

1. IMMUNE RESPONSE

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KFC  
KK

571.9646

Sri  
P



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA  
TAHUN ANGGARAN 2001

**PENINGKATAN RESPON IMUN NON-SPEKIFIK PADA IKAN NILA MERAH  
(*Oreochromis sp.*) DENGAN PEMBERIAN BAKTERI ASAM LAKTAT  
SEBAGAI PROBIOTIK**

Peneliti:

**Dra. SRI PUDJI ASTUTI W., M.Si.  
HARI SOEPRIONONO, S.Si.**

3000313023141

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 50

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2001



# LEMBAGA PENELITIAN

- |                                      |                                       |  |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional       | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional           | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      | 10. Puslit/Kesehatan Reproduksi                  |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum         | 7. Puslit Olahraga                    |  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995346  
E-mail: lpunair @ rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

3000313023141

## IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. a. Judul Penelitian	:	Peningkatan respon imun non-spesifik pada ikan nila merah ( <i>Oreochromis sp.</i> ) dengan pemberian bakteri asam laktat sebagai probiotik
b. Macam Penelitian	:	I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian	:	
a. Nama Lengkap	:	Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.
b. Jenis Kelamin	:	Perempuan
c. Pangkat/Gol. dan NIP	:	Penata /III-C dan 131 999 645
d. Jabatan sekarang	:	Lektor
e. Fakultas/Jurusan	:	Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Biologi
f. Universitas	:	Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yg. Diteliti	:	Imunologi
3. Jumlah Tim Peneliti	:	2 orang
4. Lokasi Penelitian	:	Lab. Mikrobiologi dan Lab. Biologi Reproduksi, Jurusan biologi, FMIPA-UNAIR
5. Jangka Waktu Penelitian	:	6 bulan
6. Biaya Yang Diperlukan	:	Rp 5.000.000. (lima juta rupiah)

Mengetahui :  
Dekan Fakultas MIPA

Drs. H.A. Latief Burhan, M.S.  
NIP. 131 286 709

Surabaya, 15 Januari 2002  
Ketua Peneliti

Dra. Sri Puji Astuti W., M.Si  
NIP. 131 999 645

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian Unair

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.  
NIP. 130 701 125

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

## RINGKASAN

PENINGKATAN RESPON IMUN NON-SPEKIFIK PADA IKAN NILA MERAH (*Oreochromis sp.*) DENGAN PEMBERIAN BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI PROBIOTIK (Sri Puji Astuti Wahyuningsih dan Hari Soepriandono, 2001, 45 halaman)

Pada budidaya perairan, ikan senantiasa hidup dalam lingkungan yang mengandung berbagai mikroba patogen seperti virus, bakteri, jamur dan parasit. Bakteri asam laktat sebagai probiotik dapat merangsang terjadinya proliferasi, diferensiasi dan aktivasi sel imunokompeten untuk meningkatkan kemampuannya melawan hama dan penyakit.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan (1) apakah pemberian bakteri asam laktat pada pakan berpengaruh terhadap respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*), (2) berapa dosis optimum pemberian bakteri asam laktat.

Tujuan penelitian ini adalah (1) mengetahui pengaruh pemberian bakteri asam laktat pada pakan terhadap respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dan (2) menentukan dosis optimum pemberian bakteri asam laktat.

Penelitian ini menggunakan 80 ekor ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) berumur 2 bulan, berat sekitar 20 g dan panjang tubuh sekitar 15 cm yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok I tanpa pemberian bakteri asam laktat. Kelompok II diberi bakteri asam laktat 5 g/kg pakan. Kelompok III diberi bakteri asam laktat 10 g/kg pakan. Kelompok IV diberi bakteri asam laktat 20 g/kg pakan. Setiap kelompok terdiri dari dua kali ulangan dengan kepadatan 10 ekor/ember. Bakteri asam laktat diberikan pada hewan uji selama 20 hari. Setelah itu dilakukan ujiantang dengan *Aeromonas hydrophila* secara rendaman dengan konsentrasi  $3 \times 10^8$  sel/ml. Data yang diamati adalah jumlah total leukosit dan diferensial leukosit (jumlah neutrofil, eosinofil, dan monosit), serta data tambahan berupa performan ikan dan gejala klinis yang diamati selama 3 kali, yaitu sebelum dan sesudah pemberian bakteri asam laktat, serta setelah ujiantang.

Hasil penelitian menunjukkan, ada beda nyata antara kontrol dengan perlakuan pada jumlah total leukosit, jumlah monosit, neutrofil, dan eosinofil ( $\alpha = 5\%$ ). Rerata jumlah total leukosit sebelum pemberian bakteri asam laktat relatif sama, yaitu kontrol sebanyak  $12.000 \text{ sel/mm}^3$ , II =  $12.200 \text{ sel/mm}^3$ , III =  $11.800 \text{ sel/mm}^3$ , dan IV =  $11.900 \text{ sel/mm}^3$ . Rerata jumlah total leukosit setelah 20 hari pemberian bakteri asam laktat (5, 10 dan 20 g/kg pakan) meningkat (18.150, 17.650 dan 15.300  $\text{sel/mm}^3$ ) dibanding kontrol ( $12.400 \text{ sel/mm}^3$ ). Rerata jumlah total leukosit pada semua kelompok perlakuan meningkat setelah diuji tantang terhadap *A. hydrophila*. Rerata jumlah monosit didapatkan meningkat selama perlakuan dan semakin tinggi setelah diuji tantang. Jumlah monosit setelah diuji tantang mulai dari kontrol, pemberian bakteri asam laktat 5, 10, dan 20 g/kg pakan adalah 6.995, 14.993, 13.640, dan 7.826  $\text{sel/mm}^3$ . Rerata jumlah neutrofil meningkat selama perlakuan dan setelah diuji tantang. Kenaikan tertinggi setelah pemberian bakteri asam laktat 5 g/kg pakan (2.117  $\text{sel/mm}^3$ ). Rerata jumlah eosinofil meningkat setelah pemberian probiotik bakteri asam laktat (kontrol = 488  $\text{sel/mm}^3$ , bakteri asam laktat 5, 10, dan 20 g/kg pakan adalah 1.512, 1.294, dan 1.020  $\text{sel/mm}^3$ ). Rerata jumlah eosinofil meningkat juga setelah diuji tantang. Performan ikan setelah pemberian bakteri asam laktat tidak mengalami perubahan dibanding dengan sebelum perlakuan. Performan dan gejala klinis setelah uji tantang adalah terjadi peradangan kulit (luka-luka), sirip patah, perubahan tingkah laku ikan (gerakan lambat dan lemas) dan respon makan menurun, serta kembung.

Kesimpulan hasil penelitian adalah pemberian bakteri asam laktat berpengaruh terhadap peningkatan respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dan konsentrasi optimumnya adalah 5 g/kg pakan. Berdasar hasil penelitian disarankan pemberian probiotik bakteri asam laktat dengan konsentrasi 5 g/kg pakan untuk berat ikan nila merah sebesar 20 g. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh bakteri asam laktat dalam menguji ketahanan ikan nila merah terhadap penyakit selain *A. hydrophila*.

(Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Nomor Kontrak : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001, 15 Maret 2001)

## SUMMARY

### **The Improvement of non-specific immune response on red nila fish (*oreochromis sp.*) by application lactic-acid bacteria as probiotic (Sri Puji Astuti Wahyuningsih and Hari Soepriandono, 2001, 45 p.)**

Fishes always live in the environment with many pathogenic microbes, e.g.: virus, bacteria, fungi, and parasite. Lactic acid bacteria as probiotic can stimulate proliferation, differentiation and activation of immunocompetent cell to improve their ability against pathogenic microbe and diseases.

This research want to solve the problems that: (1) by giving lactic acid bacteria via food influence on non-specific immune response red nila fish (*oreochromis sp.*), and (2) how much doses of lactic acid bacteria used to optimize the non-specific immune response.

This research aims to (1) know the effect of giving lactic acid bacteria on non-specific response immune of red nila fish (*oreochromis sp.*), and (2) look for the optimum doses of lactic acid bacteria.

Eighty red nil fishes with the criteria 20-gr. weight, and 15 cm length used in this study taken to eight buckets. These fishes divided into four groups treatment. Group I fish without lactic acid bacteria. Group II fishes with lactic acid bacteria every 5- gr./kg food. Group III fishes with lactic acid bacteria every 10-gr./kg food; Group IV fishes with lactic acid bacteria every 20-gr./kg food.

A lactic acid bacterium was given to this bucket in 20 days long. After that, they were challenged test with *Aeromonas hydrophilia* soaked with concentration 3 times  $10^8$  cell/ml.

Data observed are the total sum of leukocyte, the differential of leukocyte (total of neutrophil, eosinophil, and monocyte), and added data from especially fishes performance and clinical symptom observed three times, E.I.: before, and after given with lactic acid bacteria and after challenge test.

Result of this study showed that there is a differentiation between control group and experiment group significantly ( $\alpha < 0,05$ ). The mean of leukocyte is nearly similar

for all groups before treatment (I=12.000 cells/mm<sup>3</sup>, II=12.200 cells/mm<sup>3</sup>, III=11.800 cells/mm<sup>3</sup>, and IV = 11.900 cells/mm<sup>3</sup>). After 20 days experiment, mean of each group are II = 18,150, III = 117.650, and IV = 15.300, but group I (control group) = 12.400 cell/mm<sup>3</sup>.

Mean of total leukocyte for all groups' increase after challenge tests against *A. hydrophilia*. 12.000 cells/mm<sup>3</sup>. Mean of total monocyte for all groups increased along treatment and after challenge test. total sum of monocyte each group, Group I (control) 6,995, Group II 14.993, Group III 14,640, and Group IV 7.826 cell/mm<sup>2</sup>.

Mean of total neutrophil increase along treatment and challenge test. The highest response occurs on 5 gr./kg food lactic acid bacteria (2.117 cell/mm<sup>2</sup>). Mean of total eosinophyl increase after given probiotic lactic acid. (Control Group = 488 cell/mm<sup>2</sup>, Group II= 1.512 cell/mm<sup>2</sup>, Group III= 1.294 cell/mm<sup>2</sup>, Group IV= 1.020cell/mm<sup>2</sup>). Mean of total eosinophyl also increased after challenge test.

There is no change on fish performance after given lactic acid bacteria. Clinical performance after challenge test showed that fishes being inflammation on skin, broken fin, changes on behavior like slower on movement and drowned and response to feeding descries and swollen.

This research concluded that giving lactic acid bacteria influenced on improvement non-specific response immune of red nila fish (*oreochromis sp*), and the optimal doses 5 gr./kg food. This research recommended that 5gr/kg food concentrate good for improve immune response. We recommended that next research must apply this lactic acid bacterium to test with other bacteria.

(Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Science, Airlangga University; Contract Number: 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001, 15 Maret 2001).

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	vii
I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Ikan Nila Merah ( <i>Oreochromis sp.</i> ) .....	5
2.1.1. Klasifikasi .....	5
2.1.2. Ciri-ciri morfologi .....	5
2.1.3. Budidaya .....	7
2.1.4. Hama dan penyakit .....	9
2.2 Sistem Imun Non-Spesifik .....	10
2.3 Bakteri Asam Laktat .....	14
2.4 Penggunaan Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik .....	16
III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	18
3.1 Tujuan Penelitian .....	18
3.2 Manfaat Penelitian .....	18
IV METODE PENELITIAN .....	19
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
4.2 Sampel, Bahan dan Alat Penelitian .....	19
4.3 Pelaksanaan Penelitian .....	21
4.4 Pengambilan Data Penelitian .....	23
4.4.1. Penghitungan total leukosit .....	24
4.4.2. Pembuatan preparat hapusan darah .....	25
4.5 Analisis Data .....	27
V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	28
VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	41
5.1 Kesimpulan .....	41
5.2 Saran .....	41
DAFTAR PUSTAKA .....	42

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 1. Karakter bakteri asam laktat dan <i>A. hydrophila</i> .....	20
Tabel 2. Rerata jumlah total leukosit .....	29
Tabel 3. Rerata jumlah monosit .....	33
Tabel 4. Rerata jumlah neutrofil .....	35
Tabel 5. Rerata jumlah eosinofil .....	37
Tabel 6. Performan dan gejala klinis ikan uji .....	39
Tabel 7. Tingkat sintasan ikan nila merah setelah uji tantang .....	40



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 1. Morfologi ikan nila merah ( <i>Oreochomis sp.</i> ).....	7
Gambar 2. Sistem imun .....	12
Gambar 3. Sel darah ikan .....	14
Gambar 4. Pembagian ruang-ruang bilik hitung dan cara penghitungan total leukosit .....	25
Gambar 5. Cara pembuatan preparat hapusan darah .....	26
Gambar 6. Diagram rerata jumlah total leukosit .....	30
Gambar 7. Sediaan sel darah merah ikan nila merah dalam <i>Haemocytometer</i> Neubauer .....	32
Gambar 8. Preparat hapusan darah ikan nila merah.....	32
Gambar 9. Diagram rerata jumlah monosit .....	34
Gambar 10. Diagram rerata jumlah neutrofil .....	36
Gambar 11. Diagram rerata jumlah eosinofil .....	38

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Wilayah Indonesia sebagian besar terdiri atas perairan yang memiliki sumber daya perikanan yang kaya dan potensial. Wilayah perairan tersebut meliputi perairan darat, pantai maupun perairan laut.

