1 (16): 735-744.
- Chandra, Henni Syawal, lesje Lukistyowati. 2018. Diferensiasi leukosit ikan jambal siam *pangasius Hypophthalmus* yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* dan diobati Dengan ekstrak daun *Rhizophora* sp. Jurnal Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau Pekanbaru. 13 Hal.
- Chang, HC, Peng, CH, Yeh, DM, Kao, ES & Wang CJ. 2014. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans, Food Function. *J. Science*. 5 (4):734–739.
- Chauret, C., C. Volk., R. Creason., J. Jarosh., J. Robinson dan C. Warnes. 2001. Detection of *Aeromonas hydrophilla* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *J. Microbiol*. 47 (8): 782-786.
- Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, R.P. dan Jauzi, A. 2005. *Akuakultur Masyarakat Perikanan Nusantara (MPN) dan Taman Kuarium Air Tawar*. Jakarta. 3 Hal.
- Connell. D. W., Qiming. J. Y dan Verma. V., 2016. Influence of exposure time on toxicity-an overview. *Journal of toxicology*. 49-53.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12 (4): 564-582.
- Darmawan, Deni. 2016. Metode Penelitian Kuantitatif. PT Remaja Rosdakarya. Bandung. 330 Hal.
- Daryanto. 2008. *Tabloid Agribisnis Dwimingguan Agrina: Inspirasi Agribisnis Indonesia*. 79 Hal.
- Devi, Maria. 2009. *Dahsyatnya Khasiat Rosella*. Cemerlang Publishing. Yogyakarta. 87 Hal.
- DJPB KKP, 2017. Data dan Statistik Perikanan Budidaya Nasional 2015 – 2019. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 34 Hal.

- DJPB KKP, 2018. *Target produksi perikanan budidaya 2018 sebesar 24,08 juta ton*. Diakses dari: <https://industri.kontan.co.id/news/target-produksi-perikanan-budidaya-2018-sebesar-2408-juta-ton>. Tanggal Akses 03 Mei 2018.
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Basics of Microbiology*. Jakarta: Djambatan. 206 Hal.
- Dzulkarnain, B., D. Sundari, and A. Chozin. 1996. *Antibacterial Medicinal Plants in Indonesia*. Cermin Dunia Kedokteran. 110: 35-48.
- Efianda, T. R. 2015. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih (Piper betle) dalam Pakan Sebagai Alternatif Pengobatan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 211 Hal.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science*. 55 (3): 225-76.
- Farouq, A. 2011. Aplikasi Probiotik dan Simbiotok dalam Pakan untuk meningkatkan Respon Imun dan Kelangsungan Hidup Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diinfeksi *Streptococcus agalactiae*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 78 Hal.
- Faturrohman, M. A.. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak n-heksan Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Propionibacterium acne Sensitif, *Escherichia coli*, Dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta. 9 Hal.
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan*. Dasar pengembangan Teknologi Perikanan, Rineka Cipta. Jakarta. 179 Hal.
- Garcia CA, Gavino G, Mosqueda MB, Hevia P, Gavino VC. 2007. *Correlation of tocopherol, tokotrienol,  $\gamma$ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays*. *J. Food Chem*. 102 (2007): 1228-1232.
- Genten, F., Terwinghe, E and Danguy, A., 2009. Atlas of Fish Histology. *Science Publishers*, Enfield, NH, USA. Departemen of Histology and Biopathology of Fish Fauna Laboratory of Functional Morphology, Universite Libre de Bruxelles (U.L.B), Brussel. 219 pp.
- Ghufran, H.M., K. Kardi, B.T. Andi. 2007. Pengelolaan kualitas Air dalam Budidaya Perairan. Rineka Cipta. Jakarta. 208 Hal
- Ginandjar, A, Hendrawan, Y. dan Sonjaya. 2011. Kajian Termodinamika Interaksi Ligan Bioflukan DYT Terhadap Logam Kobalt (II) Melalui Analisis Konduktivitas, Spektrofotometer UV-Vis dan TGA. *J. Sains dan Teknologi Kimia*. 2 (1). 1-6.
- Goran, S. and Omar, S. 2016. Water Quality and Physiological Parameters of Common Carp Fingerling Fed on Jerusalem artichoke Tubers. *Polytechnic*. 6 (3). 502-516.
- Greenwood and Slack. 1995. *Medical Microbiology*. Hongkong: ELBS. 794 pp.
- Gupta, Aditya and Harpreet Kaur. 2016. Morphological, Histopathological and Molecular Characterization of *Thelohanellus Theinensis* n. Sp.(Cnidaria: Myxosporea) Infecting an Indian Major Carp, *Labeo Bata* in a Cold Water Wetland in Punjab (India) Aditya. *Journal of Parasitic Diseases*. 19 (10); 1-10.

- Gusman, E. dan Muhammad Firdaus, 2014. Pemanfaatan Buah Mangrove sebagai Campuran Pakan untuk Meningkatkan Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Harpodon Borneo*. 07 (01): 27-35.
- Hamed, S. B., M. J. T. Ranzani-Paiva, L. Tachibana, D. C. Dias, C. M. Ishikawa dan M. A. Esteban. 2018. Fish Pathogen Bacteria: Adhesion, Parameters Influencing Virulence and Interaction With Host Cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 1 (80): 550 – 562.
- Handarini, K. 2014. Potential of Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Flower Extract as a Natural Colorant and Preservative in Jelly Snacks for Children, *HEURISTIC Journal of Industrial Engineering*, 11 (2): 32–42. [https://doi: 10.1017/CBO9781107415324.004](https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004).
- Harborne, J.B. 2006. Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. 354 Hal.
- Hardi, Esti Handayani., Sukenda., Enang Harris dan Angela Mariana Lusiastuti. 2011. Karakteristik dan Patogenesis Streptococcus agalactiae Tipe  $\beta$ -Hemolitik dan Non Hemolitik pada Ikan Nila. *Jurnal Veteriner*. 12 (2) : 152-164.
- Harikrishnan, R., Nisha, R.M. dan Balasundaram, B. 2003. Hematological and Biochemical Parameters in Common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 221 (1-4): 41-50.
- Hartika R, Mustahal, Putra AN. 2014. Gambaran Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dengan Penambahan Dosis Prebiotik Yang Berbeda Dalam Pakan. *J Perikanan dan Kelautan*. 4 (4):259-267.
- Haryani, A., R. Grandiosa., I. D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonashydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3 (3): 213-220.
- Hastuti, N. D. 2012. Making Functional Drinks From Honey And Rosella Extracts (*Hibiscus sabdariffa Linn.*), *Journal of Food Technology*, 3 (1). 35.
- Hayati, Z., Yulia, W., & Karmil, T. F. 2012. Anti-bacterial activity of rosella flowers extract (*Hibiscus sabdariffa linn*) in inhibiting bacterial growth methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Science*. 2 (1), 22–24.
- Hidayat. T, 2007. Budi Daya Tanaman Rosella. CV. Sinar Cemerlang Abadi. Jakarta. 46 Hal.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zvanovic, S., Davidson, P. M., & Stewart, C. N. 2014. Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, 77 (2), 262–268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-313>
- Holmes, P., L. M. Niccoffs dan D.P. Sartory. 1996. The Ecology of Mesophilic *Aeromonas* in the Aquatic Environment. In: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.) *The Genus Aeromonas*, John Wiley & Sons, New York, NY: 39-76.
- Houghton, Peter J. & A. Rahman. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extract*. Chapman and Hall : London. 183 pp.

- Indrayani, D, Yusfiati, R. Elvyra. 2014. Struktur insang ikan Ompok hypophthalmus dari perairan Sungai Siak Kota Pekanbaru. *JOM FMIPA*.1 (2). 1-7.
- Insivitawati, Era, Gunanti Mahasri, and Kusnoto. 2015. Gambaran Darah Dan Histopatologi Insang, Usus Dan Otak Ikan Koi (*Cyprinus Carpio Koi*) Yang Diinfeksi Spora Myxobolus Koi Secara Oral. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*. 7 (2):225–34.
- Irsyad, M., Mappiratu and Rahim, A. 2017. Anthocyanin Production Covered by Maltodextrin from Rosella Flower Petals (*Hibiscus Sabdariffa, L.*) and Its Application in Functional Food Processing. *e-Jurnal Mitra Sains*, 5 (1). 12–25.
- Jamal,L. 2008. Penggunaan Kitosan untuk Pencegahan Penyakit *Motile Aromonas Septicaemia* (MAS) yang Disebabkan Oleh *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias sp.* IPB. 62 Hal.
- Ji, Y. S., Dian, N., & Rinanda, T. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) Terhadap *Streptococcus pyogenes* Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 12 (4), 31–36.
- Kabata, Z. 1985. Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic. Taylor in Francis Inc. Chery St. Phidelpia. 318 pp.
- Kamaludin, I.,2011. Efektivitas Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe vera*) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias sp*) Melalui Pakan. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 54 Hal.
- Kardi, R. H. 2013. Identifikasi dan Keragaman Ektoparasit pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*) dan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Berasal dari Lampung dan Luar Lampung. Universitas lampung. Lampung. 95 Hal.
- Khaerani, L. R., S. B. Prayitno dan A. H. C. Haditomo. 2018. Pengaruh Perendaman Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Avverhoa blimbi L.*) Untuk Mengobati Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 7 (1): 99 – 106.
- Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173 (5): 111-133.
- Kresno, S.B. 2001. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi Ketiga. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. 437 Hal.
- Kristanti, AN., N.S Aminah, M Tanjung dan B Kurniadi. 2008. *Fitokimia*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-161.
- Kurniasih. 1999. Deskripsi Histopatologi dari Beberapa Penyakit Ikan. Pusat Karantina Pertanian, Departemen Pertanian. Jakarta. 55 Hal.
- Labh, S. N. and Shakya, S. R. 2014. Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture, 2 (1). 153–156.
- Laili, U. 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) Terhadap Prevalensu dan Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Universitas Islam Negeri Malang. Malang. 87 Hal.

- Lallier, R., & Daigneault, P. 1984. Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish-pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 7(6), 509–512.
- Larger, K.F., J.E. Bardach, R.R. Miller and D.R.M Passino. 1977. *Ichthyology*. John Wiley and Sons, Inc, New York – London, 506 pp.
- Lawren, W. 2014. Kualitas Minuman Probiotik Ekstrak Mahkota dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Yogyakarta. 123 Hal.
- Lee M.S. and E.H. Kerns. 1999. LC/MS applications in drugs development. *Mass Spectrometry Reviews* 18 (3-4): 187-279.
- Lengka.K, Monoppo.H dan Kolopita.M.E.F. 2013. Peningkatan Respon Imun Non Spesifik Ikan Mas (*C. carpio*) Melalui Pemberian Bawang Putih (*Allium sativum*). *Jurnal Budidaya Perairan*. 1 (2): 21-28.
- Lestari, P. P., Kusriani, D. and Anam, K. 2014. Anthocyanin Identification of Methanol-HCl Extract Active Fraction in Rosella (*Hibiscus Sabdariffa . L*) and Its Potential as Xanthine Oxidase Inhibitor *Jurnal Sains dan Matematika*. *Jurnal Sains dan Matematika*, 22 (3), 72–78.
- Lin, HH, Chen, JH, Kuo, WH & Wang, CJ. 2007. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa L.* on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-Biological Interactions*, 165 (1): 59–75.
- Linscheid M. and D. G. Westmoreland. 1994. Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Pure & Appl. Chem.* 66 (9). 1913-1930.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) dan Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 16 (1): 144 – 160.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. *Jurnal Veteriner*. 13 (1): 43 – 50.
- Lumbessy, M., J. Abidjuju dan J. J. E. Paendong. 2015. Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mongoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal Mipa Unsrat*. 2 (1): 50 – 55.
- Lusiastuti A. M. and E. H. Hardi. 2004. Gambaran darah sebagai indikator kesehatan pada ikan air tawar. *Pros. Semin. Nas. Ikan*. 12 (1): 65–69.
- Lusiastuti, A., M., Septyan, A, dan R. Samsudin. 2017. Efektivitas kombinasi probiotik mikroenkapsulasi melalui pakan untuk pengendalian penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* pada ikan lele, *Clarias gariepinus*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 12 (2): 170-18.
- Maftuch, Happy Nursyam, dan Sukarni. 2012. Kajian Penggunaan Ciprofloxacin Terhadap Hematologi Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J.Exp. Life Sci* 2 (2): 65–69.
- Maftuch, Heny Suprastyani, dan Febby Hadi Setyawan. 2018. Uji Daya Hambat Ekstrak *Chaetoceros Calcitrans* Terhadap Bakteri *Aeromonas Salmonicida*.

