

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian telah dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu persiapan, kultivasi, pengambilan data, penghitungan parameter dan analisis data. Parameter hematologi dilakukan dengan pengambilan hemolim udang yang selanjutnya dilakukan perhitungan total hemosit count dengan alat hemocytometer. Selain itu, hemolim dilakukan pembuatan preparat pewarnaan yang selanjutnya dilakukan analisis aktivitas dan indeks fagositosis.

4.1.1 *Total Hemosit Count (THC)*

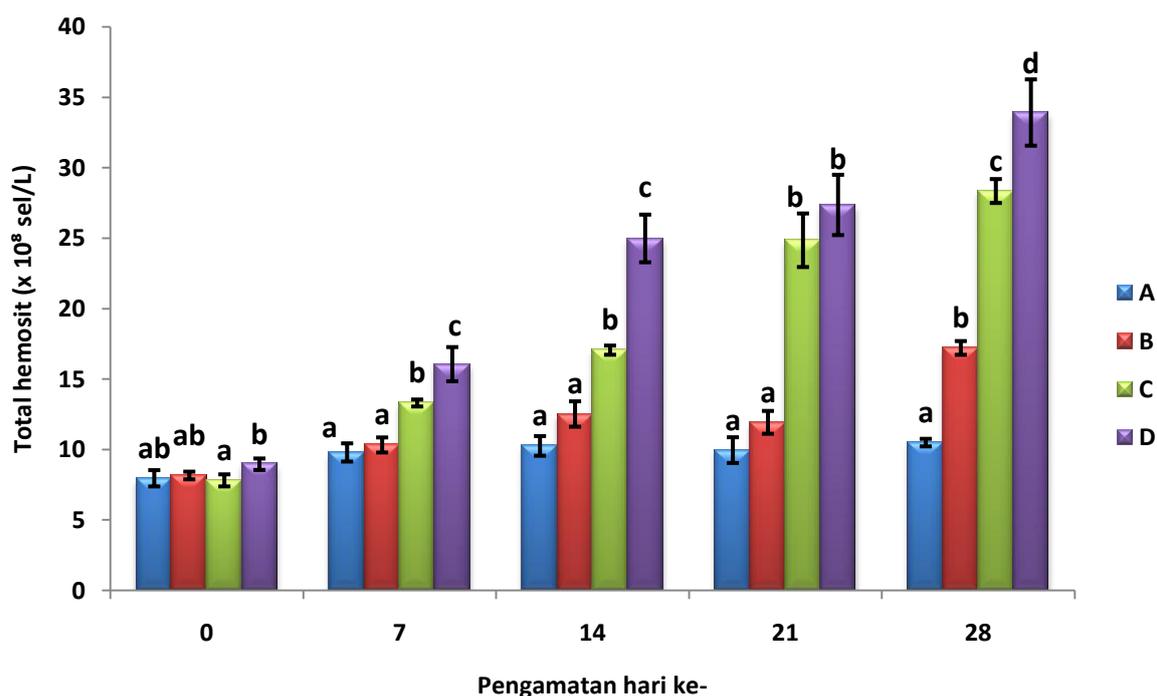
Penelitian melakukan pengambilan data total hemosit di tiap unit penelitian. Data total hemosit dilakukan pengukuran pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28. Parameter total hemosit di dapat dari menghitung jumlah hemosit pada bilik leukosit hemocytometer. Adapun hasil perhitungan total hemosit di sajikan pada gambar 2. Berdasarkan data total hemosit menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi ekstrak sodium alginat memberikan pengaruh secara signifikan ($P < 0,05$) terhadap total hemosit. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa respon jumlah hemosit udang pada H-0 memiliki selang nilai antara $7,82-8,97 \times 10^8$ sel/L, dengan nilai secara berurutan perlakuan A, B, C, D adalah $7,97^{ab}$; $8,17^{ab}$; $7,82^a$ dan $8,97^b \times 10^8$ sel/L. Jumlah hemosit udang pada H-7 hingga H-28 pada tabel berikut:

Tabel 1. Total Hemosit Count ($\times 10^8$ Sel/L)

| Perlakuan | Pengamatan hari ke- | | | | |
|-----------|---------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| A | 7,97 \pm 0,58 | 9,80 \pm 0,65 | 10,27 \pm 0,70 | 9,97 \pm 0,91 | 10,50 \pm 0,27 |
| B | 8,17 \pm 0,27 | 10,33 \pm 0,54 | 12,53 \pm 0,90 | 11,94 \pm 0,81 | 17,22 \pm 0,49 |
| C | 7,82 \pm 0,43 | 13,31 \pm 0,25 | 17,06 \pm 24,99 | 24,86 \pm 1,90 | 28,35 \pm 0,85 |
| D | 8,97 \pm 0,41 | 16,07 \pm 1,21 | 24,99 \pm 1,69 | 27,37 \pm 2,14 | 33,92 \pm 2,35 |

Keterangan : A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan penambahan sodium alginat 0, 1, 2, 3 gr/pakan. Nilai adalah rata-rata \pm standar deviasi. (Sumber: Hasil penelitian, 2017)

Berdasarkan hasil analisis pada tabel 7 dan gambar 2 menyatakan bahwa nilai THC pada H-0 perlakuan A, B dan C tidak berbeda secara nyata, sedangkan perlakuan D memiliki nilai tertinggi dan berbeda secara nyata terhadap C dengan nilai $8,97^b \times 10^8$ Sel/L. Hasil pengamatan H-7 perlakuan A dan B tidak berbeda secara nyata, akan tetapi berbeda lebih rendah secara nyata terhadap perlakuan C dan D.



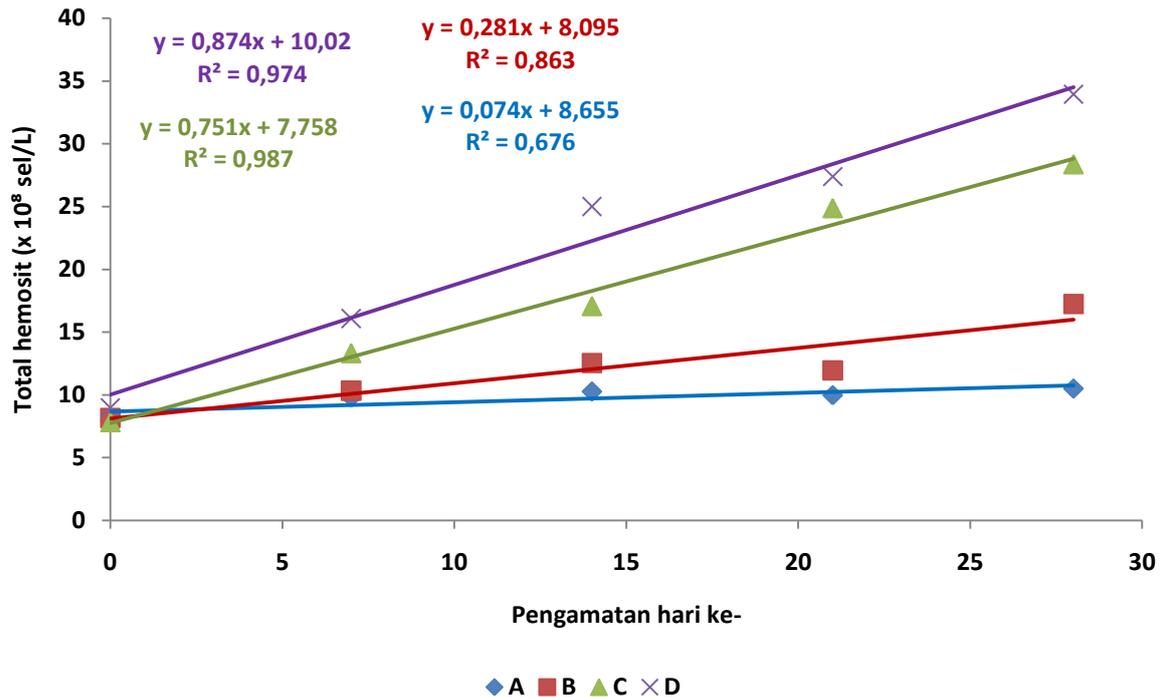
Gambar 1. Histogram Total Hemosit Count (THC)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Huruf yang berbeda pada histogram di hari yang sama menunjukkan bahwa memiliki nilai THC yang berbeda secara signifikan ($P < 0,05$).