Peningkatan kuantitas dan kualitas produksi ikan diharapkan mampu memenuhi kebutuhan protein hewani penduduk, pengembangan agrobisnis, menambah pendapatan petani nelayan dan menghasilkan devisa bagi negara.

Ikan nila merah termasuk salah satu jenis ikan air tawar yang amat potensial untuk dibudidayakan secara intensif berpola agrobisnis karena mempunyai sifat-sifat yang menguntungkan. Sifat-sifat tersebut antara lain : mudah berbiak dan pertumbuhannya sangat cepat, mempunyai daging berwarna putih, tebal, berduri sedikit, rasanya enak, serta kandungan protein tinggi (Rukmana, 1997).

Pada budidaya perairan, ikan senantiasa hidup dalam lingkungan yang mengandung berbagai mikrobia patogen seperti virus, bakteri, jamur dan parasit. Dengan demikian, sulit diduga patogen penyebab kematian ikan. Kasus kematian ikan sering disebabkan oleh campuran antara berbagai patogen tersebut.

Hama dan penyakit yang menyerang ikan merupakan salah satu faktor penghambat dalam budidaya ikan. Usaha untuk mengurangi gangguan hama dan penyakit adalah mencegah dan menghindari timbulnya hama dan penyakit (Anonim, 1994).



Pengendalian penyakit ikan akan lebih efisien bila dilakukan melalui tindakan pencegahan antara lain dengan vaksinasi, penggunaan antibiotika dan penggunaan bahan kimia. Cara vaksinasi telah dilakukan di Indonesia (Rukyani *et al.*, 1997), tetapi pada umumnya vaksin belum mampu melawan beberapa penyakit bakteri dan virus sekaligus (Raa *et al.*, 1992). Vaksin merupakan antigen yang dapat memicu pembentukan antibodi spesifik terhadap patogen tertentu. Sedangkan, penggunaan zat antibiotika yang terus menerus akan menimbulkan resistensi dari hama dan penyakit ikan terhadap zat tersebut. Penggunaan bahan kimia ada kemungkinan menimbulkan pengaruh negatif terhadap ikan, lingkungan dan konsumen.

Tindakan pencegahan dan perlindungan terhadap serangan hama dan penyakit pada ikan perlu dicarikan alternatif. Pada penelitian ini akan mencari suatu alternatif yang aman untuk perlindungan dan menghindarkan ikan dari hama dan penyakit, yaitu penggunaan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat tersebut digunakan sebagai probiotik pada pakan.

Probiotik adalah mikrobia hidup yang ditambahkan pada pakan ransum yang dapat mempengaruhi inangnya dengan cara meningkatkan keseimbangan mikrobia di dalam saluran pencernaan (Fuller, 1989; Ringo dan Gatesoupe, 1998). Bakteri asam laktat sebagai probiotik mempunyai pengaruh menguntungkan terhadap inangnya, antara lain dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen melalui produksi senyawa antiraikrobia, memperbaiki keseimbangan metabolisme mikrobia dan dapat merangsang sistem imun (Fuller, 1989). Berdasarkan hal tersebut di atas dapat diasumsikan bahwa probiotik bakteri asam laktat yang ditambahkan pada

pakan ikan akan dapat meningkatkan ketahanan tubuh ikan terhadap serangan hama dan penyakit.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang mampu melakukan metabolisme karbohidrat dengan menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya. Ada 2 familia bakteri asam laktat yang dapat digunakan sebagai probiotik atau suplemen pada pakan ikan, yaitu Lactobacillaceae (bentuk batang) dan Streptococaceae (bentuk bulat) (Djaafar, 1997).

Penelitian tentang penggunaan bakteri asam laktat sebagai probiotik telah banyak dikembangkan untuk suplemen pakan pada ternak (sapi), sedangkan penggunaan bakteri tersebut untuk probiotik pada pakan ikan masih dalam proses pengembangan penelitian. Pada penelitian ini dilakukan pengujian tentang penggunaan bakteri asam laktat sebagai probiotik pakan ikan dan bagaimana pengaruhnya pada sistem imun. Diduga bahwa bakteri asam laktat dapat merangsang sistem imun ikan dengan cara mempengaruhi respon imun non-spesifik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum bakteri asam laktat yang dapat ditambahkan pada pakan/ransum bagi peningkatan ketahanan tubuh ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dan bagaimana pengaruhnya terhadap respon imun non-spesifik, khususnya jumlah total leukosit dan diferensial leukosit (jumlah neutrofil, eosinofil dan monosit). Ikan nila merah digunakan sebagai hewan uji karena ikan tersebut adalah salah satu ikan budidaya yang memiliki peluang pasar yang bagus dan merupakan salah satu komoditas agribisnis Indonesia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Penelitian ini dirancang untuk menjawab masalah penelitian sebagai berikut.

1. Apakah pemberian bakteri asam laktat pada pakan berpengaruh terhadap respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) ?
2. Berapa konsentrasi optimum bakteri asam laktat yang dapat ditambahkan pada pakan untuk meningkatkan respon imun non-spesifik pada ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) ?

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*)

#### 2.1.1. Klasifikasi

Ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) adalah satu ikan budidaya di Indonesia. Ikan tersebut merupakan ikan nila hibrida yang diintroduksi dari Filipina pada tahun 1981. Kedudukan ikan nila merah dalam sistem klasifikasi hewan adalah sebagai berikut .

Dunia	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Kelas	: Osteichthyes
Sub kelas	: Acanthopterigii
Bangsa	: Percomorphi
Sub bangsa	: Percidae
Suku	: Cichlidae
Marga	: <i>Oreochromis</i>
Jenis	: <i>Oreochromis sp.</i> (Rukmana. 1997).

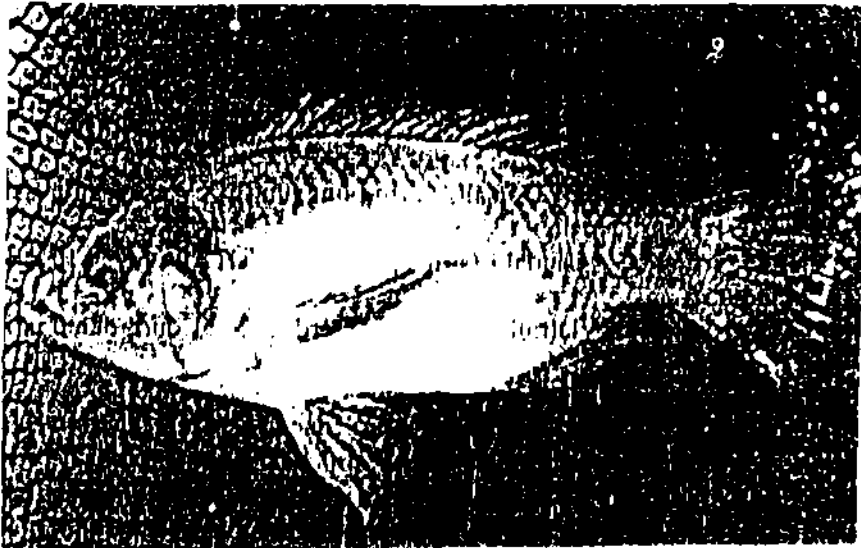
#### 2.1.2. Ciri-ciri morfologi

Ikan nila merah atau nirah merupakan ikan dari hasil persilangan antara mujair (*O. mossambicus*) dengan *O. aureus* atau *O. hornorum* atau nila biasa (*O. niloticus*) dengan *O. aureus* atau *O. hornorum*. Akibat persilangan alami antar

genus atau antar spesies menimbulkan keragaman dalam morfologi, yaitu berwarna merah kekuning-kuningan, merah agak jingga, merah berbercak atau bintuk-bintuk hitam dan merah keputihan (Rukmana, 1997).

Ikan nila merah dikenali dari bentuk tubuh, garis-garis pada tubuh, warna dan ciri fisik lainnya. Bentuk tubuh ikan nila merah adalah pipih, berpunggung lebih tinggi dari ikan mujair. Ikan nila merah mempunyai bentuk tubuh panjang dan ramping. Perbandingan antara panjang dan tinggi adalah 3:1. Garis-garis lurus (vertikal) di temukan pada badan dan sirip ekor, sedangkan garis-garis memanjang di temukan pada sirip punggung dan sirip anus (Rukmana, 1997; Santoso, 1996).

Ikan nila merah mempunyai bentuk kepala relatif lancip. mulutnya terletak di ujung moncong tampak sedikit condong ke arah bawah. Mata berukuran sedang dan sedikit menonjol dengan hiasan berwarna putih kekuningan di sekeliling pupil. Warna tubuh di bagian dorsal lebih merah dibanding bagian lateral dan ventral yang cenderung berwarna merah muda sampai kuning keputihan. Sirip punggungnya berukuran panjang dan ujungnya melewati pangkal ekor. Sirip punggung terdiri atas jari-jari keras di bagian depan dan jari-jari lunak di bagian belakangnya. Sirip ekor berbentuk seperti kipas, sedangkan sirip anusnya berbentuk lancip yang ujungnya melebihi pangkal ekor (Rochdianto, 1995). Ikan nila merah memiliki sisik berukuran besar dan agak kasar pada saat diraba, berbentuk stenoid dengan garis-garis vertikal berwarna gelap pada siripnya (Santoso, 1996). Morfologi ikan nila merah dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) (Rukmana, 1997)

### 2.1.3. Budidaya

Nila merah merupakan salah satu ikan budidaya di Indonesia. Pada mulanya, ikan nila merah dibudidayakan di Jawa dan Lampung, tetapi dalam perkembangannya pembudidayaan ikan tersebut meluas ke seluruh wilayah Nusantara (Rukmana, 1997).

Keunggulan ikan nila merah sebagai ikan budidaya adalah sifat pertumbuhan yang relatif cepat, dapat memijah sepanjang tahun (6-7 kali pertahun), toleransi terhadap lingkungan perairan cukup tinggi (mampu hidup di perairan tawar, payau atau laut), ukuran badan relatif besar, dagingnya berwarna putih, rasa daging enak, tidak berduri, mudah dikembangbiakkan, daya kelangsungan hidup tinggi dan pemeliharaannya mudah (rakus terhadap makanan sisa) (Rukmana, 1997).



Ikan nila merah hidup di perairan air tawar, tetapi dapat beradaptasi di perairan payau dan perairan laut (Santoso, 1996). Ikan tersebut juga dapat beradaptasi di perairan laut dengan teknik adaptasi bertahap. Suhu lingkungan untuk pertumbuhan ikan yang optimal adalah 25 °C sampai 28 °C. Pada suhu yang rendah (kurang dari 14 °C) ataupun suhu yang terlalu tinggi (di atas 30 °C) dapat menghambat pertumbuhan dan dapat mematikan ikan. Keadaan pH air antara 5 sampai 11 dapat ditoleransi oleh ikan nila merah, tetapi pH optimalnya adalah 7 sampai 8. Ikan tersebut juga masih dapat tumbuh pada air asin pada kadar salinitas 0 – 35 permil, terutama ikan nila merah kecil relatif lebih cepat menyesuaikan diri terhadap kenaikan salinitas (Rukmana, 1997).

Pada pembudidayaan di kolam, perairan umum atau tambak, ikan nila merah sangat respon terhadap makanan yang berasal dari hewan atau tanaman. Ikan tersebut lebih aktif mencari makan pada siang hari. Pakan buatan seperti pelet merupakan makanan yang disukai karena mengandung banyak protein dan aromanya memikat nafsu makan ikan (Santoso, 1996).

Produksi ikan nila merah dapat ditingkatkan dengan cara mengurangi jumlah kematian selama masa pemeliharaan. Ikan tersebut sangat respon terhadap pemeliharaan intensif, terutama faktor pengaturan pemberian pakan dalam jumlah yang memadai, kualitas dan jenis makanan yang diberikan serta pengaturan debit air selama masa pemeliharaan (Arsyad dan Hadarini, 1991).

#### 2.1.4. Hama dan penyakit

Hama dan penyakit merupakan faktor pembatas utama dalam budidaya ikan. Banyak kerugian yang ditimbulkan oleh adanya hama dan penyakit. di samping itu kolam yang sudah terkena penyakit sulit diselamatkan (Sudarno, 1997).

Pada budidaya ikan, penyakit ditimbulkan karena kondisi lingkungan kolam kurang baik, seperti kualitas air menurun, pemberian pakan kurang bergizi ataupun terlalu sedikit, penebaran benih terlalu padat (Cristensen, 1989 dalam Sudarno 1997).

Hama dan penyakit yang sering menyerang ikan nila merah, antara lain: infeksi bakterial *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp.* dan *Myxobacteria sp.*, infeksi jamur *Saprolegnea sp.*, infeksi cacing *Gyrodactylus sp.*, dan *Dactylogyrus sp.*, infeksi jenis protozoa seperti *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina sp.*, *Mycosoma sp.*, *Heneguya sp* dan *Myxobulus sp.*, dan hama berupa hewan air seperti *Notonecta* dan *Cybister* (Arsyad dan Hadirini, 1991, Rukmana, 1997).

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang sampai *coccobacti*. mempunyai sebuah flagel, mesofilik, diameter 0,3 – 1,0  $\mu\text{m}$  dan panjang 1,0 – 3,5  $\mu\text{m}$ , umumnya bersifat motil, susunan tunggal, tetapi ada yang berpasangan atau berbentuk rantai pendek, anaerob fakultatif. habitat normalnya adalah dalam air, terutama di perairan yang mengandung bahan organik tinggi (Holt *et al.*, 1994).

