

## Pengaruh Asap Cair Tempurung Kelapa (*Cocos nucifera*) terhadap Hematologi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*

## The Effect of Coconut Shell Liquid Smoke (*Cocos nucifera*) Fish on Nile Tilapia Hematology (*Oreochromis niloticus*) Tested the Challenge *Aeromonas hydrophila*

Rozi<sup>1</sup>, Roy C. Prijantono<sup>2</sup>, Sudarno<sup>1</sup>, Rahayu Kusdarwati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aquaculture Department, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Airlangga University, Jl. Mulyorejo, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

<sup>2</sup>Aquaculture Study Program, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Airlangga University, Jl. Mulyorejo, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

\*Correspondence email address: [rozi@fpk.unair.ac.id](mailto:rozi@fpk.unair.ac.id)

Submitted: 07 February 2022 Revised: 03 June 2022 Accepted: 05 June 2022 Publish: 11 June 2022

### Abstrak

*Aeromonas hydrophila* adalah penyakit bakteri pathogen yang berperan penting dalam menyebabkan kematian pada komoditas ikan nila. Pada penelitian ini, pakan yang mengandung asap cair tempurung kelapa yang dapat diaplikasikan sebagai imunostimulan untuk mengobati penyakit *Motile Aeromonad Sepsicemia* (MAS) pada ikan Nila. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh asap cair tempurung kelapa pada uji aktivitas antibakteri secara In vitro dan uji tantang *A. hydrophila* secara uji In vivo. Tahapan uji invitro meliputi uji MIC, uji sensitivitas asap cair, dan antibiotik ampicillin sebagai kontrol. Selanjutnya pada uji invivo dengan mencampurkan setiap 100gr pakan yang mengandung asap cair dengan dosis 1%, 3%, 5%, 7% dan 9% (v/w). Selanjutnya uji tantang dilakukan dengan menyuntikan suspensi bakteri *A. hydrophila* dengan dosis  $10^6$  sel/cfu sebanyak 0,1 ml secara oral pada pakan dan variabel pengamatan meliputi total eritrosit, hemoglobin, kadar hematokrit dan gejala klinis ikan nila. Analisis data menggunakan Anova dan diuji DMRT dengan selang kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asap cair terbaik secara invitro dengan MIC 1% dan sensitivitas asap cair 9% dengan diameter 5.63 cm, sedangkan uji tantang yang paling efektif pada perlakuan 3% dapat menurunkan infeksi *A. hydrophila* pada ikan nila dengan jumlah total eritrosit ( $10^6/L$ ):  $2,27 \pm 0,15$ , total hemoglobin (g/dL):  $8,03 \pm 0,21$ , dan kadar hematokrit (%):  $21,35 \pm 1,34$  ( $p < 0.05$ ). Ikan nila yang diuji tantang dengan *A. hydrophila* pada perlakuan kontrol menunjukkan gejala sirip geripis, sisik mengelupas, hemoragic, dan exophthalmia. Sedangkan perlakuan yang diberikan asap cair melalui pakan menunjukkan kondisi ikan nila lebih baik pada gejala klinis dan analisis hematologi daripada ikan yang tidak diberikan perlakuan.

Keyword : Asap Cair Tempurung Kelapa, *A. hydrophila*, aktivitas antibakteri, gejala klinis

### Abstract

*Aeromonas hydrophila* is a pathogenic bacterial disease that plays an important role in causing death in Nile tilapia commodities. In this study, feed containing coconut shell liquid smoke which can be applied as an immunostimulant to treat Motile Aeromonad Sepsicemia (MAS) disease in Tilapia. This study aims to determine the effect of coconut shell liquid smoke on the antibacterial activity test by in vitro and the challenge of *A. hydrophila* by in vivo test. The in vitro test stages include MIC test, liquid smoke sensitivity test, and ampicillin antibiotic as a control. Furthermore, in the in vivo test by mixing 100gr containing liquid smoke at a dose of 1%, 3%, 5%, 7% and 9% (v/w). Furthermore, the challenge test was carried out by injecting a suspension of *A. hydrophila* bacteria with a dose of  $10^6$  cells/cfu as much as 0.1 ml orally in the feed and the observation variables included total erythrocytes, hemoglobin, hematocrit levels and clinical symptoms of tilapia. Data analysis using Anova and tested DMRT with 95% confidence interval. The results showed that the best concentration of liquid smoke in vitro with MIC 1% and sensitivity of liquid smoke 9% with a diameter of 5.63 cm, while the most effective challenge test at 3% treatment could reduce *A.*

*hydrophyla* infection in tilapia with a total number of erythrocytes ( $10^6$ . /L):  $2.27 \pm 0.15$ , total hemoglobin (g/dL):  $8.03 \pm 0.21$ , and hematocrit level (%):  $21.35 \pm 1.34$  ( $p < 0.05$ ). Tilapia which was challenged with *A. hydrophyla* in the control treatment showed fin flakes, scales peeling, hemorrhagic, and exophthalmia. While the treatment given liquid smoke through feed showed that the condition of tilapia was better on clinical symptoms and hematological analysis than fish that were not treated.

Keywords: Coconut Shell Liquid Smoke, *A. hydrophyla*, antibacterial activity, clinical symptoms

## PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang paling diminati oleh masyarakat karena memiliki citra rasa dan daging yang tebal (Firnanda *et al.*, 2013). Berdasarkan Data statistik KKP, jumlah produksi tahun 2012 ikan nila di Jawa Timur mengalami peningkatan dari tahun sebelumnya yaitu sebesar 50.959 ton dan level nasional, tahun 2017 mencapai 1,15 juta ton atau naik sebesar 3,6 persen dari tahun 2016 (KKP, 2018). Tingginya permintaan ikan nila membuat budidaya ikan nila masif dilakukan secara intensif. Hal ini menyebabkan terjadinya persaingan ruang gerak dan pakan, dan berpotensi prevalensi infeksi penyakit bakteri meningkat (Bhakta *et al.*, 2009). Bakteri yang sering ditemukan pada budidaya ikan nila adalah *A. hydrophyla* yang menyebabkan penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS). Bakteri tersebut menjadi patogen karena kondisi stress dan kualitas air atau lingkungan yang buruk (Firnanda *et al.*, 2013). Penyakit ini ditandai dengan gejala klinis antara lain nafsu makan yang menurun, adanya luka pada permukaan tubuh, terdapat pendarahan pada insang, perut yang membesar karena mengandung cairan, sisik lepas, sirip ekor rusak, dan jika dilakukan pembedahan maka akan terlihat adanya pembengkakan dan