*Journal of Fisheries and Marine Research*. 2 ( 1). 127-132.

Maisyaroh, L. A. et al. 2018. Penggunaan Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) Sebagai Antibakteri Untuk Mengobati Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Sains Akukultur Tropis*, 1 (2). 36–43.

Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R. and Riani, E. 2010. Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *J. Ris. Akuakultur*. 5 (2). 245–255.

Mantau, Z. dan Sudarty. 2011. Buku Terlengkap Pembentukan Ikan Mas yang Efektif dan Efisien. Pustaka Mina. Jakarta. 63 Hal.

Maqsood, S., M.H. Samoon, P. setiaji, 2009. Immunomodulatory and Growth Promoting Effect of Dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* Fingerlings Against the Challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1 (9): 111-120.

Mardiah., Sawarni, H., R. W. Ashadi., A. Rahayu. 2009. Budi Daya dan Pengolahan Rosela si Merah Segudang Manfaat. Cetakan 1. Jakarta: Agromedia Pustaka. 98 Hal.

Maryani H. 2005. Khasiat dan Manfaat Rosella. Jakarta: Agromedia Pustaka. 3-33.

Mas'ud, F. 2013. Efektifitas *Candida* sp. sebagai imunostimulan pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) terhadap Infeksi *A. hydrophila*. *Jurnal Ilmu Eksakta*. 1 (2): 27-38.

Maswan, Nur Akbar. 2009. Pengujian Efektivitas Dosis Vaksin Dna Dan Korelasinya Terhadap Parameter Hematologi Secara Kuantitatif. Program Studi Teknologi Dan Manajemen Akuakultur Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 70 Hal.

Matofani AS, Hastuti S, dan Basuki F. 2013. Profil Darah Ikan Nila Kunti yang Diinjeksi *Streptococcus agalactiae* dengan Kepadatan Berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 2 (2). 127-135.

Monera, D. and A. Simon. 2011. The Impact of Toxic Heavy Metals on The Hematological Parameters in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Environment*. 6 (1): 23-28.

Mones, R.A. 2008. Gambaran Darah pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) Strain Majalaya yang Berasal dari Daerah Ciampea Bogor. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 134 Hal.

Mongole, A., & Chaturvedi, A. 2011. *Hibiscus sabdariffa* L. a rich source of secondary metabolites. *Research Article*. 6 (1).117-201.

Moyle PB dan Cech Jr JJ. 2004. Fishes. An Introduction to Ichthyology. 5th ed. USA: Prentice Hall, Inc. 590 pp.

Mudjiutami, E., Ciptoroso, Zainun, Z., Sumarjo dan Rahmat. 2007. Pemanfaatan Imunostimulan untuk Pengendalian Penyakit pada Ikan Mas. *Jurnal Budidaya Air Tawar*. 1 (4); 1-9.

Mukhopadhyay, M. 2002. Natural Extract Using Supercritical Carbondioxide, London: CRC Pr. 319 pp.

- Muttaqin, A. 2008. Asuhan keperawatan klien dengan gangguan system pernapasan. Salemba medika. Jakarta. 276 Hal.
- Napitupulu, Ruth Aprilyanti, Dwi Suryanto, and Desrita. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Potensial Patogen Pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) Di Kolam Budidaya Patumbak. *Jurnal Aquacoastmarine* 15 (1): 72–82.
- Nirmala, K., Y.P. Hastuti, dan V. Yuniar. 2012. Toksisitas merkuri (hg) dan tingkat kelangsungan hidup, pertumbuhan, gambaran darah dan kerusakan organ pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 11 (1): 38–48.
- Nofyan, E, Sagala, E.P dan V. Suryani. 2011. Pengaruh minyak mentah terhadap mortalitas dan morfologi insang ikan bandeng (*Chanos chanos*). *Maspari Journal Science*. 1 (2): 19–25.
- Nugrahani, Rizki, Yayuk Andayani, and Aliefman Hakim. 2016. Phytochemical Screening of Beans (*Phaseolus Vulgaris L*) Extract in Powder Preparation. *Ipa Educational Research Journal (JPPIPA)* 2 (1):8.
- Octaviana, Herna Nur, Ade Dwi Sasanti, and Mirna Fitriani. 2015. The Prevention of *Aeromonas Hydrophyla* Infection on Sangkuriang Catfish Using Phaleria Flour in Feed. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia* 3 (2): 14–24.
- Olaleye, MT. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J. Med Plants Res*, 1 (1): 009–013.
- Parameswari, Wirati, Ade Dwi Sasanti, and Muslim. 2013. Populasi Bakteri, Histologi, Kelangsungan Hidup Dan Pertumbuhan Benih Ikan Gabus (*Channa striata*) Yang Dipelihara Dalam Media Dengan Penambahan Probiotik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia* 1 (1): 76–89.
- Pantung, Nuntiya, K. G. Helander, H. F. Helander and V. Cheevaporn. 2008. Histopathological Alterations of Hybrid Walking Catfish (*Clarias macrocephalus x Clarias gariepinus*) in Acute and Subacute Cadmium Exposure. *Environment Asia*. 1 (1): 22–27.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 576 Hal.
- Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan - Udang Bakteri. UM Press. Malang. 113 Hal.
- Prakosa, D Galang. 2015. Pengaruh Ekstrak *Curcuma zedoaria* (*Quercetin*) Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UB. Malang. 110 Hal.
- Praseno, O, Krettiawan. H, Asih. S dan Sudradja. A. 2010. Uji Ketahanan Saliitas Strain Ikan Mas Yang Dipelihara Di Akuarium. *Jurnal Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Jakarta. 2 (1): 31–39.
- Prasetio, E., M. Fakhruddin dan H. Hasan. 2017. Pengaruh Serbuk Lidah Buaya (Aloe vera) Terhadap Hematologi Ikan Jelawat (*Leptobarbus hoevenii*) Yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Ruaya*. 5 (2). 44 – 54.
- Prasetya, R. R., Poetranto, E. D. and Didik Handijatno. 2017. Identifikasi Gen Aerolysin dan Sensitivitas Antibiotik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Kematian Tukik (*Lepidochelys olivacea*) di Pulau Serangan, Bali. *Jurnal Veteriner*, 18 (36): 201–206. [https://doi: 10.19087/jveteriner.2017.18.2.201](https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.2.201).

- Pratiwi, R. H. 2017. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life*. 4 (3). 418–429.
- Pratiwi, H. C. dan A. Manan. 2015. Teknik Dasar Histopatologi Pada Ikan Gurami (*Osphronemus gourami*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 7 (2): 45-50.
- Pratiwi, I. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun *Acalyph haindica* Terhadap Bakteri *Salmonella cholerasuis* dan *Salmonella tyhimurium*. Jurusan Biologi FMIPA UNS, Surakarta. 19 Hal.
- Priyatna R, Indarjulianto S, Kurniasih. 2018. Infeksi *Aeromonas salmonicida* dari Berbagai Wilayah di Indonesia Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *J. Biota*;16 (2): 287-297. <https://doi:10.24002/biota.v16i2.111>
- Purwanti SC, Suminto, dan Sudaryono. 2014. Gambaran Profil Darah Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Yang Diberi Pakan Dengan Kombinasi Pakan Buatan Dan Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (2): 53-60.
- Putra GP, Mulyana, Mumpuni FS. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) Terhadap Mortalitas Dan Gambaran Darah Benih Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) Dengan Uji Tantang Menggunakan Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *J Mina Sains*; 1 (2): 67-78.
- Putri, D. S. J., Abulias, M. N. and Bhagawati, D. 2014. Studi Kekerabatan Ikan Familia Cyprinidae Yang Tertangkap Di Sungai Serayu, Kabupaten Banyumas. *SCRIPTA BIOLOGICA*. 1 (2): 129–135.
- Radulović, N. S., P. D. Blagojević, Z. Z. Stojanović-Radić dan N. M. Stojaović. 2013. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Medicinal Chemistry*. 8 (20): 932 – 952.
- Rairakhwada., Dina, A.K. Pal, Z.P. Bhatena, N.P. Sahu, A. Jha, S.C. Mukherjee, 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 5 (22): 477-486.
- Rempe, C. S. et al. 2017. The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR). 422 pp.
- Roberts RJ. 2001. Fish Pathology. 3rd ed. Toronto: WB Saunders. 25-30 pp.
- Roihanah S, Sukoso, and Andayani S. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria Sp*. Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Secara In Vitro. *J. Exp. Life Sci*. 3 (1): 40–44.
- Ronald, N., Gladys, B. and Gasper, E. 2014. The Effects of Stocking Density on the Growth and Survival of Nile Tilapia. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 5 (2): 110-117. <https://doi: 10.4172/2155-9546.1000222>.
- Rochdianto, A. 2005. Analisis Finansial Usaha Pembenihan Ikan Karper (*Cyprinus carpio Linn*) di Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan. BFE. Universitas Tabanan. Bali. 87 Hal.
- Rostinawati T., 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar. Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran. Jatinangor. Bandung. 39 Hal.

- Rifai A.M., 2002. *Kamus Biologi*. Balai Pustaka. Jakarta. 116 Hal.
- Safitri, D., Sugito dan S. Suryaningsih. 2013. Kadar Hemoglobin Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) yang diberi Cekaman Panas dan Pakan yang Disuplementas Ikan Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb). *Jurnal Medika Veterinaria*. 7 (1): 54-60.
- Safitri, D, S.KH. 2014. Kadar Hemoglobin Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Diberi Cekaman Panas dan Pakan Yang Disuplementasikan Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb). *Animal Diseases-Veterinary Medicine Fishes-Zoology Hemoglobin-Chemistry*. Banda Aceh : Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Syiah Kuala. 34 (1): 82-87.
- Sartika, Y. 2011. Efektivitas Fitofarmaka dalam Pakan untuk Pencegahan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias sp*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 39 Hal.
- Sam, Sulastri, Abd Malik. 2016. Penetapan Kadar Fenolik Total Dari Ekstrak Etanol Bunga Rosella Berwarna Merah (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 3 (2): 182–87.
- Santoso, B. 2009. Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas. Yogyakarta. Penerbit Kanisius Cetakan 15. 83 Hal.
- Santoso, R. H. 2011. Uji Coba Penggunaan Pelet yang Mengandung Imunoglobulin-Y (Ig-Y) Anti Koi herpesvirus Sebagai Pencegah Penyakit pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. 51 Hal.
- Saputra, S. F. D. 2011. Aplikasi Sistem Resirkulasi Air Terkendali (SRAT) pada Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Institut Pertanian Bogor. Bogor. 52 Hal.
- Saputra, H. M, Marusin. N dan P. Santoso. 2013. Struktur histologis insang dan kadar hemoglobin ikan asang (*Osteochilus haseii*) di danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 2 (2): 138-144.
- Sasmita IS, Pertiwi ASP, Halim M. 2007. Gambaran Efek Pasta Gigi yang Mengandung Herbal terhadap Penurunan Indeks Plak. *J PDGI*; 37 hal.
- Sastrosupadi, A. 2002. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius: Yogyakarta. 276 Hal.
- Sari CN, NA Z, Asmilia N. 2017. Profil Hematologi Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) Yang Terpapar Merkuri Klorida (Hgcl<sub>2</sub>). *JIMVET*; 1 (3): 439-447.
- Sarono, A., K.H. Nitimulyo., I.Y. B Leluno, Widodo, N. Thaib, E.B.S. Haryani, S.Haryanto, Triyanto, Ustadi, A.N. Kusumahati, Novianti & S.W. Setianingsih. 1993. Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri. Kerjasama Pusat Karantina Pertanian dan Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan UGM. Yogyakarta. 46 Hal.
- Satiadarma, K. 2002. Asas Pengembangan Prosedur Analisis. Edisi Pertama, Airlangga University Press. Surabaya. 334 Hal.
- Sayed SM, Aamer AA. 2014. Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations

(MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus Sp.* Isolated from Bovine Clinical Mastitis. *Alternative & Integrative Medicine*. 3 (4): 87-93.