Serangan bakteri dapat mengakibatkan kerugian yang tidak sedikit. Bakteri menyerang bagian luar maupun bagian dalam tubuh ikan. Sifat serangan bakteri, antara lain : (a) kronis, dalam waktu yang lama, (b) oportunistis, memanfaatkan

kesempatan saat sistem imun ikan sedang lemah, (c) septisemia, menyerang seluruh bagian tubuh ikan seperti ginjal, hati, jantung, limpa, lapisan epidermis. Pengaruh serangan tergantung dari kondisi ketahanan tubuh organisme yang diserang (Lingga dan Susanto, 1995).

Tanda-tanda ikan yang terserang *A. hydrophila* adalah ada bagian-bagian merah pada permukaan tubuh ikan terutama dada, perut dan pangkal sirip. Di samping itu, selaput lendir (mucus) berkurang. ikan mudah ditangkap, lemah dan tidak lincah. Selanjutnya, sirip punggung, sirip dada dan sirip ekor rusak serta pecah-pecah, insang rusak dan berwarna keputih-putihan sampai kebiru-biruan, dan beberapa bagian sisik ikan rusak, rontok serta kulit melepuh ( Djajadiredja dan Cholik, 1982).

## 2.2. Sistem Imun Non-Spesifik

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai pelindung terhadap bahaya yang berasal dari berbagai bahan asing dan lingkungan. Sistem pertahanan tubuh terdiri atas sistem imun alamiah atau non-spesifik (*natural / innate*) dan sistem imun didapat atau spesifik (*acquired / adaptive*) (Roitt *et al.*, 1993).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi respon imun pada ikan meliputi faktor eksternal dan faktor internal (Robert, 1989).

Faktor-faktor eksternal yang berpengaruh pada respon imun ikan adalah suhu udara, adanya antigen yang dipengaruhi oleh dosis dan macam antigen, adanya adjuvan, pengaruh musim dan lingkungan tempat hidup. Faktor lingkungan tempat

hidup ikan yang berpengaruh terhadap respon imun, antara lain : stres lingkungan, adanya polutan, adanya senyawa antibiotik dan adanya defisiensi nutrisi dalam pakan (Robert, 1989).

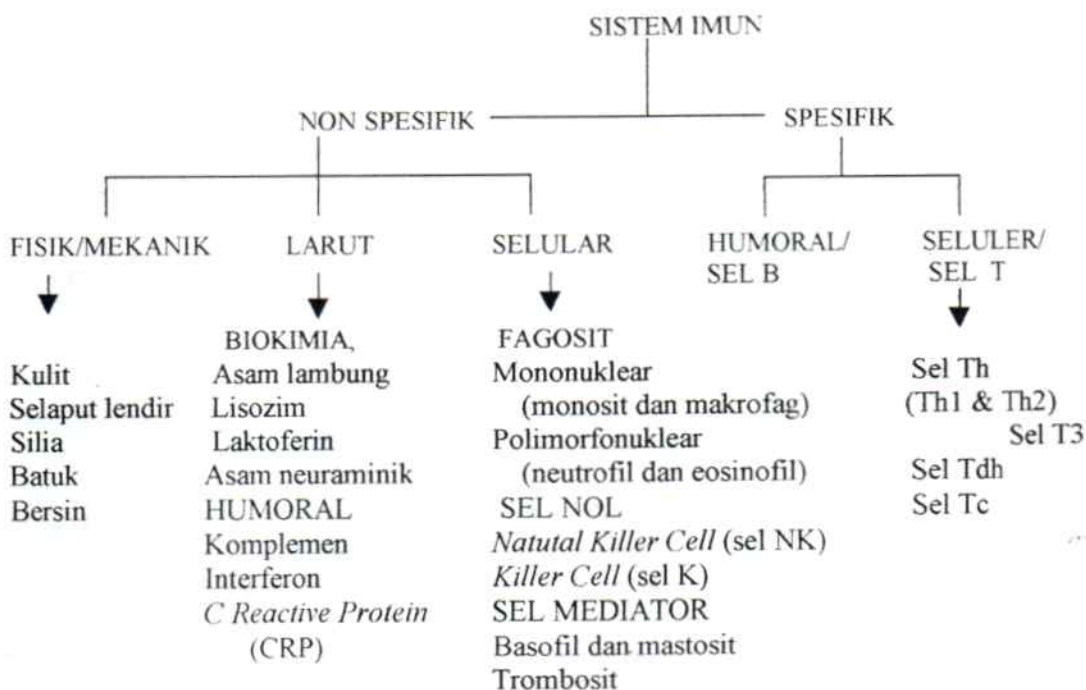
Faktor-faktor internal yang berpengaruh pada respon imun ikan adalah adanya mekanisme imunoregulator dalam sistem imun dan adanya perkembangan pematangan dalam sistem imun ikan (Robert, 1989).

Sistem imun non-spesifik merupakan pertahanan tubuh pertama dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme yang memberikan respon secara langsung terhadap adanya antigen. Sedangkan, sistem imun spesifik lebih membutuhkan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum tubuh dapat memberikan respon imun (Baratawidjaja, 1996). Antara faktor spesifik dan non-spesifik saling berhubungan dan saling mempengaruhi, sebagai contoh : makrofag sebagai pertahanan awal mampu menfagosit beberapa bakteri, tetapi kemampuan tersebut akan bertambah besar jika antigen dilapisi dengan antibodi (Robert, 1989. Mayr, 1993).

Komponen sistem imun non-spesifik dapat digolongkan sebagai berikut :

1. pertahanan fisik dan mekanik, meliputi kulit, selaput lendir, silia saluran napas, batuk dan bersin.
2. pertahanan biokimia, meliputi asam lambung, lisosim, laktoferin, asam neuraminik,
3. pertahanan humoral, meliputi komplemen, interferon, *c. reactive protein*/CRP, dan

4. pertahanan selular, meliputi fagosit, sel N01 dan sel mediator. Fagosit terdiri atas sel mononuklear (monosit dan makrofag), sel polimorfonuklear PMN (netrofil dan eosinofil). Sel Nol terdiri atas *natural killer cell* (sel NK) dan *killer cell* (sel K). Sedangkan, sel mediator terdiri atas trombosit, basofil dan mastosit (Baratawidjaja, 1996). Komponen sistem imun dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Sistem imun (Baratawidjaja, 1996)

Ada dua elemen respon imun non-spesifik yang paling penting, yaitu fagositosis dan respon inflamatoris yang juga terdapat dalam bentuk kehidupan primitif. Fagositosis pada organisme uniseluler paling primitif digunakan dalam fungsi nutrisi, pada bentuk yang lebih tinggi proses tersebut berkembang menjadi fungsi pertahanan (Bellanti, 1993).

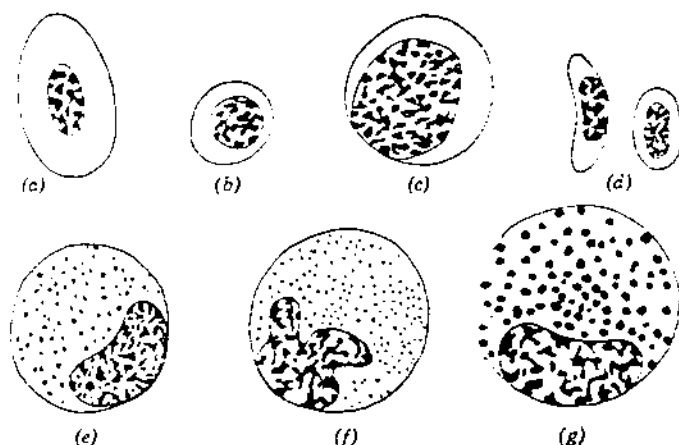
Fagositosis berperan penting dalam mekanisme pertahanan semua Vertebrata (Turner dan Wiley, 1994). Sel-sel fagositik melakukan serangan pada

sasarannya dengan proses fagositosis (*cell eating*). Fagositosis merupakan suatu upaya multifase yang memerlukan langkah-langkah sebagai berikut : pengenalan (*recognition*) dari benda yang akan dicerna, gerakan ke arah obyek (*chemotaxis*), perlekatan, penelanan (*ingestion*) dan selanjutnya pencernaan (*digestion*) intraseluler oleh mekanisme-mekanisme antimikroba (Bellanti, 1993).

Pada ikan fagositosis dilakukan terutama oleh fagosit mononuklear dan fagosit polimorfonuklear (Turner dan Wiley, 1994).

Sistem fagositik mononuklear terdiri atas populasi makrofag. Makrofag muda yang terdapat di aliran darah disebut monosit, biasanya berjumlah 5% dari total leukosit. Makrofag dapat melepaskan berbagai bahan seperti lisosim, komplemen, interferon dan sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan tubuh terhadap benda asing. Makrofag memiliki aktivitas fagositosis yang tahan lama, mengolah antigen dalam persiapan tanggap kebal dan memberi kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak dengan membuang jaringan yang mati (Baratawidjaja, 1996, Tizard, 1988).

Sistem fagositik polimorfonuklear dibentuk dalam tulang dengan kecepatan 8 juta/menit dan hidup selama 2 – 3 hari. Sel tersebut bersama dengan antibodi dan komplemen berperan pada inflamasi akut (Baratawidjaja, 1996). Sel polimorfonuklear secara morfologis dapat dibedakan menjadi neutrofil, eosinofil dan basofil. Dari ketiga sel ini yang berperan sebagai fagositik adalah neutrofil dan eosinofil, sedangkan basofil sebagai sel mediator (Bellanti, 1993). Morfologi leukosit dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Sel darah ikan.

(a) eritrosit; (b) limfosit; (c) monosit; (d) trombosit; (e) eosinofil;  
 (b) (f) neutrofil (g) basofil (Robert, 1989).

### 2.3. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang atau bulat, katalase negatif, tidak membentuk spora, pada umumnya tidak motil tetapi beberapa ada yang motil, mikroaerofilik sampai anaerob, tidak mereduksi nitrit menjadi nitrat, suhu optimum pertumbuhan 20-40°C (Stamer, 1979; Ringo dan Gatesoupe, 1998).

Menurut Djaafar (1997), berdasarkan morfologinya bakteri asam laktat dibedakan atas 2 familia, yaitu Lactobacillaceae yang berbentuk batang dan Streptococaceae yang berbentuk bulat. Familia Lactobacillaceae terdiri atas genus *Lactobacillus*. Familia Streptococaceae terdiri dari genus *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus*. Sedangkan, secara fisiologis bakteri asam laktat dibagi menjadi 2 golongan, yaitu golongan homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif mampu mengkonversi glukosa

menjadi asam laktat lebih dari 85% dari total asam, sedangkan bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif hanya menghasilkan asam laktat sebanyak 50% dari total asam dan juga menghasilkan produk akhir berupa alkohol, asam asetat dan gas CO<sub>2</sub>.

Lucke (1996) mengelompokkan genus bakteri asam laktat berdasarkan bentuk sel dan kemampuannya membentuk gas CO<sub>2</sub> selama fermentasi heksosa. Bentuk batang dikelompokkan dalam genus *Lactobacillus*, bentuk bulat homofermentatif dimasukkan ke dalam genus *Streptococcus*, bentuk bulat heterofermentatif (penghasil CO<sub>2</sub>) dimasukkan ke dalam genus *Leuconostoc* dan bentuk bulat yang kemudian membentuk rantai ketika terjadi pembelahan sel homofermentatif digolongkan ke dalam *Pediococcus*.

Pada umumnya, bakteri asam laktat ditemukan dalam saluran pencernaan hewan-hewan endotermik (mencit, tikus, babi, unggas dan manusia) (Tannock, 1988 dalam Ringo dan Gatesoupe, 1998). Bakteri tersebut juga ditemukan pada produk susu, produk makanan dari laut dan pada permukaan beberapa tanaman. Mereka umumnya digunakan untuk produksi dan preservasi produk makanan seperti keju, asinan, daging, yogurt, dan silase (McKay dan Baldwin, 1990 dalam Ringo dan Gatesoupe, 1998). Masih sedikit informasi yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat adalah bagian dari mikrobial normal pada usus ikan. Ada beberapa informasi mengemukakan bahwa bakteri tersebut juga ditemukan di epitelium mukosa saluran pencernaan ikan (Ringo dan Gatesoupe, 1998).

Bakteri asam laktat mempunyai aktivitas antimikrobia yang berkaitan dengan adanya asam organik (asam laktat, asam asetat dan asam formiat), hidrogen



peroksida dan bakteriosin (Schved *et al.*, 1992). Marrug (1991) menyatakan bahwa antimikrobia ini dapat menghambat pertumbuhan berbagai spesies bakteri perusak maupun bakteri patogen pada makanan seperti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* dan *Clostridium botulinum*.

#### 2.4. Penggunaan Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik

Fuller (1989); Ringo dan Gatesoupe (1998) menyatakan bahwa probiotik adalah mikrobia hidup yang ditambahkan pada pakan/ransum yang dapat mempengaruhi inangnya dengan cara meningkatkan keseimbangan mikrobia di dalam saluran pencernaan. Fuller (1989) melaporkan bahwa ada 3 macam mekanisme aktivitas probiotik, yaitu (a) menekan pertumbuhan bakteri patogen melalui produksi senyawa antimikrobia, kompetisi nutrisi dan kompetisi sisi pengikatan, (b) mengubah keseimbangan metabolisme mikrobia dengan meningkatkan dan menurunkan aktivitas enzim, serta (c) menstimulasi sistem imun.