kerusakan pada jaringan ginjal, hati dan limfa. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian ikan budidaya hingga 80 - 100% (Murwantoko *et al.* 2013; Kusdarwati *et al.*, 2018; Rozi *et al.*, 2018a,b). Penanggulangan penyakit ikan pada sistem akuakultur umumnya menggunakan pengobatan antibiotik. Namun, pengobatan menggunakan antibiotik secara terus menerus dapat menimbulkan efek resisten pada bakteri patogen, mengakibatkan pencemaran pada lingkungan, menyebabkan perkembangan *Multiple Antibiotic Resistance* (MAR) sehingga pemakaian antibiotik tersebut sejauh ini dilarang. Diperlukan alternatif pengobatan lain yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan efek resisten terhadap bakteri. Pengobatan tradisional dengan fitofarmaka dan pemanfaatan bahan obat alamiah lainnya mulai menjadi perhatian dunia sekarang salah satunya adalah menggunakan asap cair. Asap Cair adalah cairan yang berasal dari dispersi asap kayu dalam air yang cara pembuatannya dengan cara mengkondensasikan asap hasil pirolisis kayu pada suhu tinggi (Wang *et al.*, 2012). Pemberian asap cair pada hewan dapat meningkatkan perkembangan sistem imun. Jumlah total eritrosit, hemoglobin, dan kadar hematokrit dalam darah dapat menunjukkan keadaan

kesehatan ikan. Asap cair dari tempurung kelapa memiliki senyawa-senyawa bioaktif yaitu, asam organik, fenol dan karbonil yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Saloko *et al.*, 2014) serta dapat dikategorikan bahan tidak toksik dan aman digunakan untuk produk pangan (Budijanto *et al.*, (2008).

Beberapa penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Siskos *et al.*, (2007) pada fillet ikan trout, Saloko *et al.*, (2014) pada pengawetan ikan tuna, Putnam *et al.*, (1999) pada perbandingan sitotoksik dan mutagenik asap cair, Nancy *et al.*, (1992) pada penghambatan *Listeria monocytogenes*, Hattula *et al.*, (2001) pada penggunaan penyedap asap cair sebagai alternatif untuk asap tradisional, Budijanto *et al.*, (2008) pada indentifikasi dan uji keamanan asap cair tempurung kelapa, Diah (2015) pada efektivitas asap cair tempurung kelapa terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, Darmadji (1996) pada aktivitas anti bakteri asap cair, menunjukkan bahwa asap cair tempurung kelapa mengandung senyawa antibakteri dan antioksidan. Sedangkan penelitian Sun~en *et al.*, (1998), Sun~en *et al.*, (2001). Sun~en *et al.*, (2003) menunjukkan bahwa asap cair tempurung kelapa dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophyla*. Namun, perlakuan asap cair tempurung kelapa pada ikan nila belum banyak dilakukan, oleh sebab itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jumlah eritrosit, hemoglobin dan kadar hematocrit serta gejala klinis ikan nila yang diinfeksi *A. hydrophyla*.

## METODE PENELITIAN

### Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, 21 akuarium yang berukuran 40x20x25 cm<sup>3</sup> dengan kapasitas volume 20 liter, aerator set (Resun, China), timbangan digital (Kabuto,China), pH *paper* (Merck, Germany), *thermometer* (Reidko, China), DO meter (Hanna, Indonesia), TSA (Merck, Germany), TSB (Merck, Germany), *syringe* 1 mL (OneMed, Indonesia), mikrotube (OneMed, Indonesia), inkubator (Mermert, Germany), *scapel*, antikoagulan (Merck, Germany), *petridish* (Iwaki Pyrex, Indonesia), gelas ukur (Iwaki Pyrex, Indonesia), dan *Hematology Analyzer* (Mindray, China).

### Isolasi dan Identifikasi *A. hydrophyla*

Isolat *A. hydrophyla* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Perikanan Serang Banten, Jawa Barat dengan kode AHSB1 yang direisolasi pada media TSA (Merck, Germany), TSB (Merck, Germany) (Millership, 1984). Setelah itu diinkubasi pada 30 °C selama 24 jam. Identifikasi dilakukan berdasarkan karakterisasi morfologi, fisiologis dan biokimia dari isolat. Uji biokimia dan karakteristik yang diamati adalah gram stain, shape, motility, 0129, oxidase, catalase, OF test, methyl-red test, Voges-Proskaur, indole, H<sub>2</sub>S production, arginine decomposition, lysine decarboxilation, ornithine decarboxilation dan citrate utilization, fermentasi gula-gula diantaranya glucose,

lactose, sucrose, maltose, manitol, inositol, sorbitol, rhamnose, esculin hydrolysis. Identifikasi hasil penelitian dibandingkan dengan hasil penelitian Altwegg *et al* (1990).

### **Kepadatan *A. hydrophila* dan Asap cair Tempurung Kelapa**

Bakteri dikultur dengan menginokulasikan *A. hydrophila* kedalam 10 ml tryptic soy broth (TSB) (Merck, Jerman) kemudian di inkubasi dengan suhu 30 °C selama 24 jam. Bakteri dipanen dengan cara disentrifus (Boeco, Jerman) pada 6500 rpm selama 10 menit lalu dibilas menggunakan PBS, proses diulangi dua kali. Kekeruhan inokulum disamakan dengan standar McFarland skala 0.5 menggunakan spektrofotometer hingga didapat kepadatan bakteri  $1,5 \times 10^6$  cfu/ml. Asap cair dari tempurung kelapa didapatkan dari pabrik produksi di Yogyakarta. Hanendyo (2005) menjelaskan bahwa bahan untuk membuat asap cair adalah tempurung kelapa yang diolah dengan menggunakan alat kondensor sehingga diperoleh asap cair grade 3. Setiap akuarium mendapatkan perlakuan yang berbeda dengan dosis 1% = 1ml asap cair dalam 100gr pakan, 3% = 3ml asap cair dalam 100gr pakan, 5% = 5ml dalam 100gr pakan, 7% = 7ml dalam 100gr pakan, dan 9% = 9ml dalam 100gr pakan. Sun~en (2002) menjelaskan bahwa untuk memperoleh dosis asap cair yang diinginkan dapat dilakukan pengenceran menggunakan aquades.

### **Uji MIC**

Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan menginokulasikan isolat murni *A. hydrophila* dengan kepadatan  $1,5 \times 10^6$  cfu/ml sebanyak 10 ml diinokulasikan kedalam media TSB (Merck, Jerman) didalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan asap cair dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, 7%, 9% dan kontrol (Ampisilin). Pertumbuhan bakteri diamati setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Pengamatan MIC dilakukan dengan indera mata tanpa alat bantu. Tabung reaksi dengan konsentrasi asap cair terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dengan warna jernih didefinisikan sebagai MIC.

### **Uji Sensitivitas Asap Cair terhadap *A. hydrophila***

Uji sensitifitas asap cair dilakukan dengan metode *metode difusi disk Kirby-Bauer* dengan menggunakan disc blank yang berdiameter 6 mm (Bauer *et al.*, 1996). Sebanyak 0,1 ml suspensi *A. hydrophila* dengan kepadatan  $1,5 \times 10^6$  cfu/ml diratakan menggunakan metode *spread plate* di atas media TSA (Merck, Jerman). Setelah itu, *Discblank* (Oxoid, UK) yang telah ditetesi 0,1 ml asap cair dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, 7%, 9% dan kontrol positif menggunakan antibiotik Ampisilin (v/v) diokupasikan di atas media TSA. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah diinkubasi dengan suhu 30°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan

dibandingkan dengan standart zona hambat menurut *National Committee for Clinical Laboratory Standarts* (NCCLS, 2015).