Perlakuan D memiliki nilai THC tertinggi yang berbeda secara nyata dengan perlakuan C dengan nilai $16,07^c \times 10^8$ Sel/L. Pengamatan H-14 nilai THC perlakuan A dan B tidak berbeda secara nyata. perlakuan B memiliki nilai THC lebih tinggi secara nyata dengan nilai $17,06^b \times 10^8$ Sel/L. Perlakuan C berbeda lebih rendah secara nyata terhadap perlakuan D dengan nilai $24,99^c \times 10^8$ Sel/L. Nilai THC pada H-21 menunjukkan bahwa perlakuan A dan B tidak berbeda secara nyata begitu pula dengan perlakuan C dan D tidak berbeda secara nyata. Akan tetapi, kedua kelompok tersebut saling berbeda secara nyata dimana perlakuan C dan D lebih tinggi dari perlakuan A dan B. Analisis data THC pada H-28 menunjukkan bahwa perlakuan A, B, C dan D saling berbeda secara nyata dengan urutan nilai THC terkecil pada perlakuan A, B, C dan D yaitu dengan nilai $10,50^a$; $17,22^b$; $28,35^c$ dan $33,92^d \times 10^8$ Sel/L.

Berdasarkan data total hemosit perlakuan A dari awal penelitian hingga akhir memiliki pola regresi linier sederhana positif dengan persamaan $Y=0,522x + 8,132$ dengan nilai $R^2= 0,676$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan A pada hari ke-7 mengalami kenaikan total hemosit sebesar 23%, pada hari ke-14 meningkat 4,8 %, sedangkan pada hari ke-21 mengalami penurunan sebesar -2,98% dan pada hari ke-28 mengalami kenaikan sebesar 5,3 %.

Berdasarkan data total hemosit H-0 sampai dengan H-28 menunjukkan bahwa perlakuan B memiliki pola regresi linier sederhana positif dengan persamaan $Y=1,970x + 6,124$ dan $R^2= 0,863$. Data THC perlakuan B menunjukkan bahwa pada hari ke-7 mengalami kenaikan sebesar 26,5 %, pada hari ke-14 mengalami kenaikan 21,3 %, sedangkan pada hari ke-21 mengalami penurunan sebesar -4,7 % dan pada hari ke-28 mengalami kenaikan sebesar 44,2 %.



Gambar 2. Regresi Linier Total Hemosit Count (THC)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Persamaan adalah $Y=a+bx$. R^2 adalah koefisien determinan.

THC perlakuan C dari awal hingga akhir penelitian memiliki nilai THC berpola regresi $Y=5,261x + 2,496$ dengan $R^2= 0,987$. Perlakuan C pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 mengalami kenaikan THC secara berurutan sebesar 70,2; 28,2; 45,7 dan 14,1 %. Data total hemosit perlakuan D pada H-0, H-7, H-14, H-21 dan H-28 dari awal hingga akhir penelitian mengalami kenaikan secara linier dengan persamaan $Y=6,120x + 3,900$ dan $R^2= 0,974$ dengan nilai secara berurutan sebesar 79,2; 55,5; 9,5 dan 24%.

Berdasarkan gambar 2 menunjukkan bahwa pada hari ke-7 nilai THC tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 20,70; 55,52 dan 63,93 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 28,85 dan 35,81 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 5,41 %.

Berdasarkan gambar 2 menunjukkan bahwa pada hari ke-14 nilai THC tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 46, 46; 99,41 dan 143,38 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 36,15 dan 66,17 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 22,05 %. Berdasarkan gambar 2 menunjukkan bahwa pada hari ke-21 nilai THC tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 10, 08; 129,22 dan 174,54 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 108,22 dan 149,39 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 19,77 %.

Berdasarkan gambar 2 menunjukkan bahwa pada hari ke-28 nilai THC tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 19, 64; 97,02 dan 223,05 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 64,68 dan 170,02 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 63,97 %.

4.1.2 Aktivitas Fagositosis

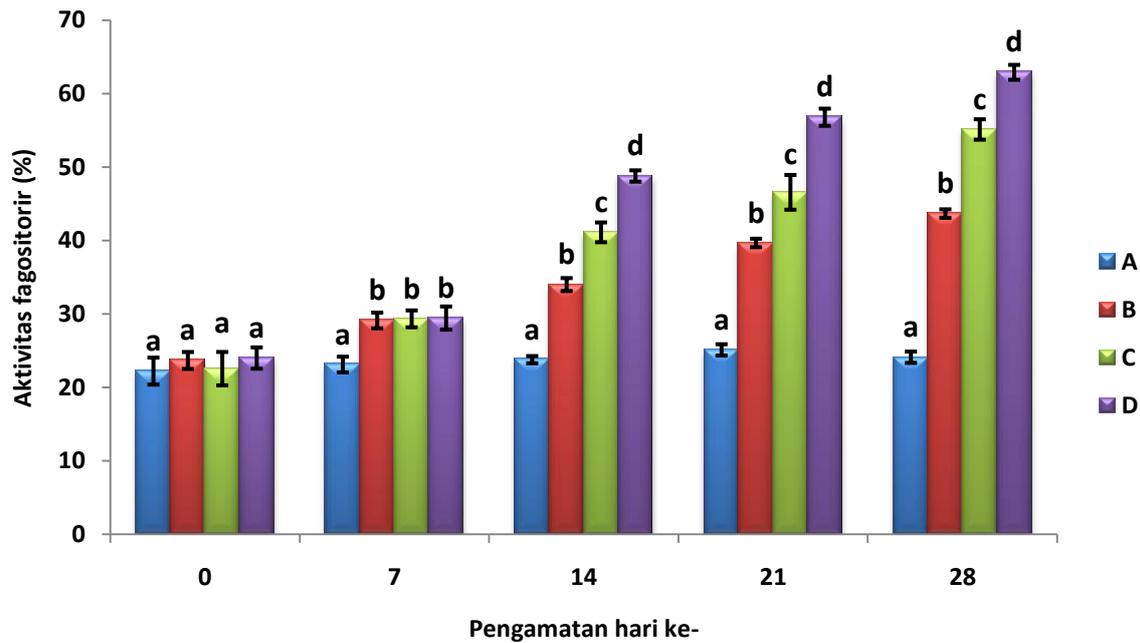
Penelitian ini melakukan kajian respon imunologi udang vaname yang telah diberikan perlakuan pakan yang mengandung sodium alginat konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Salah satu parameter imunologi yang menjelaskan bahwa terjadi peningkatan sistem imun adalah aktivitas fagositosis. Aktivitas fagositosis adalah presentase sel homosit yang aktif melakukan proses fagositosis terhadap total hemosit yang diamati. Semakin tinggi persentase sel hemosit yang aktif melakukan fagositosis maka sistem kekebalan tubuh udang semakin tinggi.

