

**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN SEMBUNG (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)
TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)
YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Oleh:
MUHAMMAD CHARIS FIRMANSYAH
NIM. 125080500111046**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN SEMBUNG (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)
TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)
YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh:
MUHAMMAD CHARIS FIRMANSYAH
NIM. 125080500111046



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

SKRIPSI
PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN SEMBUNG (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)
TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)
YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh:
MUHAMMAD CHARIS FIRMANSYAH
 NIM. 125080500111046

telah dipertahankan didepan penguji
 pada tanggal 20 Juli 2016
 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

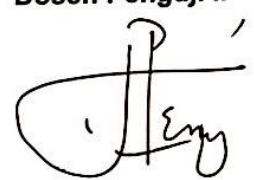
Dosen Penguji I


(Dr. Ir. Maftuch, M.Si)
 NIP. 19660825 199203 1 001
 Tanggal: 28 JUL 2016

**Menyetujui,
 Dosen Pembimbing I**


(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)
 NIP. 19611106 198602 2 001
 Tanggal: 28 JUL 2016

Dosen Penguji II


(Ir. Heny Suprastyani, MS)
 NIP. 19620904 198701 2 001
 Tanggal: 28 JUL 2016

Dosen Pembimbing II


(Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc)
 NIP. 19621014 198702 1 001
 Tanggal: 28 JUL 2016

**Mengetahui,
 Ketua Jurusan MSP**

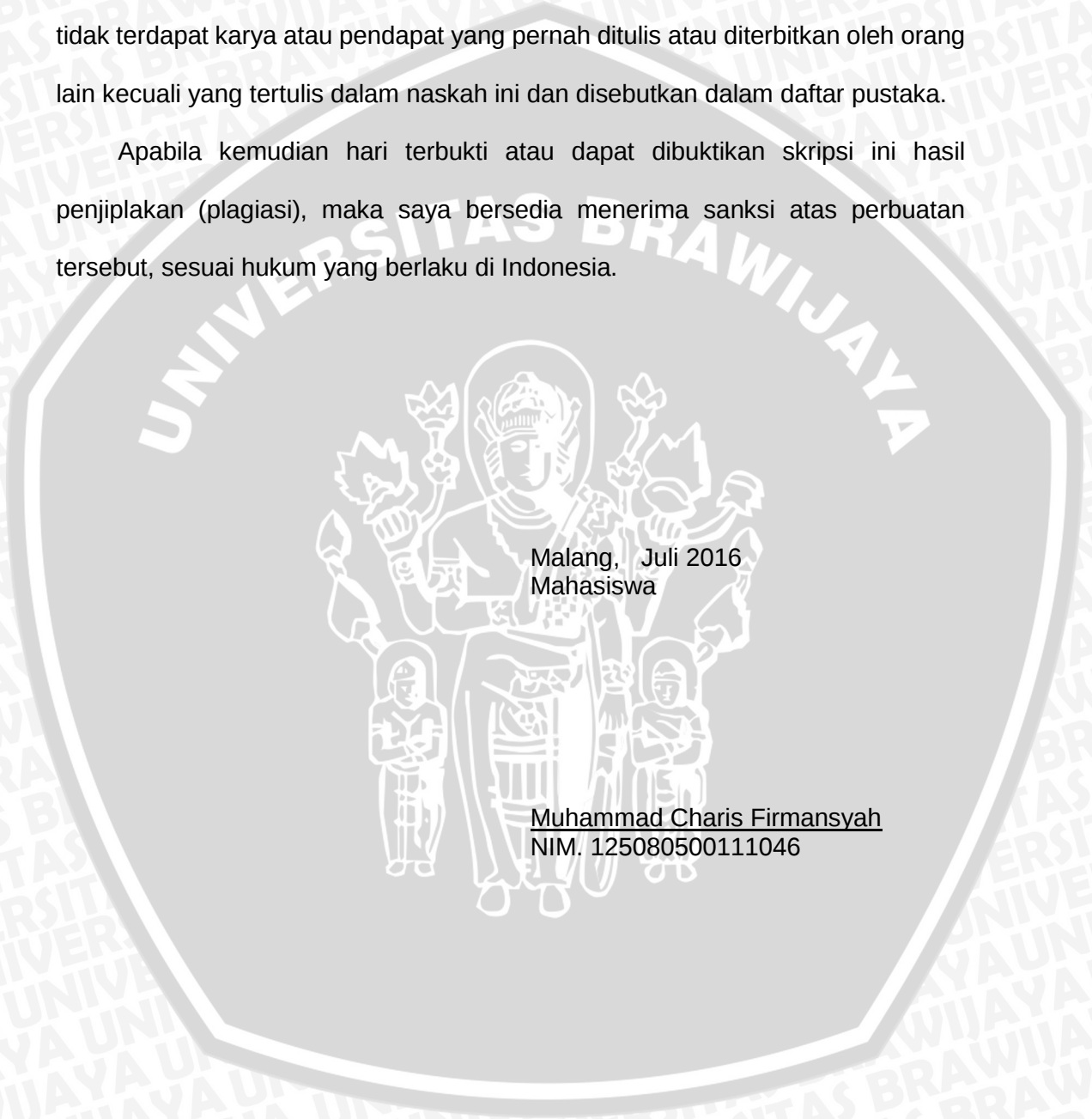

(Dr. Ir. Arning W. Ekawati, MS)
 NIP. 19620805 198603 2 001
 Tanggal: 28 JUL 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Juli 2016
Mahasiswa

Muhammad Charis Firmansyah
NIM. 125080500111046

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya pelaksanaan dan pelaporan penelitian ini dapat diselesaikan. Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Syamsul Ma'arif dan Ibu Siti Karomah serta Mbah (Ibu Hj. Sa'adah) dan kakak maupun adek yang selalu mendoakan, memberi semangat dan motivasi kepada penulis.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Bapak Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis.
3. Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si dan Ibu Ir. Heny Supratyani, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis.
4. Ibu Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang memberi motivasi kepada penulis.
5. Pak Udin, Pak Yit dan MbK Titin atas semua bantuan yang telah diberikan.
6. Semua Tim Sembung (Muhammad Afiffudin El Moslem, Kiki Nur Fitriana dan Rahman Bangun Suprayogi) yang telah membantu dalam proses penelitian berlangsung.
7. Teman-teman seperjuangan Pandawa Candi "Syamsudin, Ummami, Arfan dan Maz.el" serta Luqman dan da'ul yang memberi motivasi kepada penulis.
8. Happy Family (Yusuf, Mega, Ayun, Farid, Safira, Ria dan Solikhin) yang memberi motivasi kepada penulis.
9. Semua keluarga besar AQUASEAN BP'12 yang menemani penulis dan berjuang bersama dari awal hingga akhir demi mencapai gelar "S.Pi".

Malang, Juli 2016

Penulis

RINGKASAN

MUHAMMAD CHARIS FIRMANSYAH. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) Terhadap Histopatologi Insang Ikan Nila (*O. niloticus*) yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila* (dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**).

Budidaya ikan nila (*O. niloticus*) selama ini masih terganggu pada penggunaan bahan kimia dan obat-obatan antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam penanggulangan penyakit menunjukkan hasil yang menggembirakan, akan tetapi penggunaan antibiotik yang berkepanjangan dapat berdampak yaitu bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan dapat mencemari lingkungan. Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteri alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri, salah satunya adalah dengan penggunaan daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi *A. hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 20 Januari 2016 sampai dengan 21 Maret 2016 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Aisyiah, Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimen, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan, 2 kontrol dan 3 kali ulangan. Perlakuannya yakni ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) A (dosis 500 ppm), B (dosis 600 ppm) dan C (dosis 700 ppm), K(-) (kontrol normal) dan K(+) (kontrol infeksi). Pengambilan jaringan histologi dilakukan pada hari ke-7 setelah infeksi. Analisa data yang digunakan adalah analisa deskriptif dan skoring.

Hasil pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) dengan perlakuan yang berbeda memberi pengaruh terhadap kerusakan jaringan insang ikan nila (*O. niloticus*). Kelainan patologi insang yang terjadi diantaranya adalah hiperplasia, fusi dan nekrosis. Hasil pengamatan gambaran histopatologi insang pada perlakuan C (dosis 700 ppm) mengalami kerusakan jaringan terendah dibanding perlakuan A (dosis 500 ppm) dan B (dosis 600 ppm).

Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) yang terbaik yaitu pada perlakuan C (dosis 700 ppm) karena kerusakan jaringan insang ikan nila (*O. niloticus*) rendah dan strukturnya mengarah pada jaringan normal, namun pada penelitian ini masih perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis optimal terhadap histopatologi insang ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan laporan penelitian yang berjudul “Pengaruh pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) Terhadap Histopatologi Insang Ikan Nila (*O. niloticus*) yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*. Laporan penelitian ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis Menyadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
RINGKASAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
GAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Biologi Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	6
2.1.2 Habitat.....	7
2.2 Bakteri <i>A. hydrophila</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	8
2.2.2 Habitat.....	9
2.2.3 Infeksi Bakteri.....	9
2.3 Daun Sembung (<i>B. balsamifera</i> (L.) DC.).....	10
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	10
2.3.2 Habitat.....	12
2.3.3 Kandungan Senyawa Aktif dan Manfaat.....	12
2.4 Ekstraksi.....	13
2.5 Histopatologi.....	15
2.5.1 Pengertian Insang.....	15
2.5.2 Fungsi Insang.....	16
2.5.3 Pengamatan Histopatologi.....	17
3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Materi Penelitian.....	19
3.1.1 Alat-Alat Penelitian.....	19
3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian.....	19
3.2 Metode Penelitian.....	20
3.3 Rancangan Percobaan.....	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	23
3.4.1 Persiapan Penelitian.....	23

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian	28
3.5 Parameter Uji	31
3.5.1 Parameter Utama	31
3.5.2 Parameter Penunjang	31
3.6 Analisis Data	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Gambaran Histopatologi Insang	33
4.1.1 Histopatologi Insang Ikan Normal dan yang Terinfeksi Bakteri A. <i>hydrophila</i>	33
4.1.2 Gambaran Histopatologi Perlakuan pada Insang.....	34
4.2 Gejala Klinis	44
4.3 Pengamatan Kualitas Air.....	45
5. KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	51



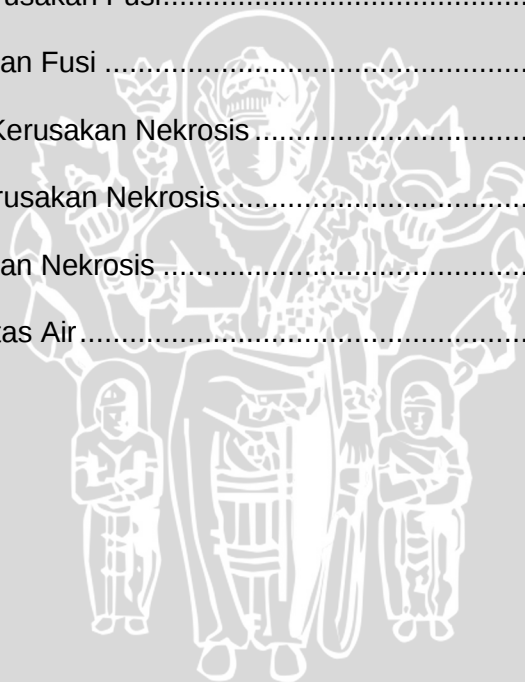
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>	6
2. Bakteri <i>A. hydrophila</i> (Perbesaran 100x)	9
3. Daun Sembung (<i>Blumea balsamifera</i> (L.) DC).....	11
4. Denah Penelitian	23
5. Perhitungan Nilai Skoring	32
6. Histopatologi Insang Normal dan Infeksi.....	33
7. Histopatologi Insang Perlakuan	34
8. Grafik Hubungan antar Dosis dan Nilai Skoring Kerusakan Hiperplasia....	37
9. Grafik Hubungan antar Dosis dan Nilai Skoring Kerusakan Fusi.....	40
10. Grafik Hubungan antar Dosis dan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis	43



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Perlakuan	22
2. Larutan Standar MC Farland	27
3. Rerata Skoring Kerusakan Hiperplasia	35
4. Sidik Ragam Kerusakan Hperplasia	36
5. Uji BNT Kerusakan Hiperplasia	36
6. Rerata Skoring Kerusakan Fusi	38
7. Sidik Ragam Kerusakan Fusi.....	39
8. Uji BNT Kerusakan Fusi	39
9. Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis.....	41
10. Sidik Ragam Kerusakan Nekrosis.....	42
11. Uji BNT Kerusakan Nekrosis	42
12. Parameter Kualitas Air.....	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian.....	51
2. Bahan Penelitian	53
3. Proses Ekstraksi Daun Sembung (<i>B. balsamifera</i> (L.) DC.)	55
4. Penentuan Dosis Perendaman Ikan dengan Ekstrak Kasar Daun Sembung (<i>Blumea balsamifera</i> (L.) DC.)	56
5. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>)	57
6. Perhitungan Kerusakan Jaringan Insang Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>).....	59
7. Data Kualitas Air.....	68
8. Hasil Identifikasi Klasifikasi Daun Sembung	71
9. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>A. hydrophila</i>	72



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Burhanudin (2014), seperti telah kita ketahui bersama bahwa 70 persen dari permukaan bumi ini tertutupi oleh air, sehingga tidak mengherankan jika ditemukan berbagai jenis, morfologi, serta habitat pada ikan. Ikan-ikan ditemukan di berbagai tempat dan habitat yang berbeda. Ikan telah mampu bertahan seiring dengan perkembangan variasi dari tempat hidupnya. Mereka hidup di air tawar yang bersih sampai pada air yang bersalinitas lebih tinggi. Seperti yang terjadi pada semua hewan, ikan juga mempunyai sejumlah penyakit yang bisa menyeranginya, baik yang diakibatkan oleh faktor eksternal seperti, virus, jamur, parasit, bakteri, protozoa, cacing dll, maupun akibat sebagian kecil yang bersifat internal.

Sumber daya yang terdapat di perairan, khususnya di Indonesia, tentu saja memiliki potensi yang besar dan tidak kalah dibandingkan sumber daya yang terdapat di daratan. Wilayah perairan Indonesia lebih luas daripada daratan dan memiliki hasil yang tinggi. Dengan kondisi perairan yang mendukung dan memiliki potensi, maka diperlukan campur tangan manusia untuk melakukan budidaya agar produksi dari sumber daya perairan menjadi optimal (Effendi, 2012).