### Uji tantang dan perlakuan pakan

Bakteri *A. hydrophila* diinjeksikan pada ikan nila menggunakan metode *Intraperitoneal injection*. Ikan terlebih dahulu dibius dengan air es lalu amati hingga ikan berhenti berenang. Ikan diambil dari air lalu diinjeksi bakteri *A. hydrophila* sebanyak 0,1 ml dengan kepadatan  $1,5 \times 10^6$  cfu/ml. Setelah itu ikan dipelihara 7 hari dan diberikan pakan yang telah dicampur asap cair. Pencampuran asap cair pada pakan dilakukan dengan menyemprot asap cair pada pakan (v/w), setelah itu diaduk lalu didiamkan sebentar. Pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali sehari sebanyak 3% dari keseluruhan berat tubuh ikan nila.

### Pengamatan Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan setelah ikan diinfeksi *A. hydrophila*. Gejala klinis yang diamati meliputi kondisi warna tubuh, luka pada tubuh, dan sirip.

### Sampling dan Perhitungan Diferensial Eritrosit

Darah ikan yang akan digunakan untuk sampel penelitian diambil dengan menggunakan alat yaitu, spuit sebanyak 1 ml. Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel darah ikan nila adalah Teknik *Punctie Vena Caudal*. Prosedur pengambilan sampel darah

dijelaskan sebagai berikut: Ikan di anestesi terlebih dahulu dengan direndam dalam air es, Kemudian isi spuit dengan EDTA 0,1% sebanyak 0,2 ml, Selanjutnya sampel darah diambil dengan menusukkan jarum spuit dibawah *Linea lateralis* (garis tengah), lalu jarum dimasukkan ke dalam muskulus hingga menyentuh tulang belakang 5. Selanjutnya tarik secara perlahan hingga darah masuk ke dalam spuit dan pastikan tidak ada gelembung 6. Setelah itu, sampel darah dimasukkan kedalam micropipet yang sudah diisi larutan EDTA untuk diuji di laboratorium (Bijanti, 2010). Untuk menghitung Eritrosit dalam darah ikan menggunakan *hematology analyzer (Sysmex XT-2000iV, Jepang)*. Parameter hematologi yang diukur adalah eritrosit, hemoglobin, dan kadar hematokrit.

### Analisis data

Data kuantitatif berupa jumlah eritrosit, hemoglobin dan kadar hematocrit dianalisis menggunakan ANOVA untuk mengetahui pengaruh pada tiap perlakuan dan dilanjutkan dengan Uji DMRT (Duncan Multiple Range Test) pada taraf uji 5 % untuk mengetahui beda nyata.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan uji biokimia. Karakteristik yang diamati meliputi gram stain, shape, motility, 0129, oxidase, catalase, OF test, glucose, lactose, sucrose, maltose, manitol, inositol, sorbitol, rhamnase, esculin hydrolysis,

methyl-red test, Voges-Proskaur, indole, H<sub>2</sub>S production, arginine decomposition, lysine decarboxilation, ornithine decarboxilation dan citrate utilization. Jika dibandingkan dengan identifikasi oleh Altwegg et. al. (1990), terdapat kecocokan sebesar 87,5%. Karakter *A. hydrophila* menunjukkan hasil uji Gram negatif, bentuk batang pendek, uji oksidase positif, uji motility positif, uji O/F fermentative, menghasilkan gas H<sub>2</sub>S, Methyl-red test negatif, Voges-Proskaur positif dan memproduksi sitrat. Hal ini sesuai dengan pendapat Austin

dan Austin (2007) yang menyatakan bahwa ciri-ciri bakteri tersebut adalah spesies *Aeromonas hydrophila* (**Tabel 1**). Uji MIC pada bakteri *A. hydrophila*, bakteri diinokulasikan pada media TSB dan dilakukan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Dilakukan pengamatan setelah 24 jam pada uji MIC. Pengujian dilakukan dengan perlakuan penambahan asap cair 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, didukung dengan perlakuan kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatif (standar McFarland 0,5).

**Tabel 1.** Hasil uji biokimia yang dibandingkan dengan Altwegg et al (1990) berdasarkan karakter *A. hydrophila*

Characters	Characterization by Altwegg et.al. (1990)	Present results
Gram stain	-	-
Shape	Rod	Rod
Motility	+	+
O129	ND	-
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
OF test	F	F
Glucose, Lactose, Sucrose, Maltose, Mannitol, Esculin hydrolysis, Voges-Proskaur, Indole, H <sub>2</sub> S production, Arginine decomposition, Lysine decarboxilation, Citrate utilization	+	+
Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Methyl-red test, Ornithine decarboxilation	-	-

Keterangan : +: Negative; -: Positive; F: Fermentative; ND: Not done

**Tabel 2.** Data lebar diameter zona hambat uji sensitifitas asap cair terhadap *A. hydrophila*

Perlakuan	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata (mm)	Standar zona hambat (CLSI 2015)
	1	2	3		
A (kontrol -)	0	0	0	0 <sup>a</sup> ± 0	Resisten
B(1%)	3,2	3,2	3,1	3,17 <sup>a</sup> ± 0,06	Resisten
C(3%)	3,3	3,2	3,2	3,23 <sup>a</sup> ± 0,06	Resisten
D(5%)	4,4	4,6	4,1	4,36 <sup>b</sup> ± 0,25	Resisten
E(7%)	4,6	4,3	4,2	4,37 <sup>b</sup> ± 0,21	Resisten
F(9%)	5,2	5,6	6,1	5,63 <sup>c</sup> ± 0,45	Resisten
G(kontrol +)	18,2	18,1	17,9	18,07 <sup>c</sup> ±0,46	Sensitif

**Keterangan:** A: kontrol (-) (hanya media TSA), B: asap cair 1%, C: asap cair 3%, D: asap cair 5%, E: asap cair 7%, F: asap cair 9%. Dan G: Kontrol (+) kloramfenikol. Dapat disajikan perlakuan penambahan asap cair 9% memiliki rata-rata terbesar yaitu 5,63 mm.