Probiotik bakteri asam laktat yang ditambahkan pada pakan merupakan stimulan dari sistem imun yang dapat meningkatkan pertahanan humoral. Fuller (1989) menyatakan bahwa probiotik menstimuli respon imun humoral dengan cara meningkatkan produksi antibodi. Sedangkan, Perdigon *et al.* (1990) dalam Ringo dan Gatesoupe (1998) melaporkan bahwa imunoglobulin (Ig) A pada mencit dapat distimulasi dengan pemberian probiotik bakteri asam laktat, sehingga mencit tersebut tahan terhadap serangan *Salmonella typhimurium*. Sedangkan, penelitian respon imun terhadap rotavirus pada serum dan intestin anak-anak ternyata meningkat setelah mengkonsumsi *Lactobacillus casei* dilaporkan oleh Majamaa *et*

*al.* (1995) dalam Ringo dan Gatesoupe (1998). Bakteri asam laktat dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit ikan seperti *Aeromonas sp.* dan *Vibrio sp.* dilaporkan oleh Irianto dan Murniyati (1997). Sedangkan, Gildberg *et al.* (1995) dalam salah satu penelitiannya melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi secara *m vitro* dari ikan salmon telah terbukti mempunyai aktivitas penghambatan terhadap *A. salmonicida* dan *V. salmonicida*. Demikian juga, bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan cod ternyata sedikit menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen *V. anguillarum*.

### III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. mengetahui pengaruh pemberian probiotik bakteri asam laktat terhadap respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dan
2. menentukan konsentrasi optimum bakteri asam laktat yang dapat ditambahkan pada pakan guna meningkatkan respon imun non-spesifik pada ikan nila merah (*Oreochromis sp.*).

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk usaha pencegahan dan pengendalian hama dan penyakit ikan melalui pemberian pakan/ransum yang ditambah bakteri asam laktat. Dengan demikian, penggunaan antibiotika dan bahan kimia untuk menanggulangi penyakit ikan dapat dihindarkan sehingga mengurangi pengaruh negatif terhadap ikan, konsumen dan lingkungan.

## IV. METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Reproduksi dan laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga. Penelitian tersebut dilaksanakan pada bulan Juli 2001 sampai bulan Oktober 2001.

### 4.2. Sampel, Bahan dan Alat Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian meliputi : bakteri asam laktat dan *Aeromonas hydrophila* dengan sifat seperti pada Tabel 1., serta ikan nila merah (*Oreochromis sp.*). Biakan bakteri asam laktat dan *A. hydrophila* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Sedangkan, ikan nila merah sebagai hewan uji diperoleh dari Pasar Ikan Bratang, Surabaya. Ikan nila merah yang digunakan berumur 2 bulan dengan berat  $\pm 20$  gram dan panjang tubuh  $\pm 15$  cm sebanyak 80 ekor.

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian meliputi pakan ikan (pelet), air, fosfat bufer salin (PBS), larutan *Natt-Herrick* sebagai pewarna dan pengencer untuk perhitungan total leukosit, metanol, pewarna *Giemsa* 10% untuk pewarnaan preparat apus darah, akuades, medium *nutrient agar* (NA) dan *nutrient broth* (NB) untuk pertumbuhan *A. hydrophila*

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian meliputi ember plastik dengan ukuran diameter 30 cm x tinggi 40 cm kapasitas 10 liter untuk pemeliharaan

hewan uji, aerator, alat pengambilan darah hewan uji (pinset, gunting dan pisau), alat pembuatan preparat hapusan darah (gelas obyek dan gelas penutup), alat perhitungan total leukosit (*haemocytometer*, *counter* dan mikroskop), tabung *Eppendorf*, tabung *Erlenmeyer* (100, 250 dan 500 ml) untuk pembuatan media pembiakan bakteri, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, timbangan analitik, *magnetic stirrer* dan sentrifugasi.

Tabel 1. Karakter bakteri asam laktat dan *A. hydrophila*

No.	Karakteristik	Bakteri asam laktat	<i>A. hydrophila</i>
1	Pewarnaan Gram	-	-
2	Bentuk koloni	batang	batang
3	Hidrolisis glukosa	-	-
4	Hidrolisis laktosa	-	-
5	Hidrolisis manitol	-	-
6	Hidrolisis maltosa	-	-
7	Hidrolisis sukrosa	-	-
8	Tumbuh dalam TSIA	A/A	A/A
9	Produksi gas CO <sub>2</sub>	-	-
10	Produksi H <sub>2</sub> S	-	-
11	Produksi indol	-	-
12	Produksi urease	-	-
13	Produksi sitrat	-	-
14	Produksi katalase	-	-
15	Menghasilkan spora	-	-

### 4.3. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui 2 tahap, yaitu tahap persiapan dan tahap perlakuan.

#### Tahap persiapan

##### a. Aklimatisasi ikan nila merah (*Oreochromis sp.*)

Ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dipelihara dalam ember plastik dengan kepadatan 10 ekor/ember dan 2 kali replikasi. Aklimatisasi dilakukan selama 2 minggu. Pergantian atau penambahan air sebanyak 50-60% total volume setiap 2 hari sekali. Pemberian pakan sebanyak 1% bobot tubuh ikan dengan frekuensi pemberian 2 hari sekali. Selama aklimatisasi/pemeliharaan ikan uji diberi aerasi dengan alat aerator.

##### b. Perbanyakan dan pemanenan bakteri asam laktat dan *Aeromonas hydrophila*

Biakan bakteri asam laktat dan *A. hydrophila* yang berasal dari medium agar miring diambil dengan jarum ose. Selanjutnya, bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium NA dalam cawan petri, suhu inkubasi 37 °C. Setelah didapatkan kultur bakteri murni, bakteri tersebut diperbanyak pada medium NB secara bertingkat (10 ml, 50 ml dan 200 ml).

Apabila kultur bakteri dalam medium NB tersebut sudah konfluen, maka bakteri dipanen untuk diambil biomasanya. Kultur bakteri dalam medium 200 ml disentrifugasi dengan kecepatan 3700 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, supernatan dibuang dan sedimen dicuci 3 kali dengan 0,01 M PBS pH 7,4. Sebagian sedimen *A. hydrophila* dibuat suspensi dalam PBS setara dengan tabung McFarland no 1 dengan jumlah bakteri sekitar  $3 \times 10^8$  sel/ml.

### c. Pembuatan pakan probiotik bakteri asam laktat

Sedimen bakteri asam laktat dari hasil sentrifugasi ditambahkan pada pakan/ransum ikan. Pada penelitian ini diterapkan 4 konsentrasi penambahan bakteri asam laktat, yaitu (a) tanpa pemberian bakteri asam laktat (kontrol) 0 g/kg pakan, (b) 5 g/kg pakan, (c) 10 g/kg pakan dan (d) 20 g/kg pakan. Sedimen ditimbang sesuai dengan berat yang dikehendaki (5 g, 10 g dan 20 g), kemudian sedimen dibuat suspensi dengan cara penambahan larutan PBS sebanyak 20 ml. Suspensi sedimen ditambahkan pada pakan ikan (sebanyak 1 kg) dengan cara diaduk dengan *magnetic stirrer*. Pakan yang telah mengandung bakteri asam laktat dikeringkan anginkan. Selanjutnya, pakan tersebut siap digunakan untuk ransum ikan uji. Sebagai kontrol digunakan pakan tanpa penambahan bakteri asam laktat.

### Tahap perlakuan

Ikan nila merah sebagai hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok.

Kelompok I : Kelompok tanpa diberi perlakuan pakan probiotik bakteri asam laktat.

Kelompok II : Kelompok yang diberi perlakuan pakan probiotik bakteri asam laktat 5 g/kg pakan

Kelompok III : Kelompok yang diberi perlakuan pakan probiotik bakteri asam laktat 10 g/kg pakan

Kelompok IV : Kelompok yang diberi perlakuan pakan probiotik bakteri asam laktat 20 g/kg pakan

Masing-masing kelompok ada 2 ulangan dengan kepadatan 10 ekor/ember. Pakan probiotik bakteri asam laktat diberikan ke hewan uji selama 20 hari pemeliharaan. Pakan tersebut diberikan sebanyak 1% dari bobot tubuh ikan dengan frekuensi pemberian sebanyak 2 hari sekali. Selama perlakuan tetap diberi aerasi dengan aerator. Pergantian atau penambahan air sebanyak 50-60% total volume setiap 2 hari sekali.

Setelah 20 hari pemeliharaan (akhir pemberian pakan probiotik bakteri asam laktat) dilakukan ujiantang dengan bakteri patogen, yaitu *Aeromonas hydrophila*. Ujiantang dilaksanakan secara rendaman pada konsentrasi sekitar  $3 \times 10^8$  sel/ml selama 60 menit. Pada saat ikan nila merah diujiantang tetap dilakukan aerasi, kemudian ikan dilepas dalam tempat pemeliharaan/ember plastik selama 15 hari pemeliharaan dengan diberi pakan tanpa probiotik bakteri asam laktat. Pergantian atau penambahan air sebanyak 50-60% total volume setiap 2 hari sekali.

#### 4.4. Pengambilan Data Penelitian

Parameter yang diamati meliputi jumlah total leukosit dan diferensial leukosit (jumlah neutrofil, eosinofil, dan monosit). Parameter tambahan tentang performan dan gejala klinis ikan uji.

Setiap parameter diamati sebanyak 3 kali, yaitu sebelum ikan diberi pakan probiotik bakteri asam laktat, sesudah ikan diberi pakan probiotik bakteri asam laktat dan setelah ikan diujiantang.





#### 4.4.1. Perhitungan jumlah total leukosit

Jumlah total leukosit dihitung dengan *haemocytometer* Neubauer menurut metode Blaxhall dan Daisley (1973) dalam Anonim (1996).

Pertama, ikan nila merah dipotong pangkal ekornya, kemudian darah ekor dihisap dengan pipet 11 sampai tanda 0,5. Bagian ujung pipa dibersihkan dan bagian ujung yang lainnya ditutup dengan jari tangan agar darah tidak keluar. Jika darah yang terhisap melebihi yang diperlukan, maka harus dikeluarkan dengan cara membuka jari. Selanjutnya, pewarnaan dan pengenceran darah dengan larutan *Natt-Herrick* yang dihisap sampai tanda 11. Kemudian pipet diputar-putar mengelilingi sumbunya selama 3 menit agar tercampur dengan baik.

Kedua, penetesan larutan darah pada *haemocytometer* untuk perhitungan total leukosit. Sebelum dilakukan penghitungan total leukosit bagian bergaris dari *haemocytometer* dan gelas penutup harus dibersihkan dengan teliti dan ditempatkan di atas bilik hitung. Larutan darah yang telah diencerkan diteteskan 1 tetes di kanan-kiri dari tepi bilik hitung. Penghitungan total leukosit dilakukan dengan cara memeriksa bilik hitung dengan mikroskop perbesaran lemah (10 X) dan leukosit dihitung dalam 4 kotak besar. Arah hitungan ditunjukkan pada Gambar 4.

#### Rumus :

$$\frac{\text{Jumlah leukosit yang terhitung}}{4} \times \text{Faktor konversi} \times \text{Faktor pengenceran}$$

Faktor konversi adalah : 10

$$\text{Volume} = \text{panjang (1 mm)} \times \text{lebar (1 mm)} \times \text{tinggi (0,1 mm)} = 0,1 \text{ mm}^3$$

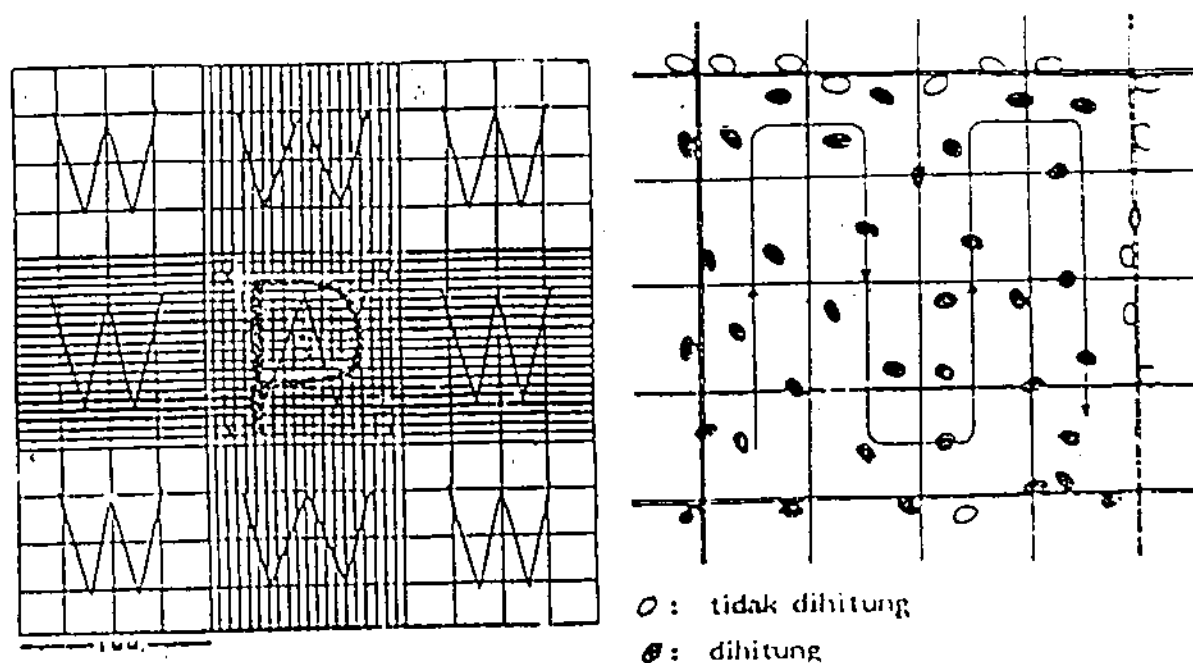
$$1 \text{ mm}^3 = 10 \times 0,1 \text{ mm}^3$$