Potensi produksi budidaya ikan nila di Indonesia cukup besar dilihat dari ketersediaan sumber daya alam. Ikan nila adalah jenis ikan konsumsi air tawar yang telah lama dibudidayakan di Indonesia setelah ikan mas (*Cyrprinus carpio*) dan telah dikembangkan pada lebih dari 85 negara. Ikan nila memiliki beberapa kelebihan dibandingkan ikan budidaya lainnya diantaranya mudah berkembang biak, pertumbuhan cepat, kandungan protein cukup tinggi, ukuran tubuh relatif besar, lebih tahan terhadap penyakit, mudah beradaptasi dengan lingkungan,

harga yang ekonomis, dan memiliki nilai gizi cukup tinggi sebagai sumber protein hewani (Carman dan Sucipto, 2009).

Menurut Rahmaningsih (2016), ikan merupakan sasaran atau inang dari penyakit. Ikan sehat memiliki kemampuan mempertahankan diri dari serangan berbagai penyakit dengan adanya mekanisme pertahanan diri. Kemampuan ikan mempertahankan diri dari serangan penyakit tergantung pada faktor internal ikan seperti kualitas ikan, umur, jenis kelamin dan faktor eksternal seperti asupan nutrisi, padat tebar, pola kultur dan faktor lingkungan. Jika stres atau kondisi lingkungan kurang menunjang, maka ikan akan mengalami penurunan derajat kesehatannya, sehingga menurunkan kemampuannya mempertahankan diri dari serangan penyakit.

Salah satu penentu tingkat keberhasilan budidaya ikan adalah kemampuan petani ikan dalam mengendalikan penyakit dan parasit ikan. Ikan nila (*O. niloticus*) merupakan ikan air tawar yang harga jualnya tinggi tetapi sangat rentan terhadap serangan mikroorganisme, misalnya bakteri. Penggunaan antibiotik dalam penanggulangan penyakit menunjukkan hasil yang menggembirakan, akan tetapi penggunaan antibiotik yang berkepanjangan dapat berdampak yaitu bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan dapat mencemari lingkungan. Selain itu, penggunaan antibiotik dalam budidaya skala besar kurang efisien karena harga antibiotik yang mahal. Sehingga diperlukan alternatif pengganti antibiotik sebagai pengobatan dan pencegahan penyakit yang efektif tetapi murah, tidak menyebabkan resisten terhadap bakteri dan ramah lingkungan.

Menurut Murtidjo (2001), sistem pernafasan ikan pada umumnya berupa insang. Insang ikan memiliki tutup insang, tetapi ada pula yang tidak memiliki tutup insang. Ikan air tawar yang dibudidayakan umumnya memiliki tutup insang. Lengkung insang terdiri atas jaringan tulang rawan dan di dalam lengkung insang terdapat dua buah bangunan rigi-rigi yang berfungsi sebagai alat penyaring

pernafasan. Lengkung insang berwarna keputih-putihan. Lembaran insang tampak berwarna merah dan berbentuk seperti sisir terdiri atas jaringan lunak. Di dalam lembaran insang banyak mengandung pembuluh-pembuluh kapiler pada lembaran-lembaran insang tersebut akan memudahkan pertukaran gas antara darah dan air. Insang merupakan organ utama yang bersentuhan langsung dengan air media tanpa perantara. Hal ini menyebabkan organ insang memiliki tingkat kerusakan paling parah jika terserang oleh bakteri *A. hydrophila*.

Salah satu penyebab utama gagalnya kegiatan budidaya ikan adalah faktor penyakit. Munculnya gangguan penyakit pada budidaya ikan merupakan risiko yang harus selalu diantisipasi. Sering kali penyakit yang menyerang dapat menyebabkan kematian massal ikan budidaya. Pengobatan yang dilakukan selama ini untuk mengatasi serangan penyakit selalu mengandung resiko. Pemberian probiotik secara cermat, terbukti mampu mengobati ikan yang terserang penyakit, terutama serangan patogen. Namun, pemberian antibiotik yang dilakukan secara terus-menerus dapat pula menyebabkan pencemaran lingkungan. Selain itu, terjadi resistensi terhadap bakteri apabila dosis yang digunakan tidak tepat (Afrianto *et al.*, 2015).

Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteri alternatif yang dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, salah satunya adalah dengan penggunaan daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.). Herti dan Maryati (2008), menyatakan bahwa daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) merupakan tumbuhan asal Nepal yang hidup ditempat terbuka sampai tempat yang agak terlindung di tepi sungai, tanah pertanian, atau ditanam dipekarangan dan dapat tumbuh pada tanah berpasir atau tanah yang agak basah. Perbanyakkan dapat dilakukan dengan biji. Tumbuhan ini memiliki senyawa aktif seperti saponin, tanin, serta flavonoid yang dimana zat aktif ini mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Penggunaan antibiotik dan obat-obatan pada ikan dapat mengakibatkan resistensi bakteri terhadap bahan kimia yang digunakan. Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif pengobatan dengan menggunakan bahan alami yang berasal dari tumbuhan (fitofarmaka). Daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) diduga memiliki kandungan senyawa aktif seperti saponin, tanin serta flavonoid dimana senyawa ini mempunyai sifat antibakteri. Insang pada ikan merupakan organ pernafasan yaitu proses pengambilan oksigen dan mengeluarkan karbondioksida, dimana insang mengalami tingkat kerusakan paling parah akibat terserangnya oleh bakteri karena berhubungan langsung dengan air media tanpa perantara. Berdasarkan latar belakang, belum diketahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Berhubungan dengan hal tersebut, maka didapatkan rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu, berapakah dosis terbaik dari pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan penelitian tentang efektivitas ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi *A. hydrophila* memiliki tujuan yaitu, mengetahui dosis terbaik dari pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*

1.5 Waktu dan Tempat

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 20 Januari 2016 sampai dengan 21 Maret 2016 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Aisyiah, Malang.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Trewavas (1980) dalam Suyanto (2010), klasifikasi ikan nila (*O. niloticus*) adalah sebagai berikut:

- Filum : Chordata
- Sub-filum : Vertebrata
- Kelas : Osteichthyes
- Subkelas : Acanthopterigii
- Ordo : Percomorphi
- Sub-ordo : Percoidea
- Famili : Cichlidae
- Genus : *Oreochromis*
- Spesies : *Oreochromis niloticus*



Gambar 1. Ikan Nila (*O. niloticus*) (Suyanto, 2010)

Ikan nila (*O. niloticus*) dapat dilihat pada Gambar 1. Secara umum, ciri-ciri ikan nila adalah sebagai berikut: badannya pipih berbentuk lonjong; pada badan, sirip ekor, sirip punggung dan sirip perut terdapat garis-garis tegak lurus dengan sirip-siripnya; matanya menonjol dan bagian tepinya berwarna putih; dagingnya

cukup tebal dan tidak terdapat duri-duri halus di dalamnya; kepalanya besar; mulutnya lebar; bibirnya tebal; sisik besar-besar dan kasar; sirip punggung dan sirip dubur memiliki beberapa jari-jari yang tajam seperti duri (Cahyono, 2000).

2.1.2 Habitat

Habitat atau tempat hidup ikan nila (*O. niloticus*) adalah air tawar, seperti sungai, danau, waduk, dan rawa-rawa. Namun, nila adalah ikan *euryhaline* atau toleran terhadap kisaran salinitas (kadar garam) yang luas, sehingga dapat hidup dengan baik di air payau maupun air laut. Nila dapat hidup di perairan dengan salinitas 0-35 ppt. Nila juga dapat hidup diperairan dengan kisaran pH yang luas, 5-11. Namun pH yang optimal adalah 7-8. Suhu optimal untuk pertumbuhan nila sekitar 25-30°C. Sementara itu nila juga dapat bertahan pada perairan dengan kandungan oksigen < 3 ppm (Ghufran dan Kordi, 2013).

Di perairan umum, ikan nila banyak terdapat di sungai-sungai, danau-danau, rawa-rawa, dan di air payau. Ikan nila umumnya terdapat di perairan yang arusnya tenang. Oleh karena itu, ikan nila lebih cocok dibudidayakan di perairan yang tenang, misalnya di kolam-kolam, di waduk-waduk dengan menggunakan jala apung atau keramba, di rawa-rawa dengan menggunakan jala apung atau keramba, di sungai-sungai dengan menggunakan keramba, dan di sawah dengan sistem mina padi (Cahyono, 2000).

Menurut Saparinto (2009), ikan nila (*O. niloticus*) bukan berasal dari Indonesia, tetapi dari sungai Nil di Afrika. Ikan nila dapat hidup di air tawar hingga air payau, mulai dari ketinggian 0 hingga 1.000 mdpl. Suhu yang baik untuk pertumbuhan 25-30°C, pH 7-8, oksigen terlarut 3-5 ppm. Dengan aklimatisasi yang baik, nila dapat hidup pada salinitas hingga 30 ppt.

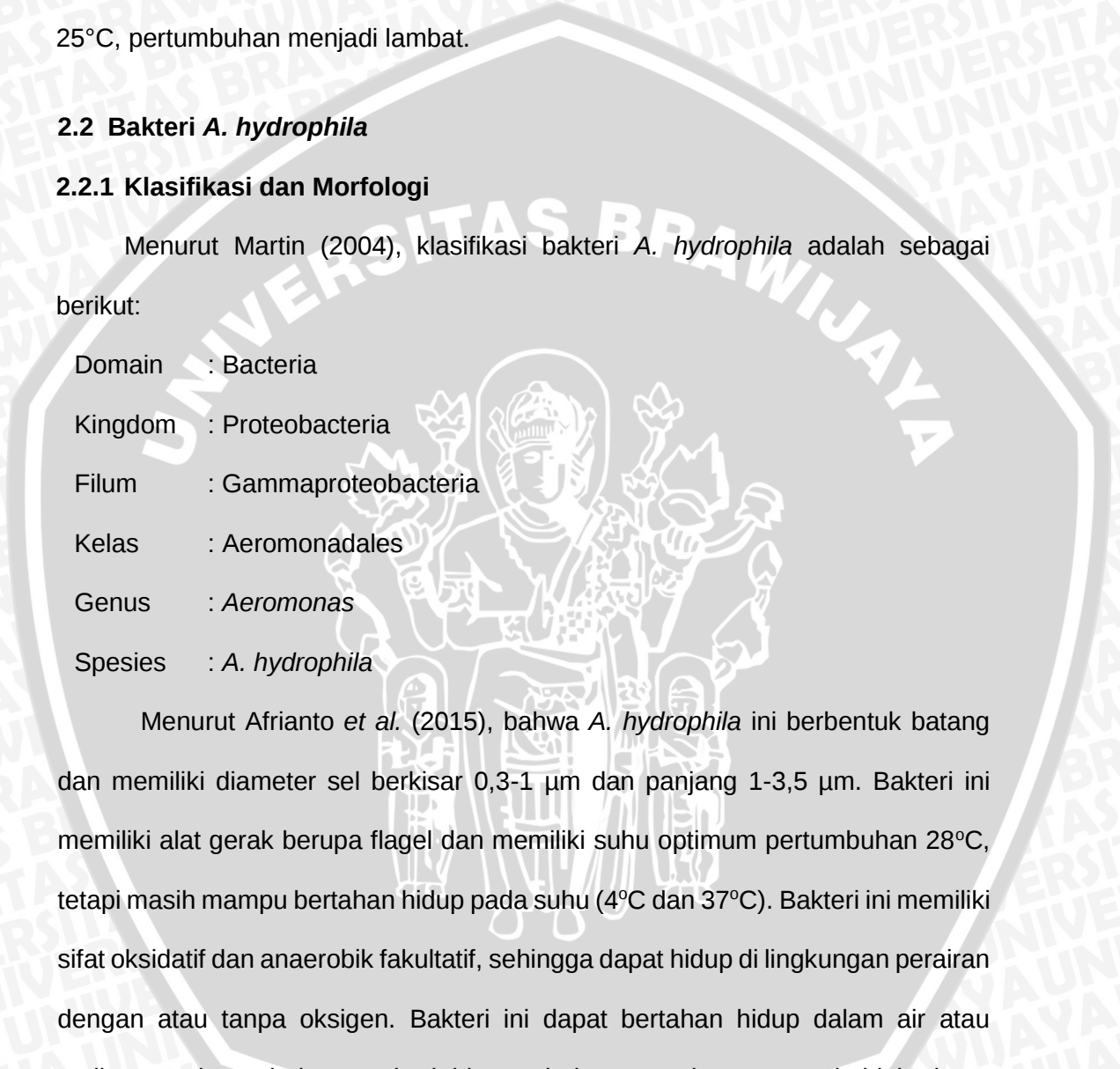
Menurut Suyanto (2010), ikan nila (*O. niloticus*) terkenal sebagai ikan yang sangat tahan terhadap perubahan lingkungan hidup. Ikan nila dapat hidup di

lingkungan air tawar, air payau, dan air asin di laut. Kadar garam air yang disukai antara 0-35 ppt. Ikan nila dapat dipindahkan ke air asin dengan proses adaptasi yang bertahap. Ikan nila dapat tumbuh pada nilai pH 6-8,5, namun optimumnya pH 7-8. Kadar oksigen terlarut 4-7 ppm. Suhu optimum 25-33°C. Pada suhu dibawah 25°C, pertumbuhan menjadi lambat.

2.2 Bakteri *A. hydrophila*

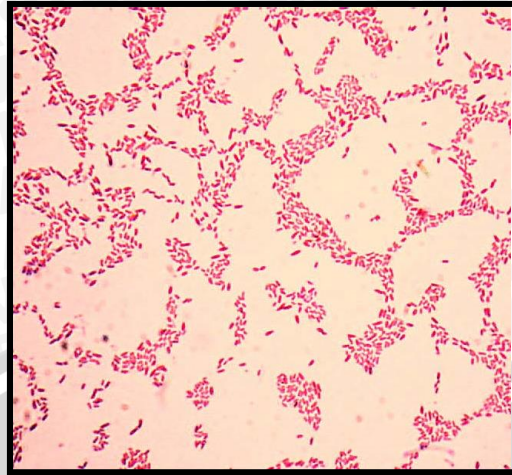
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Martin (2004), klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut:



Domain	: Bacteria
Kingdom	: Proteobacteria
Filum	: Gammaproteobacteria
Kelas	: Aeromonadales
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>A. hydrophila</i>

Menurut Afrianto *et al.* (2015), bahwa *A. hydrophila* ini berbentuk batang dan memiliki diameter sel berkisar 0,3-1 µm dan panjang 1-3,5 µm. Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagel dan memiliki suhu optimum pertumbuhan 28°C, tetapi masih mampu bertahan hidup pada suhu (4°C dan 37°C). Bakteri ini memiliki sifat oksidatif dan anaerobik fakultatif, sehingga dapat hidup di lingkungan perairan dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari hingga beberapa minggu, tetapi tidak dapat berkembang biak dan bersifat obligat. Bakteri ini termasuk bakteri patogen yang sering menyerang dan mengakibatkan kematian massal pada ikan budidaya. Bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri *A. hydrophila* (Perbesaran 100x) (Samsundari, 2006)

2.2.2 Habitat

A. hydrophila merupakan bakteri yang secara normal ditemukan dalam air tawar. Bakteri ini dapat bertahan dalam lingkungan aerob maupun anaerob dan dapat mencerna material-material seperti gelatin dan hemoglobin. Bakteri ini mampu tumbuh, berkembang biak pada suhu 37°C, dan dapat bertahan pada suhu rendah ± 4 °C dalam waktu 1 bulan (Haryani *et al.*, 2012).