Septiana R. 2011. Identifikasi dan Uji Aktivitas Bakteri Fraksi Teraktif Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav.*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 70 Hal.

Setyawan, N. 2013. *Gambaran Mikroanatomi Pada Insang Ikan Sebagai Indikator Pencemaran Logam Berat di Perairan Kaligarang Semarang.* Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. 63 Hal.

Shao, Z.J., Liu.J. and L.X. Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* Lymphocytes in Vitro. *Journal Aquaculture*, 2 (229). 11-23

Soelama, H. J. J., Kepel, B. J., & Siagian, K. V. 2015. Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Ekstrak Rumput Laut (*Euclima cottonii*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal E-GiGi (eG)*, 3 (2), 1–6.

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

Suhermanto, Achmad, Sri Andayani, and Maftuch. 2013. Pengaruh Total Fenol Teripang Pasir (*Holothuria Scabra*) Terhadap Respon Imun Non Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). *Jurnal Bumi Lestari* 13 (2): 225–33.

Sulawesty F., Tjandra Chrismadha, Dan Endang Mulyana, 2014. Laju Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus Carpio L*) dengan Pemberian Pakan Lemna (*Lemna Perpusilla Torr.*) Segar pada Kolam Sistem Aliran Tertutup. *Jurnal Limnotek*. 21 (2): 177.

Sumiati, Tuti, Taukhid, and Angela Mariana Lusiastuti. 2014. Evaluasi Keamanan Vaksin Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Inaktif Terhadap Ikan, Lingkungan, Dan Aspek Keamanan Pangan. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 1 (1): 29–39.

Surachmad, W. 1998. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar.* Penerbit Tarsito. Bandung. 338 Hal.

Susanti, L., Deswati, L. and Elfrida. 2015. Uji Penggunaan Vaksin Hydrovac Untuk Meningkatkan Kekebalan Ikan Gurami (*Osphronemus goramy Lac*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Bung Hatta*. 11 Hal.

Suseno, D. 2000. *Pengelolaan Usaha Pembenihan Ikan Mas.* Penebar Swadaya. Jakarta. 74 Hal.

Sutjiati M., 2004. *Penyakit Ikan.* Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 87 Hal.

Sutisna, D. H dan Ratno. 1995. *Pembenihan Ikan Air Tawar.* Yogyakarta. Kanisius. 135 Hal.

- Suwandi, T. 2012. Pengembangan Potensi Anti Bakteri Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L. (Rosella) Terhadap *Streptococcus sanguinis* Penginduksi Gingivitis Menuju Obat Herbal Terstandar. Disertasi. Fakultas Kedokteran Gigi. UI : Jakarta. 257 Hal.
- Svobodova, Z and B. Vykusova. 1991. Diagnostics, Prevention and therapy of fish diseases and intoxications. *Research Institute Of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany, Czechoslovakia*. 270 pp.
- Takashima, F., T. Hibiya. 1995. An Atlas Fish Histology, Normal and Pathological Features. Second Edition. Kodansha Ltd. Tokyo. 195 pp.
- Talaro, K. P. and Talaro, A., 1999. Foundation in Microbiology. Third Edition. McGraw-Hill Company, Boston. 46 pp.
- Tambunan, J. E. 2011. Infestasi Ektoparasit Lerneia sebagai Faktor Pemicu Munculnya Bakteri *Aeromonas* pada Benih Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Universitas Airlangga. Surabaya. 179 Hal.
- Thomson R.G. 1984. General Veterinary Pathology. WB Saunders Company. Philadelphia. 6-24.
- Tina, R., 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar. Penelitian Mandiri, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor. 79 Hal.
- Tiwari, Prashant, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, and Harleen Kaur. 2011. *Phytochemical Screening and Extraction: A Review*. Internationale Pharmaceutica Scientia. 1 (1): 98–106.
- 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.
- Tsuzuki, M.Y., K. Ogawa, C.A. Strussmann, M. Maita, F. Takashima. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in dult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 1 (2): 349–362.
- Underwood, J.C.E. 1999. Patologi: Umum dan Sistematis, Edisi 2. Jakarta: EGC. 647 Hal.
- 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*. 2 (4): 7-20.
- Valon, By Morina, Aliko Valbona, Eldores Sula, and Gavazaj Fahri. 2013. Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River , Kosovo Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River. *Kosovo*. 13 (5): 41-44.
- Vasconcelos, N., Croda, J., & Simionatto, S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *In Microbial Pathogenesis*. 5 (120): 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>
- Volk, W. dan M. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 388-396.

Wahjuningrum, D., N. Ashry, dan S. Nuryati. 2008. Pemanfaatan ekstrak daun ketapan (*Terminalia cattapa*) untuk pencegahan dan pengobatan ikan patin (*Pangasionodon hypothalamus*) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 7 (1): 79-94.

Wahjuningrum, D., R. Astrini dan M. Setiawati. 2013. Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Benih Ikan Lele *Clarias sp.* yang Berumur 11 Hari Menggunakan Bawang Putih *Allium sativum* dan Meniran *Phyllanthus niruri*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 12 (1): 94 – 104.

Wahjuningrum, D., Hasanah, M. dan Rahman. 2016. Efikasi daun sembukan *Paederia foetida* untuk pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 15 (2): 108–116. [https://doi:10.19027/jai.15.2.108-116](https://doi.org/10.19027/jai.15.2.108-116).

Widyaningrum, Hikmah, Sorta Basar Ida Simanjuntak, and Priyo Susatyo. 2017. Diferensial Leukosit Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy Lac.*) Dengan Perbedaan Level Suplementasi Spirulina Platensis Dalam Pakan. *SCRIPTA BIOLOGICA* 4 (1): 37–40.

Witeska, M., K. Lugowska dan E. Kondera. 2016. Reference Values of Hematological Parameter for Juvenile *Cyprinus carpio*. *Bull. Eur. Fish. Pathol.* 36 (4): 169 – 178.

Wu, Y., Bai, J., Zhong, K., Huang, Y., Qi, H., Jiang, Y., & Gao, H. 2016. Antibacterial Activity and Membrane-Disruptive Mechanism of 3- p - trans - Coumaroyl-2-hydroxyquinic Acid, a Novel Phenolic Compound from Pine Needles of *Cedrus deodara* , against *Staphylococcus aureus*. *MDPI Molecules*. 1 (21): 1084. <https://doi.org/10.3390/molecules21081084>

Zou, J., Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C. dan Secombes, C.J. 2000. Factors influencing the expression of Interleukin-1 $\beta$  in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Leukocytes. *Dev Comp Immun*, 6 (24): 575–582.

Zhou, T., Chuang, C., & Zuo, L. 2015. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Hindawi Publishing Corporation; *BioMed Research International*: 9 (15): 1-10.

Zuhrawati., Nuzul. A., Asri. Ri., Zuraidawati., Nazaruddin., Mulyadi. A, dan Mutaqqien. 2015. Pengaruh pemberian infusa daun labu siam (*Sechium edule*) terhadap kadar hemoglobin dan nila hematokrit tikus putih (*Rattus norvegicus*) anemia. *Jurnal Medika Veterinaria*. 9 (2): 80-85.

### LAMPIRAN

#### Lampiran 1. Foto Kegiatan Penelitian



Bunga rosella segar setelah dikerinkan



Tahap proses maserasi



Proses evaporasi



Hasil kultur bakteri *A. hydrophila*



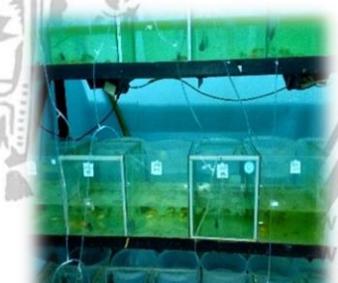
Proses pembuatan media



Proses uji MIC



Proses uji cakram



Akuarium pengamatan



Alat dan bahan pengamatan hematologi



Proses pengambilan darah ikan



Proses pengambilan organ insang



Konsultasi kepada dosen pembimbing

## Lampiran 2. Sertifikat Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN  
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA  
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU  
LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA

Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418  
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724

[www.bbpbapiepara.djpb.kkp.go.id](http://www.bbpbapiepara.djpb.kkp.go.id); Email: [bbpbapjpr@gmail.com](mailto:bbpbapjpr@gmail.com)

### HASIL UJI BIOKIMIA

Hal : Uji biokimia Identifikasi Bakteri  
Asal : Lab. Mikrobiologi  
Alamat : BBAPAP Jepara  
Metode : Cowan and stell's, Manual for Identification of medical bacteria  
Hasil :

| Uji Bio Kimia    | Isolat                       |
|------------------|------------------------------|
|                  | <i>Aeromonas hydrophilla</i> |
| Gram             | —                            |
| Bentuk           | Batang                       |
| Katalase         | +                            |
| Oksidase         | +                            |
| H <sub>2</sub> S | —                            |
| Indol            | +                            |
| Motil            | +                            |
| OF medium        | Fermentatif                  |
| VP               | +                            |
| MR               | —                            |
| Gelatin          | +                            |
| Urea             | —                            |
| Glukosa          | +                            |
| Sukrosa          | +                            |

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara

Penyelia

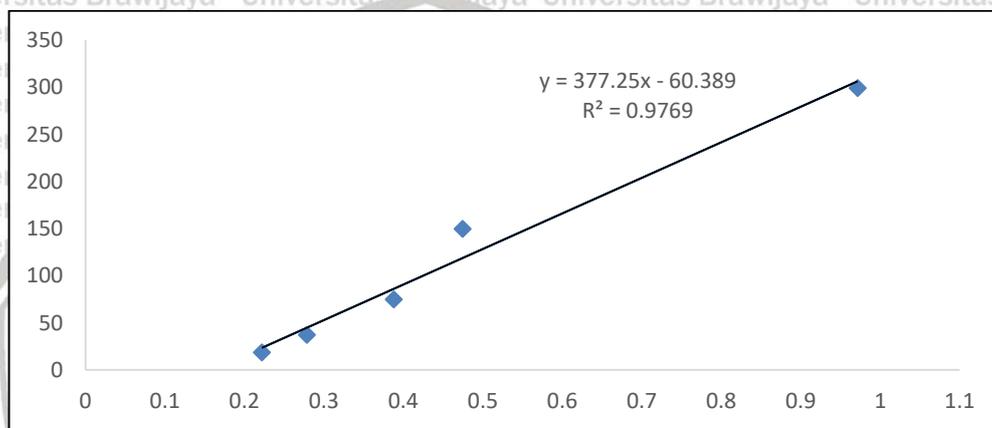
  
Sri Murti Astuti, SP.