Tabel 2. Aktivitas Fagositosis (%)

| Perlakuan | Pengamatan hari ke- | | | | |
|-----------|---------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| A | 22 ± 1,8 | 23 ± 1,1 | 24 ± 0,5 | 25 ± 0,8 | 24 ± 0,8 |
| B | 24 ± 1,2 | 29 ± 1,1 | 34 ± 0,9 | 40 ± 0,6 | 44 ± 0,6 |
| C | 23 ± 2,3 | 29 ± 1,2 | 41 ± 1,3 | 47 ± 2,4 | 55 ± 1,4 |
| D | 24 ± 1,5 | 29 ± 1,6 | 49 ± 0,8 | 57 ± 1,2 | 63 ± 1,0 |

Keterangan : A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan penambahan sodium alginat 0, 1, 2, 3 gr/pakan. Nilai adalah rata-rata ± standar deviasi. (Sumber: Hasil penelitian, 2017)

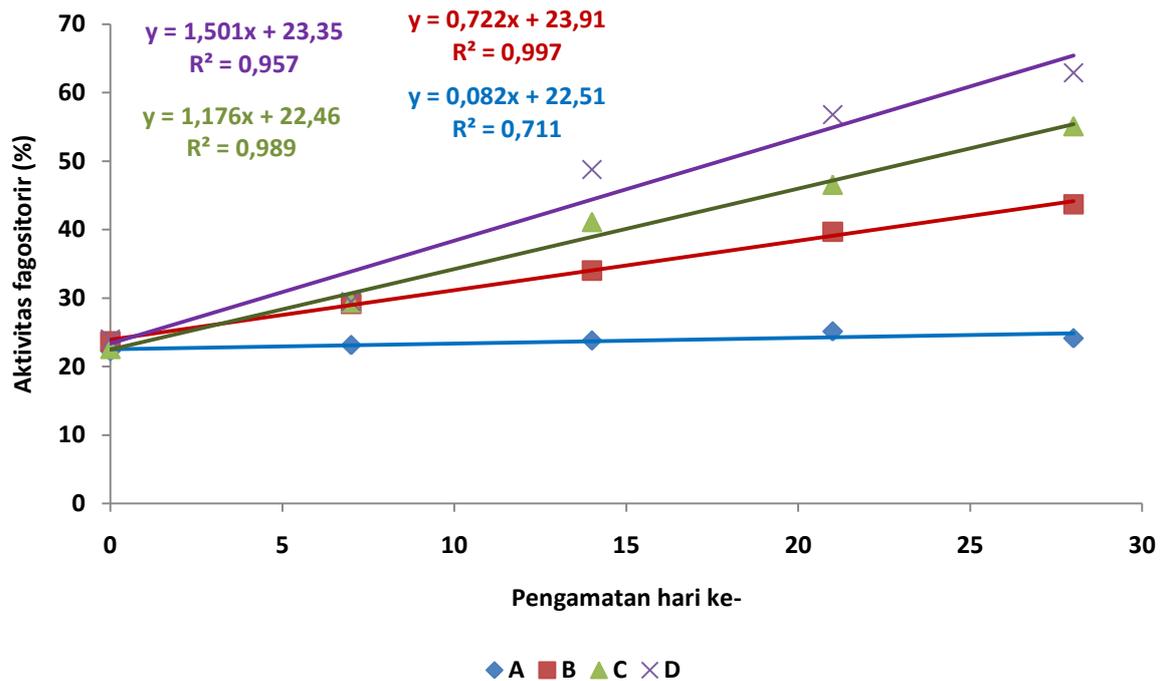
Data aktivitas fagositosis hasil pengamatan memiliki sifat berdistribusi normal, data homogen dan aditiv. Selanjutnya berdasarkan analisis *one way annova* pada gambar 4 menunjukkan bahwa pada H-0 nilai aktivitas fagositosis keempat perlakuan tidak berbeda secara nyata. nilai aktivitas fagositosis pada H-7 menunjukkan bahwa nilai terkecil adalah pada perlakuan A dengan nilai 23^a %. Perlakuan B, C dan D saling tidak berbeda nyata, tetapi kelompok tersebut memiliki nilai yang lebih tinggi secara nyata daripada perlakuan A. Hasil pengamatan H-14 menunjukkan bahwa perlakuan A, B, C dan D secara berurutan berbeda secara nyata dengan nilai aktivitas fagositosis tertinggi pada perlakuan D dengan nilai 49^d %. Demikian sama halnya dengan pengamatan H-21 dan H-28 perlakuan A,B, C dan D berbeda secara nyata dengan perlakuan D adalah tertinggi pada H-21 dan H-28 dengan nilai sebesar 57^d dan 63^d %.



Gambar 3. Histogram Aktivitas Fagositosis (AF)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Huruf yang berbeda pada histogram di hari yang sama menunjukkan bahwa memiliki nilai AF yang berbeda secara signifikan ($P < 0,05$).

Berdasarkan data aktivitas fagositosis perlakuan A dari awal penelitian hingga akhir memiliki pola regresi linier sederhana positif dengan persamaan $Y = 0,577x + 21,93$ dengan nilai $R^2 = 0,711$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan A pada hari ke-7 mengalami kenaikan aktivitas fagositosis sebesar 4%, pada hari ke-14 mengalami kenaikan sebesar 2,9 %, pada hari ke-21 mengalami kenaikan sebesar 5,6% dan pada hari ke-28 mengalami penurunan sebesar -4%.



Gambar 4. Regresi Linier Aktivitas Fagositosis (AF)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Persamaan adalah $Y=a+bx$. R^2 adalah koefisien determinan.

Data aktivitas fagositosis perlakuan B selama penelitian memiliki pola regresi dengan persamaan $Y=5,055x + 18,85$ dan $R^2= 0,997$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan B pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 terus mengalami kenaikan aktivitas fagositosis yaitu secara berturut-turut sebesar 23; 16,8; 16,7 dan 10,1 %.

Perlakuan C memiliki data AF yang terus meningkat secara linier dari awal penelitian hingga akhir dengan persamaan $Y=8,233x + 14,23$ dan $R^2= 0,989$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan C pada hari ke-7 mengalami kenaikan aktivitas fagositosis sebesar 30 %, pada hari ke-14, 21 dan 28 juga mengalami kenaikan sebesar 40,2; 13,2 dan 18,4 %.

Berdasarkan data aktivitas fagositosis perlakuan D dari awal hingga akhir penelitian memiliki pola regresi $Y=10,51x + 12,84$ dan $R^2= 0,957$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan D pada hari ke-7 mengalami peningkatan aktivitas fagositosis

sebesar 22,7 %, hari ke-14 meningkat 65,7 %, hari ke-21 meningkat 16,4 % dan hari ke-28 meningkat 10,8 %.