Menurut Afrianto *et al.* (2015), bakteri *A. hydrophila* tidak memiliki kemampuan untuk membentuk spora. Bakteri ini dapat dijumpai di lingkungan air payau, air tawar, atau lautan dan termasuk bakteri yang memiliki kemampuan untuk bergerak (motil). Bakteri *A. hydrophila* menyukai lingkungan kolam yang tercemar bahan organik, terutama di musim kemarau atau menjelang musim hujan. Kualitas air kolam yang kurang baik atau perbedaan suhu siang dan malam hari juga berperan munculnya penyakit ini.

2.2.3 Infeksi Bakteri

Menurut Afrianto *et al.* (2015), *Aeromonas* sp. merupakan bakteri patogen yang sering menyerang dan mengakibatkan kematian massal pada ikan budidaya. Kontak yang terjadi antara *Aeromonas* sp. dengan ikan, memungkinkan bakteri ini

memasuki tubuh ikan sehingga mengakibatkan infeksi. *Aeromonas* sp. biasanya berperan sebagai infeksi kedua. Serangan *Aeromonas* sp. biasanya diawali karena perubahan kondisi lingkungan secara mendadak, terutama suhu tinggi dan rendahnya oksigen terlarut. Stres yang dialami ikan karena penebaran yang terlalu tinggi (*overcrowding*). Stres pada ikan juga disebabkan karena penanganan secara kasar selama pengangkutan. Keterlambatan pemberian pakan dan kualitas maupun kuantitas pakan yang dapat memicu serangan *Aeromonas* sp. infeksi yang diakibatkan oleh patogen lain akan berpengaruh terhadap fisiologis ikan sehingga kerentanan terhadap infeksi.

Pada beberapa kejadian bakteri *A. hydrophila* dapat menyebar secara cepat pada ikan dengan padat penebaran tinggi dan bisa mengakibatkan kematian benih hingga 90% bahkan sampai membunuh semua benih yang ada. Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* bersifat “opportunis” yaitu mampu berkembang menjadi lebih ganas pada keadaan optimum. Penularan penyakit dapat melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang tercemar atau dengan pemindahan ikan yang telah terserang *A. hydrophila* dari satu tempat ke tempat lain (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.3 Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Hani (2008), klasifikasi dari daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) adalah sebagai berikut;

- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledoneae
- Bangsa : Asterales
- Suku : Compositae

Marga : Blumea

Jenis : *B. balsamifera* (L.) DC.



Gambar 3. Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) (badan POM RI, 2008)

Menurut Afifah *et al.* (2005), daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dapat dilihat pada Gambar 3. Daun sembung merupakan tanaman perdu tegak yang memiliki tinggi sekitar 2-4 meter. Batangnya memiliki bulu yang banyak seperti domba. Pada umumnya batang bagian bawahnya tidak bercabang namun bagian atasnya memiliki cabang banyak. Daun tanaman sembung ini panjang berbentuk taji, berlekuk dan bersirip serta memiliki rasa pahit. Bunganya mengumpul membentuk gerombolan berwarna kuning.

Menurut Maryani dan Suharmiati (2003), sembung merupakan tanaman perdu dengan tinggi 2-3 m. berbatang tegak, berbentuk bulat, bagian atas berbulu lebat, dan berwarna hijau tua. Berdaun tunggal yang tersebar, berbentuk lonjong, berbulu, pangkal dan ujung meruncing, tepi gerigi, pertulangan menyirip dengan panjang daun 25-40 cm, lebar 10-20 cm, dan berwarna hijau. Sembung mempunyai bunga majemuk berbentuk tandan, duduk atau bertangkai, tumbuh di ketiak daun dan ujung batang, terkumpul sebagai malai, mahkota bunga berwarna putih kekuningan. Berbuah kotak, bentuk silindris, keras, berambut, dan berwarna putih kecokelatan.

2.3.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Herliana (2013), sembung (*B. balsamifera* (L.) DC) merupakan tanaman yang berasal dari Nepal. Tanaman ini hidup ditempat terbuka sampai agak terlindungi ditepi sungai dan lahan pertanian. Dapat tumbuh pada ketinggian sampai 2.200 mdpl dengan kondisi tanah berpasir atau tanah yang agak basah.

Tanaman sembung (*B. balsamifera* (L.) DC) termasuk dari suku *Asteraceae* biasanya dapat tumbuh ditempat terbuka, terlindung, tepi sungai, tanah pertanian, pekarangan, tanah berpasir dan tanah yang sedikit basah pada ketinggian 2.200 meter diatas permukaan laut (Isnawati *et al.*, 2006). Tanaman sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) merupakan tanaman herbal yang memiliki kecenderungan tumbuh liar dan dapat ditemukan di berbagai habitat, misalnya pinggir jalan dan tanah lapang, kemudian terdapat di dataran rendah dan wilayah pegunungan. Tanaman ini juga dapat tumbuh di daerah berpasir atau tanah yang agak basah pada ketinggian sampai 2.200 mdpl (Hut, 2012).

2.3.3 Kandungan Senyawa Aktif dan Manfaat

Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) bersifat pedas, sedikit pahit, dan hangat. Tanaman ini memiliki senyawa aktif, yaitu 0,5% minyak atsiri yang berupa sineol, borneol, landerol, dan kamper. Daun ini memiliki manfaat memperlancar peredaran darah, sebagai anti peradangan, peluruh dahak (ekspektoran), astrigen, tonikum, mematikan pertumbuhan kuman, dan bersifat analgesik. Saat ini daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) banyak digunakan sebagai obat penyakit diabetes, rematik, persendian sakit setelah melahirkan, nyeri haid, influenza, demam, bronchitis, perut kembung, diare, dan nyeri dada akibat penyempitan pembuluh darah koroner (Herliana, 2013).

Daun dan kulit batang sembung mengandung alkaloid. Di samping itu, daun juga mengandung tanin dan minyak astiri. Kulit batang mengandung saponin. Akarnya mengandung saponin dan polifenol. Daun sembung berkhasiat untuk

mengobati demam, meredakan batuk, dan melancarkan keluarnya keringat (Maryani dan Suharmiati, 2003).

Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) juga mengandung senyawa lain seperti kamper, tanin, saponin, damar, dan ksantoksilin serta flavonoid dimana zat aktif ini mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Senyawa tanin merupakan suatu zat yang terdapat dalam berbagai tumbuhan salah satunya terdapat pada tanaman sembung. Tanin ini mempunyai sifat mudah larut dalam air, etanol, dan larutan aseton. Tanin akan rusak pada suhu 210°C. Tanin ini mampu menghambat sintesis dinding sel dan sintesis protein sel bakteri (Rumihat, 2015).

Senyawa tanin merupakan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan yang bersifat sebagai antibakteri dengan membentuk ikatan yang stabil dengan protein sehingga terjadi koagulasi protoplasma bakteri, tanin juga memiliki kemampuan menyamak kulit dan juga dikenal sebagai astringensia (Robinson, 1995). Senyawa lain yang terdapat pada daun sembung yaitu saponin. Senyawa saponin mempunyai sifat seperti sabun yang merupakan senyawa "*surfactant agent*" yang kuat, sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel (Robinson, 1995). Diabsorbsinya saponin pada permukaan sel akan mengakibatkan kerusakan dengan naiknya permeabilitas atau kebocoran membran sel, sehingga bahan-bahan essensial yang dibutuhkan oleh bakteri untuk kehidupannya hilang dan dapat menyebabkan kematian sel bakteri (Miranti *et al.*, 2013).

2.4 Ekstraksi

Proses ekstraksi terdiri dari tiga langkah besar, yaitu proses pencampuran, proses pembentukan fase setimbang dan proses pemisahan fase setimbang. Proses ekstraksi dapat berjalan dengan baik apabila pelarut ideal harus memenuhi syarat-syarat yaitu selektivitasnya tinggi, memiliki perbedaan titik didih dengan *solute* cukup besar, perbedaan kepadatan cukup besar, tidak beracun, tidak

bereaksi secara kimia dengan *solute* maupun diluen, viskositasnya kecil, tidak bersifat korosif, tidak mudah terbakar, murah dan mudah didapat, beberapa faktor yang berpengaruh dalam proses ekstraksi adalah temperatur, waktu kontak, perbandingan *solute*, faktor ukuran partikel, pengadukan dan waktu dekantasi (Yasita dan Rachmawati, 2009).

Menurut Katno (2009), faktor-faktor yang berpengaruh dalam ekstraksi antara lain ukuran bahan, waktu kontak antara bahan dengan pelarut dan suhu ekstraksi. Faktor lain yang menentukan hasil ekstraksi adalah perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi) dan jangka waktu di mana sampel kontak dengan cairan pengestraksi (waktu ekstraksi). Apabila bahan yang digunakan pada proses ekstraksi menggunakan bahan dari dedaunan maka bahan tersebut harus cukup tua. Menurut Simanjuntak (2008), ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyaring tertentu. Ada beberapa metode ekstraksi, yaitu :

1) Cara Dingin

- a. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserasi pertama, dan seterusnya.
- b. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyaringan sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

2) Cara Panas

- a. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- b. Digesti adalah maserasi dengan pengadukan kontinyu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar yaitu pada suhu 40-50°C.
- c. Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 90°C) selama 15 menit.
- d. Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 30 menit.
- e. Sokletasi adalah metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantong ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu.

2.5 Histopatologi

2.5.1 Pengertian Insang

Insang atau *branchia* merupakan organ pernafasan yang digunakan oleh ikan untuk melakukan proses pernafasan yaitu pengambilan oksigen dan pelepasan karbon dioksida. Setiap ikan memiliki insang pada bagian kanan dan kiri dari faring (Wilson dan Laurent, 2002). Kebanyakan ikan bertulang sejati memiliki empat pasang insang, namun ada yang sampai enam pasang (Sukiya, 2003).

Menurut Tanjung (1982), tingkat kerusakan pada insang yang berhubungan dengan toksisitas adalah tingkat I, terjadi edema pada lamela dan terlepasnya sel-sel epithelium dari jaringan dibawahnya; tingkat II, terjadi hiperplasia pada basal proksimal lamela sekunder; tingkat III, hiperplasia

menyebabkan bersatunya dua lamela sekunder; tingkat IV, hampir seluruh lamela sekunder mengalami hiperplasia; tingkat V, hilangnya struktur lamela sekunder dan rusaknya filamen.

2.5.2 Fungsi Insang

Menurut Omar (1987), setiap insang ikan terdiri dari filamen insang atau *hemibranchia* atau *gill filament*, berwarna merah, terdiri jaringan lunak dengan bentuk menyerupai sisir dan melekat pada lengkung insang. Tiap satu lembaran insang terdiri dari sepasang filamen, dan pada setiap filamen mengandung banyak lapisan tipis yang disebut lamela. Filamen mengandung pembuluh darah kapiler yang memungkinkan oksigen (O_2) berdifusi masuk dan karbondioksida (CO_2) berdifusi keluar. Pada ikan bertulang sejati insang ditutupi oleh tutup insang yang disebut operculum. Tulang lengkung insang atau *archus branchialis* atau *gill arch*, merupakan tempat melekatnya filamen dan tapis insang, berwarna putih, dan memiliki saluran darah yaitu arteri afferent dan arteri efferent yang memungkinkan darah keluar masuk ke dalam insang. Dan tapis insang atau *gill rakers*, berupa sepasang deretan batang tulang rawan yang pendek dan bergerigi, melekat pada bagian depan dari lengkung insang dan memiliki 9 fungsi untuk menyaring air pernafasan. Pada ikan-ikan herbivora pemakan plankton, tapis insang biasanya rapat dan ukurannya panjang dan berfungsi sebagai penyaring makanan.

Secara histologi, menurut Nabib dan Pasaribu (1989), luas permukaan epitel dari insang menyerupai luas dari permukaan kulit, bahkan pada sebagian besar spesies ikan luas permukaan epitel insang ini jauh melebihi kulit, sehingga insang memiliki peran penting dalam proses hemostatis. Insang ikan memiliki lapisan epitel yang tipis berguna untuk efisiensi pertukaran gas yaitu penyerapan oksigen dan pelepasan karbondioksida. Selain mempermudah pertukaran gas, lebarnya sel epitel dapat mempermudah masuknya bibit penyakit dan

meningkatkan resiko iritasi. Selain itu, insang memiliki fungsi untuk mengatur pertukaran garam dan air serta berfungsi dalam ekskresi produk-produk limbah nitrogen, terutama amonia. Kerusakan ringan pada struktur insang ikan mengakibatkan gangguan dalam osmoregulasi dan kesulitan bernafas.

2.5.3 Pengamatan Histopatologi

Histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ sasaran utama dari bahan pencemar seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring lingkungan dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme (Martinez dan Marina, 2007 dalam Setyowati *et al.*, 2010).