Lampiran 3. Pengukuran Nilai OD dan Perhitungan Kepadatan Bakteri *A. hydrophila*

| OD (Optical Density) | TPC (Total Plate Count) $10^8$ |
|----------------------|--------------------------------|
| 0.972                | 299                            |
| 0.475                | 149.5                          |
| 0.388                | 74.75                          |
| 0.279                | 37.37                          |
| 0.222                | 18.69                          |
| 0.144                | 9.34                           |

• Grafik Kurva Regresi



Perhitungan:

$$\begin{aligned}
 y &= 377,5 (x) - 60,389 \\
 &= 377,5 (0,728) - 60,389 \\
 &= 234,6205 \times 10^8 \\
 &= 2,35 \times 10^{10}
 \end{aligned}$$

Pengenceran Bakteri *A. hydrophila*

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

$$10^8 = \frac{10^8 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}} = 43 \text{ ml}$$

$$10^7 = \frac{10^7 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}} = 4,3 \text{ ml}$$

$$10^6 = \frac{10^6 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}} = 0,43 \text{ ml}$$

$$10^5 = \frac{10^5 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}} = 0,043 \text{ ml}$$

## Lampiran 4. Surat Keterangan Identifikasi Kelopak Bunga Rosella



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA  
 JURUSAN BIOLOGI  
 Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841  
<http://biologi.ub.ac.id>

### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0234/UN10.F09.42/03/2018

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Sitti Khairul Bariyyah (NIM 166080100011009)

Instansi : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 431, diidentifikasi sebagai:

**Familia** : Malvaceae  
**Genus** : *Hibiscus*  
**Species** : *Hibiscus sabdariffa* L.  
**Nama lokal** : Rosella

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 7 Agustus 2018

Kepala Laboratorium  
  
 LABORATORIUM  
 TAKSONOMI  
 Dr. Fauz Bahari, M.Si  
 NIP. 195704251986011001



**Lampiran 5. Perhitungan Dosis Ekstrak Kelopak Bunga Rosella**

$$\text{Perlakuan A (75 ppm)} = \frac{75 \times 10000}{1000} = 750 \text{ mg} = 0,75 \text{ g}$$

$$\text{Perlakuan B (150 ppm)} = \frac{150 \times 10000}{1000} = 1500 \text{ mg} = 1,50 \text{ g}$$

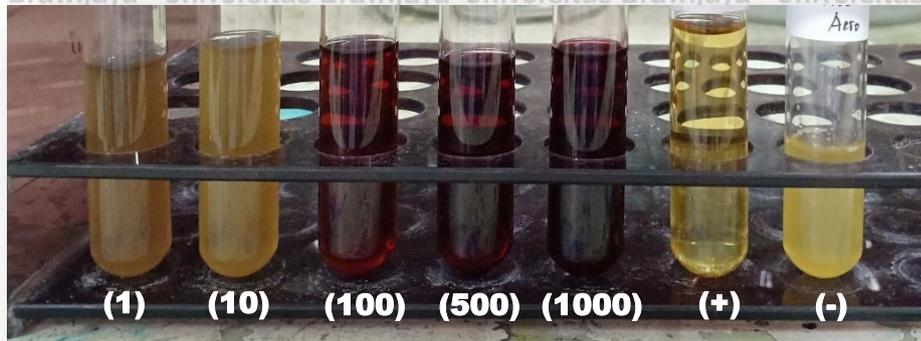
$$\text{Perlakuan C (225 ppm)} = \frac{225 \times 10000}{1000} = 2250 \text{ mg} = 2,25 \text{ g}$$

$$\text{Perlakuan D (300 ppm)} = \frac{300 \times 10000}{1000} = 3000 \text{ mg} = 3,00 \text{ g}$$

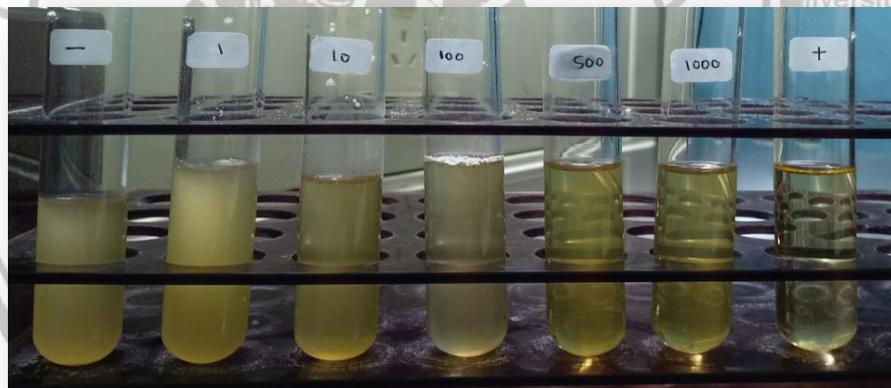
$$\text{Perlakuan E (375 ppm)} = \frac{375 \times 10000}{1000} = 3750 \text{ mg} = 3,75 \text{ g}$$



Lampiran 6. Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

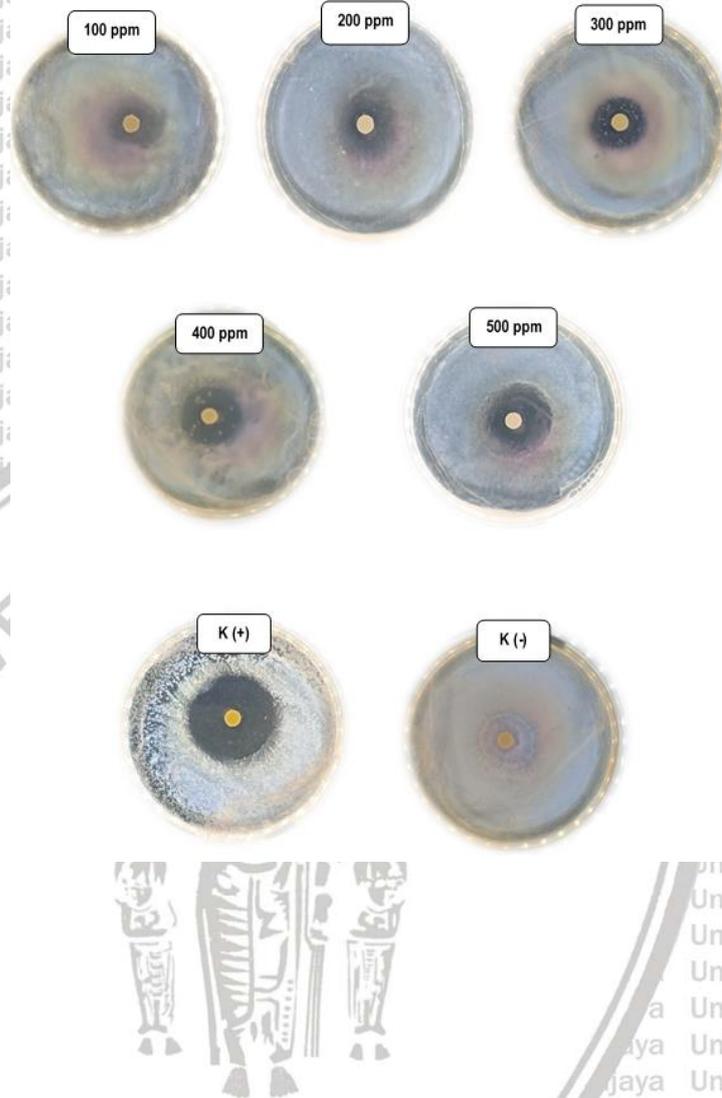


Hasil Uji MIC Ekstrak Kelopak Bunga Rosella dengan Pelarut Metanol



Hasil Uji MIC Ekstrak Kelopak Bunga Rosella dengan Pelarut Etil Asetat

### Lampiran 7. Hasil Uji Cakram



## Lampiran 8. Hasil Uji Fitokimia

8/3/2018

**Laboratorium Kimia – Fakultas Saintek****Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang**

### Fitokimia

Tanggal Analisa : 07 Agustus 2018

| Jenis Senyawa                 | Hasil Analisa   |       |
|-------------------------------|---|-------|
| <b>Alkaloid</b> - Dragendorff |    | (+)   |
|                               |    | (++)  |
| <b>Flavonoid</b>              |   | (+++) |
| <b>Saponin</b>                |  | (+)   |
| <b>Triterpenoid</b>           |  | (+)   |
| <b>Steroid</b>                |  | (+)   |
| <b>Tanin</b>                  |  | (+)   |

## Lampiran 9. Hasil Uji Spektrofotometri Ultraviolet – visible (UV-VIS)

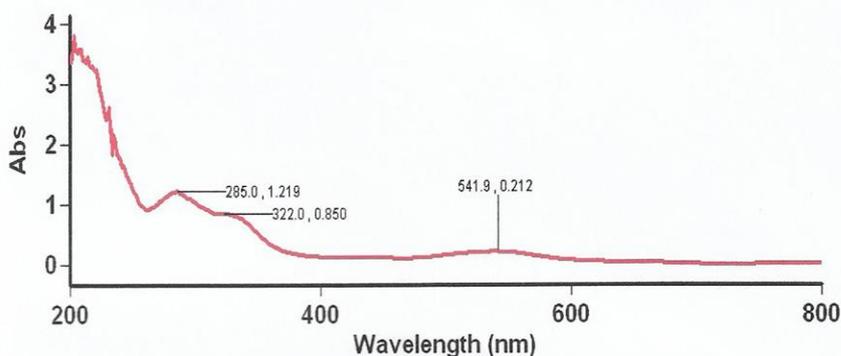
10/2/2018

Laboratorium Kimia – Fakultas Saintek

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

### Lamdha Maks Bunga Rosella

Tanggal Analisa : 24 September 2018



### Scan Analysis Report

Report Time : Mon 24 Sep 09:52:17 AM 2018

Method:

Batch: D:\Layanan Analisa\UB\Lamdha Maks Flavonoid Bunga Rosella Siti Khairul Bariyyah (24-09-2018).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Bunga Rosella

Collection Time 9/24/2018 9:54:38 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

800.0nm to 199.9nm

| Wavelength (nm) | Abs   |
|-----------------|-------|
| 541.9           | 0.212 |
| 322.0           | 0.850 |
| 285.0           | 1.219 |
| 242.0           | 1.654 |
| 240.0           | 1.789 |
| 237.9           | 1.853 |
| 235.0           | 2.160 |
| 233.1           | 2.269 |
| 231.0           | 2.616 |
| 221.0           | 3.253 |
| 218.0           | 3.312 |
| 213.9           | 3.456 |
| 209.1           | 3.591 |
| 205.0           | 3.581 |
| 202.9           | 3.813 |

**Lampiran 10. EPA Probit Analysis Toksisitas Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.)**

| Dosis (mg/L) | Ikan mati (ekor) | Total Ikan Uji (ekor) |
|--------------|------------------|-----------------------|
| 100          | 1                | 10                    |
| 100          | 3                | 10                    |
| 100          | 5                | 10                    |
| 100          | 7                | 10                    |
| 100          | 8                | 10                    |