Berdasarkan gambar 4 menunjukkan bahwa pada hari ke-7 nilai AF tertinggi dimiliki oleh perlakuan B, C dan D yang nilai ketiganya lebih tinggi dari pada lebih tinggi dari pada A sebesar 27%. Data AF pada hari ke-14 tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 19, 43 dan 105 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 21 dan 73 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 43%.

Berdasarkan gambar 4 menunjukkan bahwa pada hari ke-21 nilai AF tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 22, 43 dan 126 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 17 dan 85 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 58%. Nilai AF pada hari ke-28 tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 14,44 dan 161%. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 26 dan 129%. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 81 %.

4.1.3 Indeks Fagositosis

Fagositosis merupakan proses pertahanan diri non spesifik yang dilakukan dengan proses pemakanan atau enkapsulasi agen infectan. Penelitian ini melakukan pengamatan indeks fagositosis. Pengamatan tersebut dilakukan terhadap preparat fagositosis. Penelitian melakukan pengambilan hemosit secara injeksi pada bagian hepatopankreas. Hemosit yang didapatkan dimasukkan kedalam tube yang berisi bakterin. Selanjutnya dilakukan inkubasi supaya terjadi proses fagositosis. Setelah inkubasi dilakukan selanjutnya membuat preparat

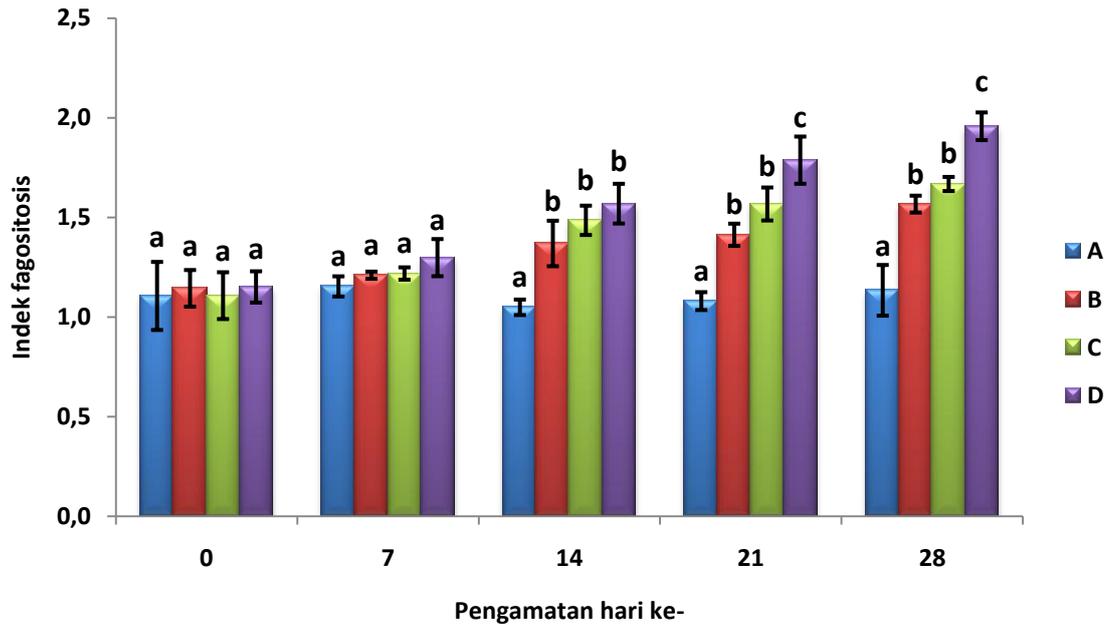
apusan dan diwarnai menggunakan safranin. Preparat tersebut diamati pada mikroskop perbesaran total 400x. Data yang diambil adalah jumlah bakteri yang terfagositosis dan jumlah sel hemosit yang aktif melakukan fagositosis. Data tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan nilai indeks fagositosis.

Tabel 3. Indeks Fagositosis

| Perlakuan | Pengamatan hari ke- | | | | |
|-----------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| A | 1,11 ± 0,17 | 1,15 ± 0,05 | 1,05 ± 0,04 | 1,08 ± 0,04 | 1,13 ± 0,13 |
| B | 1,14 ± 0,09 | 1,21 ± 0,02 | 1,37 ± 0,11 | 1,41 ± 0,06 | 1,57 ± 0,04 |
| C | 1,11 ± 0,12 | 1,22 ± 0,03 | 1,49 ± 0,07 | 1,57 ± 0,08 | 1,67 ± 0,04 |
| D | 1,15 ± 0,08 | 1,30 ± 0,09 | 1,57 ± 0,10 | 1,79 ± 0,12 | 1,96 ± 0,07 |

Keterangan : A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan penambahan sodium alginat 0, 1, 2, 3 gr/pakan. Nilai adalah rata-rata ± standar deviasi (Sumber: Hasil penelitian, 2017).

Berdasarkan nilai indeks fagositosis yang didapatkan menunjukkan bahwa H-0 dan H-7 keempat perlakuan A, B, C dan D saling tidak berbeda nyata. hasil *one way annova* indeks fagositosis H-14 perlakuan B, C dan D tidak saling berbeda nyata, tetapi kelompok tersebut berbeda lebih tinggi secara nyata daripada perlakuan A dengan nilai 1,05^a. Hasil analisis indeks fagositosis pada H-21 dan H-28 memiliki pola perbedaan yang sama yaitu perlakuan A memiliki nilai indeks fagositosis terendah berbeda secara nyata dengan yang lainnya dengan nilai 1,08^a dan 1,13^a. Sedangkan perlakuan B dan C memiliki nilai yang saling tidak berbeda secara nyata. selanjutnya perlakuan D memiliki nilai IF tertinggi pada H-21 dan H-28 berbeda signifikan dengan nilai 1,79^c dan 1,96^c.