Menurut Susanto (2008), ikan dibedah kemudian diambil sebagian organ usus, otot, insang dan diawetkan dalam larutan fiksatif Bufer Netral Formalin (BNF) 100% selama 1-2 hari. Setelah itu organ ditrimming dan dimasukkan ke dalam kaset plastik untuk dibuat blok lilin. Blok ini yang terbentuk di potong dengan menggunakan mesin mikrotom dan diletakkan di gelas objek. Setelah itu dilakukan pewarnaan HE (Haematoxylin Eosin). Pertama kali dimasukkan ke dalam xylol I, xylol II, alkohol absolut, alkohol 95% dan alkohol 85% masing-masing selama dua menit. Setelah itu secara berurutan dicuci dengan air kran selama satu menit, direndam pada larutan pewarna Haematoxylin selama delapan menit, dicuci dengan air kran selama 30 detik, dimasukkan ke lithium carbonat selama 15-30 detik, kemudian dicuci dengan air kran selama 2 menit dan dimasukkan ke Eosin selama 2-3 menit. Setelah itu secara berlawanan seperti perlakuan awal di celupkan ke dalam alkohol 85%, alkohol 95%, alkohol absolut, xylol I dan xylol II

masing-masing 2 menit. Preparat di keringkan dan ditutup dengan cove yang diberi perekat.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian tentang “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) Terhadap Histopatologi Insang Ikan Nila (*O. niloticus*) Yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila* antara lain:

- Akuarium 40x40x40 cm
- Timbangan Digital
- Aerator Set
- Pipet Tetes
- Nampan
- Autoclave
- Vortex Mixer
- Crushable tank
- Sesar
- DO Meter
- pH Meter
- Rotary evaporator
- Sectio set
- Objek glas
- Cover glas
- Sprayer
- Botol Film
- Jarum Ose
- Fotomikroskop
- Cetakan es
- Microtom Rotary

3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Ikan nila (*O. niloticus*) ukuran 8-12 cm
- Bakteri *A. hydrophila*
- Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)
- NB (*Nutrient Broth*)
- Kertas label
- Alkohol 70%
- Sampel uji
- Aquades
- Kapas
- Tissue
- Benang kasur
- Kertas Saring

- Xylene
- Formalin 10%
- Parafin Cair
- Asam Asetat
- Hematoksin Eosin
- Etanol 96%

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Subali (2010), penelitian eksperimen yaitu dimana peneliti melakukan intervensi dengan cara memanipulasi variabel bebas yang dijadikan faktor untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan. Peneliti akan mengontrol secara ketat semua faktor lain yang diduga dapat mempengaruhi atau menekan atau mengganggu hasil eksperimen. Hal ini didukung oleh pernyataan Myers dan Hansen (2002) dalam Hastjarjo (2014), yang merumuskan rancangan eksperimen sebagai struktur umum sebuah eksperimen, yang ditentukan oleh tiga aspek (a) jumlah variabel independen atau perlakuan, (b) jumlah variasi variabel independen atau kondisi perlakuan, dan (c) penggunaan subjek yang sama atau berbeda untuk masing-masing kondisi perlakuan.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai suatu tujuan yang diharapkan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena media yang digunakan bersifat homogen, artinya keragaman antara satuan percobaan tersebut kecil, sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanya faktor kebetulan. Menurut Sastrosupadi (2007), Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca, dan peternakan.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : nilai rata-rata

τ_i : pengaruh faktor perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dengan dosis berdasarkan dari percobaan LD₅₀ daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) terhadap ikan nila (*O. niloticus*). Dosis awal yang akan digunakan pada uji LD₅₀ berpatokan pada uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) yang telah dilakukan oleh Ghufra (2014), pada penelitian tersebut didapatkan bahwa konsentrasi 150 ppm ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) mengalami kejernihan pertama kali atau merupakan dosis terkecil yang sudah dapat menghambat atau membunuh bakteri *A. hydrophila*. Mengingat tujuan dari uji LD₅₀ adalah untuk mengetahui kematian 50% hewan percobaan maka harus ada dosis pembanding, berdasarkan saran dosen pembimbing dosis pembanding tersebut yaitu dengan menambahkan dengan selisih 200 ppm dari dosis awal, sehingga didapatkan dosis 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan 800 ppm.

Pada uji LD₅₀ digunakan ikan nila (*O. niloticus*) sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, selanjutnya diadaptasikan selama satu minggu dan dilakukan pemberian pakan dua kali sehari pada pukul 08.00 WIB dan 16.00 WIB kemudian dilakukan pengamatan terhadap jumlah ikan. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan perlakuan sebagai berikut:

Penentuan LD₅₀ merupakan tahap awal untuk mengetahui tingkat toksisitas daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.). Menurut *Environmental Protection Agency* (EPA 2002) dalam Supriyono (2007), LD₅₀ digunakan untuk mengetahui kematian 50% hewan percobaan dalam 24-96 jam. Pengaruh LD₅₀ secara umum diukur menggunakan dosis bertingkat. Toksisitas akut dilakukan untuk mengetahui

respon hewan percobaan terhadap dosis yang diberikan. Penghitungan LD₅₀ didasarkan pada jumlah kematian hewan percobaan.

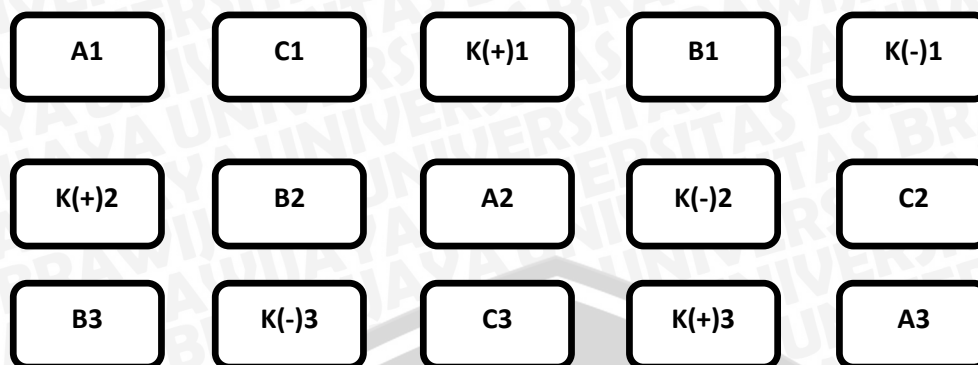
Setelah didapatkan dosis yang sesuai dari uji LD₅₀, selanjutnya didapatkan dosis perlakuan 500 ppm, 600 ppm dan 700 ppm. Pada penelitian ini digunakan 2 kontrol pembanding yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif, perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dan tanpa pengobatan sedangkan kontrol negatif adalah (normal) yaitu perlakuan sampel tanpa diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan perendaman ekstrak. Perlakuan yang ada pada penelitian ini berjumlah tiga dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali sehingga total sampel yang diamati ada 15 sampel. Rancangan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1 dan denah penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 1. Rancangan Perlakuan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃
K (+)	K (+) ₁	K (+) ₂	K (+) ₃
K (-)	K (-) ₁	K (-) ₂	K (-) ₃

Keterangan:

- A : Pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) 500 ppm
 B : Pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) 600 ppm
 C : Pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) 700 ppm
 K(+) : Penginfeksi bakteri tanpa pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)
 K(-) : Perlakuan tanpa infeksi maupun perendaman ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) (normal)



Gambar 4. Denah Penelitian

Keterangan :

A-B-C : Perlakuan penelitian

K(+): Kontrol positif

K(-): Kontrol negatif

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

A. Persiapan Ikan

Ikan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan nila (*O. niloticus*) yang diperoleh dari petani ikan di Kota Batu. Ikan nila (*O. niloticus*) yang dipilih mempunyai karakteristik sehat dengan ukuran 8-12 cm dan berjumlah sebanyak 300 ekor. Ikan tersebut kemudian diaklimatisasi dalam akuarium selama 7 hari pengamatan. Proses aklimatisasi ini untuk mengetahui keadaan ikan yang digunakan adalah ikan yang benar-benar sehat dan telah beradaptasi dengan lingkungan barunya. Selama aklimatisasi ikan diberi pakan pelet secara adlibitum sebanyak 2 kali sehari pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 16.00 WIB. Selain itu juga dilakukan penyiponan setiap pagi apabila kondisi air pada akuarium telah kotor akibat sisa pakan dan feses. Hal ini dilakukan untuk mencegah timbulnya zat racun. Apabila ikan sampel sudah beradaptasi dengan lingkungan barunya, maka ikan siap untuk digunakan.

B. Pembuatan Ekstrak Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)

Pembuatan ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dilakukan dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3. Penyarian dilakukan menggunakan pelarut etanol 96%. Kandungan kimia dari daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) yang diduga mengandung senyawa aktif antara lain saponin dan flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga dapat larut dalam pelarut seperti etanol, metanol, butanol dan aseton (Markham, 1988). Berdasarkan sifat masing-masing senyawa tersebut, saponin dan flavonoid dapat tersari dalam etanol 96% yang bersifat universal. Daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) kering dihaluskan sampai berbentuk serbuk. Ditimbang serbuk daun sembung 3000 gram dimasukkan ke dalam 3 toples dan diberi pelarut etanol 96% sebanyak 9000 ml dan direndam selama 2 x 24 jam ditempat yang gelap, kemudian dihomogenkan dengan diaduk menggunakan spatula. Proses maserasi ini didiamkan selama 2 hari pada tempat yang gelap. Setelah 2 hari hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dengan endapannya, didapatkan hasil maserasi sebanyak 3600 ml. Setelah terpisah, larutan hasil saringan kemudian diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kasar dari daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.). Proses penguapan ini menggunakan alat yang disebut *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan kecepatan 90 rpm. Setelah diuapkan selama 1 jam maka akan dihasilkan ekstrak kasar sebanyak 42 gram, 36 gram untuk perlakuan dan 6 gram untuk uji fitokimia.

C. Sterilisasi Alat dan Bahan

Mekanisme sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

- alat yang dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan koran dan diikat;
- akuades dimasukkan ke dalam ruang sterilisasi autoklaf sampai menutup sistem pemanas untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas;

- keranjang yang berisi bahan atau alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian tutup autoklaf;
- pada saat menutup, selang dimasukkan ke posisi yang tepat. Tanda panah pada penutup sejajar dengan garis. Tuas ditutup secara diagonal agar seimbang kekuatan pada saat menutup autoklaf;
- Tombol ON dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan 1 atm, keadaan ini dipertahankan selama 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup autoklaf;
- Tombol OFF ditekan, ditunggu beberapa saat hingga suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian kran uap dibuka dan penutup autoklaf dibuka dengan cara simetris;
- Alat dan bahan dikeluarkan yang telah disterilisasi diambil;
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

D. Persiapan Alat Penelitian

Wadah yang digunakan adalah akuarium dengan ukuran $40 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$ sebanyak 15 buah. Akuarium dicuci dengan detergen kemudian direndam dengan *chlorin* selama 30 menit dan kemudian dinetralisir dengan Na-Thiosulfat. Selanjutnya akuarium dibilas dan dikeringkan selama 1 hari, kemudian siap diisi dengan air pemeliharaan. Kemudian diisi air sebanyak 20 liter dan dilengkapi dengan aerasi dan juga heater untuk menjaga kandungan oksigen dan menjaga suhu dalam air.

E. Pembuatan Media Bakteri

Nutrien Broth ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlemneyer kemudian diaduk hingga larut sempurna berwarna kuning. Selanjutnya

erlemenyser ditutup kapas dan *aluminium foil* lalu diikat menggunakan benang kasur. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit, selanjutnya media diangkat dari autoklaf dan dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

F. Pembuatan stock bakteri *A. hydrophila* kepadatan 1×10^7 sel/ml

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau Jepara, Jawa Tengah. Bakteri yang diperoleh adalah dengan kepadatan 6×10^8 sel/ml hasil pengkulturan pada media NB yang sudah dicocokkan dengan metode Mc Farland. Langkah-langkah dalam penentuan kepadatan tersebut adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan Biakan Bakteri (seperti yang sudah dijelaskan diatas)
2. Perhitungan Jumlah Bakteri

Perhitungan jumlah bakteri yang ada pada media Nutrien Broth (NB) dapat dilakukan menggunakan metode MC Farland dengan cara:

- Menyediakan 10 tabung reaksi yang bersih;
- Membuat larutan H_2SO_4 murni dalam 1% dan membuat larutan $BaCl_2$ dalam 1%;
- Campurkanlah kedua jenis larutan tersebut dalam tabung berdasarkan perbandingan yang ada pada tabel. Sehingga isi dari satu tabung tersebut menjadi 10 ml larutan. Kemudian tutuplah tabung-tabung tersebut;
- Suspensi larutan yang terdapat dalam tabung tersebut sama dengan jumlah suspense sel *E. coli* per ml seperti dalam Tabel 2 berikut;

Tabel 2. Larutan Standart Mc Farland

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H ₂ SO ₄ (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Kepadatan sel <i>E. coli</i> (1 x 10 ⁸) sel/ml	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Adapun langkah-langkah untuk mendapatkan kepadatan bakteri 1 x 10⁷ sel/ml dilakukan proses pengenceran berseri sebagai berikut :

- Dipersiapkan bakteri *A. hydrophila*;
- Dipersiapkan tabung reaksi yang masing-masing tabung diisi 9 ml akuades;
- Diambil 1 ml bakteri dari stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung pertama kemudian di vortex;
- Diambil 1 ml bakteri dari tabung reaksi pertama menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua kemudian di vortex;
- Didapatkan bakteri dengan kepadatan 1 x 10⁷ sel/ml.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

A. Penginfeksi Bakteri pada Ikan Nila (*O. niloticus*)

Penginfeksi bakteri dilakukan dengan cara perendaman, yaitu dengan memasukkan bakteri langsung pada media pemeliharaan. Penginfeksi dilakukan menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 1 x 10⁷ sel/ml. Pada perendaman ikan digunakan akuarium dengan ukuran 80 x 40 x 50 cm³ yang sudah dilengkapi aerasi. Perendaman ini dilakukan menggunakan kapasitas air 40 liter (40.000 ml), sehingga dapat digunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 V_1 \times (6 \times 10^8) &= 40.000 \times 10^7 \\
 V_1 &= \frac{40.000 \times 10^7}{6 \times 10^8} \\
 &= 667 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan diatas diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan adalah sebanyak 667 ml dan dicampurkan dengan air tawar sebanyak 39.333 ml, selanjutnya ikan nila direndam dalam media yang tercampur bakteri 1×10^7 sel/ml dan dipelihara selama satu minggu, kemudian diamati gejala klinis ikan yang sudah diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

B. Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)

Pemberian ekstrak kasar daun sembung dilakukan dengan cara perendaman dengan memasukkan ekstrak kasar kedalam media pemeliharaan. Langkah pertama disiapkan ekstrak kasar daun sembung yang akan digunakan kemudian dilakukan perhitungan berdasarkan dari volume media pemeliharaan yang digunakan (20.000 ml) dan dosis ekstrak yang akan digunakan (500 ppm, 600 ppm dan 700 ppm) dengan rumus pengenceran. Setelah semua hasil didapat, selanjutnya ditimbang ekstrak sesuai hasil yang didapat dan dimasukkan kedalam akuarium perlakuan dengan dosis yang berbeda-beda. Sebelumnya sampel uji diinfeksi terlebih dahulu selama 1×24 jam dengan cara perendaman, kemudian baru ditaruh ke akuarium pengobatan pada perlakuan yang berbeda dan diambil kembali untuk ditaruh pada media pemeliharaan selama 5 hari pemeliharaan. Serta diamati parameter penunjang seperti DO, pH dan suhu setiap hari pada pagi dan sore pada pukul (08.00 dan 16.00 WIB).