**Analisis Probit test**

| Cell Counts and Residuals |       |                    |                    |                    |          |             |
|---------------------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|-------------|
| Number                    | dosis | Number of Subjects | Observed Responses | Expected Responses | Residual | Probability |
|                           |       |                    |                    |                    |          |             |
| 2                         | 2.301 | 10                 | 3                  | 2.917              | -.083    | .292        |
| 3                         | 2.477 | 10                 | 5                  | 5.179              | -.179    | .518        |
| 4                         | 2.602 | 10                 | 7                  | 6.887              | -.113    | .689        |
| 5                         | 2.699 | 10                 | 8                  | 8.013              | -.013    | .801        |

| Probability | 95% Confidence Limits for dosis |             |             | 95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>a</sup> |             |             |
|-------------|---------------------------------|-------------|-------------|---|-------------|-------------|
|             | Estimate                        | Lower Bound | Upper Bound | Estimate  | Lower Bound | Upper Bound |
| .010        | 75.170                          | .           | .           | 1.876   | .           | .           |
| .020        | 88.708                          | .           | .           | 1.948   | .           | .           |
| .030        | 98.536                          | .           | .           | 1.994   | .           | .           |
| .040        | 106.641                         | .           | .           | 2.028   | .           | .           |
| .050        | 113.722                         | .           | .           | 2.056   | .           | .           |
| .060        | 120.119                         | .           | .           | 2.080   | .           | .           |
| .070        | 126.023                         | .           | .           | 2.100   | .           | .           |
| .080        | 131.556                         | .           | .           | 2.119   | .           | .           |
| .090        | 136.798                         | .           | .           | 2.136   | .           | .           |
| .100        | 141.807                         | .           | .           | 2.152   | .           | .           |
| .150        | 164.577                         | .           | .           | 2.216   | .           | .           |
| .200        | 185.254                         | .           | .           | 2.268   | .           | .           |
| .250        | 205.052                         | .           | .           | 2.312   | .           | .           |
| .300        | 224.628                         | .           | .           | 2.351   | .           | .           |
| .350        | 244.432                         | .           | .           | 2.388   | .           | .           |
| .400        | 264.836                         | .           | .           | 2.423   | .           | .           |
| .450        | 286.197                         | .           | .           | 2.457   | .           | .           |
| <b>.500</b> | <b>308.901</b>                  | .           | .           | <b>2.490</b>                                      | .           | .           |
| .550        | 333.406                         | .           | .           | 2.523   | .           | .           |
| .600        | 360.298                         | .           | .           | 2.557   | .           | .           |
| .650        | 390.375                         | .           | .           | 2.591   | .           | .           |
| .700        | 424.792                         | .           | .           | 2.628   | .           | .           |
| .750        | 465.345                         | .           | .           | 2.668   | .           | .           |
| .800        | 515.076                         | .           | .           | 2.712   | .           | .           |
| .850        | 579.789                         | .           | .           | 2.763   | .           | .           |
| .900        | 672.886                         | .           | .           | 2.828   | .           | .           |
| .910        | 697.527                         | .           | .           | 2.844   | .           | .           |
| .920        | 725.321                         | .           | .           | 2.861   | .           | .           |
| .930        | 757.162                         | .           | .           | 2.879   | .           | .           |
| .940        | 794.378                         | .           | .           | 2.900   | .           | .           |
| .950        | 839.062                         | .           | .           | 2.924   | .           | .           |
| .960        | 894.780                         | .           | .           | 2.952   | .           | .           |
| .970        | 968.375                         | .           | .           | 2.986   | .           | .           |
| .980        | 1075.662                        | .           | .           | 3.032   | .           | .           |
| .990        | 1269.398                        | .           | .           | 3.104   | .           | .           |

a. Logarithm base = 10.

### Lampiran 11. EPA Probit Analysis Patogenitas *A. hydrophila*

| Kepadatan Bakteri (cfu/ml) | Ikan mati (ekor) | Total Ikan Uji (ekor) |
|----------------------------|------------------|-----------------------|
| $10^5$                     | 1                | 10                    |
| $10^6$                     | 3                | 10                    |
| $10^7$                     | 5                | 10                    |
| $10^8$                     | 7                | 10                    |

#### Analisis Probit test

| Cell Counts and Residuals |           |                    |                    |                    |          |             |
|---------------------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|-------------|
| Number                    | kepadatan | Number of Subjects | Observed Responses | Expected Responses | Residual | Probability |
| 1                         | 5.000     | 10                 | 1                  | 1.178              | -.120    | .178        |
| 2                         | 6.000     | 10                 | 3                  | 2.734              | .504     | .266        |
| 3                         | 7.000     | 10                 | 5                  | 4.924              | -.723    | .076        |
| 4                         | 8.000     | 10                 | 7                  | 7.138              | .275     | .138        |

| Cell Counts and Residuals |                                     |             |             |  |             |             |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--|-------------|-------------|
| Probability               | 95% Confidence Limits for kepadatan |             |             | 95% Confidence Limits for log(kepadatan) |             |             |
|                           | Estimate                            | Lower Bound | Upper Bound | Estimate                                 | Lower Bound | Upper Bound |
| .010                      | 1112.153                            | .           | .           | 3.046                                    | .           | .           |
| .020                      | 3260.627                            | .           | .           | 3.513                                    | .           | .           |
| .030                      | 6451.851                            | .           | .           | 3.810                                    | .           | .           |
| .040                      | 10780.573                           | .           | .           | 4.033                                    | .           | .           |
| .050                      | 16368.188                           | .           | .           | 4.214                                    | .           | .           |
| .060                      | 23354.220                           | .           | .           | 4.368                                    | .           | .           |
| .070                      | 31894.301                           | .           | .           | 4.504                                    | .           | .           |
| .080                      | 42160.021                           | .           | .           | 4.625                                    | .           | .           |
| .090                      | 54339.572                           | .           | .           | 4.735                                    | .           | .           |
| .100                      | 68638.798                           | .           | .           | 4.837                                    | .           | .           |
| .150                      | 180556.890                          | .           | .           | 5.257                                    | .           | .           |
| .200                      | 389450.294                          | .           | .           | 5.590                                    | .           | .           |
| .250                      | 753104.580                          | .           | .           | 5.877                                    | .           | .           |
| .300                      | 1361614.796                         | .           | .           | 6.134                                    | .           | .           |
| .350                      | 2357151.197                         | .           | .           | 6.372                                    | .           | .           |
| .400                      | 3967731.916                         | .           | .           | 6.599                                    | .           | .           |
| .450                      | 6566739.445                         | .           | .           | 6.817                                    | .           | .           |
| Probit <b>.500</b>        | <b>10781722.227</b>                 | .           | .           | <b>7.033</b>                             | .           | .           |
| .550                      | 17702169.418                        | .           | .           | 7.248                                    | .           | .           |
| .600                      | 29297728.937                        | .           | .           | 7.467                                    | .           | .           |
| .650                      | 49316112.734                        | .           | .           | 7.693                                    | .           | .           |
| .700                      | 85373289.518                        | .           | .           | 7.931                                    | .           | .           |
| .750                      | 154355101.838                       | .           | .           | 8.189                                    | .           | .           |
| .800                      | 298486189.549                       | .           | .           | 8.475                                    | .           | .           |
| .850                      | 643816662.536                       | .           | .           | 8.809                                    | .           | .           |
| .900                      | 1693583480.241                      | .           | .           | 9.229                                    | .           | .           |
| .910                      | 2139242709.055                      | .           | .           | 9.330                                    | .           | .           |
| .920                      | 2757245620.175                      | .           | .           | 9.440                                    | .           | .           |
| .930                      | 3644711767.911                      | .           | .           | 9.562                                    | .           | .           |
| .940                      | 4977495792.338                      | .           | .           | 9.697                                    | .           | .           |
| .950                      | 7101918424.539                      | .           | .           | 9.851                                    | .           | .           |
| .960                      | 10782871410.712                     | .           | .           | 10.033                                   | .           | .           |
| .970                      | 18017392970.088                     | .           | .           | 10.256                                   | .           | .           |
| .980                      | 35651280690.678                     | .           | .           | 10.552                                   | .           | .           |
| .990                      | 104522964282.692                    | .           | .           | 11.019                                   | .           | .           |

a Logarithm base = 10.

## Lampiran 12. Analisa Data Hematologi Ikan Mas (*C. carpio*)

### 1. Sel Darah Merah (Eritrosit)

#### ANOVA

| Eritrosit      |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 16016.286      | 6  | 2669.381    | 162.484 | .000 |
| Within Groups  | 230.000        | 14 | 16.429      |         |      |
| Total          | 16246.286      | 20 |             |         |      |

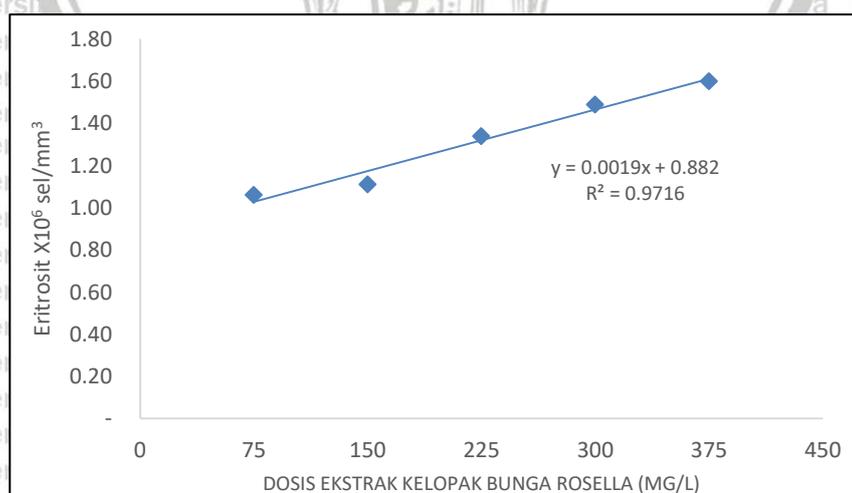
#### Eritrosit

| Subset for alpha = 0.05 |   |         |          |          |          |          |          |
|-------------------------|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Perlakuan               | N | 1       | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        |
| Duncan <sup>a</sup> K-  | 3 | 80.3333 |          |          |          |          |          |
| 75                      | 3 |         | 106.3333 |          |          |          |          |
| 150                     | 3 |         |          | 121.6667 |          |          |          |
| 225                     | 3 |         |          |          | 133.6667 |          |          |
| 300                     | 3 |         |          |          |          | 148.6667 |          |
| 375                     | 3 |         |          |          |          |          | 160.3333 |
| K+                      | 3 |         |          |          |          |          | 161.0000 |
| Sig.                    |   | 1.000   | 1.000    | 1.000    | 1.000    | 1.000    | .843     |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Polinomial Orthogonal



## 2. Hematokrit

### ANOVA

| Hematokrit     |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 425.905        | 6  | 70.984      | 212.952 | .000 |
| Within Groups  | 4.667          | 14 | .333        |         |      |
| Total          | 430.571        | 20 |             |         |      |

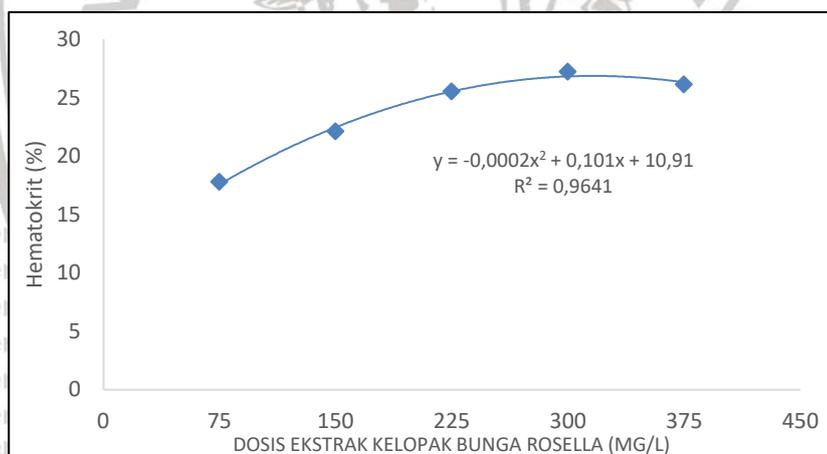
### Hematokrit

|                     |      | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |         |         |         |         |
|---------------------|------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Perlakuan           |      | N                       | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       |         |
| Duncan <sup>a</sup> | K-   | 3                       | 15.6667 |         |         |         |         |         |         |
|                     | 75   | 3                       |         | 17.6667 |         |         |         |         |         |
|                     | 150  | 3                       |         |         | 22.0000 |         |         |         |         |
|                     | 225  | 3                       |         |         |         | 25.3333 |         |         |         |
|                     | 375  | 3                       |         |         |         |         | 26.0000 | 26.0000 |         |
|                     | 300  | 3                       |         |         |         |         |         | 27.0000 |         |
|                     | K+   | 3                       |         |         |         |         |         |         | 28.3333 |
|                     | Sig. |                         |         | 1.000   | 1.000   | 1.000   | .179    | .052    | 1.000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Polinomial Orthogonal



### Nilai Optimum X dan Y

| Hematokrit  | Nilai   |       |       | X opt       | Y opt                                     |
|---|---------|-------|-------|-------------|---|
|   | a       | b     | c     | $X = -b/2a$ | $y = (-0.0002*(X^2)) + (0.101*X) + 10.91$ |
| $y = -0,0002x^2 + 0,101x + 10,91$<br>$R^2 = 0,9641$ | -0,0002 | 0,101 | 10,91 | 252,5       | 25,979                                    |