Faktor pengenceran = 20 kali

$$\frac{\text{Jumlah leukosit terhitung}}{4} \times 10 \times 20 = \text{jumlah total leukosit/mm}^3$$

Atau

$$\text{Jumlah leukosit yang terhitung} \times 50 = \text{jumlah total leukosit/mm}^3$$



Gambar 4. Pembagian ruang-ruang bilik hitung dan cara penghitungan total leukosit (Wirawan *et al.*, 1996)

#### 4.4.2. Pembuatan preparat hapusan darah

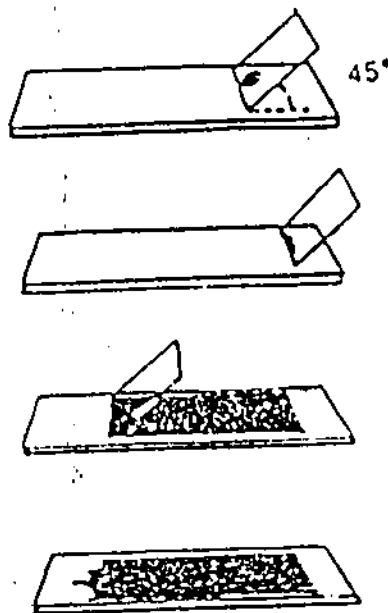
Pengamatan diferensial leukosit dilakukan dengan membuat preparat hapusan darah dan dihitung menurut metode Lucky (1977). Prosedur pembuatan preparat hapusan darah sebagai berikut.

1. Satu tetes kecil darah ikan yang berasal dari pangkal ekor di teteskan pada gelas obyek yang telah disiapkan, kemudian dengan cepat dan hati-hati mengoleskan

tetes darah tersebut menggunakan gelas obyek lain dengan sudut  $30 - 40^\circ$ .

Cara penetasan dan pembuatan olesan seperti Gambar 5.

2. Hasil olesan darah tersebut dibiarkan sampai kering di udara dengan cara dikeringanginkan.
3. Hasil olesan darah difiksasi dalam metanol selama 5 menit dengan cara merendamnya ke dalam wadah berisi metanol.
4. Sediaan kering di angkat dan dibiarkan sekali lagi di udara.
5. Seluruh permukaan sediaan oles ditetesi dengan larutan pewarna *Giemsa*  $10\%$  dan dibiarkan selama 30 - 40 menit. Kemudian dicuci dengan akuades.
6. Tahap perhitungan jumlah monosit, neutrofil, dan eosinofil di bawah mikroskop dengan cara mengamati sebanyak 100 sel leukosit. Kemudian, hasil perhitungan dikonversi dalam bentuk presentasi. Kemudian, presentasi jumlah sel tersebut dikalikan dengan rata-rata jumlah total leukosit.



Gambar 5. Cara pembuatan preparat hapusan darah (Anonim, 1996)

#### 4.5. Analisis Data

Data yang diperoleh adalah rerata total leukosit dan diferensial leukosit (presentase rata-rata monosit, neutrofil, dan eosinofil). Semua data kuantitatif dari hasil penelitian dianalisis dengan MANAVA (*multivariate analysis of variance*) untuk mengetahui ada tidaknya beda nyata antar perlakuan.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh gambaran respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) sebelum dan sesudah pemberian pakan probiotik bakteri asam laktat, serta setelah ujiantang. Performan dan gejala klinis ikan uji sebelum dan sesudah pemberian pakan probiotik, serta setelah diujiantang terhadap *A. hydrophila* juga ditampilkan dalam penelitian ini.

Respon imun non-spesifik akibat pemberian pakan probiotik bakteri asam laktat dapat dilihat melalui rerata jumlah total leukosit dan diferensial leukosit (rerata jumlah monosit, neutrofil, dan eosinofil). Baratawidjaja (1996) dan Bellanti (1993) menyatakan bahwa salah satu komponen sistem imun non-spesifik adalah pertahanan seluler yang terdiri atas fagositik (monosit, makrofag, neutrofil dan eosinofil).

### Rerata jumlah total leukosit

Jumlah total leukosit merupakan keseluruhan jumlah sel darah putih, tanpa memperhitungkan macam atau jenis sel darah putih tersebut. Roitt *et al.* (1993) menyatakan bahwa jenis sel darah putih terdiri atas granulosit (neutrofil, eosinofil dan basofil) dan agranulosit (monosit dan limfosit). Rerata jumlah total leukosit dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 6.

Berdasarkan MANAVA pada  $\alpha = 5\%$  mendapatkan nilai  $F_{Sig} = 0$ , baik pada antar kelompok perlakuan, antar waktu maupun interaksinya. Hal tersebut menunjukkan ada beda nyata antara kelompok perlakuan (I, II, III, dan IV). Beda

nyata juga terjadi antar waktu pengambilan data, yaitu sebelum perlakuan. sesudah pemberian bakteri asam laktat, setelah uji tantang (lihat Lampiran).

Rerata jumlah total leukosit sebelum perlakuan menunjukkan nilai yang hampir sama, yaitu 12.000, 12.200, 11.800, dan 11.900 sel/mm<sup>3</sup> masing-masing nilai dari kontrol (I), perlakuan II, III dan IV (lihat Tabel 2). Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi kesehatan ikan uji relatif sama. Jumlah total leukosit sebelum perlakuan dikategorikan sedikit lebih rendah daripada normal. Menurut Chinabut *et al.* (1991), total leukosit pada ikan normal berkisar antara 20.000-150.000 sel/mm<sup>3</sup>.

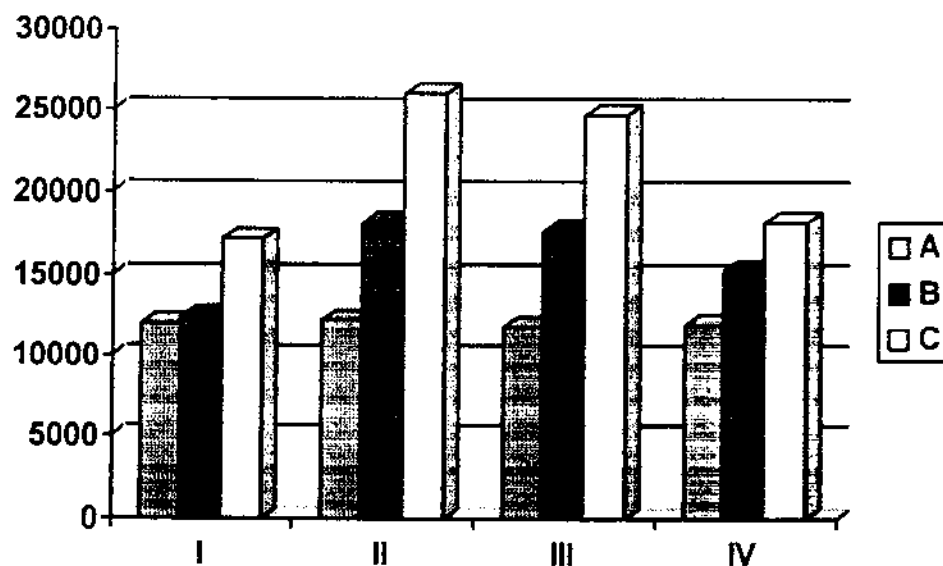
Tabel 2. Rerata jumlah total leukosit

Kelompok Perlakuan	Rerata jumlah total leukosit (sel mm <sup>3</sup> )		
	A	B	C
I	12.000 ± 100	12.400 ± 557	17.200 ± 180
II	12.200 ± 265	18.150 ± 180	26.000 ± 50
III	11.800 ± 200	17.650 ± 150	24.650 ± 132
IV	11.900 ± 100	15.300 ± 173	18.200 ± 229

Keterangan : A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 C = setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila*

Rerata jumlah total leukosit terjadi peningkatan setelah perlakuan dengan pemberian probiotik bakteri asam laktat pada kelompok II, III dan IV. Sedangkan, pada kelompok kontrol relatif sama antara sebelum (12.000se mm<sup>3</sup>) dengan setelah

perlakuan ( $12.400 \text{ sel/mm}^3$ ). Nilai rerata jumlah total leukosit pada kelompok perlakuan di atas terjadi peningkatan dibanding dengan sebelum perlakuan, diduga hal tersebut karena telah terjadi stimulasi sistem imun. Sedangkan, pada kontrol tidak terjadi stimulasi sistem imun.



Gambar 6. Diagram rerata jumlah total leukosit ( $\text{sel/mm}^3$ ).

A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat, B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat, dan C = setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila*. Kelompok perlakuan I, II, III dan IV.

Berdasarkan hasil penelitian ini, perlakuan pemberian bakteri asam laktat menyebabkan total leukosit ikan uji mendekati jumlah normal dan lebih tinggi dari jumlah sebelum pemberian bakteri asam laktat. Peningkatan tersebut terjadi karena proses proliferasi dan diferensiasi dari sel-sel darah putih distimulasi oleh adanya bakteri asam laktat. Fuller (1989) melaporkan bahwa salah satu aktivitas probiotik adalah menstimulasi sistem imun. Hal tersebut juga didukung pendapat Ringo dan Gatesoupe (1998) bahwa bakteri asam laktat disamping sebagai probiotik juga

berfungsi sebagai imunostimulan (penguat imun). Menurut Bellanti (1993), suatu penguat imun dapat merangsang terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel-sel imunokompeten.

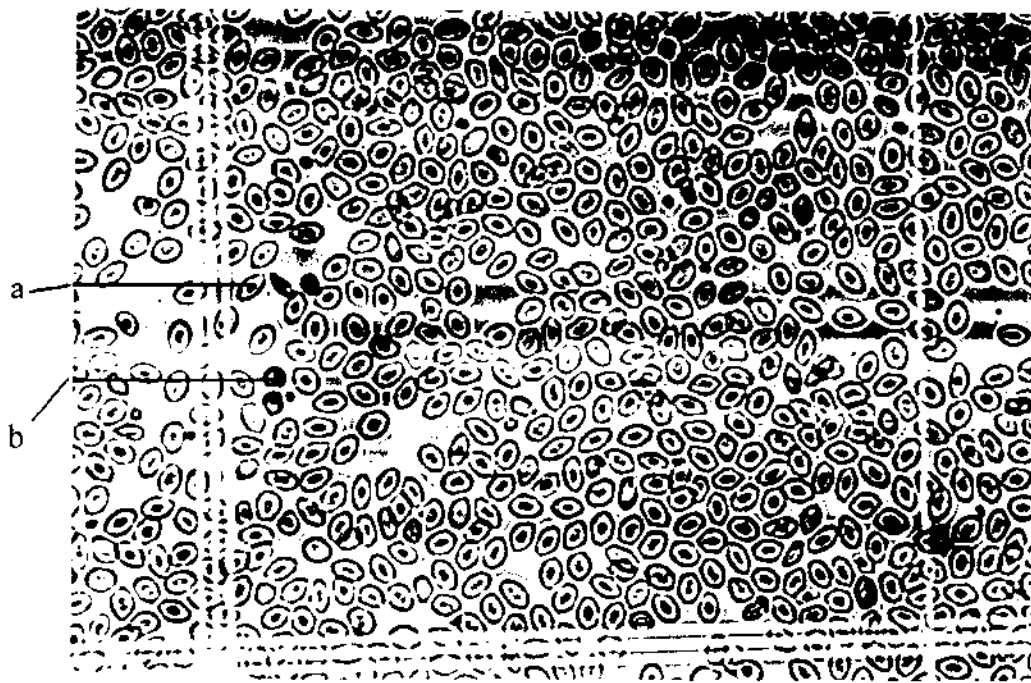
Rerata jumlah total leukosit pada semua kelompok baik kontrol maupun perlakuan probiotik bakteri asam laktat mengalami peningkatan sangat pesat setelah ikan diuji tantang terhadap *A. hydrophila*. Jumlah total leukosit pada kelompok perlakuan relatif lebih tinggi dibandingkan kontrol. Peningkatan tertinggi terlihat pada kelompok II (26.000 sel/mm<sup>3</sup>), selanjutnya diikuti oleh kelompok III (24.650 sel/mm<sup>3</sup>). Sedangkan, jumlah total leukosit pada kelompok IV (18.200 sel/mm<sup>3</sup>) sedikit lebih tinggi dari kontrol (17.200 sel/mm<sup>3</sup>). Peningkatan jumlah total leukosit setelah uji tantang diduga karena pembentukan leukosit dirangsang oleh adanya antigen. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Bellanti (1993), bahwa imunostimulan dapat memperpanjang masa respon dan mengembangkan respon terhadap antigen yang sebelumnya tidak merangsang.