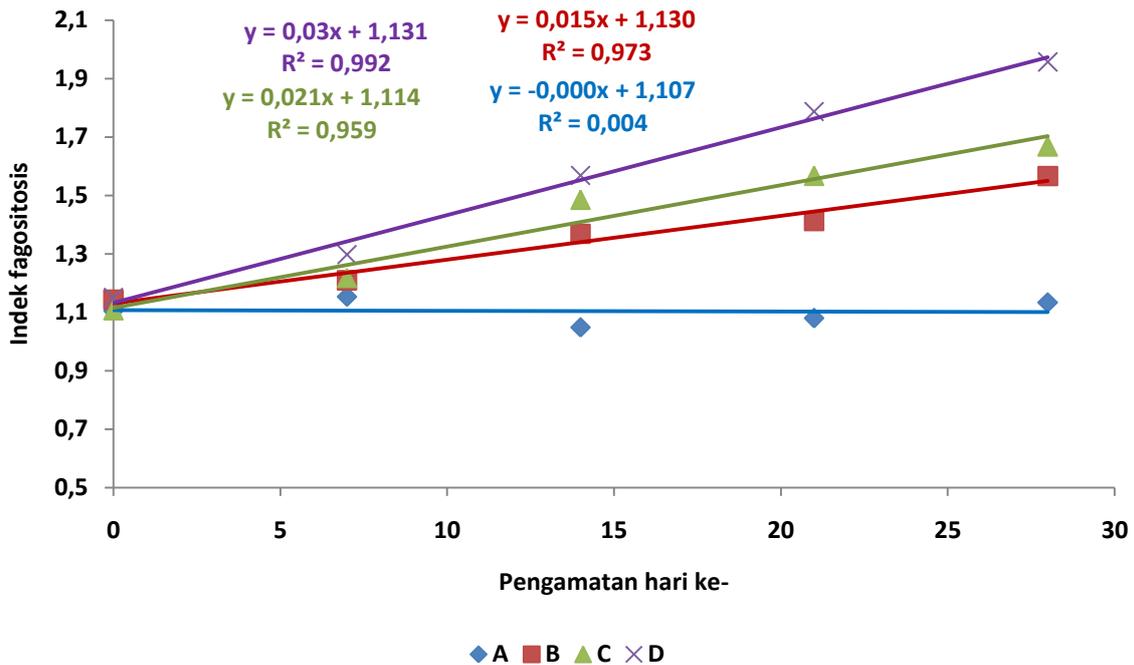


Gambar 5. Histogram Indeks Fagositosis (IF)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Huruf yang berbeda pada histogram di hari yang sama menunjukkan bahwa memiliki nilai IF yang berbeda secara signifikan ($P < 0,05$).

Berdasarkan data indeks fagositosis perlakuan A dari awal penelitian hingga akhir memiliki pola regresi linier sederhana positif dengan persamaan $Y = -0,001x + 1,109$ dengan nilai $R^2 = 0,004$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan A pada hari ke-7 mengalami kenaikan indeks fagositosis sebesar 4,3 %, pada hari ke-14 mengalami penurunan sebesar -9,1 %, pada hari ke-21 mengalami kenaikan sebesar -3% dan pada hari ke-28 mengalami kenaikan sebesar 5 %.

Data indeks fagositosis perlakuan B selama penelitian memiliki pola regresi $Y = 0,104x + 1,025$ dan $R^2 = 0,973$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan B pada hari ke-7 mengalami peningkatan indeks fagositosis sebesar 5,8 %, pada hari ke-14 meningkat 13,2 %, hari ke-21 meningkat 3,2 % dan hari ke-28 mengalami meningkat 10,9 %.



Gambar 6. Regresi Linier Indeks Fagositosis (IF)

Keterangan: A, B, C, D adalah perlakuan pakan dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Persamaan adalah $Y=a+bx$. R^2 adalah koefisien determinan.

Perlakuan C memiliki nilai IF selama penelitian meningkat linier dengan persamaan $Y=0,147x + 0,967$ dan $R^2= 0,959$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan C pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 secara berturut-turut sebesar 10; 21,9; 5,5 dan 6,4 %. Indeks fagositosis perlakuan D di awal hingga akhir penelitian memiliki pola regresi $Y=0,210x + 0,921$ dan $R^2= 0,992$. Berdasarkan persamaan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan D pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 mengalami kenaikan indeks fagositosis secara terus menerus dengan nilai sebesar 12,8; 20,9; 13,9 dan 9,5.

Berdasarkan gambar 6 menunjukkan bahwa pada hari ke-7 nilai IF tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 56, 548; 7,281 dan 12,535 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 0,689 dan 5,619 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 4,897 %. nilai IF pada hari ke-14 tertinggi dimiliki oleh

perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 5,630; 14,596 dan 49,628 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 8,488 dan 41,654 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 30,570 %.

Nilai IF tertinggi pada hari ke-21 dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 14,037; 26,516 dan 65,530 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 10,943 dan 45,155 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 30,838 %. Berdasarkan gambar 6 menunjukkan bahwa pada hari ke-28 nilai IF tertinggi dimiliki oleh perlakuan D. Respon perlakuan D berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan C, B dan A sebesar 17,368; 24,950 dan 72,633 %. Sedangkan perlakuan C berbeda lebih tinggi terhadap perlakuan B dan A yaitu sebesar 6,641 dan 47,087 %. Sedangkan untuk perlakuan B berbeda lebih tinggi terhadap C yaitu sebesar 38,161 %.

4.2 Pembahasan

4.2.1 *Total Hemosit Count (THC)*

Ekstrak sodium alginat dalam penelitian ini diberikan bertujuan untuk merangsang atau memperbaiki fungsi atau mekanisme sistem ketahanan udang sehingga bisa lebih merespon patogen yang masuk tubuh udang. Udang mempunyai sistem imun innate (alami) yang cepat dan efisien sebagai pelindung dari mikroorganisme invasi (Lee and Söderhäll 2002). Pengamatan pada total hemosit (THC) pada hari ke-0 memiliki nilai yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$) yaitu secara berurutan perlakuan A, B, C, D adalah $7,97^{ab}$; $8,17^{ab}$; $7,82^a$ dan $8,97^b \times 10^8$ sel/ml, hal ini menunjukkan bahwa di awal penelitian ini udang yang memiliki ukuran bobot yang homogen juga memiliki nilai imun THC yang homogen. Udang yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kondisi morfologi dan

kesehatan yang baik. Hennig *et al.*, (1998) dalam Song *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa nilai THC pada udang putih tanpa perlakuan adalah $6,4 - 7,3 \times 10^8$ sel/L.

Pengamatan pada total hemosit (THC) hari ke-7, 14 dan 21 pada perlakuan A dan B memiliki nilai THC yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$), sedangkan pada hari ke-28 perlakuan B berbeda lebih tinggi secara signifikan ($p \geq 0,05$) dari pada perlakuan A. Hal ini diduga pemberian perlakuan pakan tersuplemen sodium alginat 1 % merupakan konsentrasi yang rendah sehingga memerlukan waktu untuk akumulasi. Setelah terakumulasinya senyawa imunostimulan alginat pada udang sehingga mampu menstimulasi produksi THC. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa diperlukan konsentrasi atau dosis yang cukup untuk mampu menstimulasi sistem imun udang secara baik. Selain itu konsentrasi sodium alginat yang digunakan juga menentukan waktu respon stimulan imun udang, yaitu semakin rendahnya konsentrasi sodium alginat maka respon stimulasi imun juga semakin lama atau sebaliknya semakin tinggi konsentrasi sodium alginat maka respon stimulasi imun juga semakin cepat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa imunostimulan tertentu misalnya β -glukan, peptidoglikan dan polisakarida (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000; Cheng *et al.* 2004).

Alginat merupakan polisakarida yang didapatkan dari rumput laut coklat. Dikemukakan oleh Castro *et al.* (2006) bahwa dinding sel rumput laut berisi matrix polisakarida yang berlimpah yang dibentuk oleh gula netral dan gula asam yang juga ditemukan pada tumbuhan darat. Namun rumput laut juga mengandung polisakarida bersulfat, yang tidak terdapat pada tumbuhan darat (Percival 1979; Kloareg and Quatrano, 1988). Dengan demikian gula terbentuk dan dengan adanya kelompok sulfat diikuti pembentukan sejumlah molekul dengan bentuk dan fungsi biologis yang berbeda termasuk antiviral, antikoagulasi, antitumor dan aktifitas *immunomodulatory* pada mamalia (Castro *et al.* 2006).