Hasil pengujian didapatkan bahwa bakteri masih dapat tumbuh pada konsentrasi 1%, hal tersebut dibuktikan dengan hasil dari kontrol negatif yang menunjukkan kekeruhan yang sama. Pertumbuhan bakteri pada media TSB ditandai dengan perubahan media yang menjadi putih keruh. Pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 3%, 5%, 7%, 9% bakteri tidak tumbuh (media TSB berwarna jernih), hal tersebut dibuktikan dengan hasil dari kontrol antibiotik kloramfenikol yang juga berwarna jernih yang menunjukkan bakteri tidak tumbuh. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Sun'en *et al.*, (2002) yang menunjukkan bahwa MIC asap cair terhadap bakteri *A. hydrophyla* adalah 10%. Hal tersebut diperkirakan karena asap cair yang berasal dari tempurung kelapa mempunyai keasaman yang lebih tinggi daripada kayu jenis lain. Diduga kandungan zat asam yang lebih banyak pada asap cair tempurung kelapa dapat menghambat bakteri dengan konsentrasi yang lebih sedikit (Nancy *et al.*, 1992). Uji sensitifitas asap cair terhadap bakteri *A. hydrophyla* yaitu dilakukan dengan merendam *disc blank* pada asap cair lalu diletakkan pada media TSA yang sudah diinokulasi (Tabel 2). Hasil pengamatan pada perlakuan 1 dengan konsentrasi penambahan asap cair sebesar 1% tidak ditemukan zona hambat. Di duga dengan penambahan asap cair dalam jumlah yang lebih sedikit hanya 1% tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini sesuai dengan hasil uji MIC bahwa

pada konsentrasi asap cair 1% bakteri *A. hydrophyla* masih dapat tumbuh. Sesuai dengan pernyataan Siskos *et al.*, (2007), asap cair mempunyai kandungan fenol yang dominan sebagai senyawa antibakteri. Pada penelitian Sun'en *et al.*, (2003) semakin tinggi kandungan fenol pada asap cair, pertumbuhan *A. hydrophyla* juga semakin sedikit. Senyawa fenol berdifusi pada media TSA disekitar *disc blank* sehingga menghambat pertumbuhan bakteri dan terbentuk zona hambat. Sedangkan berdasarkan kontrol positif yang menggunakan antibiotik kloramfenikol, dihasilkan zona hambat sebesar 18,07 mm.

Berdasarkan sebaran data jumlah eritrosit terbesar adalah pada perlakuan penambahan asap cair 3% yakni  $2,27 \times 10^6/L$ , sedangkan sebaran data jumlah eritrosit terkecil adalah pada perlakuan penambahan asap cair 1% sebesar  $0,70 \times 10^6/L$ , kemudian hasil kontrol positif sebesar  $0,63 \times 10^6/L$  (Tabel 3). Kadar eritrosit ikan nila normal menurut (Robert, 1978) berkisar 1–3 juta sel/mm<sup>3</sup>. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Orsi *et al.*, (2017) yang menyimpulkan jumlah eritrosit ikan nila yang diuji tantang *A. hydrophyla* sebesar  $1,76 \times 10^6/L$ .

Sedangkan penelitian Dotta *et al.*, (2018), jumlah eritrosit ikan nila yang diuji tantang bakteri *A. hydrophyla* sebesar  $1,72 \times 10^6/L$  dan perlakuan sebelum diinjeksi bakteri *A. hydrophyla* sebesar  $2,22 \times 10^6/L$ . Penurunan total eritrosit pada perlakuan kontrol negatif

diduga disebabkan oleh bakteri *A. hydrophyla* yang menginfeksi menyebabkan kerusakan pada organ ginjal. Ginjal merupakan organ penghasil eritrosit. Ginjal ikan yang rusak menyebabkan produksi eritrosit menurun.

Selain itu, jumlah eritrosit berkaitan erat dengan hemoglobin dan kadar hematokrit (Fujaya, 2004). Rendahnya jumlah eritrosit menunjukkan bahwa ikan mengalami infeksi (Maswan, 2009).

**Tabel 3.** Data jumlah eritrosit ikan nila pada setiap perlakuan asap cair

Perlakuan	Jumlah Eritrosit ( $\times 10^6/L$ )			Rata-rata ( $\times 10^6/L$ )	Kadar Normal (Robert, 1978)
	1	2	3		
A (Kontrol (+))	0,3	0,9	0,7	$0,63^a \pm 0,31$	1–3 $\times 10^6/L$
B(1%)	0,6	0,7	0,8	$0,70^a \pm 0,10$	
C(3%)	2,3	2,1	2,4	$2,27^c \pm 0,15$	
D(5%)	1,4	1,2	1,3	$1,30^b \pm 0,10$	
E(7%)	1,5	1,2	1,3	$1,33^b \pm 0,07$	
F(9%)	1,1	1,6	1,5	$1,40^b \pm 0,26$	
G(Kontrol (-))	2,5	2,3	2,4	$2,35^c \pm 0,15$	

**Keterangan:** A: kontrol (+), B: asap cair 1%, C: asap cair 3%, D: asap cair %, E: asap cair 7%, F: asap cair 9%. Dan G: Kontrol (-). Dapat disajikan perlakuan penambahan asap cair 3% memiliki rata-rata terbesar yaitu  $2,27 \times 10^6/L$ .

**Tabel 4.** Data jumlah hemoglobin ikan nila pada setiap perlakuan asap cair

Perlakuan	Jumlah Hemoglobin (g/dL)			Rata-rata (g/dL)	Kadar Normal (Salasia et al., 2001)
	1	2	3		
A(Kontrol (+))	5,9	4,4	5,4	$5,23^a \pm 0,76$	5,05-8,33 g/dL
B(1%)	6,7	7,2	7,1	$7,00^b \pm 0,26$	
C(3%)	7,8	8,2	8,1	$8,03^c \pm 0,21$	
D(5%)	3,9	4,1	5,3	$4,43^a \pm 0,76$	
E(7%)	7,3	7,1	7,2	$7,20^{bc} \pm 0,10$	
F(9%)	7,0	7,2	8,1	$7,43^{bc} \pm 0,59$	
G(Kontrol (-))	8,2	8,1	8,0	$8,10^c \pm 0,10$	

**Keterangan:** A: kontrol (+), B: asap cair 1%, C: asap cair 3%, D: asap cair 5%, E: asap cair 7%, F: asap cair 9%. Dan G: Kontrol (-). Dapat disajikan perlakuan penambahan asap cair 3% memiliki rata-rata terbesar yaitu 8,03 g/dL.

Sedangkan Wedemeyer dan Yasutake (1977) menyatakan bahwa jumlah eritrosit yang tinggi menunjukkan ikan dalam keadaan stress. *A. hydrophyla* memproduksi eksotoksin berupa hemolisin, hemolisin merupakan enzim yang mampu melisis sel-sel darah merah dan membebaskan hemoglobin, sehingga rataan eritrosit ikan uji umumnya menurun atau lebih rendah dari

normal hingga hari ke-14 setelah ujiantang (Angka, 2001). Menurut Wedemeyer dan Yasutake (1977) dalam Sa'diyah (2006), rendahnya jumlah eritrosit menunjukkan ikan menderita anemia dan kerusakan ginjal, sedangkan tingginya jumlah eritrosit menandakan ikan dalam keadaan stress. Total eritrosit yang berbeda tiap perlakuan diduga dipengaruhi penggunaan asap cair yang



mengandung senyawa fenol. Hal ini juga didukung oleh penelitian Siskos *et al.* (2007) menjelaskan bahwa didalam asap cair terkandung zat anti bakteri yakni senyawa fenol. Dimana mekanisme antimikroba dari senyawa fenol dapat dilakukan dengan bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan meningkatnya permeabilitas dengan membrane sel yang berakibat hilangnya isi sel, dengan inaktivasi enzim- enzim esensial atau dengan inaktivasi fungsional materi genetik (Nancy *et al.* 1992).