C. Pengambilan Jaringan Insang

Pengambilan jaringan insang dilakukan sebanyak 3 kali yaitu pada ikan normal sebelum diinfeksi, pada ikan nila (*O. niloticus*) setelah penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dan pada hari ke-5 pemeliharaan yang diberi perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.). Pengambilan insangnya dengan menggunakan bantuan *sectio set* pada bagian samping kanan dan kiri di mana agar diketahui kerusakan yang terjadi didaerah mana. Sampel

insang dibilas dengan aquades untuk menghilangkan darahnya, setelah itu insang yang sudah diambil dimasukkan ke dalam botol kaca kecil dan diberi bahan pengawet berupa larutan formalin 10%, dilanjutkan dengan pembuatan preparat untuk histopatologi.

D. Pembuatan Preparat Histopatologi

Setelah masa adaptasi selesai, insang ikan diambil sebagai sampel untuk diamati histopatologinya. Sampel insang dimasukkan ke dalam botol film dan diberi bahan pengawet yaitu larutan formalin 10%, dilanjutkan dengan pembuatan dan pengamatan preparat hasil histopatologi. Adapun tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut:

- Tahap Fiksasi

Sampel insang yang akan diamati jaringannya diambil. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.

- Tahap Dehidrasi

Tahap dehidrasi dilakukan dengan penarikan air secara bertahap menggunakan alat *auto technicon* selama 20 jam. Tabung *auto technicon* terdiri atas alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 90% selama 2 jam, alkohol 96% selama 2 jam, alkohol *absolute* 1 selama 2 jam dan alkohol *absolute* 2 selama 2 jam.

- Tahap *Clearing*

Tahap *clearing* untuk mentransparankan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan. Dilakukan dengan mencelupkan kedalam larutan xylol 1 selama 1 jam, xylol 2 selama 2 jam dan xylol 3 selama 2 jam.

- Tahap Impregnasi

Tahap impregnasi bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (*embedding*). Dilakukan dengan mencelupkan

bahan ke parafin cair dengan suhu 56-60°C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali kedalam parafin cair dengan suhu 56-60°C selama 2 jam

- Tahap *Embedding* (Pengeblokan)

Tahapan ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam *waterbath* (suhu 40°C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass (untuk persiapan pewarnaan HE (*Haematoxylin Eosin*), sebelumnya obyek glass harus diolesi dengan perekat polyisin. Berikutnya, keringkan pada oven dengan suhu 50-60°C kurang lebih selama 30 menit.

- Teknik Pewarnaan Jaringan Dengan Menggunakan HE (*Haematoxylin Eosin*)

Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu deparafinisasi, hidrasi, cat utama, dehidrasi dan clearing.

- Tahap *Mounting*

Tahapan ini merupakan prosedur akhir dalam pembuatan preparat sebelum diamati secara makroskopik dan mikroskopik bertujuan untuk mempermudah saat pengamatan. Preparat dilem dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan *cover glass* jangan sampai terjadi gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati dibawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh *Haematoxylin* yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh *eosin* yang bersifat asam.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

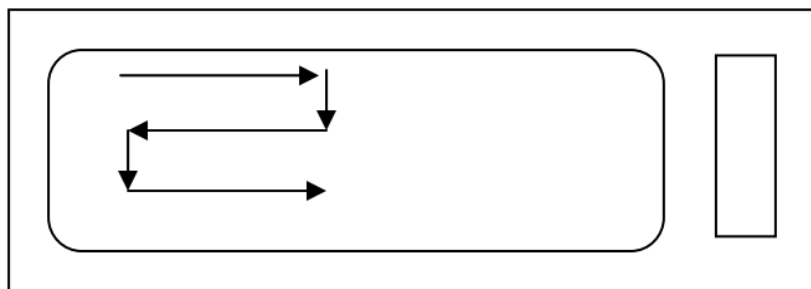
Parameter utama pada penelitian ini adalah histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*). Pengamatan ini dilakukan untuk melihat gambaran jaringan insang pada ikan yang tanpa perlakuan larutan dan infeksi, ikan yang diinfeksi dan diobati yang dipelihara selama 5 hari.

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah gejala klinis ikan dan pengukuran kualitas air seperti suhu, oksigen terlarut dan pH yang dilakukan pada pukul 08.00 WIB dan 16.00 WIB setiap hari.

3.6 Analisis Data

Data yang didapat dari penelitian ini akan dianalisa pengaruhnya pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F. Apabila nilai F hitung berbeda nyata atau sangat nyata, maka analisa akan dilanjutkan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik dengan derajat kepercayaan 5% dan 1%. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dan jumlah kerusakan jaringan insang maka dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif. Menurut Kakkilaya (2002), yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwanai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) kearah kepala kemudian turun ke bawah dan bergeser kearah ekor kembali (gerak zig zag) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Alur Perhitungan Skoring (gerak zig zag) (Suswandari, 2005)

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang sehingga mendapatkan hasil yang maksimal pada tingkat kerusakan jaringan. Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria hiperplasia, fusi dan nekrosis (kerusakan sel), kemudian di persentase dengan pemberian skor dari angka 1 sampai 4. Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarakan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut KIM (2006) dalam Raza'i (2008) dengan rumus:

$$\text{Persentase kerusakan} = \frac{\text{Jumlah sel yang rusak}}{\text{Jumlah sel analisis}} \times 100\%$$

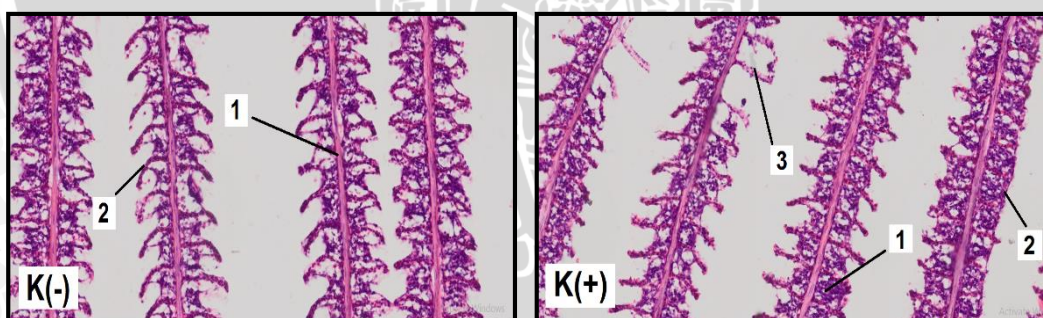
Kemudian persentase yang telah didapatkan diberi skoring dari angka 1 sampai 4. Angka 1 (ringan) mempunyai tingkat persentase kerusakan jaringan 0-5%, angka 2 (sedang) tingkat persentase kerusakan jaringan 6-25%, angka 3 (berat) tingkat persentase kerusakan jaringan 26-50% dan angka 4 (sangat berat) tingkat persentase kerusakan jaringan >50%.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Gambaran Histopatologi Insang

4.1.1 Histopatologi Insang Ikan Normal dan yang Terinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan hasil penelitian, gambaran jaringan insang ikan nila (*O. niloticus*) normal (tanpa infeksi bakteri *A. hydrophila* dan tanpa perendaman ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC) dan ikan nila yang diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 6. Kondisi insang ikan nila (*O. niloticus*) tanpa infeksi memperlihatkan bentuk histopatologi yang normal. Menurut Asniatih *et al.* (2013), bahwa pemeriksaan histopatologi pada ikan dapat memberikan gambaran perubahan jaringan ikan yang terinfeksi penyakit. Dalam penentuan penyakit pada ikan, diagnosa penyakit merupakan langkah awal yang perlu diterapkan. Pada proses diagnosa penyakit infeksi pada ikan, terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan yaitu, tanda-tanda klinis yang meliputi tingkah laku, ciri-ciri eksternal maupun internal serta perubahan patologi.



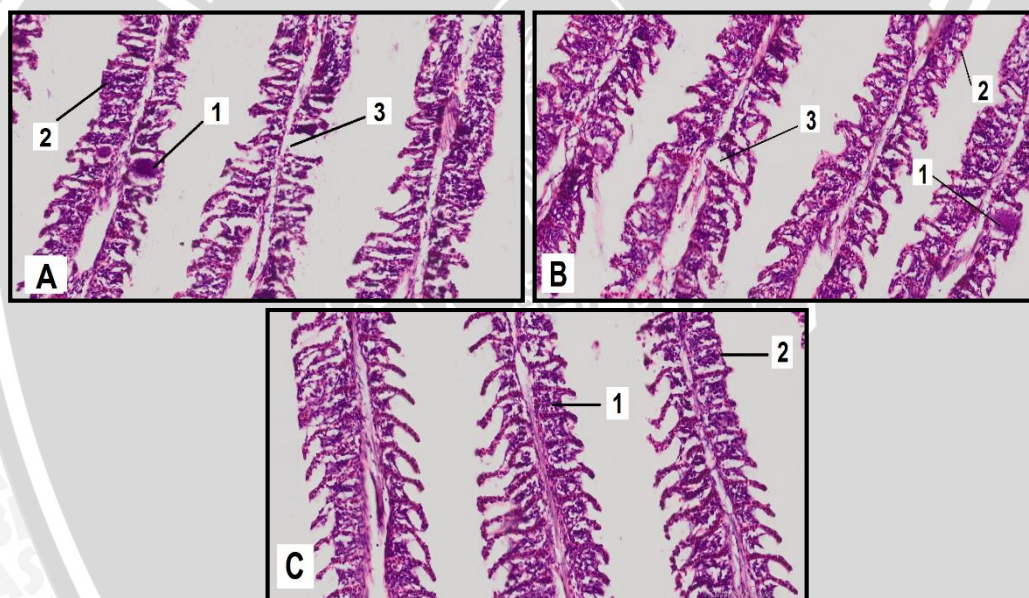
Gambar 6. K(-) Histopatologi Insang Normal. Tanda panah no 1. Lamela primer; 2. Lamela sekunder. K(+) Histologi insang terinfeksi bakteri. Tanda panah no 1. Hiperplasia; 2. Fusi; 3. Nekrosis. Mikroskop cahaya perbesaran 100x.

Pada Gambar 6 dapat dilihat jaringan insang ikan sehat menunjukkan tidak adanya kerusakan. Penampang jaringan insang pada lamella sekunder dalam kondisi normal. Sedangkan pada jaringan insang yang terinfeksi bakteri banyak

terjadi kerusakan. Kerusakan yang terjadi diantaranya yaitu hiperplasia, fusi dan nekrosis.

4.1.2 Gambaran Histopatologi Perlakuan pada Insang

Pengamatan histopatologi digunakan untuk melihat perubahan patologi pada ikan nila (*O. niloticus*) yang direndam dengan ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.) dengan dosis yang berbeda serta diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Dimana dosis yang digunakan saat penelitian yaitu A (500 ppm), B (600 ppm) dan C (700 ppm). Berikut ini penampang dari insang ikan nila yang dipelihara selama 7 hari setelah pengobatan (Gambar 7).



Gambar 7. Histopatologi insang dengan perendaman ekstrak kasar daun sembung dengan perlakuan, (A). 500 ppm, (B). 600 ppm, (C). 700 ppm. Tanda panah No.1. Hiperplasia; 2. Fusi; 3. Nekrosis. Mikroskop cahaya perbesaran 100x.

Berdasarkan Gambar 7 perlakuan A, B dan C dengan dosis ekstrak berturut-turut adalah 500 ppm, 600 ppm dan 700 ppm, rata-rata mengalami kerusakan jaringan insang dengan penambahan dosis ekstrak kasar daun sembung yang berbeda dapat ditunjukkan melalui nilai skoring yang dapat dilihat pada Lampiran 6.

Analisis data kerusakan pada histopatologi jaringan insang yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan dengan perendaman ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) adalah sebagai berikut;

1) Hiperplasia

Hiperplasia ditandai dengan adanya penebalan jaringan epitel diujung filament yang memperlihatkan bentuk seperti pemukul bisbol. Hiperplasia ini terjadi akibat peningkatan jumlah sel lamella insang. Menurut Robert (2001), bahwa hiperplasia terjadi disertai dengan adanya peningkatan jumlah sel-sel mucus di dasar lamella dan mengakibatkan fusi lamella. Ruang interlamella yang merupakan saluran air dan ruang produksi mucus dapat tersumbat akibat hiperplasia sel epitel yang berasal dari filament primer sehingga seluruh ruang interlamella diisi oleh sel-sel baru. Hiperplasia dapat mengakibatkan penebalan jaringan epitel di ujung filamen atau penebalan jaringan yang terletak di dekat dasar lamella.