### 3. Hemaglobin

#### ANOVA

| Hemaglobin     |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 256590.476     | 6  | 42765.079   | 144.849 | .000 |
| Within Groups  | 4133.333       | 14 | 295.238     |         |      |
| Total          | 260723.810     | 20 |             |         |      |

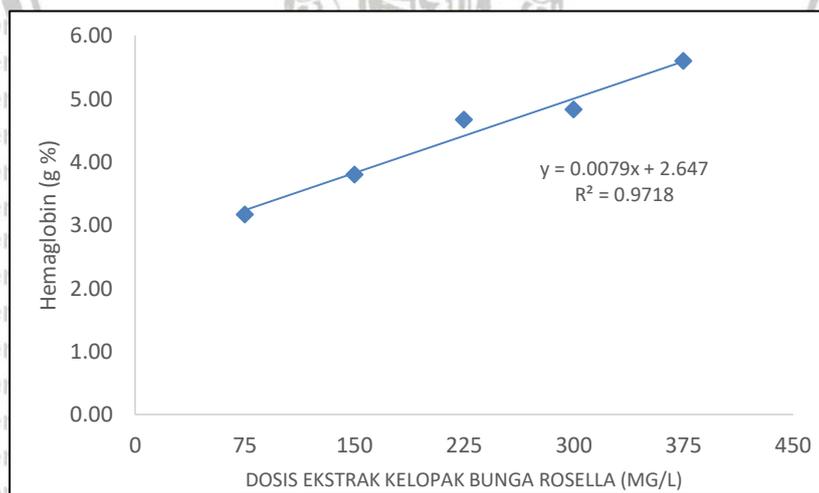
#### Hemaglobin

| Subset for alpha = 0.05 |   |          |          |          |          |          |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| Perlakuan               | N | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        |
| Duncan <sup>a</sup>     |   |          |          |          |          |          |
| K-                      | 3 | 263.3333 |          |          |          |          |
| 75                      | 3 |          | 316.6667 |          |          |          |
| 150                     | 3 |          |          | 380.0000 |          |          |
| 225                     | 3 |          |          |          | 466.6667 |          |
| 300                     | 3 |          |          |          | 483.3333 |          |
| 375                     | 3 |          |          |          |          | 560.0000 |
| K+                      | 3 |          |          |          |          | 576.6667 |
| Sig.                    |   | 1.000    | 1.000    | 1.000    | .255     | .255     |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Polinomial Orthogonal



#### 4. Sel Darah Putih (Leukosit)

##### ANOVA

| Leukosit       |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 647265.143     | 6  | 107877.524  | 175.004 | .000 |
| Within Groups  | 8630.000       | 14 | 616.429     |         |      |
| Total          | 655895.143     | 20 |             |         |      |

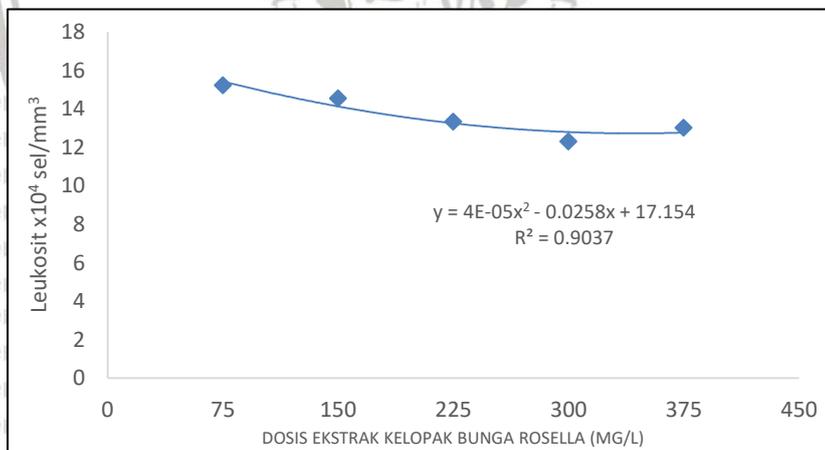
##### Leukosit

|                     |      | Subset for alpha = 0.05 |           |           |           |           |           |       |
|---------------------|------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Perlakuan           | N    | 1                       | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         |       |
| Duncan <sup>a</sup> | K +  | 3                       | 1133.0000 |           |           |           |           |       |
|                     | 300  | 3                       |           | 1229.3333 |           |           |           |       |
|                     | 375  | 3                       |           |           | 1301.0000 |           |           |       |
|                     | 225  | 3                       |           |           | 1332.3333 |           |           |       |
|                     | 150  | 3                       |           |           |           | 1454.0000 |           |       |
|                     | 75   | 3                       |           |           |           |           | 1521.0000 |       |
|                     | K -  | 3                       |           |           |           |           | 1693.3333 |       |
|                     | Sig. |                         | 1.000     | 1.000     | .144      | 1.000     | 1.000     | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### Polinomial Orthogonal



#### Nilai Optimum X dan Y

| Leukosit  | Nilai   |         |        | X opt       | Y opt                                       |
|---|---------|---------|--------|-------------|---|
| $y = 4E-05x^2 - 0.0258x + 17.154$<br>$R^2 = 0.9037$ | a       | b       | c      | $X = -b/2a$ | $y = (0.00004*(X^2)) - (0.0258*X) + 17.154$ |
|   | 0,00004 | -0,0258 | 17,154 | 322,5       | 11,404                                      |

5. Diferensial Leukosit  
a. Neutrofil

ANOVA

| Neutrofil      |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 485.619        | 6  | 80.937      | 169.967 | .000 |
| Within Groups  | 6.667          | 14 | .476        |         |      |
| Total          | 492.286        | 20 |             |         |      |

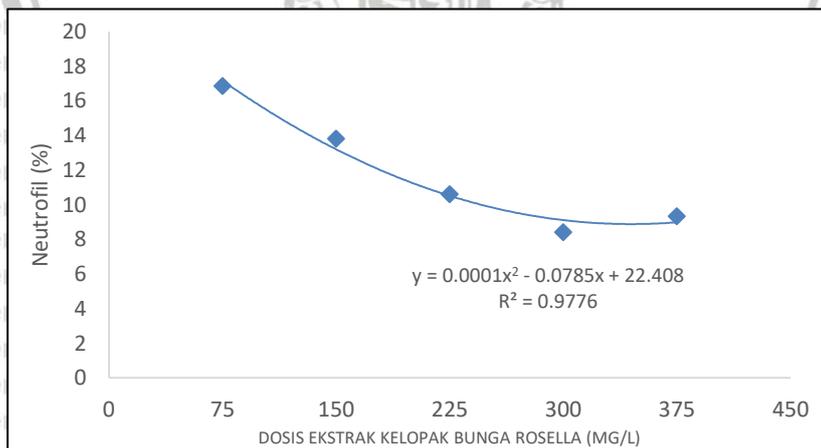
Neutrofil

| Subset for alpha = 0.05 |   |      |       |       |       |       |
|-------------------------|---|------|-------|-------|-------|-------|
| Perlakuan               | N | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Duncan <sup>a</sup>     |   |      |       |       |       |       |
| 375                     | 3 | 8.33 |       |       |       |       |
| K +                     | 3 | 8.33 |       |       |       |       |
| 300                     | 3 | 9.00 |       |       |       |       |
| 225                     | 3 |      | 10.67 |       |       |       |
| 150                     | 3 |      |       | 13.67 |       |       |
| 75                      | 3 |      |       |       | 17.00 |       |
| K -                     | 3 |      |       |       |       | 22.00 |
| Sig.                    |   | .280 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Polinomial Orthogonal



Nilai Optimum X dan Y

| Neutrofil  | Nilai  |         |        | X opt       | Y opt                                      |
|--|--------|---------|--------|-------------|--|
|  | a      | b       | c      | $X = -b/2a$ | $y = (0.0001*(X^2)) - (0.0785*X) + 22.408$ |
| $y = 0,0001x^2 - 0,0785x + 22,408$<br>$R^2 = 0,9776$ | 0,0001 | -0,0785 | 22,408 | 392,5       | 12,842                                     |

**b. Limfosit**

**ANOVA**

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 1432.571       | 6  | 238.762     | 313.375 | .000 |
| Within Groups  | 10.667         | 14 | .762        |         |      |
| Total          | 1443.238       | 20 |             |         |      |

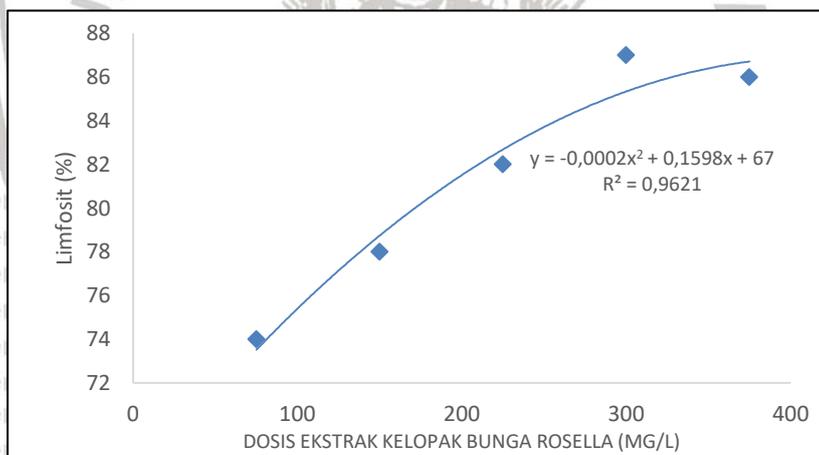
**Limfosit**

| Perlakuan           | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |       |       |
|---------------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                     |   | 1                       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
| Duncan <sup>a</sup> |   |                         |       |       |       |       |       |
| K -                 | 3 | 63.00                   |       |       |       |       |       |
| 75                  | 3 |                         | 73.33 |       |       |       |       |
| 150                 | 3 |                         |       | 78.00 |       |       |       |
| 225                 | 3 |                         |       |       | 81.67 |       |       |
| 375                 | 3 |                         |       |       |       | 86.00 |       |
| 300                 | 3 |                         |       |       |       | 86.67 | 86.67 |
| K +                 | 3 |                         |       |       |       |       | 87.67 |
| Sig.                |   | 1.000                   | 1.000 | 1.000 | 1.000 | .365  | .182  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

| Limfosit  | Nilai   |        |    | X opt       | Y opt                                   |
|---|---------|--------|----|-------------|---|
|   | a       | b      | c  | $X = -b/2a$ | $y = (-0.0002*(X^2)) + (0.1598*X) + 67$ |
| $y = -0,0002x^2 + 0,1598x + 67$<br>$R^2 = 0,9621$ | -0,0002 | 0,1598 | 67 | 399,5       | 73,700                                  |



c. Monosit

ANOVA

| Monosit        |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 2434991.238    | 6  | 405831.873  | 197.778 | .000 |
| Within Groups  | 28727.333      | 14 | 2051.952    |         |      |
| Total          | 2463718.571    | 20 |             |         |      |