Jumlah total leukosit dihitung dengan alat *haemocytometer* Neubauer. Leukosit diwarnai dengan pewarna *Natt-Herrick* yang menyebabkan sel berwarna merah jingga. Tampilan *haemocytometer* Neubauer yang telah ada sel darahnya dalam pewarnaan *Natt-Herrick* dapat di lihat pada Gambar 7.

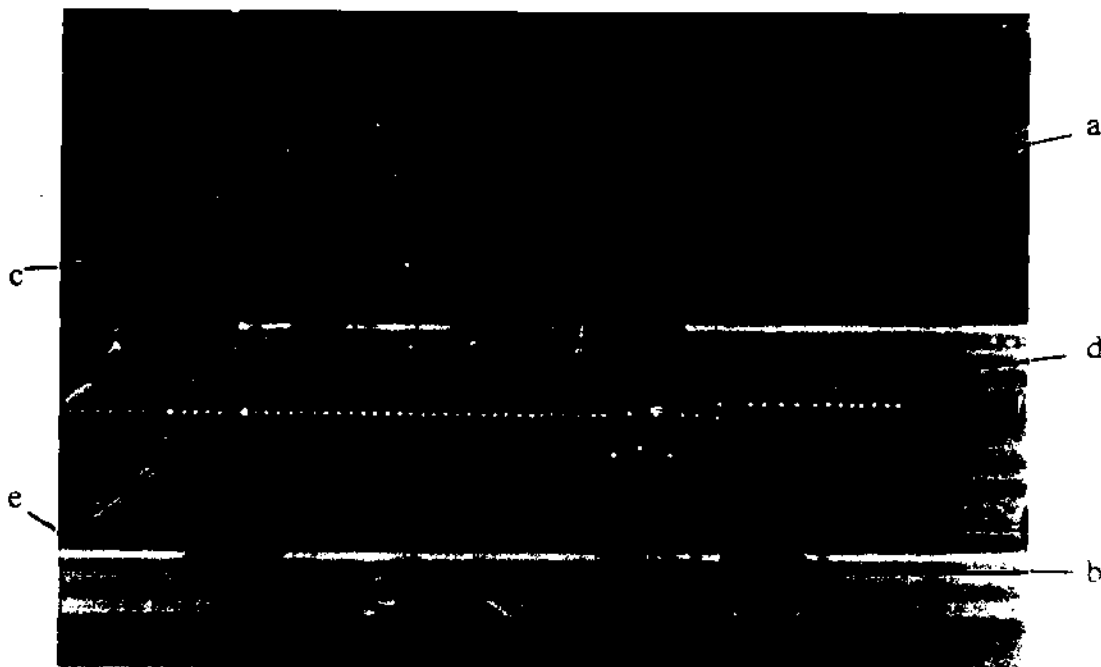
### Diferensial leukosit

Pengamatan diferensial leukosit dilakukan dengan menghitung jumlah monosit, neutrofil, dan eosinofil sebelum dan sesudah perlakuan serta setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila*. Perhitungan diferensial leukosit di lihat dengan pembuatan preparat hapusan darah (lihat Gambar 8).





Gambar 7. Sediaan sel darah merah ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) dalam *Haemocytometer* Neubauer dengan pewarnaan *Natt - Herrick*. (a) eritrosit dan (b) leukosit (Perbesaran 400 X)



Gambar 8. Preparat apus darah pada perlakuan pemberian bakteri asam laktat 5 g/kg pakan dengan pewarnaan *Giemsa*. (a) eritrosit, (b) monosit, (c) neutrofil, (d) eosinofil, dan (e) limfosit. (Perbesaran 1000 X).

Monosit merupakan komponen sistem imun yang termasuk fagosit mononuklear. Berdasarkan MANAVA pada  $\alpha = 5\%$  dengan nilai  $F_{sig} = 0$ , terdapat perbedaan nyata antara kelompok kontrol (I) dengan kelompok perlakuan II dan III. Beda nyata juga terjadi antara kelompok II dengan kelompok IV, serta antara kelompok III dengan kelompok IV. Rerata jumlah monosit antara kelompok I dengan kelompok IV tidak ada perbedaan nyata. Sedangkan, berdasarkan perbedaan waktu pengambilan data ada perbedaan nyata antara sebelum perlakuan dengan sesudah perlakuan dan setelah ujiantang, antara sesudah perlakuan dengan setelah ujiantang dengan nilai  $F_{sig} = 0$  (lihat Lampiran).

Berdasarkan hasil penelitian ini, jumlah monosit meningkat sesudah perlakuan dan semakin tinggi setelah diinfeksi bakteri. Hasil lengkap rerata jumlah monosit dapat di lihat pada Tabel 3 dan Gambar 9.

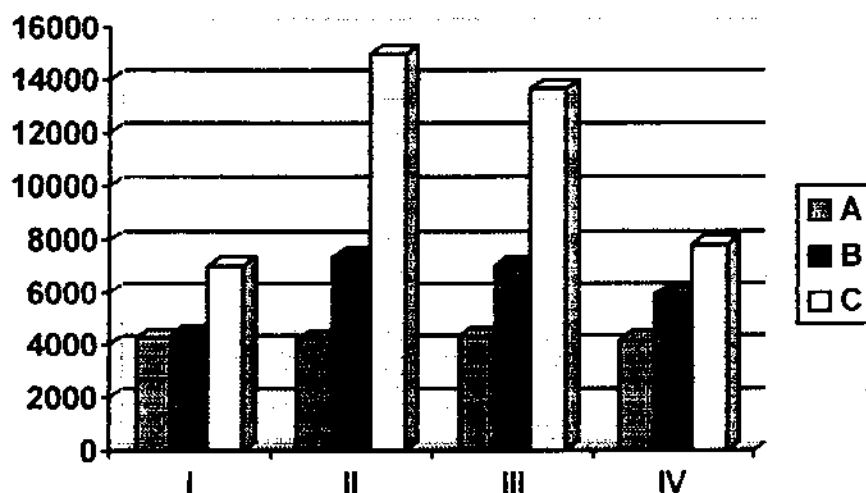
Tabel 3. Rerata jumlah monosit

Kelompok Perlakuan	Rerata jumlah monosit (sel/mm <sup>3</sup> )		
	A	B	C
I	4.240 ± 69	4.351 ± 141	6.995 ± 99
II	4.189 ± 70	7.381 ± 277	14.993 ± 397
III	4.327 ± 180	7.001 ± 269	13.640 ± 285
IV	4.165 ± 0	5.916 ± 234	7.826 ± 482

Keterangan : A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 C = setelah ujiantang terhadap *A. hydrophilu*

Peningkatan jumlah monosit ini diduga karena fungsinya sebagai makrofag yang berguna untuk memfagosit benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh (Robert, 1978).

Rerata jumlah monosit setelah ujiantang paling tinggi pada kelompok II, selanjutnya kelompok III dan IV. Jumlah monosit terendah pada kontrol. Menurut Baratawidjaja (1996) dan Tizard (1988), proporsi monosit dalam darah hanya sekitar 5 %, tetapi oleh Lucky (1977) dikatakan bahwa kadar monosit akan meningkat 38 % dalam waktu yang singkat bila terjadi infeksi.



Gambar 9. Diagram rerata jumlah monosit ( $\text{sel}/\text{mm}^3$ ).

A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat, B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat, dan C = setelah ujiantang terhadap *A. hydrophila*. Kelompok perlakuan I, II, III dan IV

Fungsi utama neutrofil adalah penghancuran bahan asing melalui proses fagositik, yaitu kemotaksis di mana sel bermigrasi menuju partikel, perlekatan pada sel, penelanan partikel oleh sel dan penghancuran partikel oleh enzim lisosom di dalam fagolisosom (Tizard, 1988). Berdasarkan uji MANAVA pada  $\alpha = 5\%$

didapat nilai  $F_{sig} = 0$ . Hal tersebut berarti ada perbedaan nyata antara kelompok kontrol (I) dengan kelompok perlakuan II, III, dan IV. Beda nyata juga terjadi antara kelompok II dengan kelompok III dan IV, serta antara kelompok III dengan kelompok IV. Sedangkan, ada juga perbedaan nyata antara sebelum perlakuan dengan sesudah perlakuan dan setelah ujiantang, antara sesudah perlakuan dengan setelah ujiantang (lihat Lampiran).

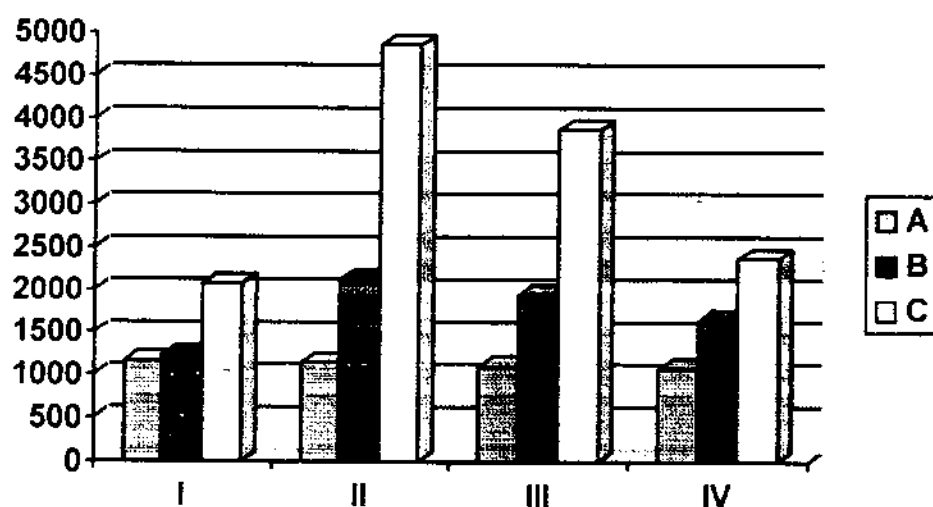
Rerata jumlah neutrofil cenderung meningkat selama perlakuan dan setelah diinfeksi dengan bakteri. Hasil lengkap rerata jumlah neutrofil dapat di lihat pada Tabel 4 dan Gambar 10. Menurut Dellman dan Brown (1989), pada umumnya jumlah neutrofil meningkat pada saat terjadi kasus penyakit bakteri karena neutrofil keluar dari pembuluh darah menuju daerah infeksi. Keluarnya neutrofil dari pembuluh darah pada saat terjadinya infeksi disebabkan karena adanya pengaruh rangsangan kimiawi eksternal atau kemotaksis.

Tabel 4. Rerata jumlah neutrofil

Kelompok Perlakuan	Rerata jumlah neutrofil (sel/mm <sup>3</sup> )		
	A	B	C
I	1.160 ± 69	1.220 ± 0	2.064 ± 172
II	1.139 ± 70	2.117 ± 105	4.853 ± 150
III	1.101 ± 68	1.941 ± 177	3.862 ± 143
IV	1.071 ± 0	1.632 ± 88	2.366 ± 0

Keterangan : : A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 C = setelah ujiantang terhadap *A. hydrophila*

Jumlah neutrofil pada pengamatan didapatkan nilai yang rendah, meski terjadi peningkatan. Hal ini disebabkan karena proporsi neutrofil dalam populasi leukosit hanya sekitar 6-8% (Roberts, 1978). Peningkatan jumlah neutrofil setelah diuji tantang berhubungan dengan responnya terhadap infeksi, yaitu membunuh bakteri dan membersihkan pecahan jaringan. Neutrofil merupakan garis pertahanan pertama yang bergerak cepat ke arah bahan asing dan menghancurkannya, tetapi tidak mampu bertahan lama. Pada umumnya, neutrofil hanya menghancurkan tuntas setiap bahan asing dengan menelan dan tidak mengolah antigen sebagai persiapan guna disajikan pada sel peka antigen (Tizard, 1988). Lucky (1977) menjelaskan bahwa pada saat terjadi infeksi, jumlah neutrofil meningkat 6-7%.



Gambar 10. Diagram rerata jumlah neutrofil (sel/mm<sup>3</sup>).

A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat, B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat, dan C = setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila*. Kelompok perlakuan I, II, III dan IV

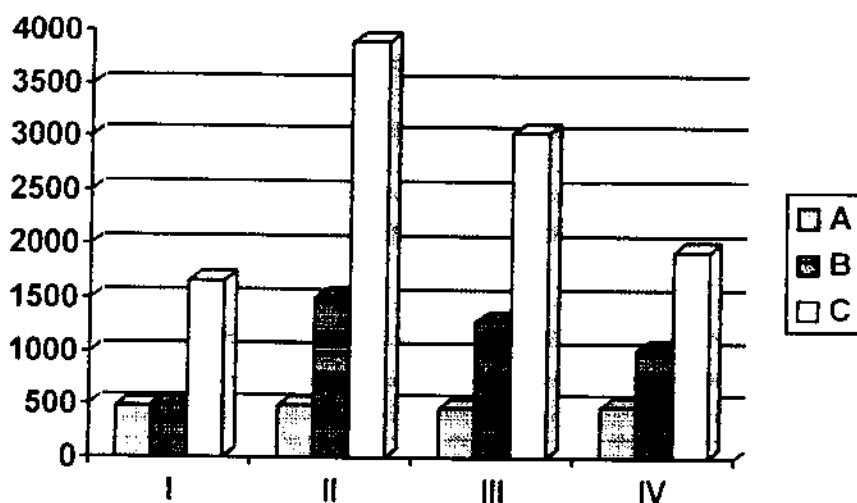
Eosinofil merupakan kelompok sel darah putih yang bergranula. Menurut Baratawidjaja (1996), eosinofil adalah sel polimorfonuklear yang berfungsi juga sebagai fagosit. Berdasarkan MANAVA didapat nilai  $F_{sig} = 0$  pada  $\alpha = 5\%$ , terdapat perbedaan nyata antara kelompok kontrol (I) dengan kelompok perlakuan II, III, dan IV. Beda nyata juga terjadi antara kelompok II dengan kelompok III dan IV, serta antara kelompok III dengan kelompok IV. Sedangkan, ada juga perbedaan nyata antara sebelum perlakuan dengan sesudah perlakuan dan setelah ujiantang, antara sesudah perlakuan dengan setelah ujiantang (lihat Lampiran).