Perlakuan yang diberikan selama penelitian pada ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) memberikan hasil rerata yang berbeda terhadap histopatologi insang ikan nila yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Skoring Hasil Penelitian Kerusakan Hiperplasia Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	3.20	2.80	2.80	8.80	2.93	0.23
B	2.40	2.60	2.40	7.40	2.47	0.12
C	1.60	2.00	1.40	5.00	1.67	0.31
Total	7.20	7.40	6.60	21.20	7.07	0.65

Berdasarkan Tabel 3 dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan hiperplasia pada jaringan insang ikan nila secara berurutan pada perlakuan A (500 ppm), B (600 ppm) dan C (700 ppm) yaitu 2,93, 2,47 dan 1,67. Rerata terendah diperoleh pada perlakuan C (700 ppm) hal tersebut diduga karena dosis ekstrak kasar daun sembung yang diberikan dapat mengobati ikan nila yang telah diinfeksi bakteri *A.*

hydrophila. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) terhadap kerusakan hiperplasia pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Sidik Ragam Hasil Penelitian Kerusakan Hiperplasia Jaringan Insang

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	2.46	1.23	23.08**	5.14	10.92
Acak	6	0.32	0.05			
Total	8	2.78				

Keterangan **: Sangat Berbeda Nyata

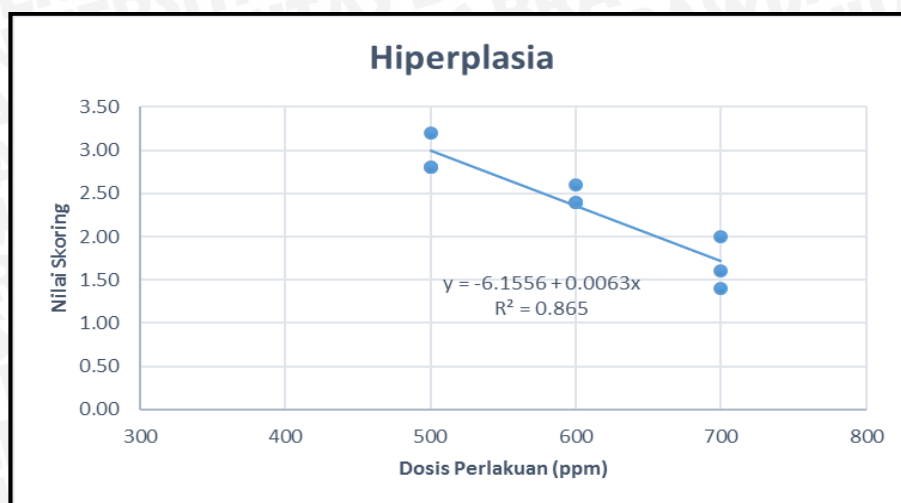
Pada Tabel 4 menunjukkan bahwa pada hasil uji sidik ragam, nilai F hitung $> F_{5\%} < F_{1\%}$, sehingga dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sembung berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan hiperplasia pada histopatologi insang ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan maka perlu dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji BNT Hasil Penelitian Kerusakan Hiperplasia Jaringan Insang

Perlakuan	Rataan	C	B	A	Notasi
		1.67	2.47	2.93	
C	1.67				a
B	2.47	0.80**			b
A	2.93	1.27**	0.47*		c

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda sangat nyata antar perlakuan

Pada Tabel 5 dapat terlihat bentuk kerusakan jaringan yang mengalami hiperplasia didapatkan notasi a, b dan c. Hal ini berarti bahwa perlakuan A (dosis 500 ppm) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan B (dosis 600 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi b. Perlakuan B (dosis 600 ppm) dengan notasi b juga berbeda sangat nyata dengan perlakuan C (dosis 700 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda yaitu notasi c. Kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan A (dosis 500 ppm).



Gambar 8. Grafik Hubungan antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Hiperplasia Ikan Nila

Pada grafik diatas dapat diketahui bahwa hubungan antara dosis ekstrak daun sembung dengan kerusakan hiperplasia pada jaringan insang berbanding terbalik, dimana apabila semakin tinggi dosis maka nilai skoring kerusakan hiperplasia semakin rendah, dan didapatkan persamaan $y = -6,1556 + 0,0063x$ yang memiliki nilai koefisien determinasi yakni 0,865 menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar daun sembung berpengaruh terhadap presentase kerusakan hiperplasia jaringan insang ikan nila karena nilainya mendekati 1, hal ini sesuai dengan pendapat Sarwono (2006), bahwa keselarasan model regresi dapat diterangkan dengan menggunakan nilai R^2 semakin besar nilai tersebut maka model semakin baik. Jikan nilai mendekati 1 maka model regresi semakin baik. Nilai R^2 mempunyai karakteristik diantaranya: 1) Selalu positif, 2) Nilai R^2 maksimal 1. Maksudnya seluruh variasi dalam variabel Y dapat diterangkan oleh model regesi. Sebaiknya jika R^2 sama dengan nol (0), maka tidak ada hubungan linier antara X dan Y.

Perubahan jaringan pada ikan nila, dipengaruhi oleh penambahan dosis ekstrak kasar daun sembung. Hal ini dikarenakan pada daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) terdapat bahan antimikroba seperti flavonoid dan senyawa

aktif lainnya yang terbukti mampu menghambat perkembangan bakteri *A. hydrophila* dalam jaringan insang ikan nila (*O. niloticus*). Pernyataan ini didukung oleh Pelczar dan Chan (2008), bahwa flavonoid merupakan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kinerja protein sel.

2) Fusi

Fusi ditandai dengan adanya lamella sekunder insang yang terlihat menempel satu sama lain, hal ini dikarenakan adanya peleburan antara lamella sekunder sehingga lamella sekunder terlihat menempel dan menyatu. Menurut Panigoro *et al.* (2007), bahwa fusi pada insang merupakan kondisi ruang antara lamella sekunder dengan sel interlamella sangat berdekatan. Jadi lamella insang akan terlihat menyatu. Menurut Camargo dan Martinez (2007), Fusi lamella merupakan hasil akhir dari hiperplasia lamella secara besar-besaran yang mengakibatkan berkurangnya luas permukaan insang.

Perlakuan yang diberikan selama penelitian pada ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) memberikan hasil rerata yang berbeda terhadap histopatologi insang ikan nila yang ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Rerata Skoring Hasil Penelitian Kerusakan Fusi Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	2.80	2.80	2.80	8.40	2.80	0.00
B	2.60	2.40	2.60	7.60	2.53	0.12
C	1.60	1.80	2.00	5.40	1.80	0.20
Total	7.00	7.00	7.40	21.40	7.13	0.32

Berdasarkan Tabel 6 dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan fusi pada jaringan insang ikan nila secara berurutan pada perlakuan A (500 ppm), B (600 ppm) dan C (700 ppm) yaitu 2,80, 2,53 dan 1,80. Rerata terendah diperoleh pada

perlakuan C (700 ppm) hal tersebut diduga karena dosis ekstrak kasar daun sembung yang diberikan dapat mengobati ikan nila yang telah diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) terhadap kerusakan fusi pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang ditunjukkan pada Tabel 7.

Table 7. Sidik Ragam Hasil Penelitian Kerusakan Fusi Jaringan Insang

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
				45.25*	5.1	10.9
Perlakuan	2	1.61	0.80	*	4	2
Acak	6	0.11	0.02			
Total	8	1.72				

Keterangan **: Sangat Berbeda Nyata

Pada tabel 7 menunjukkan bahwa pada hasil uji sidik ragam, nilai F hitung $> F_{5\%} < F_{1\%}$, sehingga dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sembung berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan fusi pada histopatologi insang ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan maka perlu dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang ditunjukkan pada Tabel 8.

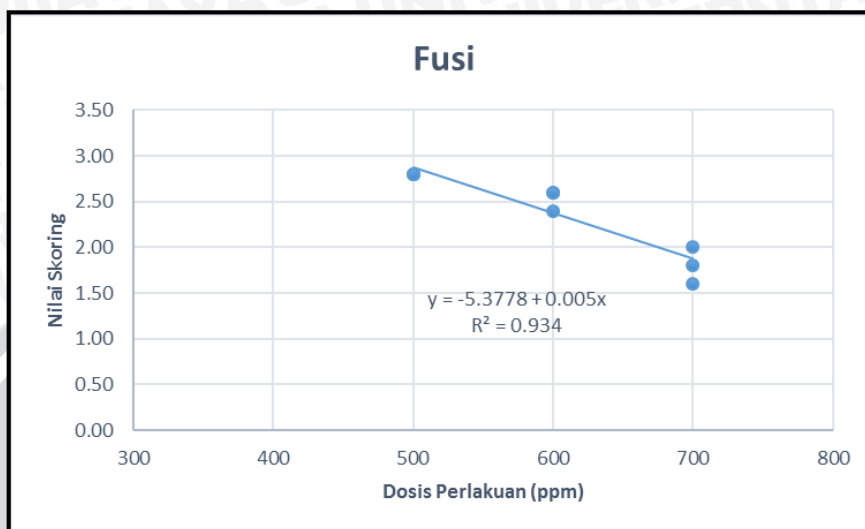
Tabel 8. Uji BNT Hasil Penelitian Kerusakan Fusi Jaringan Insang

Perlakuan	Rataan	C	B	A	Notasi
		1.80	2.53	2.80	
C	1.80				a
B	2.53	0.73**			b
A	2.80	1.00**	0.27*		c

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda sangat nyata antar perlakuan

Pada Tabel 8 dapat terlihat bentuk kerusakan jaringan insang mengalami fusi didapatkan notasi a, b dan c. Hal ini berarti bahwa perlakuan A (dosis 500 ppm) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan B (dosis 600 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi b. Perlakuan B (dosis 600 ppm) dengan notasi b juga berbeda sangat nyata dengan perlakuan C (dosis 700 ppm) dengan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda yaitu notasi c. Kerusakan paling parah

yaitu pada perlakuan A (dosis 500 ppm), diikuti dengan perlakuan B (dosis 600 ppm) dan C (dosis 700 ppm). Semakin tinggi dosis maka tingkat kerusakan fusi pada insang semakin kecil.



Gambar 9. Grafik Hubungan antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Fusi Ikan Nila

Pada grafik diatas didapatkan persamaan $y = -5,3778 + 0,005x$ yang memiliki nilai koefisien determinasi yakni 0,934 menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar daun sembung berpengaruh terhadap presentase kerusakan fusi jaringan insang ikan nila karena nilainya mendekati 1. Hubungan antara dosis ekstrak daun sembung dengan kerusakan fusi pada insang berbanding terbalik, dimana apabila semakin tinggi dosis maka nilai skoring kerusakan fusi semakin rendah. Hal ini sesuai dengan pendapat Rolizawaty *et al.* (2013), bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula bahan aktif yang terkandung sebagai antibakteri sehingga meningkatkan kemampuan daya hambat terhadap mikroba.

Berdasarkan uji fitokimia didapatkan senyawa aktif pada daun sembung antara lain tanin dan alkaloid, namun kandungan terbanyak dimiliki oleh senyawa tanin. Mekanisme kerja tanin adalah dengan cara mengkerutkan dinding sel atau membran sel, sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibatnya sel

tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004).

3) Nekrosis

Nekrosis merupakan kerusakan jaringan sel insang yang diakibatkan adanya kematian sel, sehingga insang terlihat rontok dan berlubang. Menurut Copenhaver *et al.* (1982), bahwa kematian sel merupakan bagian integral dari pertumbuhan jaringan dan organ. Selama perkembangan beberapa jaringan, sejumlah besar sel akan mati. Dalam kasus ini produksi dari tipe sel berbeda-beda, dan hanya ada beberapa sel yang berfungsi seperti bagaimana mestinya untuk bertahan hidup. Kematian sel lokal (nekrosis) terjadi secara normal didalam tubuh, atau mungkin karena pengaruh penyakit, seperti stress dan subtansi interseluler.

Perlakuan yang diberikan selama penelitian pada ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) dengan dosis perlakuan A (500 ppm), B (600 ppm) dan C (700 ppm) memberikan hasil rerata yang berbeda terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang ditunjukkan pada Tabel 9.

Table 9. Rerata Skoring Hasil Penelitian Pengamatan Kerusakan Nekrosis Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3			
A	2.80	3.00	2.80	8.60	2.87	0.12
B	2.60	2.60	2.40	7.60	2.53	0.12
C	1.80	1.40	1.60	4.80	1.60	0.20
Total	7.20	7.00	6.80	21.00	7.00	0.43

Berdasarkan Tabel 9, dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan nekrosis pada jaringan insang ikan nila seacara berurutan pada perlakuan A (500 ppm), B (600 ppm) dan C (700 ppm) yaitu 2,87, 2,53 dan 1,60. Rerata terendah diperoleh pada perlakuan C dengan dosis 700 ppm, hal tersebut diduga bahwa dosis ekstrak kasar daun sembung yang diberikan dapat mengobati ikan nila yang telah diinfeksi

bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Sidik Ragam Skoring Nekrosis Jaringan Insang

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	2.59	1.29	58.20**	5.14	10.92
Acak	6	0.13	0.02			
Total	8	2.72				

Keterangan**: sangat Berbeda Nyata

Pada Tabel 10 dapat ditunjukkan bahwa hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan nekrosis pada histopatologi insang ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, maka diperlukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang ditunjukkan pada Tabel 11.

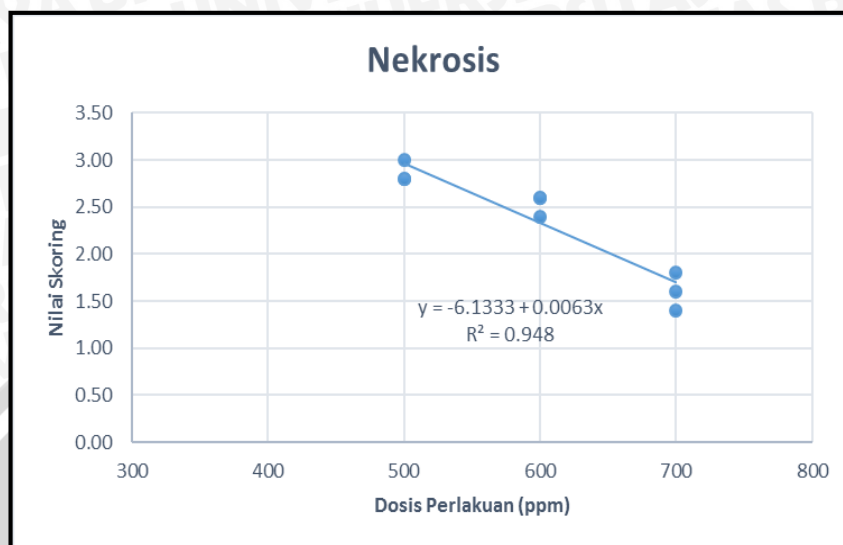
Tabel 11. Uji BNT Skoring Nekrosis Jaringan Insang

Perlakuan	Rataan	C	B	A	Notasi
		1.60	2.53	2.87	
C	1.60				a
B	2.53	0.93**			b
A	2.87	1.27**	0.33*		c

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda sangat nyata antar perlakuan.

Pada Tabel 11, dapat terlihat bentuk kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis didapatkan notasi a, b dan c. Hal ini berarti bahwa perlakuan A (dosis 500 ppm) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan B (dosis 600 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi b. Perlakuan B (dosis 600 ppm) dengan notasi b juga berbeda sangat nyata dengan perlakuan C (dosis 700 ppm) dengan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda yaitu notasi c. Kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan A (dosis 500 ppm), diikuti dengan perlakuan B (dosis 600

ppm) dan C (dosis 700 ppm). Semakin tinggi dosis maka tingkat kerusakan nekrosis pada insang semakin kecil.