Pengamatan pada total hemosit (THC) perlakuan A menunjukkan bahwa pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 memiliki nilai THC yang cenderung sama yaitu sebesar 7,97^{ab}; 9,80^a; 10,27^a; 9,97^a dan 10,50^a x 10⁸ sel/L. Hal ini dikarenakan perlakuan yang diberikan adalah pakan dasar yang tanpa disuplementasi dengan sodium alginat. Sehingga, imun udang perlakuan tersebut tidak mengalami stimulasi.

Berdasarkan data THC udang selama penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian pakan tersuplementasi sodium alginat yang semakin lama dapat memberikan nilai THC yang semakin tinggi. Selama penelitian atau setelah pemberian ekstrak terlihat bahwa terjadi peningkatan jumlah hemosit untuk udang yang diberi ekstrak sodium alginat, bila dibandingkan dengan udang kontrol (tanpa pemberian ekstrak). Peningkatan hemosit tersebut terjadi dari hari ketujuh hingga akhir penelitian. Peningkatan jumlah hemosit udang ini menunjukkan bahwa ekstrak sodium alginat mampu untuk meningkatkan respon imun. Hal ini juga mengindikasikan bahwa ekstrak sodium alginat mampu merangsang pembentukan sel-sel hemosit yang kemudian dilepaskan ke dalam hemolim udang. Hal itu juga disampaikan Hou and Chen, (2005) bahwa pemberian ekstrak rumput laut pada udang vaname memberikan peningkatan THC pada hari pertama (Hou and Chen, 2005). Demikian juga pemberian ekstrak polysakarida meningkatkan THC pada hari pertama pada dosis ekstrak yang lebih tinggi (6 µg/g bobot udang) (Fu *et al.* 2007).

Hemosit pada udang sama pentingnya seperti halnya sel darah merah dan putih pada ikan. Pentingnya total haemocyte count (THC) pada krustasea dalam resistensi patogen, dimana bila terjadi penurunan THC maka bisa terjadi infeksi akut yang dapat menyebabkan kematian (Rondriguez and Le Moullac, 2000). THC meningkat maka akan meningkatkan kemampuan untuk memfagositosis karena diproduksi banyak sel hemosit untuk melakukan fungsi tersebut, misalnya sel hialin dan sel semi granular. Peningkatan THC juga menjadikan

daya peningkatan sel granular untuk melakukan aktifitas phenoloxidase sehingga udang dapat bertahan terhadap serangan bakteri.

Hemosit udang memegang peran yang penting dalam respon imun diataranya adalah melalui recognition, phagocytosis, melanization, cytotoxicity dan komunikasi antar sel (Smith *et al.*, 2003). Sehingga salah satu parameter kemampuan suatu zat atau senyawa untuk menstimulasi sistim pertahanan nospesifik udang adalah melalui peningkatan jumlah Hemosit. Hasil penelitian penghitungan jumlah total hemosit udang putih (Tabel 4) menunjukkan bahwa ekstrak dan powder *Halimeda sp* yang digunakan dalam penelitian ini dapat menstimulasi peningkatan jumlah total hemosit udang putih. Hennig *et al.*, (1998) dalam Song *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa nilai THC pada udang putih tanpa perlakuan adalah $0,164 - 0,73 \times 10^7$ sel/L. Nilai THC pada udang dengan perlakuan lebih tinggi dari THC pada udang kontrol, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak memberikan pengaruh positif terhadap kesehatan udang karena perubahan dalam THC. Penelitian yang sama dibidang imunostimulant nonspesifik pada tubuh udang putih telah dilakukan oleh Selvin *et al.*, (2004), yaitu menggunakan ekstrak *Ulva* dan ekstrak *Dendrilla* yang dapat meningkatkan THC masing-masing sampai 6725 dan 6200 sel / mL. Demikian juga terhadap diferensiasi Hemosit terjadi perubahan prosentase sebagai respon aplikasi ekstrak. Penelitian lain yang telah dilakukan menunjukkan respon imun udang dapat ditingkatkan melalui aplikasi glukukan (Chang *et al.*, 2000) dan peptidoglikan (Takahashi *et al.*, 2000).

Beberapa hal yang mempengaruhi kemampuan suatu ekstrak untuk menstimulasi sistem pertahanan tubuh nonspesifik berdasarkan hasil penelitian diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Zat aktif atau senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak dan powder *Halimeda sp* memang tidak mempunyai aktivitas menstimulasi sistim pertahanan tubuh;

2. Zat atau senyawa aktif berada dalam jumlah yang lebih kecil dari jumlah minimal yang diperlukan untuk memunculkan efek imunostimulant, atau bahkan sebaliknya dosis terlalu tinggi sehingga tidak memberikan efek atau berperilaku sebagai inhibitor. Imunostimulan meningkatkan respon imun dan mengembangkan proteksi terhadap infeksi patogen dipengaruhi oleh dosis aplikasi. Robertsen *et al.*, (1994) dalam Sakai (1999) melaporkan aktivitas respiratory burst ditingkatkan oleh glucan-treated macrophages pada konsentrasi maksimal 0.1–1 mg/ml, sedangkan pada konsentrasi 10 mg/ml tidak menunjukkan efek yang muncul dan pada konsentrasi 50 mg/ml glucan bersifat inhibitor. Hasil penelitian Lee & Shiau (2004) menunjukkan bahwa jumlah THC *P. monodon* secara nyata dipengaruhi oleh konsentrasi vitamin E yang diberikan. Ini menunjukkan bahwa respon imunostimulasi ditentukan oleh konsentrasi imunostimulan. Pemberian imunostimulan pada konsentrasi dibawah nilai minimal untuk terjadinya respon imun tidak akan memberikan pengaruh pada peningkatan THC;
3. Zat atau senyawa aktif berada dalam bentuk yang tidak dapat diabsorpsi dari sistim pencernaan. Suatu zat atau senyawa aktif akan menunjukkan aktivitasnya kalau zat atau senyawa aktif itu dapat sampai di lokasi targetnya. Zat atau senyawa aktif akan dapat mencapai lokasi target hanya kalau dapat diserap oleh darah dari saluran pencernaan untuk selanjutnya dibawa atau ditransfer ke tempat zat atau senyawa itu akan memberikan efek aktivitasnya. Hasil penelitian Lee & Shiau (2004) mengenai percobaan aplikasi vitamin C sebagai imunostimulan pada udang windu menunjukkan bahwa THC dalam haemolymph *P. monodon* meningkat secara signifikan akibat aplikasi vitamin C secara oral. Efek imunostimulan terhadap peningkatan THC ini dipengaruhi oleh ketersediaan vitamin C. Dalam percobaan Lee & Shiau (2002) vitamin C yang diberikan pada udang windu dalam bentuk tidak stabil sehingga sulit untuk diabsorpsi dalam saluran pencernaan.

4.2.2 Aktivitas Fagositosis

Organisme krustasea akuatik yang hidup pada lingkungan budidaya (akuakultur) baik pada habitat air tawar, air laut maupun payau sering rentan terkena infeksi baik oleh parasit maupun patogen lainnya. Oleh karena itu krustasea tersebut harus mampu meningkatkan pertahanan yang efisien untuk melawan organisme penyerang. Pertahanan krustasea sebagian besar berdasarkan pada aktifitas sel darah atau hemosit. Sel ini bisa menghilangkan partikel asing pada tubuh krustasea akuatik melalui aktifitas fagositosis atau enkapsulasi. Selain itu juga penutupan luka yang cepat untuk mencegah keluarnya hemolim dan juga untuk mencegah mikroorganismemenempel pada luka, juga ada reaksi pada pertahanan krustasea yang disebut *clotting* (Söderhälland and Cerenius, 1992).

