

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan media NA

Cara kerja

1. Nutrient agar sintetis sebanyak 3,9 g dicampurkan dalam 100 ml akuades.
2. Media dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*.
3. Media disetrilisasikan menggunakan *autoclaf* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
4. Media dimasukan ke dalam tabung reaksi dengan volume 10 ml (sesuai kebutuhan).
5. Media disimpan di dalam kulkas sampai waktu yang akan digunakan.

Lampiran 2. Pembuatan media NB

Cara kerja

1. Nutrient broth sintetis sebanyak 1,3 g dicampurkan dalam 100 ml akuades.
2. Media dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*.
3. Media disetrilisasikan menggunakan *autoclaf* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
4. Media dimasukan ke dalam tabung reaksi dengan volume 10 ml (sesuai kebutuhan).
5. Media disimpan di dalam kulkas sampai waktu yang akan digunakan.

Lampiran 3. Pembuatan media SWC

Cara kerja pembuatan SWC padat

1. Bacto pepton sebanyak 0,5 g, yeast ekstrak 0,1 g, gliserol 0,3 ml dicampurkan ke dalam 75 ml air laut dan ditambah 25 ml air tawar.
2. Larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer*.
3. Larutan disterilisasikan menggunakan *autoclaf* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
4. Media yang sudah steril dituangkan dalam tabung reaksi 10 ml (agar miring).

Cara kerja pembuatan SWC cair

1. Bacto pepton sebanyak 0,5 g, yeast ekstrak 0,1 g, gliserol 0,3 ml dicampurkan ke dalam 75 ml air laut dan ditambah 25 ml air tawar.
2. Larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer*.
3. Larutan disterilisasikan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
4. Media yang sudah steril dituangkan dalam tabung reaksi 10 ml (sesuai kebutuhan).

Lampiran 4. Pembuatan Giemsa

Cara kerja

1. Cairan Giemsa dilarutkan dalam air dengan pH 7,2 dengan perbandingan 1:20.
2. Larutan dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 5 menit.

Lampiran 5. Pembuatan Larutan Turk

1. Asam asetat glasial sebanyak 0,5 ml dan larutan kristal violet 1 % sebanyak 1 ml dicampurkan ke dalam 100 ml akuades.
3. Larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer*.

Lampiran 6. Pengamatan Titer Antibodi

Cara kerja

1. Serum darah ikan sampel sebanyak 25 μ l dimasukkan ke dalam tabung mikrotiter pada sumur 1 dan 2.
2. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak 25 μ l dimasukkan ke dalam tabung mikrotiter pada sumur 1-12
3. Mikrotiter berisi serum darah dan PBS dihomogenkan dengan cara digoyangkan membentuk angka delapan selama tiga menit.
4. Mikrotiter berisi serum darah dan PBS yang telah dihomogenkan diinkubasi selama satu malam dalam refrigerator.
5. Titer antibodi diamati dengan melihat kabut putih yang terbentuk pada masing-masing sumur.

Lampiran 7. Pengamatan hematokrit

Cara kerja

1. Darah ikan sampel dimasukan ke dalam pipa kapiler sebanyak $\frac{3}{4}$ volume pipa kapiler.
2. Pipa kapiler ditutup menggunakan plastisin dan dibungkus menggunakan tissue.

3. Pipa kapiler *disentrifuge* selama 15 menit dan diamati total hematokrit yang terbentuk.

Lampiran 8. Pengamatan total leukosit

Cara kerja

1. Sampel darah ikan sebanyak 0,5 ml dan larutan hayem dimasukkan ke dalam alat hisap eritrosit (kapiler merah).
2. Alat hisap yang sudah terisi sampel darah dan larutan hayem dibuang 2 tetes guna menghilangkan gelembung
3. Sampel darah diteteskan di kamar hitung sebanyak 1 tetes untuk diamati di mikroskop
4. Hasilnya dihitung menggunakan rumus total leukosit

Lampiran 9. Pengamatan difernsial leuksit

Cara kerja

1. Gelas objek yang akan digunakan dibersihkan dengan alkohol 70%
2. Darah diteteskan pada ujung gelas objek lalu dihapus kearah depan dengan sudut 45°C.
3. Preparat darah didiamkan sampai kering pada suhu kamar, difiksasi dengan metanol absolut ± 5 menit dengan cara memasukan gelas objek ke dalam beker gelas yang telah diisi metanol absolut sampai semua apusan darah terendam dalam metanol.
4. Preparat dikeringkan dalam suhu kamar. Setelah kering preparat diwarnai dengan larutan Giemza selama 20 menit.

5. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dalam suhu kamar dan diamati di bawah mikroskop.