Gambar 10. Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Jaringan Insang

Pada grafik diatas dapat dikatakan bahwa dosis ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) berpengaruh terhadap presentase kerusakan jaringan insang nekrosis dimana semakin tinggi dosis maka semakin rendah tingkat kerusakan jaringan insang nekrosis, dapat ditunjukkan pula dengan persamaan $y = -6,1333 + 0,0063x$ yang memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) yakni sebesar 0,948 dimana nilai tersebut mendekati 1 yang artinya dosis ekstrak kasar daun sembung berpengaruh terhadap kerusakan jaringan insang nekrosis ikan nila. Hal tersebut diduga karena ekstrak kasar daun sembung dengan dosis yang semakin tinggi mampu menghambat dan membunuh bakteri *A. hydrophila*, karena diduga dalam daun sembung terdapat zat aktif yang berupa flavonoid yang dapat membunuh bakteri. Sesuai dengan pernyataan (Wahjuningrum *et al.*, 2008), flavonoid merupakan perubah respon alami, kemampuan flavonoid dalam merubah reaksi tubuh terhadap penyebab alergi, virus dan penyebab kanker. Zat ini juga memiliki aktivitas anti-alergi, antiradang, antimikroba dan antikanker.

Berdasarkan uji fitokimia didapatkan senyawa aktif pada daun sembung antara lain tanin dan alkaloid, namun kandungan terbanyak dimiliki oleh senyawa tanin. Hal ini sesuai dengan pendapat Doss *et al.* (2009), bahwa tanin merupakan senyawa antimikroba yang mempunyai kemampuan untuk merusak dinding sel bakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri.

4.2 Gejala Klinis

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil bahwa pada saat perendaman bakteri ikan nila (*O. niloticus*) terlihat gelisah dan berenang tidak beraturan, sedangkan setelah perendaman dengan ekstrak ikan terlihat lebih tenang. Pada saat dilakukan pembedahan insang terlihat memucat dan pada akhir penelitian terdapat luka memar pada bagian bawah mulut di beberapa ikan.

Menurut Rahmaningsih (2016), ikan yang terserang penyakit pada kulitnya akan terlihat lebih pucat (tampak jelas pada ikan yang berwarna gelap) dan berlendir. Ikan tersebut akan menggosokkan tubuhnya pada benda-benda yang ada di sekitarnya. Jika insang ikan terserang, maka menyebabkan ikan sulit bernafas, tutup insang mengembang dan insang menjadi pucat. Jika menyerang organ dalam sering mengakibatkan perut ikan membengkak dengan sisik-sisik yang berdiri. Seringkali dijumpai perut ikan menjadi kempis. Jika menyerang usus biasanya akan mengakibatkan peradangan, dan jika menyerang gelembung renang, ikan akan kehilangan keseimbangan pada saat berenang.

Ikan yang terserang *Aeromonas* sp. cenderung terlihat lemah, gerakannya lambat, kesulitan bernapas, dan sering terlihat megap-megap di permukaan air. warna tubuhnya menjadi lebih gelap, tetapi warna insangnya memucat, kulit kesat, dan timbul pendarahan. Terlihat adanya bercak-bercak merah pada bagian luar tubuhnya dan kerusakan pada sirip, insang, dan kulit. Pendarahan pada saluran kapiler terjadi di permukaan sirip dan submucosa perut ikan. Ikan

memproduksi lendir secara berlebihan dan akhirnya menimbulkan pendarahan (Afrianto *et al.*, 2015).

4.3 Pengamatan Kualitas Air

Air merupakan media tempat hidup ikan selama pemeliharaan. Ikan sangat mudah terserang pathogen pada lingkungan yang kurang baik. Dalam hal ini yang sangat mempengaruhi adalah kualitas air. Kualitas air merupakan faktor yang harus diperhatikan dalam pemeliharaan ikan. Ikan akan tumbuh optimal apabila parameter kualitas air di tempat hidupnya sesuai dengan kisaran toleransi yang dapat diterima oleh ikan tersebut. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Parameter Kualitas Air

No.	Parameter Kualitas Air	Parameter Kualitas Air	Literatur
1	Suhu	26,4-29,4 °C	25-29 °C (Cahyono, 2001)
2	pH	6,7-8,1	5-8,7 (Cahyono, 2001)
3	Oksigen Terlarut	4,9-8,7 ppm	>3 ppm (Cahyono, 2000)

Berdasarkan Tabel 12 diperoleh hasil bahwa air sebagai media pemeliharaan dan media hidup ikan uji selama perlakuan masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologis ikan uji.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) dengan konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Dosis terbaik terdapat pada perlakuan C (700 ppm) dengan rerata nilai skoring kerusakan hiperplasia (1,67), fusi (1,80) dan nekrosis (1,60). Daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) mempunyai sifat antibakteri seperti alkaloid, tanin dan flavonoid sehingga semakin tinggi dosis maka semakin kecil tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan insang karena kandungan senyawa aktif juga semakin tinggi.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan hasil pada dosis 700 ppm mendapatkan hasil terbaik dibandingkan dosis 500 ppm dan 600 ppm namun belum didapatkan dosis yang optimal untuk pemberian ekstrak. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis optimal dari pemberian ekstrak kasar daun sembung (*B. balsamifera* (L) DC.) untuk pengobatan ikan nila (*O. niloticus*) tentang histopatologi jaringan insang yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, E. 2005. Tanaman Obat Untuk Mengatasi Hepatitis. Agromedia Pustaka: Jakarta. 94 hlm.
- Ajizah, A. 2004. Sensivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. *Jurnal Bioscientie*. **1** (1): 31-38.
- Afrianto, E., E. Liviawaty., Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penerbit Swadaya: Jakarta. 220 hlm.
- Arfianto, E. dan E. Liviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan Kanisius. Jakarta
- Burhanudin, A. I. 2014. Ikhtiologi Ikan dan Segala Aspek Kehidupannya. Deepublish. Yogyakarta. 421 hlm.
- Cahyono, B. 2000. Budidaya Ikan Air. Kanisius: Yogyakarta. 114 hlm.
- . 2001. Budidaya Ikan Di Perairan Umum. Kanisius: Yogyakarta. 93 hlm.
- Carman, O. dan A. Sucipto. 2009. Panen Nila 2,5 Bulan. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Camargo, M. M. P., dan B. R. M. Claudia. 2007. *Histopathology of Gills, Kidney and Liver of a Neotropical Fish Caged in an Urban Stream*. *Neotropical Ichthyology* **5**(3): 327-336.
- Copenhaver, W.M., Kelly, D.E. and Wood, R.L. 1982. *Bailey's Textbook of Histology*. Igaku Shoin. Tokyo
- Ditjen POM. 2008. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal 3-5, 10-11
- Doss, A., H. M. Mubarak dan R. Dhanabalan. 2009. Antibacterial Activity of Tanins from the Leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian journal of Science and Technology*. **2** (2): 41-43
- Ghufran, M. H. dan K. Kordi. 2013. Budidaya Nila Unggul. Penerbit Agromedia Pustaka. Jakarta Selatan. 148 hlm.
- Ghufran, M. H. 2014. Uji Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Brawijaya: Malang.
- Hani, I. 2008. Uji Efek Ekstrak Etanol 70% Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Kelinci Jantan. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta.

- Haryani, A., R. Grandiosa., I, D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji efektifitas daun papaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3): 213-220.
- Hastjarjo, T. D. 2014. Rancangan eksperimen acak. *Buletin Psikologi*. **22** (2): 73-86.
- Herliana, E. 2013. Diabetes Kandas Berkat Herbal. Penerbit Fmedia (Imprint Agromedia Pustaka). Jakarta Selatan. 106 hlm.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Universitas Gajah Mada Press. Yogyakarta
- Isnawati, A., M, Raini., S, Alegantina. 2006. Standarisasi Simplisia Dan Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) Dari Tiga Tempat Tumbuh. Media Litbang Kesehatan XVII
- Kabata, Z. 1985. *Oarasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics*. London and Philadelphia: Taylor and Fancis Press.
- Kakkilaya, B.S. 2002. *Peripheral smear examination for malaria parasite.CE Update Microbiology Molecular Diagnostics*. **34**(8): 602-608.
- Khairuman dan K. Amri. 2012. Pembesaran Nila di Kolam Air Deras. Penerbit Agromedia:Jakarta Selatan. 92 hlm
- . 2013. Budidaya Ikan Nila. Agromedia Pustaka: Jakarta. 108 hlm.
- Kordi, M. G. H. 2011. Budi Daya Ikan Nila di Kolam Terpal. Lily Publisher: Yogyakarta. 112 hlm.
- Martin, J. 2004. *Aeromonas hydrophila*. <http://web.mst.edu>. Diakses 11 Januari 2016.
- Maryani, H dan Suharmiati. 2003. Tanaman Obat untuk Mengatasi Penyakit pada Usia Lanjut. PT Agromedia Pustaka: Yogyakarta. 73 hlm.
- Miranti, M., Prasectorini dan C. Suwary. 2013. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 30% dan 96% Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Ekologia*. **13**(1): 9-18
- Murtidjo, B. A. 2001. Beberapa Metode Pembenihan Ikan Air Tawar. Kanisius. Yogyakarta. 107 hlm.
- Nabib, R. Dan F.H. Passaribu. 1989. Patologi dan Penyakit Ikan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Bogor. Bogor.158 hlm
- Omar, S. B. A. 1987. Penuntun Praktikum Ichtyologi. Jurusan Perikanan Universitas Hasanuddin, Ujungpandang.

- Panigoro, N., I. Astuti., M. Bahnan., D. Prayuda., K. Wakita. 2007. Teknik Dasar Histologi Dan Atlas Dasar Histopatologi Ikan. Jambi.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 2008. Dasar-dasat Mikrobiologi 1. Universitas Indonesia Press. Malang. 443 hlm.
- Rahmaningsih, S. 2016. Diktat Mata Kuliah Hama dan Penyakit Ikan. Publisher. Yogyakarta. 352 hlm.
- Raza'i, T.S. 2008. *Analisis Histopatologi Organ Insang dan Usus Ikan Kerapu Lumpur (Epinephelus coloides) yang Diberi Khamir Laut (Marine Yeast) Sebagai Immunostimulan*. Tesis. 95 hlm.
- Roberts, R.J. 2001. Fish Pathology. 3rd ed. WB Saunders, London.
- Robinson, T., 1995, Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, Edisi VI, Hal 191-216, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung.
- Roslizawaty, Y. R. Nita, Fakhurrazi dan Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakterial Ekstrak etanol dan Rebusan sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Eschericia coli*. *Journal Medika Veterinaria*, **7** (2): 91-94
- Samsundari, S. 2006. Pengujian Ekstrak Temulawak Dan Kunyit Terhadap Resistensi Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Yang Menyerang Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). *Gamma*, **11** (1): 71-83.
- Saparinto, C. 2009. Budidaya Ikan Di kolam Terpal. Penebar Swadaya: Jakarta. 97 hlm
- Sarwono, J. 2006. Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius: Yogyakarta. 276 hlm.
- Setyowati, A., D. Hidayati., P. N. Awik dan N. Abdulgani. 2010. Studi histopatologi hati Ikan Belanak (*Mugil cephalus*) Di Muara Sungai Aloo Sidoarjo. *Jurnal Akuakultur*, **1** (1): 1-10.
- Simanjuntak, Marojahan. 2012. Kualitas air laut ditinjau dari aspek zat hara oksigen terlarut dan pH di perairan Banggal, Sulawesi Tengah. *Jurnal ilmu dan teknologi kelautan*, **4** (2): 1-10.
- Subali, B. 2010. Metodologi Penelitian Pendidikan Biologi. Universitas Negeri Yogyakarta: Yogyakarta. 58 hlm.
- Sukiya. 2003. Biologi Vertebrata. Universitas Negeri Yogyakarta: JICA
- Supriyono. 2007. Pengujian lethal dosis (LD 50) ekstrak etanol biji buah duku (*Lansium domesticum* Corr) pada mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor: Bogor.

- Susanto, H. 1986. Budidaya Ikan di Pekarangan. Penebar Swadaya: Jakarta. 152 hlm.
- Suyanto, S. R. 2010. Pembenihan dan Pembesaran Nila. Penerbit Penebar Swadaya. 124 hlm
- Tanjung, S. 1982. *The Toxicity of Aluminium for Organs of Salvinus Fontanalis Mitchill In Acid Water* . Jakarta.
- Tanjung, L. R., N. H. Sadi., M. Maghfiroh., R. Dina dan D. S. Said. 2013. Keanekaragaman bakteri *Aeromonas* dari KJA di Waduk Jatiluhur dan kolam budidaya di Pulau Lombok dan Sumbawa. *LIMNOTEK*. **20** (1): 100-110.
- Wahjuningrum, D., N. Ashry dan S. Nuryati. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Kasar Daun Ketapang (*Terminalia cattapa*) untuk pencegahan Pengobatan Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Akuakultur Indonesia*, **7**(1): 79-94.
- Wilson, J.M. dan P. Laurent. 2002. Fish Gill Morphology. *Journal of Experimental Zoology*, **293** (3): 192-213.
- Yogananth, N., R. Bhakayaraj., A. Chanthuru., T. Anbalagan dan M. Nila. 2009. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolates from Fish Samples Using PCR Thecnique. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* **4** (1): 51-53.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Penelitian

a). Alat yang digunakan dalam penelitian



Rotary Evaporator



Timbangan Digital



pH Meter



DO Meter



Microtom Rotary



Akuarium



Termometer



Tabung Reaksi



Autoklaf



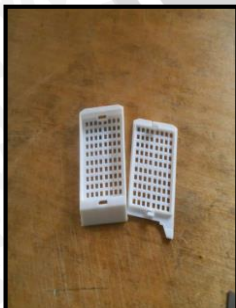
Handtally Counter



Sectio Set



Botol Film



Wadah Embedding



Mikroskop



Inkubator



Beaker Glass

Lampiran 1. (Lanjutan)



Aerator Set



Hot Plate



Vortex



Laminary Flow



Seser Ikan



Sprayer



Erlenmeyer



Nampian



Gelas Ukur



Lap Basah

Lampiran 2. Bahan Penelitian

b). Bahan yang digunakan dalam penelitian



Serbuk
Daun Sembung



TSA



NB



Aluminium Foil



Plastic Wrap



Ikan Nila



Formalin 10%



Tisu



Kertas Label



Organ Insang Ikan Nila



Haematoxilín



Etanol



Alkohol Absolut



Alkohol 96%



Alkohol 80%



Lithium Carbonat

Lampiran 2. (Lanjutan)



Alkohol 96%



Alkohol 70%



Ekstrak Daun Sembung

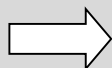
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 3. Proses Ekstraksi Daun Sembung (*B. balsamifera* (L.) DC.)