Berdasarkan sebaran data jumlah hemoglobin terbesar adalah pada perlakuan penambahan asap cair 3% yakni 8,03g/dL, sedangkan presentase hemoglobin terkecil pada perlakuan penambahan asap cair 5 % sebesar 4,43g/dL dan kontrol positif sebesar 5,23g/dL (Tabel 4). Kadar hemoglobin dalam sel darah merah ikan nila normal menurut Salasia *et al.*, (2001) berkisar 5,05-8,33g/dL. Berdasarkan hal tersebut, perlakuan penambahan asap cair dalam penelitian ini kadar hemoglobin ikan nila masih dalam taraf normal. Penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Orsi *et al.*, (2017) yang menyimpulkan kadar hemoglobin sebelum diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophyla* sebesar 6,49 g/dL dan sesudah sebesar 6,07g/dL.

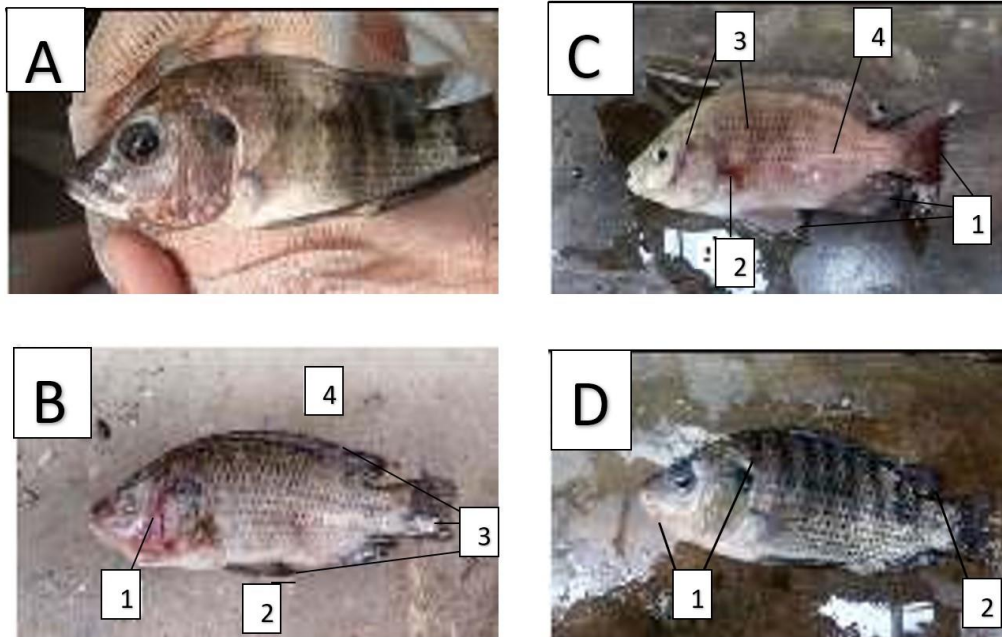
Penelitian lain yang sejalan yaitu penelitian Dotta *et al.*, (2018), jumlah hemoglobin ikan nila yang diuji tantang bakteri *A. hydrophyla* sebesar 5,7 g/dL. Nirmala *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa hemoglobin menentukan tingkat ketahanan tubuh pada ikan karena memiliki hubungan yang sangat erat dengan daya ikat oksigen dalam darah. Rendahnya kadar hemoglobin menyebabkan laju metabolisme menurun dan energi yang dihasilkan menjadi rendah (Bastiawan *et al.*, 1995). Kuswardani (2006) menyatakan bahwa semakin rendah kadar hemoglobin dalam darah ikan, maka semakin kecil kemampuan darah untuk mengangkut oksigen ke dalam tubuh dan menyebabkan ikan mudah terserang penyakit. Berdasarkan sebaran data presentase kadar hematokrit terbesar adalah pada perlakuan penambahan asap cair 3% yakni sebesar 21,35%. Sedangkan data presentase kadar hematokrit terkecil adalah pada perlakuan penambahan asap cair 5% yakni sebesar 12,27% (Tabel 5). Kadar hematokrit dalam sel darah merah ikan nila normal menurut Royan (2014) berkisar 21%-22,67%. Berdasarkan hal tersebut, perlakuan penambahan asap cair dalam penelitian ini kadar hematokrit ikan nila masih dalam taraf normal.

**Tabel 5.** Data presentase kadar hematokrit ikan nila pada setiap perlakuan asap cair

Perlakuan	Jumlah Hematokrit (%)			Rata-rata	Kadar Normal (Bond, 1979)
	1	2	3		
A(Kontrol (+))	14,1	14,3	15,7	14,70 <sup>b</sup> ± 0.87	
B(1%)	19,9	18,4	19,3	19,20 <sup>c</sup> ± 0.75	

C(3%)	20,4	23,1	22,3	21,35 <sup>de</sup> ± 1.34	20-30%
D(5%)	11,3	12,4	13,1	12,27 <sup>a</sup> ± 0.91	
E(7%)	21,6	20,9	20,7	21,07 <sup>d</sup> ± 0.47	
F(9%)	19,2	19,3	18,8	19,10 <sup>c</sup> ± 0.26	
G(Kontrol (-))	24,5	23,8	22,2	23,50 <sup>e</sup> ± 1.18	

**Keterangan:** A: kontrol (+), B: asap cair 1%, C: asap cair 3%, D: asap cair 5%, E: asap cair 7%, F: asap cair 9%. Dan G: Kontrol (-). Dapat disajikan perlakuan penambahan asap cair 3% memiliki rata-rata terbesar yaitu 21,35%.



**Gambar 1.** Gejala klinis ikan nila setelah ujiantang perlakuan asap cair terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*. Perlakuan kontrol negatif (A): tidak terlihat gejala klinis, Ikan berwarna cerah. Perlakuan kontrol positif (B): 1. Haemorrhagic, 2. Hiperemia, 3. Sirip punggung, dan 4. perut geripis Tubuh pucat. Perlakuan asap cair 1% (C): 1. Sirip ekor, perut dan anal geripis dan berwarna kemerahan, 2. Hemorrhagic lokal pada pangkal sirip dada, 3. Hiperemia, dan 4. Tubuh pucat. Perlakuan asap cair 9% (D): 1. Hiperemia, 2. Sirip punggung geripis.

Penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Orsi *et al.*, (2017) yang menyimpulkan kadar hematokrit sebelum diuji tantang dengan dengan bakteri *A. hydrophila* sebesar 35% dan sesudah sebesar 25,5%. Penelitian lain yang sejalan yaitu penelitian Dotta *et. al.*, (2018), kadar hematokrit ikan nila yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila* sebelum sebesar 28% dan sesudah sebesar 22%. Penghitungan kadar hematokrit dan hemoglobin mencerminkan oksigen

yang di muat dalam darah. Nilai yang rendah dapat disebabkan karena kerusakan insang atau osmoregulasi yang cacat, sementara nilai yang tinggi menunjukkan naiknya permintaan oksigen atau tekanan yang akut (Dewi, 2012). Apabila ikan terkena infeksi, nafsu makan ikan akan menurun dan kadar hematokrit darah akan menurun. Pada kasus seperti anemia mikrositik, jumlah dan ukuran sel darah merah berkurang, sehingga kadar hematokrit juga rendah. Kadar hematokrit juga

dipengaruhi oleh jenis kelamin, ukuran tubuh dan masa pemijahan (Jawad *et al.*, 2004). Putri *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa kadar hematokrit dapat dijadikan acuan untuk menentukan kesehatan ikan, infeksi patogen, indikasi stress, dan perubahan kondisi lingkungan yang menyebabkan turunnya kadar hematokrit dalam darah. Doppingtonung (2008) menyatakan bahwa kadar hematokrit yang nilainya lebih kecil dari 22% menunjukkan bahwa ikan mengalami anemia dan kemungkinan terserang penyakit.

Gejala klinis diamati setelah 24 jam pasca ikan diinfeksi bakteri *A. hydrophyla* (Gambar 1). Pengamatan dilakukan untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada ikan yang terserang bakteri. Gejala klinis muncul 3 hari pasca infeksi bakteri. Perlakuan yang paling parah gejala klinisnya adalah kontrol negatif yaitu warna tubuh menjadi pucat, sirip punggung, ekor dan perut geripis, hemorragic dan hiperemia. Hal ini sejalan dengan Lubis *et al.*, (2014) yang menyatakan bahwa gejala klinis yang ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophyla* yaitu warna tubuh menjadi pucat, munculnya luka pada tubuh, hemorragic dan sirip geripis.

Terjadinya hiperemia pada permukaan tubuh dan hemorragic pada tubuh sejalan dengan gejala klinis yang ditimbulkan oleh infeksi *A. hydrophyla* dan reaksi hemolisis pada agar darah (Filler *et al.*, 2000). Chopra *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa hemorragic dan luka yang muncul pada tubuh ikan diduga disebabkan oleh toksin ekstraselular yang bekerja sama merusak jaringan tubuh ikan. Hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri *A. hydrophyla* bekerja dengan

cara memecah dan melisiskan sel-sel darah merah. Hal ini terlihat dengan adanya luka dan pendarahan pada tubuh ikan nila. Pengujian yang dilakukan pada media agar darah menunjukkan terjadinya zona bening yang merupakan aktivitas dari  $\beta$ -hemolisis di sekeliling koloni bakteri, yang memperlihatkan proses terjadinya lisis yang sempurna oleh *A. hydrophyla*. Munculnya gejala klinis pada luka dan pendarahan pada tubuh ikan nila disebabkan oleh toksin yang dihasilkan oleh *A. hydrophyla* salah satunya adalah toksin hemolisin. Cipriano (2001) dan Huys *et al.* (2002) menyatakan bahwa toksin hemolisin berperan dalam memecah sel-sel darah merah yang dapat menyebabkan sel keluar dari pembuluh darah dan dapat menimbulkan warna kemerahan pada permukaan kulit ikan nila. Daya kerja toksin yang dihasilkan oleh bakteri berkaitan dengan sel reseptor spesifik. Interaksi yang terjadi antara sel reseptor dalam tubuh ikan dengan hemolisin, menyebabkan efek terjadinya luka pada tubuh ikan. Hal ini sejalan dengan pernyataan Virella (1997), yang menyatakan bahwa toksin ekstraselular mempunyai dua wilayah penentu virulensi yaitu daerah aktif yang menjadi penyebab utama infeksi pada sel dan daerah perlekatan yang menjadi tempat toksin melekat pada sel reseptor spesifik.

Bakteri *Aeromonas* yang berbeda strain memproduksi sejumlah enzim yang juga berbeda. Selain menghasilkan enzim, bakteri *A. hydrophyla* juga menghasilkan toksin yaitu hemolisin, enterotoksin dan sitotoksin. Banyak

faktor virulensi dan sangat kompleks yang terlibat dalam virulensi bakteri *A. hydrophyla*. Hemolisin dan enzim saling bekerja sama untuk membuka jaringan pada permukaan kulit dan sisik ikan. Proses invasi bakteri patogen ke dalam tubuh ikan diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit, yang menggunakan pili, flagela dan kait untuk dapat bergerak, dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang terlindungi oleh zat kitin. Selama proses invasi berlangsung *A. hydrophyla* juga memproduksi enzim kitinase yang berfungsi untuk mendegradasi lapisan kitin sehingga dapat dengan mudah ditembus oleh bakteri. Selain menggunakan enzim kitinase, *A. hydrophyla* juga menghasilkan enzim lainnya yaitu enzim lesitinase yang membantu bakteri untuk masuk ke dalam aliran darah ikan (Nasran *et al.*, 2003). Dua enzim yang dihasilkan oleh *A. hydrophyla* yaitu enzim kitinase dan lesitinase mempunyai peran yang penting dalam proses infeksi. Hal ini sesuai dengan yang dijelaskan oleh Harini *et al.*, (2006), bahwa proses degradasi lapisan kitin merupakan reaksi hidrolisis yang disebabkan oleh katalisator kitinase untuk memecah dan memutus ikatan  $\beta$ -1-4-glikosidik pada zat kitin yang melindungi bagian epidermis pada tubuh ikan. Hidrolisis enzim menghasilkan N-asetil-D-glukosamin yang merupakan oligomer pendek yang dapat digunakan oleh bakteri untuk sumber karbon, sehingga bakteri dapat dengan mudah menembus lapisan kitin. Del Bene *et al.*, (1997) menyatakan

bahwa lesitinase adalah enzim ekstraselular yang ada pada bakteri patogen yang berfungsi untuk menghidrolisis fosfolipid sebagai penyusun membran plasma sel untuk menjadi fosfokolin dan digliserida, sehingga dapat digunakan sebagai asupan nutrisi oleh bakteri. Bevelender *et al.*, (1979) menjelaskan bahwa bakteri dapat bergerak dengan sangat cepat didalam pembuluh darah, sehingga dapat dengan mudah mencapai organ-organ penting ikan seperti pada ginjal dan sinusoid hati, yang akan digunakan bakteri sebagai media tempat hidup dan memperbanyak diri, serta memanfaatkan nutrisi yang ada di sekitarnya dalam proses metabolisme. Pengamatan parameter kualitas air selama pemeliharaan ikan nila menunjukkan suhu berkisar 26,3°C, DO 5,1 mg/L, dan pH sebesar 6,8-7,0. Kualitas air tersebut masih sesuai dengan kisaran optimal kebutuhan kelangsungan hidup ikan nila yaitu suhu 25- 32°C, DO dari  $\geq 3$  mg/L, dan pH sekitar 6,5-8,5 (SNI 7550-2009).