Fagosit hemosit (makrofage pada hewan tingkat tinggi) merupakan sel *kompten immunology* yang tertua dan sangat konsisten. Untuk mengaktifkan imunologi, hemosit ini harus melewatikeadaan aktifasi dimana termasuk perubahan morfologi tertentu. *Hemosit* yang tidak diaktifkan cenderung untuk terlihat halus dan membulat, sementara *Hemosit* yang aktif berserat (*crenellated*) dan *may extrude pseudopods* (mempunyai kaki semu) yang digunakan untuk menangkap dan fagositosis (mencerna) patogen.

Parameter respon imun selain ditunjukkan oleh nilai THC juga ditunjukkan oleh aktivitas fagositosis. Aktivitas fagositosis merupakan salah satu cara yang sangat penting dalam mengendalikan dan menghancurkan partikel-partikel asing. Pengamatan pada aktifitas fagositosis (AF) pada hari ke-0 memiliki nilai yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$) yaitu secara berurutan perlakuan A, B, C, D adalah 22^a; 23^a; 24^a dan 24^a %, hal ini menunjukkan bahwa di awal penelitian ini udang yang memiliki ukuran bobot yang homogen juga memiliki nilai AF yang homogen. Kondisi kesehatan udang pada ukuran dan kondisi lingkungan media yang sama cenderung memiliki morfologi dan kesehatan yang homogen. Kondisi ini terjadi karena lingkungan media hidup mendukung dan pada kondisi optimal

untuk berlangsungnya kehidupan udang tersebut. Perlakuan A dari awal penelitian hingga akhir penelitian memiliki nilai AF yang tidak meningkat signifikan yaitu pada hari ke- 0, 7, 14, 21 dan 24 sebesar 22^a, 23^a, 24^a, 25^a dan 24^a %. Hal ini dikarenakan perlakuan yang diberikan adalah pakan dasar yang tanpa disuplementasi dengan sodium alginat. Sehingga, imun udang perlakuan tersebut tidak mengalami stimulasi.

Nilai aktifitas fagositosis (AF) hari ke 7 memiliki nilai respon AF yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$) yaitu secara berurutan perlakuan B, C, D adalah 29^b; 29^b dan 29^b %. Hal ini diduga bahwa konsentrasi sodium alginat pada pakan yang diberikan belum cukup terakumulasi di tubuh sehingga stimulasi aktifitas fagositosis udang belum terjadi secara signifikan antar perlakuan tersebut.

Berdasarkan data AF udang selama penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian pakan tersuplementasi sodium alginat yang semakin tinggi konsentrasi maka dapat memberikan nilai AF yang semakin tinggi. Selain itu juga yang semakin lama pakan suplemen sodium alginat yang diberikan maka dapat memberikan nilai AF yang semakin tinggi pula dengan nilai kelulus hidupan yang tinggi. Sodium alginat merupakan ekstrak polisakarida yang didapatkan dari rumput laut *Sargassum* sp. Kegunaan struktur molekul polisakarida dalam aktifitas *immunomodulatory* telah diketahui dari beberapa penelitian. Polisakarida dari beberapa spesies rumput laut dapat menstimulasi aktifitas *respiratory burst* dari fagosit turbot, proses yang berperan penting dalam membunuh mikroba (Castro *et al.* 2006). Ditambahkan juga bahwa metabolit primer yang umumnya merupakan senyawa polisakarida dan bersifat “hidrokoloid” seperti karaginan, agar, alginat dan furcellaran digunakan sebagai senyawa “additive” dalam industri farmasi. Metabolit primer asam amino sebagai sumber gizi, serta metabolit sekunder yang merupakan senyawa “*bioactive substances*” dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai obat (Angadiredja dkk. 1996).

Pemberian ekstrak sodium alginat diasumsikan mampu meningkatkan kemampuan koordinasi dan komunikasi antar sel imun udang vaname sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname lebih baik. Dimana, jika terjadi infeksi bakteri patogen, maka bakteri tersebut akan dikenal kemudian hemosit semi granular dan granular melepaskan sistem proPO yang diaktifkan. Selanjutnya dilepaskannya peroxinectin yang dapat menstimulasi peningkatan aktifitas fagositosis oleh sel hialin atau enkapsulasi oleh sel semi granular. Selain itu juga dihasilkan sejumlah protein antimikroba (Cerenius and Söderhäll, 2004).

Proses pertahanan melalui fagositosis ini secara klasik dibagi menjadi beberapa proses yaitu khemotaksis, recognition dan internalisation (Bachere *et al.* 1995). Nilai aktivitas fagositosis pada udang putih *L. Vannamei* dengan perlakuan ekstrak dan powder *Halimeda sp* mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan pada kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak berpengaruh meningkatkan kemampuan fagositosis dari udang. Cheng *et al.* (2004) mengemukakan bahwa aktivitas fagositosis udang windu yang diberi pakan mengandung 0,5; 1,0; dan 2,0 µg/g sodium alginat secara signifikan lebih tinggi dari udang kontrol. Aktivitas fagositosis adalah 9,9%, 21,5%, 19,3% dan 29,4% untuk udang windu yang diberi pakan mengandung sodium alginat. Peningkatan nilai AF tersebut sesuai dengan pernyataan Takahashi *et al.* (2000) bahwa *P. japonicus* setelah tujuh hari diberi lipopolisakarida (LPS) pada dosis 20 mg/kg berat tubuh mengalami peningkatan nilai indeks fagositosis. Peningkatan nilai AF diduga disebabkan oleh peningkatan kemampuan sel fagosit yang aktif untuk mencerna bakteri.

Proses fagositosis merupakan proses menelan dan mencernakan partikel benda asing yang masuk ke dalam tubuh (sel mikroba yang utuh, partikel yang tidak dapat larut, jaringan yang luka dan rusak serta sisa-sisa sel) yang dilakukan secara aktif oleh sel-sel khusus (sel fagosit) yaitu : neutrofil dan granulosit lain, makrofag (di jaringan limfoid sekunder) dan *non-*

specific cytotoxic cells (NCC). Post (1983) dalam Desrina (2007) menyatakan bahwa fagositosis disebut juga pertahanan seluler kekebalan non-spesifik. Nilai fagositosis ditunjukkan dengan nilai indeks fagositosis dan aktifitas fagositosis.

Aktivitas Fagositosis adalah kemampuan sel respon imun non-spesifik untuk fagositosis agen penyakit yang masuk ke dalam tubuh. Peningkatan aktifitas fagositik ini dapat ditingkatkan antara lain dengan pemberian imunostimulan (Johnny *et al.*, 2001). Aktifitas fagositosis merupakan salah satu cara yang sangat penting dalam mengendalikan dan menghancurkan partikel asing. Proses pertahanan melalui fagositosis ini dibagi menjadi beberapa proses yaitu : kemotaksis, recognition, dan internalization (Bachere *et al.* 1995). Hemosit melakukan reaksi inflamatory seperti fagositosis, haemocyte clumping, produksi reaktif oxygen metabolites dan pelepasan mikrobisidal protein. Menurut Yeh *et al.* (2006) fagositosis dipengaruhi oleh waktu aplikasi imunostimulan. Selain itu penurunan IF diduga kemampuan sel untuk mencerna bakteri menurun atau mungkin sel membutuhkan waktu lebih lama untuk menimbulkan proses fagositosis dalam menghilangkan bakteri yang ada dalam haemolimph.