Berdasarkan hasil pengamatan, jumlah eosinofil tiap kelompok sebelum perlakuan relatif sama. Sedangkan, jumlah eosinofil sesudah pemberian probiotik relatif meningkat terutama pada kelompok II dan III. Peningkatan jumlah eosinofil semakin besar setelah dilakukan ujiantang. Hasil lengkap rerata jumlah eosinofil dapat di lihat pada Tabel 5 dan Gambar 11.

Tabel 5. Rerata jumlah eosinofil .

Kelompok Perlakuan	Rerata jumlah eosinofil (sel/mm <sup>3</sup> )		
	A	B	C
I	480 ± 0	488 ± 0	1.663 ± 99
II	488 ± 122	1.512 ± 105	3.900 ± 0
III	472 ± 118	1.294 ± 102	3.040 ± 142
IV	476 ± 0	1.020 ± 88	1.941 ± 105

Keterangan : A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 C = setelah ujiantang terhadap *A. hydrophila*



Gambar 11. Diagram rerata eosinofil (sel/mm<sup>3</sup>).

A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat, B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat, dan C = setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila*. Kelompok perlakuan I, II, III dan IV

### Performan dan gejala klinis ikan uji

Performan dan gejala klinis ikan uji merupakan data tambahan yang diamati selama pemeliharaan (lihat Tabel 6). Performan ikan sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat menunjukkan bahwa ikan nila merah yang digunakan untuk penelitian dalam keadaan sehat dan normal.

Performan ikan uji setelah pemberian probiotik bakteri asam laktat relatif tidak mengalami perubahan. Penampakan yang teramati menunjukkan ikan dalam kondisi sehat.

Performan pada sebagian ikan nila merah setelah uji tantang terhadap *A. hydrophila* menunjukkan perubahan yang berbeda dari normal. Perubahan tersebut banyak terjadi pada ikan kontrol. Gejala yang timbul adalah peradangan kulit, sirip patah, gerakan lambat dan lemas, dan respon makan menurun. Rukmana (1997)

menyatakan bahwa ikan nila merah yang terserang oleh *A. hydrophyla* mempunyai tanda-tanda luka-luka borok berwarna merah pada tubuh ikan, nafsu makan hilang, berenang tidak normal, perut kembung karena banyak mengandung cairan berwarna kuning. Sebagian ikan mengapung dipermukaan atau mati setelah ujiantang.

Tabel 6. Performan dan gejala klinis ikan uji

Pengamatan	A	B	C
Keadaan kulit	Segar dan lembab	Segar dan lembab	Tidak segar
Pigmentasi kulit	Normal	Normal	Kurang jelas (suram)
Keadaan sisik	Lengket	Lengket	Sedikit lengket dan sebagian lepas
Sirip	Utuh	Utuh	Pecah-pecah
Warna insang	Merah	Merah	Merah muda
Subtansi mukoid	Sedikit	Sedikit	Agak banyak
Anus	Tertutup	Tertutup	Terbuka
Perut	Tidak kembung	Tidak kembung	Kembung
Mata	Jernih, tranparan, Sedikit menonjol	Jernih, tranparan, Sedikit menonjol	Keruh agak tenggelam
Tubuh	Tidak ada luka	Tidak ada luka	Luka-luka
Bau	Tidak berbau	Tidak berbau	Sedikit berbau
Gerakan ikan	Cepat dan gesit	Cepat dan gesit	Lambat dan lemas
Respon makan	Pakan cepat habis	Pakan cepat habis	Pakan tidak habis

Keterangan : A = sebelum perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 B = sesudah perlakuan pemberian bakteri asam laktat  
 C = setelah ujiantang terhadap *A. hydrophila*

Pada penelitian ini, ikan yang mati menunjukkan kulit kering dan sedikit lengket, pigmen tidak jelas, anus membengkak dan berwarna kemerahan, mata terlihat keruh dan tenggelam, serta perut kembung. Sedangkan, kemampuan ikan



dalam mempertahankan kehidupan setelah diuji tantang terhadap patogen dinamakan tingkat sintasan (lihat Tabel 7).

Tabel 7. Tingkat sintasan ikan nila merah setelah uji tantang dengan *A. hydrophila*

Kelompok perlakuan	Tingkat sintasan (%)
I (Kontrol)	57,14
II	85,71
III	71,42
IV	14,29

Pada konsentrasi bakteri asam laktat yang tinggi (kelompok IV) diperoleh tingkat sintasan yang paling rendah. Robertsen *et al.* (1990) menyatakan bahwa konsentrasi imunostimulan yang tinggi terkadang menggambarkan kematian yang lebih tinggi daripada ikan kontrol. Lebih lanjut dijelaskan pada saat sejumlah imunostimulan masuk ke dalam tubuh, maka imunostimulan tersebut memberi rangsangan kepada sel-sel fagositik ikan melebihi dari kemampuannya, sehingga akan menurunkan aktivitas dalam membunuh bakteri dan bahan asing lainnya.

Berdasarkan semua hasil pengamatan dari rerata jumlah total leukosit, diferensial leukosit dan performan dari ikan uji pada penelitian ini tampak bahwa konsentrasi pemberian probiotik bakteri asam laktat yang optimal adalah 5 g/kg pakan. Pemberian bakteri asam laktat pada konsentrsai tersebut memberikan pengaruh positif berupa peningkatan jumlah total leukosit, jumlah monosit, neutrofil, dan eosinofil. Di samping itu, performan ikan tetap sehat dan tidak menunjukkan gejala klinis setelah perlakuan, serta kemampuan hidup paling tinggi.

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian ini, dapat disusun kesimpulan sebagai berikut.

1. Ada pengaruh pemberian probiotik bakteri asam laktat terhadap peningkatan respon imun non-spesifik pada ikan nila merah (*Oreochromis sp.*).
2. Konsentrasi optimum pemberian probiotik bakteri asam laktat yang dapat ditambahkan pada pakan untuk peningkatan respon imun non-spesifik dan ketahanan ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) terhadap infeksi *A. hydrophyla* adalah 5 g/kg pakan.

### 6.2 Saran

Berdasar hasil penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan respon imun non-spesifik ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) akibat pemberian pemberian probiotik bakteri asam laktat pada konsentrasi 5 g/kg pakan untuk berat ikan sekitar 20 g, maka hasil penelitian tersebut dapat digunakan sebagai salah satu usaha pencegahan terserang hama dan penyakit pada ikan yang relatif aman.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan terutama untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik bakteri asam laktat dalam menguji ketahanan ikan nila merah (*Oreochromis sp.*) terhadap serangan hama dan penyakit yang lain, selain *A. hydrophyla*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1994. *Petunjuk praktikum ilmu hama dan penyakit ikan*. Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Anonim. 1996. *Petunjuk teknis diagnosa identifikasi hama dan penyakit ikan karantina*. Pusat Karantina, Jakarta.
- Arsyad, H dan Hadirini, R. E. 1991. *Penuntun praktis budidaya perikanan (suatu rangkuman)*, cetakan III. Penerbit PD. Mahkota. Jakarta.
- Baratawidjaja, K. G. 1996. *Imunologi dasar*. Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Bellanti, J. A. 1993. *Imunologi III*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Chinabut, S. Limsuwan and Kitsawar, P. 1991. *Histology of the walking catfish (Clarias batrachus)*. AAHRI, Bangkok, Thailand.
- Dellman, H. D. dan Brown, E. M. 1989. *Buku teks histologi veteriner*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Djaafar, T.F. 1997. Bakteri asam laktat dan manfaatnya sebagai pengawet makanan. *J. Litbang Pertanian XVI (1) : 19-22*
- Djajadiredja, R. dan Cholik, F. 1982. *Jurnal penelitian dan pengembangan pertanian, 1 : 1*. Balai Penelitian perikanan darat, Bogor.
- Fuller, R. 1989. A Review. Probiotic in man and animals. *J. Appl. Bac. 66 : 365-378*.
- Gildberg, A., Johansen, A. dan Bogwald, J. 1995. Growth and survival of atlantic salmon (*Salmon salar*) fry given diets with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture 138 : 23-34*.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Irianto, H.E. dan Murniyati, 1997. Bakteri asam laktat sebagai probiotik pada pakan ikan. *Warta penelitian perikanan Indonesia 4: 7-10*.

- Lingga, P. dan Susanto, H. 1995. *Ikan hias air tawar*. cetakan ke VII. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Lucke, F.K. 1996. Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry *dalam Lactic acid bacteria : Current advances in metabolism, genetic and applications* (Editor: T. F. Bozoglu dan B. Ray). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, hal. : 81-99.
- Lucky, Z. 1977. Methods for the diagnosis of fish diseases. Amerind Publishing Co. PVT. LTD. New Dehli, Bombay, Calcuta.
- Marrug, J. D. 1991. Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnology 5(3)*: 305-312.
- Mayr, A. 1993. The paraspecific immune defence system potentials and limitations. *Animal research and development*, 38. Institute for Scientific Co-operation, Tubingen.
- Raa, J. Roerstad, G., Engstad, R. dan Robertsen, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections *In : M. Shariff, R.P. Subangsihe & J.R. Arthur (eds). 1992. Diseases in Asian aquaculture I. Fish Health section. Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines*
- Ringo, E. dan Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish : a review. *Aquaculture 160* : 177-203.
- Robert, R.J. 1978. *Fish pathology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 1989. *Fish pathology*, 2<sup>nd</sup> ed. Bailliére Tindall, London.
- Rochdianto, A. 1995. *Kandungan ikan di jaring terapung*. PT. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Roitt, V., Brostoff, J. dan Male, D. 1993. *Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed . Mosby-Year Book Europe Ltd., London
- Rukmana, A. 1997. *Ikan nila budidaya dan prospek agribisnis*. PT. Kanisius, Yogyakarta
- Rukyani, A., Silvia, E., Sunarto, A. dan Tauhid. 1997. Peningkatan respon kebal non-spesifik pada ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) dengan pemberian imunostimulan ( $\beta$ -glucan). *Jurnal Litbang Pertanian*, III (1) : 1-9.
- Santoso, H. 1996. *Budidaya ikan nila*. Penerbit PT kanisius, Yogyakarta.

- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. dan Juven, B.J. 1992. Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediosin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol* 78 : 5-10.
- Stamer, J.R. 1979. The lactic acid bacteria : Microbes of diversity. *Food Technol.* 3 : 60-65.
- Sudarno. 1997. Titer antibodi pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) pasca vaksinasi dengan vaksin *Aeromonas hydrophila*. *Laporan penelitian*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tizard, I.R. 1988. *Pengantar imunologi veteriner* (terjemahan oleh Partodiredjo M. dan S.Hardjosworo). Airlangga University Press, Surabaya.
- Turner, R.J., dan Wiley. 1994. *Imunology a comparative approach*. John Wiley and Sons, Inggris.
- Wirawan, R., Setiabudi, R., Satyawirawan, F.S., Silman, E., Loko, T. dan Pitono, I. 1996. *Hematologi sederhana*, edisi ke-2. Penerbit FK UI, Jakarta.