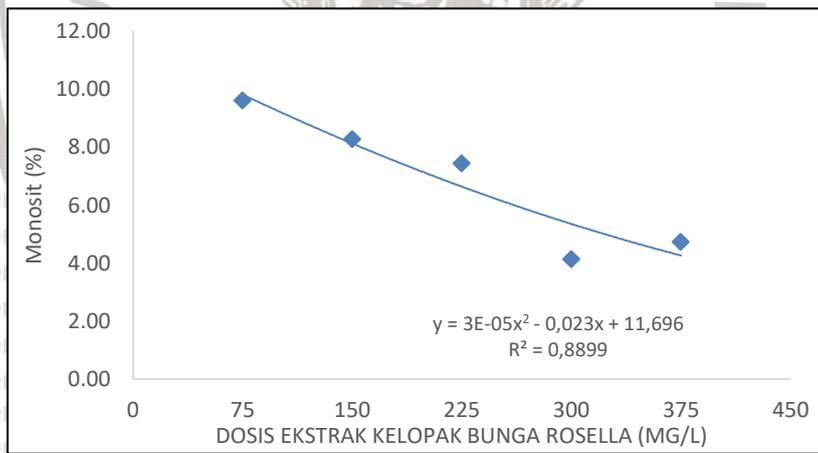
Monosit

| Monosit                 |           |   |        |        |        |        |         |
|-------------------------|-----------|---|--------|--------|--------|--------|---------|
| Subset for alpha = 0.05 |           |   |        |        |        |        |         |
|                         | Perlakuan | N | 1      | 2      | 3      | 4      |         |
| Duncan <sup>a</sup>     | K +       | 3 | 403.33 |        |        |        |         |
|                         | 300       | 3 | 413.33 |        |        |        |         |
|                         | 375       | 3 | 473.33 |        |        |        |         |
|                         | 225       | 3 |        | 743.33 |        |        |         |
|                         | 150       | 3 |        |        | 826.67 |        |         |
|                         | 75        | 3 |        |        |        | 960.00 |         |
|                         | K -       | 3 |        |        |        |        | 1422.00 |
|                         | Sig.      |   |        | .093   | 1.000  | 1.000  | 1.000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Polinomial Orthogonal



Nilai Optimum X dan Y

| Monosit  | Nilai   |        |        | X opt       | Y opt                                      |
|--|---------|--------|--------|-------------|--|
|  | a       | b      | c      | $X = -b/2a$ | $y = (0.00003*(X^2)) - (0.023*X) + 11.696$ |
| $y = 3E-05x^2 - 0,023x + 11,696$<br>$R^2 = 0,8899$ | 0,00003 | -0,023 | 11,696 | 383,3333    | 6,972                                      |

### Lampiran 13. Analisa Data Histopatologi Insang Ikan Mas (*C. carpio*)

| Perlakuan K (-)   | Kerusakan   |       | Total |
|-------------------|-------------|-------|-------|
|                   | Hiperplasia | Fusi  |       |
|                   | 421         | 328   | 749   |
|                   | 443         | 346   | 789   |
|                   | 414         | 385   | 799   |
| <b>Persen (%)</b> | 32.22       | 31.26 | 63.48 |
|                   | 35.98       | 32.53 | 68.51 |
|                   | 34.03       | 34.84 | 68.87 |

| Perlakuan A<br>(Dosis 75 mg/L) | Kerusakan   |       | Total |
|--------------------------------|-------------|-------|-------|
|                                | Hiperplasia | Fusi  |       |
|                                | 121         | 68    | 189   |
|                                | 111         | 67    | 178   |
|                                | 114         | 70    | 184   |
| <b>Persen (%)</b>              | 25.82       | 11.33 | 37.15 |
|                                | 24.44       | 11.17 | 35.61 |
|                                | 24.49       | 11.67 | 36.16 |

| Perlakuan B<br>(Dosis 150 mg/L) | Kerusakan   |       | Total |
|---------------------------------|-------------|-------|-------|
|                                 | Hiperplasia | Fusi  |       |
|                                 | 98          | 62    | 160   |
|                                 | 95          | 66    | 161   |
|                                 | 93          | 60    | 153   |
| <b>Persen (%)</b>               | 22.49       | 9.49  | 31.98 |
|                                 | 21.59       | 9.82  | 31.41 |
|                                 | 20.66       | 10.00 | 30.66 |

| Perlakuan C<br>(Dosis 225 mg/L) | Kerusakan   |      | Total |
|---------------------------------|-------------|------|-------|
|                                 | Hiperplasia | Fusi |       |
|                                 | 72          | 31   | 103   |
|                                 | 76          | 35   | 111   |
|                                 | 87          | 33   | 120   |
| <b>Persen (%)</b>               | 18.28       | 7.26 | 25.54 |
|                                 | 18.46       | 7.73 | 26.19 |
|                                 | 19.03       | 7.89 | 26.92 |

| Perlakuan D<br>(Dosis 300 mg/L) | Kerusakan   |      | Total |
|---------------------------------|-------------|------|-------|
|                                 | Hiperplasia | Fusi |       |
|                                 | 27          | 18   | 45    |

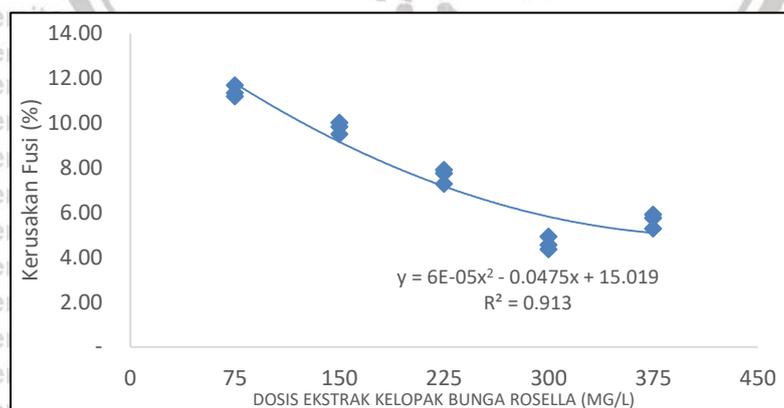
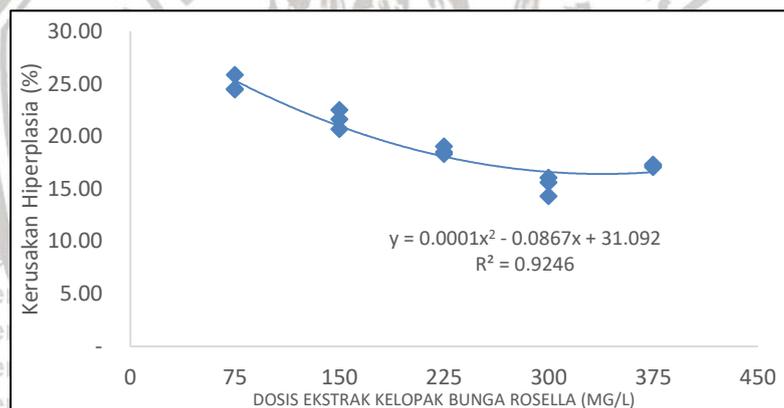
|  |    |    |    |
|--|----|----|----|
|  | 23 | 19 | 42 |
|  | 29 | 14 | 43 |

| Persen (%) | Kerusakan   |       | Total |
|------------|-------------|-------|-------|
|            | Hiperplasia | Fusi  |       |
|            | 14.28       | 4.54  |       |
| 15.59      | 4.91        | 20.50 |       |
| 16.03      | 4.34        | 20.37 |       |

| Perlakuan E<br>(Dosis 375 mg/L) | Kerusakan   |      | Total |
|---------------------------------|-------------|------|-------|
|                                 | Hiperplasia | Fusi |       |
|                                 | 34          | 22   | 56    |

|  |    |    |    |
|--|----|----|----|
|  | 31 | 20 | 51 |
|  | 36 | 24 | 60 |

| Persen (%) | Kerusakan   |       | Total |
|------------|-------------|-------|-------|
|            | Hiperplasia | Fusi  |       |
|            | 17.28       | 5.26  |       |
| 17.16      | 5.73        | 22.89 |       |
| 17.03      | 5.89        | 22.92 |       |



### Nilai Optimum X dan Y

| Fusi   | Nilai   |         |        | X opt       | Y opt                                       |
|--|---------|---------|--------|-------------|---|
|  | a       | b       | c      | $X = -b/2a$ | $y = (0.00006*(X^2)) - (0.0475*X) + 15.019$ |
| $y = 6E-05x^2 - 0.0475x + 15.019$<br>$R^2 = 0.913$ | 0,00006 | -0,0475 | 15,019 | 395,8333    | 11,525                                      |