4.2.3 Indeks Fagositosis

Pengamatan pada indek fagositosis (IF) pada hari ke-0 dan 7 memiliki nilai yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$) yaitu pada hari ke 0 secara berurutan perlakuan A, B, C, D adalah 1,105^a ; 1,144^a ; 1,107^a dan 1,151^a. Sedangkan pada hari ke 7 adalah 1,153^a; 1,210^a; 1,218^a dan 1,298^a. Hal ini menunjukkan bahwa di awal penelitian ini udang yang memiliki ukuran bobot yang homogen juga memiliki nilai IF yang homogen. Sedangkan nilai IF pada hari ke 7 yang tidak berbeda signifikan ini diduga karena diperlukan konsentrasi yang cukup dan akumulasi senyawa yang cukup pada udang untuk dapat meningkatkan IF udang.

Perlakuan A dari awal penelitian hingga akhir penelitian memiliki nilai IF yang tidak meningkat signifikan yaitu pada hari ke- 0, 7, 14, 21 dan 24 sebesar 1,105^a, 1,153^a, 1,048^a, 1,080^a dan 1,134^a. Hal ini dikarenakan perlakuan yang diberikan adalah pakan dasar yang tanpa disuplementasi dengan sodium alginat. Sehingga, imun udang perlakuan tersebut tidak mengalami stimulasi.

Nilai indek fagositosis (IF) hari ke 14 memiliki nilai respon IF yang tidak berbeda secara signifikan ($p \geq 0,05$) yaitu secara berurutan perlakuan B, C, D adalah 1,369^b; 1,485^b dan 1,569^b. Hal ini diduga bahwa konsentrasi sodium alginat pada pakan yang diberikan belum cukup terakumulasi di tubuh sehingga stimulasi aktifitas fagositosis udang belum terjadi secara signifikan antar perlakuan tersebut.

Sodium alginat merupakan agen imunostimulan yang didapatkan dari rumput laut sargassum sp. Pemanfaatan rumput laut ini sudah banyak dilakukan baik sebagai obat, bahan makanandan industri. Salah satu manfaat yang kini diperhatikan adalah pemanfaatan rumput laut sebagai bahan imunostimulan pada budidaya udang. Kandungan utama rumput laut sargassum sp. Adalah polisakarida (Dirjen, 2005). Bahan dalam rumput laut yang mempunyai kemampuan menstimulasi adalah adanya polisakarida bersulfat. Dengan adanya kelompok sulfat ini maka terbentuknya sejumlah molekul dengan fungsinya masing-masing salah satunya sebagai *immunomodulatory activities* pada mamalia (Castro *et al.* 2006). Kandungan sulfat dari ekstrak rumput laut berkisar antara 3,25 – 4,79%. Selain itu pula beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa polisakarida rumput laut dapat menstimulasi sistem imun ikan dan juga dapat memodifikasi resistensi ikan terhadap penyakit.

Berdasarkan data IF udang selama penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian pakan tersuplementasi sodium alginat yang semakin tinggi konsentrasi maka dapat memberikan nilai IF yang semakin tinggi. Selain itu juga yang semakin lama pakan suplemen

polisakarida sodium alginat yang diberikan maka dapat memberikan nilai IF yang semakin tinggi pula.

Ekstrak polysakarida dapat menstimulasi fagositosis dan respiratory burst pada makrofage tikus baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Yoshizawa *et al.* 1996). Karagenan, polisakarida bersulfat yang diperoleh dari alga merah, memicu leukosit tikus untuk memproduksi TNF- α sebagai respon terhadap lipopolisakarida bakteri (Ogata *et al.* 1999). Walaupun demikian beberapa tipe dari karagenan terlihat merusak fungsi dari makrofag (Schmidt *et al.* 1993). Agar merupakan polisakarida campuran yang terdapat dalam matrix sel dari alga merah (Rhodophyta). Polisakarida rumput laut diketahui juga mempunyai aktifitas *antimicrobial* pada ikan terhadap beberapa jenis bakteri (Bansemir *et al.* 2006).

Peningkatan indeks fagositik mengindikasikan bahwa ekstrak sodium alginat mampu meningkatkan indeks fagositik sel-sel fagosit. Sel yang berperan besar dalam proses fagositik ini merupakan sel hialin. Pemberian ekstrak sodium alginat meningkatkan daya tahan terhadap penyakit infeksi, bukan karena meningkatnya respon imun spesifik tapi oleh meningkatnya mekanisme pertahanan non spesifik (Sakai, 1999) atau dengan kata lain ekstrak sodium alginat dapat menstimulasi sistem ketahanan udang vaname. Awalnya bila bakteri masuk dalam tubuh udang maka akan segera dikenali oleh plasma dan diikat. Kemudian terjadi respon pada sel semi granular dan granular dengan melepaskan sistem proPO yang diaktifkan, yang meliputi *cell-adhesive* dan *opsonic protein*, peroxinectin. Selanjutnya dapat menstimulasi fagositosis oleh sel hialin atau enkapsulasi oleh sel semi granular (Söderhäll dan Cerenius, 1998; Johansson *et al.*, 1995; Thornqvist *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1990).

Peningkatan nilai AF dan IF tersebut sesuai dengan pernyataan Takahashi *et al* (2000) bahwa *P. japonicus* setelah tujuh hari diberi lipopolisakarida (LPS) pada dosis 20 mg/kg berat tubuh mengalami peningkatan nilai indeks fagositosis. Peningkatan nilai IF diduga

disebabkan oleh peningkatan kemampuan sel fagositosis untuk mencerna bakteri. Menurut Anderson (1996) dalam Johnny *et al.* (2001) mekanisme kerja imunostimulan diduga dengan cara meningkatkan aktifitas fagositosis yaitu suatu kemampuan sel respon imun nonspesifik untuk memfagosit agen penyakit yang masuk kedalam tubuh.

Pemberian rumput laut ini dapat meningkatkan nilai hematokrit, jumlah leukosit, persentase monosit, neutrofil, limfosit dan indeks fagositosis. Peningkatan jumlah leukosit dan persentase monosit, neutrofil dan limfosit dipengaruhi oleh dosis, waktu pemberian dan patogen. Nilai aktifitas fagositosis dan indeks fagositosis udang *L. Vannamei* dengan perlakuan mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak sodium alginat mempengaruhi aktifitas dan indeks fagositosis. Cheng *et al.* (2004) mengemukakan bahwa aktifitas fagositosis udang yang diberi pakan 0,5 : 1,0 dan 2,0 $\mu\text{g}/\text{gr}$ sodium alginat secara signifikan lebih tinggi daripada udang kontrol. Yeh *et al.* (2006) menyatakan bahwa aktifitas fagositosis dipengaruhi oleh konsentrasi dari ekstrak air panas *Sargassum duplicatum* dan waktu aplikasi. Aktifitas fagositosis tertinggi dicapai pada perlakuan dosis 20 $\mu\text{g}/\text{gr}$ pakan pada hari ke-dua yaitu sebesar 35%.