# LAMPIRAN

## A. Multivariate Analysis of Variance Jumlah Total Leukosit

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VAR00006

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	792936875.0 <sup>a</sup>	11	72085170.455	1373.051	.000
Intercept	9746625625	1	9746625625	185650.01	.000
VAR00001	147226875.0	3	49075625.000	934.774	.000
VAR00002	551821250.0	2	275910625.0	5255.440	.000
VAR00001 * VAR00002	93888750.000	6	15648125.000	298.060	.000
Error	1260000.000	24	52500.000		
Total	10540822500	36			
Corrected Total	794196875.0	35			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .998)

### Pairwise Comparisons

Dependent Variable: VAR00006

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-4916.667*	108.012	.000	-5139.593	-4693.740
	3.00	-4166.667*	108.012	.000	-4389.593	-3943.740
	4.00	-1266.667*	108.012	.000	-1489.593	-1043.740
2.00	1.00	4916.667*	108.012	.000	4693.740	5139.593
	3.00	750.000*	108.012	.000	527.073	972.927
	4.00	3650.000*	108.012	.000	3427.073	3872.927
3.00	1.00	4166.667*	108.012	.000	3943.740	4389.593
	2.00	-750.000*	108.012	.000	-972.927	-527.073
	4.00	2900.000*	108.012	.000	2677.073	3122.927
4.00	1.00	1266.667*	108.012	.000	1043.740	1489.593
	2.00	-3650.000*	108.012	.000	-3872.927	-3427.073
	3.00	-2900.000*	108.012	.000	-3122.927	-2677.073

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Pairwise Comparisons**

Dependent Variable: VAR00006

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-3900.000*	93.541	.000	-4093.060	-3706.940
	3.00	-9537.500*	93.541	.000	-9730.560	-9344.440
2.00	1.00	3900.000*	93.541	.000	3706.940	4093.060
	3.00	-5637.500*	93.541	.000	-5830.560	-5444.440
3.00	1.00	9537.500*	93.541	.000	9344.440	9730.560
	2.00	5637.500*	93.541	.000	5444.440	5830.560

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Parameter Estimates**

Dependent Variable: TOTLUEKO

Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent Parameter	Observed Power <sup>f</sup>
					Lower Bound	Upper Bound			
Intercept	18200.000	132.288	137.579	.000	17926.972	18473.028	.999	37.579	1.000
[DOSIS=1]	-1000.000	187.083	-5.345	.000	-1395.120	-612.880	.543	5.345	.999
[DOSIS=2]	7800.000	187.083	41.693	.000	7413.860	8186.120	.986	41.693	1.000
[DOSIS=3]	6450.000	187.083	34.477	.000	6063.860	6836.120	.980	34.477	1.000
[DOSIS=4]	0 <sup>c</sup>								
[WAKTU=1]	-6300.000	187.083	-33.675	.000	-6686.120	-5913.880	.979	33.675	1.000
[WAKTU=2]	-2900.000	187.083	-15.501	.000	-3286.120	-2513.880	.909	15.501	1.000
[WAKTU=3]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=1] * [WAKTU=1]	1100.000	264.575	4.158	.000	553.944	1646.056	.419	4.158	.979
[DOSIS=1] * [WAKTU=2]	-1900.000	264.575	-7.161	.000	-2446.056	-1353.944	.662	7.161	1.000
[DOSIS=1] * [WAKTU=3]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=2] * [WAKTU=1]	-7500.000	264.575	-28.347	.000	-8046.056	-6953.944	.971	28.347	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=2]	-4950.000	264.575	-18.709	.000	-5496.056	-4403.944	.936	18.709	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=3]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=3] * [WAKTU=1]	-6550.000	264.575	-24.757	.000	-7096.056	-6003.944	.962	24.757	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=2]	-4100.000	264.575	-15.497	.000	-4646.056	-3553.944	.909	15.497	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=3]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=1]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=2]	0 <sup>c</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=3]	0 <sup>c</sup>								

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.



## B. Multivariate Analysis of Variance Jumlah Monosit

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VAR00003

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	364644180.1 <sup>a</sup>	5	72928836.017	27.454	.000
Intercept	1807255973	1	1807255973	680.336	.000
VAR00001	85306483.194	3	28435494.398	10.704	.000
VAR00002	279337696.9	2	139668848.4	52.578	.000
Error	79692551.556	30	2656418.385		
Total	2251592705	36			
Corrected Total	444336731.6	35			

a. R Squared = .821 (Adjusted R Squared = .791)

### Pairwise Comparisons

Dependent Variable: VAR00003

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-3659.111*	768.320	.000	-5228.229	-2089.993
	3.00	-3127.111*	768.320	.000	-4696.229	-1557.993
	4.00	-773.667	768.320	.322	-2342.785	795.452
2.00	1.00	3659.111*	768.320	.000	2089.993	5228.229
	3.00	532.000	768.320	.494	-1037.118	2101.118
	4.00	2885.444*	768.320	.001	1316.326	4454.563
3.00	1.00	3127.111*	768.320	.000	1557.993	4696.229
	2.00	-532.000	768.320	.494	-2101.118	1037.118
	4.00	2353.444*	768.320	.005	784.326	3922.563
4.00	1.00	773.667	768.320	.322	-795.452	2342.785
	2.00	-2885.444*	768.320	.001	-4454.563	-1316.326
	3.00	-2353.444*	768.320	.005	-3922.563	-784.326

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Pairwise Comparisons**

Dependent Variable: VAR00003

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-1932.333*	665.384	.007	-3291.230	-573.437
	3.00	-6633.333*	665.384	.000	-7992.230	-5274.437
2.00	1.00	1932.333*	665.384	.007	573.437	3291.230
	3.00	-4701.000*	665.384	.000	-6059.896	-3342.104
3.00	1.00	6633.333*	665.384	.000	5274.437	7992.230
	2.00	4701.000*	665.384	.000	3342.104	6059.896

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Parameter Estimates**

Dependent Variable: MONOSIT

Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>a</sup>
					Lower Bound	Upper Bound			
Intercept	7828.000	144.001	54.347	.000	7528.796	8123.204	.992	54.347	1.000
[DOSIS=1]	-831.333	203.648	-4.082	.000	-1251.644	-411.023	.410	4.082	.875
[DOSIS=2]	7167.333	203.648	35.185	.000	6747.023	7587.644	.981	35.185	1.000
[DOSIS=3]	5613.667	203.648	28.548	.000	5383.356	6233.977	.971	28.548	1.000
[DOSIS=4]	0 <sup>b</sup>								
[WAKTU=1]	-3681.000	203.648	-17.977	.000	-4081.311	-3240.689	.931	17.977	1.000
[WAKTU=2]	-1910.000	203.648	-9.379	.000	-2330.311	-1489.689	.786	9.379	1.000
[WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=1] * [WAKTU=1]	906.333	288.003	3.147	.004	311.524	1500.742	.292	3.147	.855
[DOSIS=1] * [WAKTU=2]	-733.333	288.003	-2.546	.018	-1327.742	-138.924	.213	2.546	.686
[DOSIS=1] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=2] * [WAKTU=1]	-7143.667	288.003	-24.804	.000	-7738.076	-6549.258	.962	24.804	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=2]	5702.000	288.003	19.788	.000	6296.509	5107.591	.942	19.798	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=3] * [WAKTU=1]	-5852.000	288.003	-19.625	.000	-6246.409	-5057.591	.941	19.625	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=2]	-4726.667	288.003	-16.419	.000	-5323.076	-4134.258	.916	16.419	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=1]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=2]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

## C. Multivariate Analysis of Variance Jumlah Neutrofil

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VAR00004

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	46804265.556 <sup>a</sup>	11	4254933.232	373.095	.000
Intercept	150389344.4	1	150389344.4	13186.939	.000
VAR00001	8485658.444	3	2828552.815	248.023	.000
VAR00002	30014290.389	2	15007145.194	1315.906	.000
VAR00001 * VAR00002	8304316.722	6	1384052.787	121.361	.000
Error	273706.000	24	11404.417		
Total	197467316.0	36			
Corrected Total	47077971.556	35			

a. R Squared = .994 (Adjusted R Squared = .992)

## Pairwise Comparisons

Dependent Variable: VAR00004

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-1221.778*	50.342	.000	-1325.679	-1117.877
	3.00	-820.111*	50.342	.000	-924.012	-716.210
	4.00	-208.333*	50.342	.000	-312.234	-104.433
2.00	1.00	1221.778*	50.342	.000	1117.877	1325.679
	3.00	401.667*	50.342	.000	297.766	505.567
	4.00	1013.444*	50.342	.000	909.544	1117.345
3.00	1.00	820.111*	50.342	.000	716.210	924.012
	2.00	-401.667*	50.342	.000	-505.567	-297.766
	4.00	611.778*	50.342	.000	507.877	715.679
4.00	1.00	208.333*	50.342	.000	104.433	312.234
	2.00	-1013.444*	50.342	.000	-1117.345	-909.544
	3.00	-611.778*	50.342	.000	-715.679	-507.877

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Pairwise Comparisons**

Dependent Variable: VAR00004

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-609.917*	43.597	.000	-699.897	-519.936
	3.00	-2168.500*	43.597	.000	-2258.481	-2078.519
2.00	1.00	609.917*	43.597	.000	519.936	699.897
	3.00	-1558.583*	43.597	.000	-1648.564	-1468.603
3.00	1.00	2168.500*	43.597	.000	2078.519	2258.481
	2.00	1558.583*	43.597	.000	1468.603	1648.564

based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments)

**Parameter Estimates**

Dependent Variable: NEUTROFI

Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>a</sup>
					Lower Bound	Upper Bound			
Intercept	2366.000	61.656	38.374	.000	2238.748	2493.252	.984	38.374	1.000
[DOSIS=1]	-302.000	87.195	-3.464	.002	-481.991	-122.039	.333	3.464	.973
[DOSIS=2]	2487.333	87.195	28.526	.000	2307.372	2667.295	.971	28.526	1.000
[DOSIS=3]	1495.667	87.195	17.153	.000	1315.705	1675.628	.925	17.153	1.000
[DOSIS=4]	0 <sup>b</sup>								
[WAKTU=1]	-1295.000	87.195	-14.852	.000	-1474.991	-1115.039	.902	14.852	1.000
[WAKTU=2]	-734.000	87.195	-8.418	.000	-913.991	-554.039	.747	8.418	1.000
[WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=1] * [WAKTU=1]	391.000	123.312	3.171	.004	136.456	645.504	.295	3.171	.950
[DOSIS=1] * [WAKTU=2]	-110.000	123.312	-.892	.381	-364.504	144.504	.032	.892	.157
[DOSIS=1] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=2] * [WAKTU=1]	-2419.667	123.312	-19.622	.000	-2674.770	-2165.163	.941	19.622	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=2]	-2002.000	123.312	-16.235	.000	-2256.504	-1747.496	.917	16.235	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=3] * [WAKTU=1]	-1465.333	123.312	-11.883	.000	-1719.837	-1210.830	.855	11.883	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=2]	-1186.333	123.312	-9.621	.000	-1440.837	-931.830	.794	9.621	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=1]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=2]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant

### D. Multivariate Analysis of Variance Jumlah Eosinofil

#### Tests of Between-Subjects Effects

pendent Variable: VAR00005

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41084050.306 <sup>a</sup>	11	3734913.664	452.493	.000
Intercept	70344564.694	1	70344564.694	8522.396	.000
VAR00001	6302672.306	3	2100890.769	254.527	.000
VAR00002	29750783.389	2	14875391.694	1802.186	.000
VAR00001 * VAR00002	5030594.611	6	838432.435	101.578	.000
Error	198098.000	24	8254.083		
Total	111626713.0	36			
Corrected Total	41282148.306	35			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .993)

#### Pairwise Comparisons

pendent Variable: VAR00005

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-1089.889*	42.828	.000	-1178.282	-1001.496
	3.00	-725.111*	42.828	.000	-813.504	-636.718
	4.00	-268.889*	42.828	.000	-357.282	-180.496
2.00	1.00	1089.889*	42.828	.000	1001.496	1178.282
	3.00	364.778*	42.828	.000	276.385	453.171
	4.00	821.000*	42.828	.000	732.607	909.393
3.00	1.00	725.111*	42.828	.000	636.718	813.504
	2.00	-364.778*	42.828	.000	-453.171	-276.385
	4.00	456.222*	42.828	.000	367.829	544.615
4.00	1.00	268.889*	42.828	.000	180.496	357.282
	2.00	-821.000*	42.828	.000	-909.393	-732.607
	3.00	-456.222*	42.828	.000	-544.615	-367.829

based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: VAR00005

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-599.583*	37.090	.000	-676.134	-523.033
	3.00	-2157.000*	37.090	.000	-2233.550	-2080.450
2.00	1.00	599.583*	37.090	.000	523.033	676.134
	3.00	-1557.417*	37.090	.000	-1633.967	-1480.866
3.00	1.00	2157.000*	37.090	.000	2080.450	2233.550
	2.00	1557.417*	37.090	.000	1480.866	1633.967

based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Parameter Estimates

Dependent Variable: EOSINOFI

Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>a</sup>
					Lower Bound	Upper Bound			
Intercept	1941.333	52.453	37.011	.000	1833.075	2049.592	.983	37.011	1.000
[DOSIS=1]	-278.667	74.180	-3.757	.001	-431.767	-125.566	.370	3.757	.950
[DOSIS=2]	1958.667	74.180	26.404	.000	1805.566	2111.767	.967	26.404	1.000
[DOSIS=3]	1098.667	74.180	14.811	.000	945.566	1251.767	.901	14.811	1.000
[DOSIS=4]	0 <sup>b</sup>								
[WAKTU=1]	-1465.333	74.180	-19.754	.000	-1618.434	-1312.233	.942	19.754	1.000
[WAKTU=2]	-921.333	74.180	-12.420	.000	-1074.434	-768.233	.865	12.420	1.000
[WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=1] * [WAKTU=1]	282.667	104.907	2.694	.013	66.150	499.184	.232	2.694	.734
[DOSIS=1] * [WAKTU=2]	-253.333	104.907	-2.415	.024	-469.850	-36.816	.195	2.415	.640
[DOSIS=1] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=2] * [WAKTU=1]	-1946.667	104.907	-18.556	.000	-2163.184	-1730.150	.935	18.556	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=2]	-1465.333	104.907	-13.977	.000	-1682.850	-1249.816	.891	13.977	1.000
[DOSIS=2] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=3] * [WAKTU=1]	-1102.667	104.907	-10.511	.000	-1319.184	-886.150	.822	10.511	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=2]	-824.667	104.907	-7.861	.000	-1041.184	-608.150	.720	7.861	1.000
[DOSIS=3] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=1]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=2]	0 <sup>b</sup>								
[DOSIS=4] * [WAKTU=3]	0 <sup>b</sup>								

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.