Lampiran 14. Data Pengamatan Kualitas Air Selama Penelitian

| Parameter | Waktu | Hari Ke- | Perlakuan |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Rata-rata |      |
|-----------|-------|----------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
|           |       |          | K-        |      |      | 75   |      |      | 150  |      |      | 225  |      |      | 300  |      |      | 375  |      |      | K+   |      |      |           |      |
|           |       |          | 1         | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    |      |      |      |           |      |
| Suhu (°C) | Pagi  | 1        | 24,2      | 24,4 | 25,0 | 24,0 | 24,3 | 25,1 | 24,4 | 24,1 | 24,5 | 25,1 | 25,0 | 25,1 | 24,3 | 25,1 | 24,3 | 24,4 | 24,4 | 25,4 | 24,5 | 24,0 | 24,4 | 24,6      |      |
|           |       | 2        | 24,0      | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,3 | 24,0 | 24,1 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,1 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0 | 24,0      | 24,0 |
|           |       | 3        | 24,3      | 24,5 | 24,0 | 25,0 | 24,0 | 25,0 | 25,0 | 24,0 | 25,0 | 24,0 | 25,0 | 24,5 | 24,0 | 24,5 | 24,5 | 25,0 | 25,0 | 24,5 | 25,3 | 25,0 | 25,2 | 24,6      |      |
|           |       | 4        | 25,1      | 24,3 | 25,1 | 24,0 | 24,3 | 24,5 | 24,5 | 25,0 | 24,5 | 24,0 | 24,0 | 25,0 | 25,0 | 24,0 | 24,5 | 24,3 | 24,5 | 24,0 | 24,2 | 24,5 | 24,3 | 24,5      | 24,5 |
|           |       | 5        | 24,2      | 24,5 | 24,5 | 24,5 | 25,0 | 24,5 | 24,4 | 24,2 | 24,4 | 25,1 | 25,0 | 24,2 | 24,0 | 25,0 | 25,0 | 24,4 | 24,2 | 25,3 | 24,3 | 25,1 | 24,1 | 24,6      | 24,6 |
|           |       | 6        | 24,3      | 24,3 | 24,0 | 24,3 | 25,1 | 25,0 | 25,0 | 24,3 | 25,0 | 24,5 | 24,2 | 24,5 | 24,5 | 24,0 | 25,0 | 25,0 | 25,3 | 24,5 | 25,2 | 24,3 | 24,5 | 24,6      | 24,6 |
|           |       | 7        | 25,0      | 25,2 | 25,0 | 24,0 | 25,1 | 25,0 | 24,5 | 25,1 | 25,0 | 24,5 | 25,0 | 24,2 | 24,0 | 24,2 | 24,5 | 24,0 | 25,1 | 24,5 | 24,1 | 25,3 | 24,5 | 24,7      | 24,7 |
|           | Sore  | 1        | 26,0      | 26,5 | 27,0 | 26,6 | 26,5 | 27,0 | 27,0 | 26,6 | 26,0 | 27,0 | 26,2 | 27,0 | 26,2 | 26,0 | 27,0 | 26,0 | 26,4 | 26,6 | 26,1 | 26,0 | 26,5 | 26,5      | 26,5 |
|           |       | 2        | 26,1      | 26,2 | 26,0 | 26,4 | 26,6 | 26,4 | 26,5 | 26,4 | 26,5 | 26,3 | 26,5 | 26,6 | 26,4 | 26,7 | 26,1 | 26,6 | 26,1 | 26,3 | 26,5 | 26,6 | 26,3 | 26,4      | 26,4 |
|           |       | 3        | 27,0      | 26,5 | 26,1 | 26,3 | 26,5 | 26,5 | 26,3 | 26,2 | 26,0 | 27,0 | 26,3 | 27,0 | 26,5 | 27,0 | 27,0 | 26,5 | 27,0 | 26,1 | 26,5 | 26,3 | 26,5 | 26,5      | 26,5 |
|           |       | 4        | 26,3      | 26,3 | 26,1 | 26,2 | 26,0 | 26,4 | 26,0 | 27,0 | 26,3 | 26,0 | 26,5 | 26,3 | 27,0 | 26,5 | 26,3 | 26,2 | 26,0 | 27,0 | 26,3 | 26,0 | 26,2 | 26,3      | 26,3 |
|           |       | 5        | 27,1      | 27,3 | 27,3 | 27,3 | 26,5 | 26,3 | 27,4 | 26,3 | 27,3 | 26,2 | 26,6 | 27,4 | 27,4 | 27,3 | 27,3 | 26,3 | 26,4 | 27,3 | 27,3 | 27,3 | 26,5 | 27,0      | 27,0 |
|           |       | 6        | 27,2      | 26,2 | 26,6 | 26,0 | 26,3 | 26,4 | 26,2 | 26,0 | 26,2 | 26,0 | 26,3 | 26,2 | 26,5 | 26,3 | 26,4 | 27,0 | 26,4 | 27,0 | 26,5 | 26,4 | 26,2 | 26,4      | 26,4 |
|           |       | 7        | 26,6      | 26,3 | 26,2 | 27,0 | 26,2 | 26,0 | 26,2 | 26,5 | 27,6 | 26,2 | 27,0 | 26,0 | 26,2 | 27,0 | 26,5 | 26,2 | 27,0 | 26,2 | 26,5 | 27,0 | 26,4 | 26,5      | 26,5 |
| pH        | Pagi  | 1        | 7,5       | 7,5  | 7,5  | 7,4  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,3  | 7,5  | 7,4  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,3  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,4  | 7,5  | 7,5       |      |
|           |       | 2        | 7,2       | 7,4  | 7,2  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,2  | 7,3  | 7,0  | 7,3  | 7,1  | 7,0  | 7,4  | 7,1  | 7,0  | 7,4  | 7,3  | 7,5  | 7,4  | 7,2  | 7,0  | 7,2       |      |
|           |       | 3        | 7,0       | 7,4  | 7,1  | 7,4  | 7,1  | 7,0  | 7,3  | 7,0  | 7,3  | 7,4  | 7,0  | 7,2  | 7,4  | 7,3  | 7,0  | 7,3  | 7,1  | 7,0  | 7,3  | 7,4  | 7,2  | 7,2       | 7,2  |
|           |       | 4        | 7,4       | 7,1  | 7,3  | 7,1  | 7,1  | 7,4  | 7,1  | 7,2  | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,4  | 7,4  | 7,2  | 7,5  | 7,4  | 7,5  | 7,0  | 7,5  | 7,2  | 7,4  | 7,3       | 7,3  |
|           |       | 5        | 7,3       | 7,4  | 7,0  | 7,4  | 7,5  | 7,0  | 7,5  | 7,4  | 7,0  | 7,4  | 7,2  | 7,3  | 7,5  | 7,4  | 7,4  | 7,0  | 7,1  | 7,3  | 7,4  | 7,2  | 7,0  | 7,3       | 7,3  |
|           |       | 6        | 7,0       | 7,4  | 7,3  | 7,0  | 7,4  | 7,0  | 7,0  | 7,3  | 7,4  | 7,2  | 7,4  | 7,4  | 7,3  | 7,5  | 7,2  | 7,1  | 7,5  | 7,2  | 7,5  | 7,3  | 7,4  | 7,3       | 7,3  |
|           |       | 7        | 7,4       | 7,0  | 7,5  | 7,3  | 7,5  | 7,4  | 7,2  | 7,0  | 7,4  | 7,0  | 7,0  | 7,4  | 7,0  | 7,3  | 7,3  | 7,5  | 7,3  | 7,1  | 7,4  | 7,0  | 7,1  | 7,2       | 7,2  |
|           | Sore  | 1        | 7,2       | 7,2  | 7,0  | 7,2  | 7,3  | 7,0  | 7,1  | 7,1  | 7,2  | 7,0  | 7,1  | 7,4  | 7,0  | 7,0  | 7,3  | 7,2  | 7,0  | 7,3  | 7,4  | 7,3  | 7,1  | 7,2       | 7,2  |
|           |       | 2        | 7,0       | 7,1  | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,2  | 7,0  | 7,4  | 7,0  | 7,2  | 7,3  | 7,4  | 7,2  | 7,1       | 7,1  |
|           |       | 3        | 7,1       | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,0       | 7,0  |
|           |       | 4        | 7,4       | 7,0  | 7,0  | 7,3  | 7,0  | 7,0  | 7,3  | 7,4  | 7,4  | 7,4  | 7,3  | 7,3  | 7,4  | 7,3  | 7,4  | 7,2  | 7,0  | 7,4  | 7,4  | 7,2  | 7,4  | 7,3       | 7,3  |
|           |       | 5        | 7,3       | 7,0  | 7,0  | 7,2  | 7,0  | 7,2  | 7,3  | 7,0  | 7,2  | 7,3  | 7,1  | 7,4  | 7,1  | 7,2  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,3  | 7,0  | 7,3  | 7,0       | 7,1  |
|           |       | 6        | 7,0       | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,2  | 7,0  | 7,1  | 7,1  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,1  | 7,0  | 7,2  | 7,0       | 7,0  |
|           |       | 7        | 7,0       | 7,0  | 7,0  | 7,2  | 7,3  | 7,2  | 7,4  | 7,3  | 7,4  | 7,4  | 7,3  | 7,0  | 7,0  | 7,1  | 7,4  | 7,0  | 7,0  | 7,0  | 7,4  | 7,1  | 7,4  | 7,4       | 7,2  |

| Parameter | Waktu | Hari Ke- | Perlakuan |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Rata-rata |
|-----------|-------|----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
|           |       |          | K-        |     |     | 75  |     |     | 150 |     |     | 225 |     |     | 300 |     |     | 375 |     |     | K+  |     |     |           |
|           |       |          | 1         | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   |           |
| DO (mg/L) | Pagi  | 1        | 6,5       | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,7 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,7 | 6,2 | 6,0 | 6,7 | 6,5       |
|           | Pagi  | 2        | 6,7       | 6,5 | 6,2 | 6,0 | 6,7 | 6,5 | 6,5 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 6,2 | 6,9 | 6,5       |
|           | Pagi  | 3        | 6,0       | 6,5 | 6,1 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,7 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,0 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,4 | 6,4       |
|           | Pagi  | 4        | 6,1       | 6,4 | 6,9 | 6,7 | 6,0 | 6,7 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,3 | 6,1 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,5 | 6,5 | 6,4 | 6,1 | 6,4       |
|           | Pagi  | 5        | 6,0       | 6,5 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,9 | 6,9 | 6,2 | 6,4 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,3 | 6,5       |
|           | Pagi  | 6        | 6,2       | 6,2 | 6,0 | 6,2 | 6,9 | 6,7 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,9 | 6,1 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,0 | 6,0 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 6,0 | 6,5 | 6,4       |
|           | Pagi  | 7        | 6,0       | 6,2 | 6,1 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 6,0 | 6,0       |
| DO (mg/L) | Sore  | 1        | 7,0       | 7,1 | 7,3 | 7,2 | 7,4 | 7,7 | 7,2 | 7,4 | 7,3 | 7,1 | 7,4 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,4 | 7,2 | 7,1 | 7,2 | 7,3 | 7,1 | 7,2 | 7,2       |
|           | Sore  | 2        | 7,7       | 7,4 | 7,2 | 7,0 | 7,3 | 7,4 | 7,1 | 7,2 | 7,1 | 7,7 | 7,1 | 7,0 | 7,7 | 7,0 | 7,4 | 7,7 | 7,2 | 7,3 | 7,7 | 7,3 | 7,4 | 7,3       |
|           | Sore  | 3        | 7,1       | 7,3 | 7,4 | 7,3 | 7,1 | 7,3 | 7,7 | 7,3 | 7,4 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,2 | 7,3 | 7,3 | 7,2 | 7,4 | 7,2 | 7,4 | 7,4 | 7,1 | 7,3       |
|           | Sore  | 4        | 7,4       | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,3 | 7,2 | 7,3 | 7,0 | 7,3 | 7,0 | 7,3 | 7,4 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,3 | 7,3 | 7,1       |
|           | Sore  | 5        | 7,5       | 7,0 | 7,0 | 7,7 | 7,0 | 7,0 | 7,7 | 7,4 | 7,2 | 7,7 | 7,2 | 7,4 | 7,0 | 7,3 | 7,4 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,4 | 7,0 | 7,2       |
|           | Sore  | 6        | 7,7       | 7,6 | 7,7 | 7,7 | 7,7 | 7,6 | 7,7 | 7,6 | 7,7 | 7,6 | 7,7 | 7,6 | 7,6 | 7,7 | 7,5 | 7,6 | 7,7 | 7,7 | 7,6 | 7,7 | 7,7 | 7,7       |
|           | Sore  | 7        | 7,2       | 7,3 | 7,6 | 7,7 | 7,7 | 7,6 | 7,4 | 7,0 | 7,4 | 7,4 | 7,2 | 7,2 | 7,7 | 7,2 | 7,4 | 7,7 | 7,1 | 7,3 | 7,4 | 7,4 | 7,5 | 7,4       |

**Lampiran 15. Analisa Data Kelulushidupan (Survival Rate) Ikan Mas (*C. carpio*)**

**Data Kelulushidupan Ikan Mas**

| Perlakuan | Hari ke- |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Rerata Awal | Rerata Akhir | SR (%) |
|-----------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|--------------|--------|
|           | 1        |    |    | 2  |    |    | 3  |    |    | 4  |    |    | 5  |    |    | 6  |    |    | 7  |    |    |             |              |        |
| K-        | 15       | 15 | 15 | 12 | 13 | 14 | 10 | 10 | 13 | 9  | 9  | 10 | 8  | 7  | 6  | 5  | 5  | 5  | 5  | 4  | 5  | 15          | 4,67         | 31     |
| 75        | 15       | 15 | 15 | 14 | 15 | 14 | 14 | 14 | 13 | 13 | 14 | 13 | 12 | 10 | 11 | 10 | 8  | 9  | 7  | 8  | 7  | 15          | 7,33         | 49     |
| 150       | 15       | 15 | 15 | 15 | 14 | 15 | 14 | 14 | 15 | 14 | 14 | 15 | 14 | 14 | 13 | 13 | 13 | 11 | 10 | 9  | 8  | 15          | 9,00         | 60     |
| 225       | 15       | 15 | 15 | 14 | 15 | 15 | 14 | 15 | 15 | 14 | 13 | 14 | 13 | 11 | 13 | 10 | 11 | 12 | 10 | 11 | 12 | 15          | 11,00        | 73     |
| 300       | 15       | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 | 14 | 14 | 13 | 14 | 14 | 13 | 14 | 14 | 15          | 13,67        | 91     |
| 375       | 15       | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 | 15 | 15 | 14 | 14 | 15 | 14 | 13 | 13 | 12 | 13 | 13 | 12 | 13 | 15          | 12,67        | 84     |
| K +       | 15       | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 | 15 | 15 | 14 | 15 | 14 | 14 | 15 | 14 | 14 | 15 | 15          | 14,33        | 96     |

**ANOVA**

| Kelulushidupan |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 9315.810       | 6  | 1552.635    | 58.432 | .000 |
| Within Groups  | 372.000        | 14 | 26.571      |        |      |
| Total          | 9687.810       | 20 |             |        |      |

**Kelulushidupan**

| Perlakuan              | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |       |       |
|------------------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                        |   | 1                       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
| Duncan <sup>a</sup> K- | 3 | 31.00                   |       |       |       |       |       |
| 75                     | 3 |                         | 49.00 |       |       |       |       |
| 150                    | 3 |                         |       | 60.00 |       |       |       |
| 225                    | 3 |                         |       |       | 73.33 |       |       |
| 375                    | 3 |                         |       |       |       | 84.67 |       |
| 300                    | 3 |                         |       |       |       |       | 91.00 |
| K +                    | 3 |                         |       |       |       |       | 95.33 |
| Sig.                   |   | 1.000                   | 1.000 | 1.000 | 1.000 | .127  | .286  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.