## KESIMPULAN

Pemberian asap cair tempurung kelapa mampu memberikan pengaruh efektif terhadap jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit pada ikan nila (*O. niloticus*) pasca diinfeksi bakteri *A. hydrophyla* dan konsentrasi asap cair 3% pada pakan merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menurunkan infeksi

*A. hydrophila* pada ikan nila dengan sedikitnya gejala klinis.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga (FPK UNAIR) dan Laboratorium Mikrobiologi FPK UNAIR dalam memberikan fasilitasnya sehingga penelitian ini dapat tercapai. Serta semua pihak yang telah membantu dalam terlaksananya penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Angka, S. L., B. P. Priosoeryanto., B. W. Lay., dan E. Harris. 2004. Penyakit Motile Aeromonas Septicaemia pada Ikan Lele Dumbo *Clarias sp.* *Forum Pascasarjana*, 27: 339-350.
- Altwegg M., Arnold G. S., Regula A., Jacqueline L.H., and Don J.B. 1990. Biochemical identification of Aeromonas genospecies isolated from humans. *Journal Clinical Microbiol*, 28: 258-264.
- Austin, B and D.A. Austin. 2007. Bacterial Fish Pathogen Disease of Farmed and Wild Fish. Fourth Edition. Praxis Publishing, Chichester.
- Bastiawan, D., M. Tauhid, Alifudin dan T. S. Dermawati. 1995. Perubahan hematologi dan jaringan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang diinfeksi cendawa *phanomyces sp.* *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 1(2): 106-115.
- Bhakta, J.N.; Biswas, J. K.; Bhakta, P.; Munekage, Y. and Jana, B.B. 2009. Fish Stocking Density Induced Growth Responses Of Somebiogeochemical Cycling Bacterial Population. *J. Aquat. Sci. Technol*, 13(2):45-50
- Bevelander, G. dan Ramaley, J. A. 1979. Dasar dasar histologi, Terjemahan dari *Essential of histology* oleh Gunarso, W. 8th ed. Tobing, M. H. dan Sitohang, M. J. (Eds.). 1979. Gelora Aksara Pratama. Jakarta. 460 hlm.
- Bijanti, R. 2010. Buku Ajar Hematologi Ikan (Tehnik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan) edisi 2. PT Revka Petra Media. Surabaya. Hal 23.
- Budijanto, S., Hasbullah, R., Prabawati, S., Setyadjit, Sukarno dan Zuraida, I. 2008. Identifikasi dan uji keamanan asap cair tempurung kelapa untuk produk pangan. *Jurnal Pascapanen*, 5(1): 32-40.
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby., J.C. Sherris and M. Truck. 1996. Antibiotic Suspectibility Testing by Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45(6):495.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 22th ed. CLSI 2012 document M100- S22 Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. USA. 32(3).
- Cipriano, R., G. L. Bullock, and S. W. Pyle. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile *Aeromonas Septicemias* of Fish. Fish Disease Leaflet. Hal 68.
- Chopra, A. K., X. I. Xu, D. Ribardo, M. Gonzales, K. Kuhl, J. W. Peterson, dan W. Huston. 2000. The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* Includes Proinflammatory Cytokine Production and Activates Arachidonic Acid Metabolism in Macrophages. *Infection and Immunity*. 68(5): 2808-2818.
- Darmadji, E. P. 2009. Teknologi Asap Cair dan Aplikasinya pada Pangan dan Hasil Pertanian. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar dalam Bidang Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian pada Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, 28 April 2009.
- Darmadji, P. 1996. Aktivitas Antibakteri Asap Cair yang diproduksi dari Berbagai macam Limbah Pertanian. *Agritech*, 16(4): 19-22.
- Darmadji, P. 2002. Optimasi proses Pembuatan Tepung Asap. *Agritech* 22: 172- 177.
- Darmadji, P. and Izimoto, M. 1995. Antibacterial Effects of Spices on Fermented Meat. The Scientific Reports of The Faculty of Agriculture Okayama University. 83(1): 9-15.
- Darmadji, P., Supriyadi, dan Hidayat, C. 1999. Produksi Asap Rempah Cair dan Limbah Padat Rempah dengan Cara Pirolysis. *Agritech*, 19(1): 11-15.
- Del Bene, V. dan Schmidt, M. G. 1997. Bacterial virulence factors. Dalam: Virella, G. (Ed.). 1997. Microbiology and infectious disease. 3rd Ed. *William and Wilkins, Baltimore*, 65-70.

- Dewi, N. K. 2012. Biomarker Pada Ikan Sebagai Alat Monitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium, Timbal dan Merkuri di Perairan Kaligarang Semarang. *Thesis*. Universitas Diponegoro.
- Diah Sudiarti. 2015. Efektivitas (*liquid smoke*) Asap Cair Tempurung Kelapa (*Cocos nucifera*) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Jurnal Bioshell*, 4(1): 212-221.
- Dopongtonung, A. 2008. Gambaran Darah Ikan Lele (*Clarias* sp.) yang Berasal dari Daerah Laladon-Bogor. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Dotta. G., de Andrade J. I. A., Garcia P., Alves Jesus G. F., Mourião J. L. P., Mattos J. J., Dias Bainy A. C., and Martins M. L. 2018. Antioxidant Enzymes, Hematology And Histology Of Spleen In Nile Tilapia Fed Supplemented Diet With Natural Extracts Challenged With Aeromonas. *Fish and Shellfish Immunology*, 79: 175–180.
- Filler, G., Ehrich, J. H. H., Strauch, E., dan Beutin, L. 2000. Acute renal failure in an infant associated with cytotoxic *Aeromonas sobria* isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of Infectio. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1): 469 – 470.
- Firnanda, R., Sugito, Fakhurrazi, Ambarwati D. V. S. 2013. Isolasi *Aeromonas hydrophila* pada sisik ikan nila *O. niloticus* yang diberi tepung daun jalah *Salix tetrasperma* Roxb. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7: 22–24.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan: Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan. Jakarta : Rineka Cipta. 179 hlm.
- Hanendyo, C. 2005. Kinerja Alat Ekstraksi Asap Cair dengan Sistem Kondensasi. Skripsi. Fakultas Perikanan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Harini, N. dan Septariningrum, D. 2006. Karakterisasi enzim chitinase hasil isolasi dari kultur murni bakteri *Vibrio alginolyticus*. Prosiding Seminar Nasional Tahunan III Hasil Penelitian Perikanan Dan Kelautan.
- Hattula, T. And Luoma, T. 2001. Use of Liquid Smoke Flavouring as An Alternative to Traditional Flue Gas Smoking of Rainbow Trout Fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Lebensm. Wiss.u-Technol*, 34: 521-525.
- Huys, G., P. Kampfer., M. J. Albert., I khun., R. Denys dan J. Swings. 2002. *Aeromonas hydrophila* subsp Isolated from Children with Diaerhoea in Bangladesh. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, 52: 705 – 712.
- Jawad, L. A., M. A. Al-Mukhtar and H. K. Ahmed. 2004. The Relationship Between Haematocrit and Some Biological Parameters of the Indian Shad, *Tenualo sailisha* (Family Clupeidae). *Anim. Biod Conserv*, 27(2): 47-52.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. Data Statistik Series Produksi Perikanan Budidaya Indonesia. [www.djpb.kkp.go.id](http://www.djpb.kkp.go.id). Diakses pada tanggal 27 September 2018. Pukul 14.00 WIB.
- Kuswardani, Y. 2006. Pengaruh Pemberian Resin Lebah Terhadap Gambaran Darah Maskoki (*Carassius auratus*) yang Terinfeksi Bakteri *A. hydrophila*. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Kusdarwati, R., Dinda, N. D., & Nurjanah, I. 2018. Antimicrobial resistance prevalence of *Aeromonas hydrophila* isolates from motile *Aeromonas* septicemia disease. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1): 012076
- Lubis, Y. P. P., Yunasfi dan R. Leidonald. 2014. Jenis-Jenis Bakteri Pada Luka Ikan Patin. *Jurnal Aquacostamarine*, 2(1): 66-77.
- Maswan, N. A. 2009. Pengujian Efektifitas Dosis Vaksin DNA dan Korelasinya Terhadap Parameter Hematologi Secara Kuantitatif. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Murwantoko, M., Rozi, R., Istiqomah, I., & Nitimulyo, K. H. 2013. Isolasi, Karakterisasi, dan Patogenitas Bakteri Penyebab Penyakit pada Gurami (*Ospironemus goramy*) di Kabupaten Bantul. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 15(2):83-90.
- Nancy, G. Faith., Ahmed E. Yousef., and John B. Luchansky. 1992. Inhibition Of *Listeria Monocytogenes* by Liquid Smoke and Isoeugenol, A Phenolic Component Found In Smoke. Food Research Institute Department of Food Microbiology & Toxicology. University of Wisconsin-Madison 1925 Willow Drive Madison. WI 53706.
- Nasran, S., Ariyani, F., dan Indriyati, N. 2003. Produksi kitinase dan kitin deasetilase dari

- Vibrio harveyi*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 9(5): 33–38.
- Nirmala, K., Y. P Hastuti, dan V. Yuniar. 2012. Toksisitas merkuri (hg) terhadap tingkat kelangsungan hidup, pertumbuhan, gambaran darah dan kerusakan organ pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 11(1): 38-48.
- Orsi, R. O, Vivian G. Dos Santos, Luiz E. Pezzato, Pedro L. P. F. De Carvalho, Caroline P. Teixeira, Jakeline M. A. Freitas, Carlos R. Padovani, Maria M. P. Sartori, Margarida M. Barros. 2017. Activity Of Brazilian Propolis Against *Aeromonas* And Its Effect On Nile Tilapia Growth, Hematological And Non-Specific Immune Response Under Bacterial Infection. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 89(3): 1785- 1799.
- Putnam, K. P., Bombick D. W., Avalos J. T., and Doolittle D. J. 1999. Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food.
- Putri, R. R., F. Basuki., dan S. Hastuti. 2013. Profil Darah dan Kelulushidupan Ikan Nila Pandu F5 (*Oreochromis niloticus*) yang Diinfeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan Kepadatan Berbeda. *Journal Of Aquaculture Management and Technology*. 2 (2) : 47-56.
- Putri, Siska Dyah Kusuma, Susilowati, Ari, Setyaningsih, Ratna. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Jurnal Universitas Sebelas Maret*.
- Roberts, R. J., 1989. *Fish Pathology* 2thed. Baillierre Tindall: London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto. Hal 207-311.
- Roberts, R. J., 2001. *Fish Patology*. 3rd Ed. Baillierre Tindall : Cadar, England. Hal 305-306.
- Royan, F., S. Rezeki dan A. H. C. Haditomo. 2014. Pengaruh Salinitas Yang Berbeda Terhadap Profil Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal Aquaculture Management Technology*. 3 (2) : 109-117.
- Rozi, Rahayu, K., Daruti, D. N., & Stella, M. S. P. 2018. Study on characterization, pathogenicity and histopathology of disease caused by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 137, No. 1, p. 012003). IOP Publishing.
- Rozi, Rahayu, K., & Daruti, D. N. 2018. Detection and analysis of hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* isolated from Gouramy (*Osphronemus gouramy*) by polymerase chain reaction (PCR). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1): 012001
- Salasia, S. I. O., D. Sulanjari., dan A. Ratnawati. 2001. Studi Hematologi Ikan Air Tawar. *Biologi*, 2(12): 710-723.
- Saloko, S., P. Darmadji., B. Setiaji., and Y. Pranoto. 2014. Antioxidative and Antimicrobial Activities of Liquid Smoke Nanocapsules using Chitosan and Maltodextrin and its Application on Tuna Fish Preservation. *Journal of Food Bioscience*, 7: 71-79.
- Siskos I., Zotos A., Melidou S., and Tsikritzi R. 2007. The effect of liquid smoking of fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage. *Food Chemical*, 101: 458-464.
- Sun'en, E. 1998. Minimum Inhibitory Concentration of Smoke Wood Extracts Against Spoilage and Pathogenic Microorganism Associated with Food. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 45-48.
- Sun'en, E., Carol Aristimunõ., and Belen Fernandez-Galian. 2001. Activity of Smoke Wood Condensates Against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at Low Temperature. *Food Microbiology*, 18: 387-393.
- Sun'en, E., Carol Aristimunõ., and Belen Fernandez-Galian. 2003. Activity of Smoke Wood Condensates Against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in Vacuum-packaged, Cold-smoked Rainbow Trout Stored at 4°C. *Food Research International*, 36 (2003): 111-116.
- Virella, G. 1997. *Microbiology and infectious disease*. 3rd Ed. William dan Wilkins. Baltimore. hal 65–70.
- Wang, H. F., J. L. Wang., C. Wang., W. M. Zhang., J. X. Liu., and B. Dai. 2012. Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and

fecal bacterial communities of weaned piglets. *Livest. Science*. 144: 173–180.  
Wedemeyer, G. A., Yasutake. 1977. Clinical Methods for The Assessment on The Effect

of Enviromental Stress on Fish Health. Technical Paper of The US Departement of The Interior Fish ang the Wildlife Service. 89: 1-17.