Penyaringan Daun Sembung



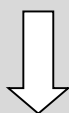
Daun Sembung di Maserasi selama 48 jam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3 (daun sembung : etanol)



Proses evaporasi dilakukan dengan suhu 50°C dan kecepatan 90 rpm dengan Vaccum Rotary Evaporator

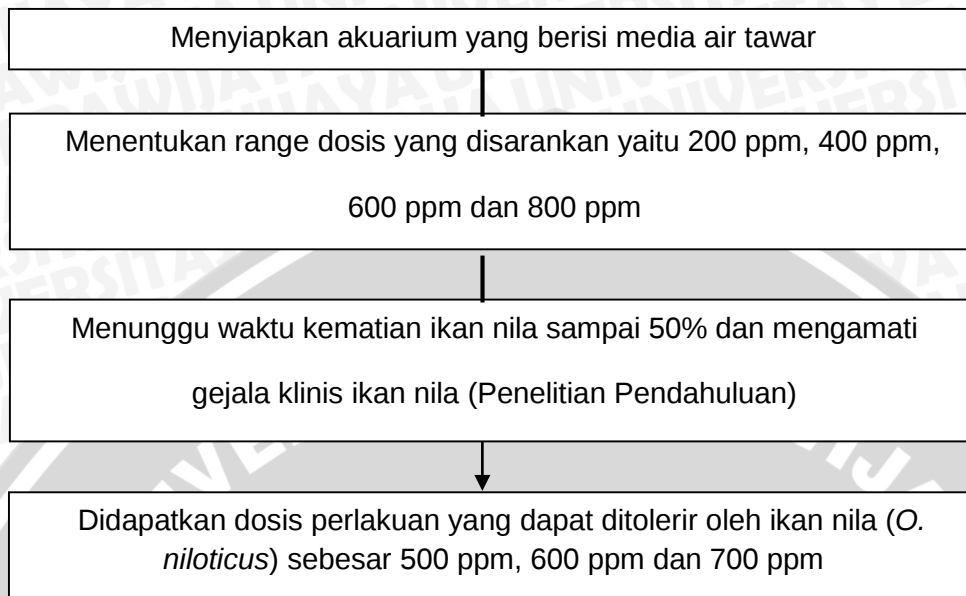


Proses Evaporasi



Ekstrak Kasar Daun Sembung

Lampiran 4. Penentuan Dosis Perendaman Ikan dengan Ekstrak Kasar Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.)



Lampiran 5. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang Ikan Nila (*O. niloticus*)

Organ	Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata sampel
				1	2	3	4	5		
Insang	Hiperplasia	A	1	3	4	3	3	3	3.2	2.93
			2	3	3	2	3	3	2.8	
			3	3	3	3	2	3	2.8	
		B	1	3	2	2	2	3	2.4	2.47
			2	3	2	3	3	2	2.6	
			3	2	2	3	2	3	2.4	
		C	1	2	2	1	2	1	1.6	1.67
			2	2	2	2	2	2	2	
			3	1	1	2	2	1	1.4	
		K(-)	1	1	1	1	1	1	1	1
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
		K(+)	1	3	4	3	3	3	3.2	3.13
			2	3	3	3	3	3	3	
			3	3	4	3	3	3	3.2	
	Fusi	A	1	3	3	2	2	4	2.8	2.8
			2	4	2	3	3	2	2.8	
			3	3	3	3	2	3	2.8	
		B	1	3	2	3	2	3	2.6	2.53
			2	2	2	2	3	3	2.4	
			3	2	3	2	3	3	2.6	
		C	1	2	2	1	2	1	1.6	1.8
			2	1	2	2	2	2	1.8	
			3	2	2	2	2	2	2	
		K(-)	1	1	1	1	1	1	1	1
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
		K(+)	1	3	4	3	3	3	3.2	3.27
			2	3	3	3	3	4	3.2	
			3	3	3	3	4	4	3.4	
	Nekrosis	A	1	3	4	2	3	2	2.8	2.87
			2	3	2	3	3	4	3	
			3	2	3	3	3	3	2.8	
		B	1	3	2	3	2	3	2.6	2.53
			2	2	3	2	3	3	2.6	
			3	2	3	2	2	3	2.4	
		C	1	2	1	2	2	2	1.8	1.6
			2	1	2	2	1	1	1.4	
			3	2	2	2	1	1	1.6	

	1	1	1	1	1	1	1	
K(-)	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	
	1	3	3	3	2	4	3	
K(+)	2	4	3	4	3	3	3.4	3.67
	3	3	4	3	3	4	3.4	

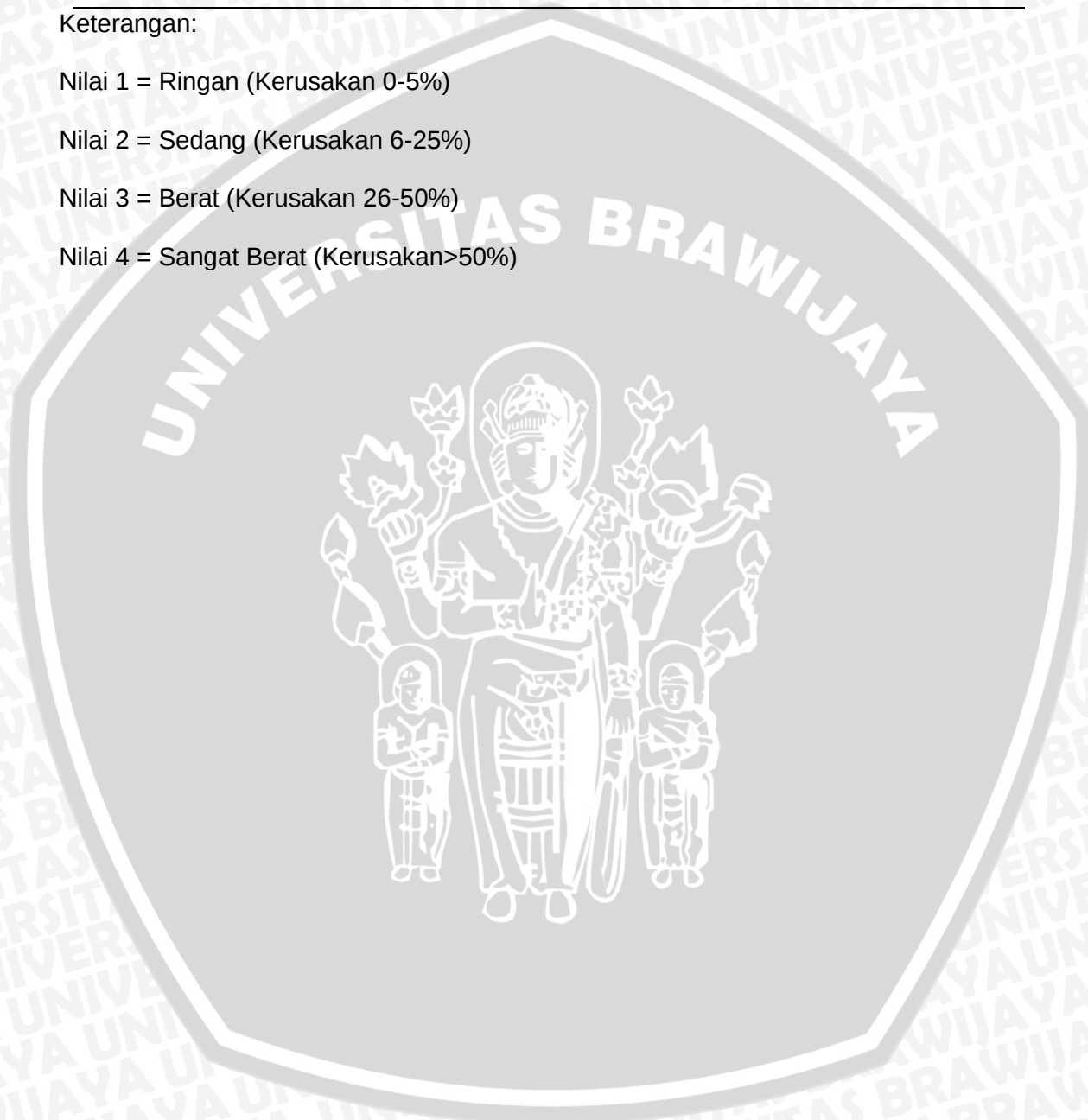
Keterangan:

Nilai 1 = Ringan (Kerusakan 0-5%)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6-25%)

Nilai 3 = Berat (Kerusakan 26-50%)

Nilai 4 = Sangat Berat (Kerusakan>50%)



Lampiran 6. Perhitungan Kerusakan Jaringan Insang Ikan Nila

a) Hiperplasia

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata	SD
	1	2	3			
500 ppm (A)	3.20	2.80	2.80	8.80	2.93	0.23
600 ppm (B)	2.40	2.60	2.40	7.40	2.47	0.12
700 ppm (C)	1.60	2.00	1.40	5.00	1.67	0.31
Total	7.20	7.40	6.60	21.00	7.07	0.65

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \text{Total}^2 / n.r \\ &= (21,20)^2 / 9 \\ &= 49,94\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat (JK) Total} &= (A1)^2+(A2)^2+(A3)^2+(B1)^2+.....+(C3)^2 - FK \\ &= (3,2)^2+(2,8)^2+(2,8)^2+(2,4)^2+.....+(1,4)^2- 49,94 \\ &= 2,78\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan} &= \frac{\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2}{r} - FK \\ &= \frac{7,2^2 + 7,4^2 + 6,6^2}{3} - 49,94 \\ &= 2,46\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 2,78 - 2,46 \\ &= 0,32\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas (db) Total} &= (t)*(r) - 1 \\ &= (3) * (3) - 1 \\ &= 8\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Db Perlakuan} &= (t) - 1 = (3) - 1 = 2 \\ \text{Db Acak} &= \text{db Total} - \text{db Acak} = 8 - 2 = 6\end{aligned}$$

$$\text{Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} = \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}} = \frac{2,46}{2} = 1,23$$

$$\text{KT Acak} = \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}} = \frac{0,32}{6} = 0,05$$

$$\text{F Hitung} = \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}} = \frac{1,23}{0,05} = 23,08$$

Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	2	2,46	1,23	23,08**	5,14	10,92
Acak	6	0,32	0,05			
Total	8	2,78				

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

Karena didapatkan hasil nilai F hitung lebih besar dari F tabel 5% dan F tabel 1%, maka dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Menghitung Nilai BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{2 \text{ KT acak/r}} = \sqrt{2 \times 0,05 / 3} = 0,19 \\ \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\%} \times \text{SED} = 1,943 \times 0,19 = 0,46 \\ \text{BNT 1\%} &= t \text{ tabel 1\%} \times \text{SED} = 3,143 \times 0,19 = 0,70 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rerata	C	B	A	Notasi
		1,67	2,47	2,93	
C	1,67	-			A
B	2,47	0,80**	-		B
A	2,93	1,27**	0,47*	-	C

Keterangan : * = berbeda nyata
 ** = berbeda sangat nyata

Perhitungan Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	8,80	-1	1
B	7,40	0	-2
C	5,00	1	1
Q=ΣCi*Ti		-3,80	-1,00
Hasil Kuadrat Ci		2	6
Kr= (ΣCi^2)*r		6	18
JK regresi =Q^2/Kr		2,4067	0,0556

$$\begin{aligned} \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} \\ &= 2,4067 + 0,0556 \\ &= 2,4623 \end{aligned}$$

Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	2,46	-	-	-	-
Linier	1	2,41	2,41	45,13**	5,99	13,75
Kuadratik	1	0,06	0,06	1,04 ns	5,99	13,75
Acak	6	0,32	0,05			
Total	8					

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata
 ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

Menghitung R Square (R²)

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} = \frac{2,41}{2,41 + 0,32} = 0,883$$

Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 6,156 - 0,006x$ dengan perhitungan sebagai berikut:

Perlakuan	X	Y	xy	X ²
A1	500	3.2	1600	250000
A2	500	2.8	1400	250000
A3	500	2.8	1400	250000
B1	600	2.4	1440	360000
B2	600	2.6	1440	360000
B3	600	2.4	1440	360000
C1	700	1.6	1120	490000
C2	700	2.0	1400	490000
C3	700	1.4	980	490000
Total	$\Sigma x = 5400$	$\Sigma y = 21,20$	$\Sigma xy = 12340$	$\Sigma x^2 = 3300000$
Rata-rata	$\bar{x} = 600$	$\bar{y} = 2,36$	1371,11	366666,7

Mencari b₁

$$b_1 = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} = \frac{12340 - \frac{5400 \times 21,20}{9}}{3300000 - \frac{5400^2}{9}} = -0,006$$

Mencari b₀

$$\begin{aligned} b_0 &= \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} \\ &= 2,36 - (-0,006 \cdot 600) \\ &= 6,156 \end{aligned}$$

Persamaan regresi linier adalah $y = b_0 + b_1 \cdot x$ sehingga didapatkan persamaan $y = 6,156 - 0,006x$.

Lampiran 6. (Lanjutan)

b). Fusi

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang			Jumlah	Rerata	SD
	Pandang					
	1	2	3			
500 ppm (A)	2.80	2.80	2.80	8.40	2.80	0.00
600 ppm (B)	2.60	2.40	2.60	7.60	2.53	0.12
700 ppm (C)	1.60	1.80	2.00	5.40	1.80	0.20
Total	7.00	7.00	7.40	21.40	7.13	0.32

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \text{Total}^2 / n.r \\ &= (21,4)^2 / 9 \\ &= 50,88\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat (JK) Total} &= (A1)^2 + (A2)^2 + (A3)^2 + (B1)^2 + \dots + (C3)^2 - \text{FK} \\ &= (2,8)^2 + (2,8)^2 + (2,8)^2 + (2,6)^2 + \dots + (2)^2 - 50,88 \\ &= 1,72\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan} &= \frac{\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{7^2 + 7^2 + 7,4^2}{3} - 50,88 \\ &= 1,61\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 1,72 - 1,61 \\ &= 0,11\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas (db) Total} &= (t) * (r) - 1 \\ &= (3) * (3) - 1 \\ &= 8\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Db Perlakuan} &= (t) - 1 = (3) - 1 = 2 \\ \text{Db Acak} &= \text{db Total} - \text{db Acak} = 8 - 2 = 6\end{aligned}$$

$$\text{Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} = \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}} = \frac{1,61}{2} = 0,80$$

$$\text{KT Acak} = \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}} = \frac{0,11}{6} = 0,02$$

$$\text{F Hitung} = \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}} = \frac{0,80}{0,02} = 45,25$$

Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	2	1.61	0.80	45.25**	5.14	10.92
Acak	6	0.11	0.02			
Total	8	1.72				

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lampiran)

Karena didapatkan hasil nilai F hitung lebih besar dari F tabel 5% dan F tabel 1%, maka dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Menghitung Nilai BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{2 \text{ KT acak/r}} = \sqrt{2 \times 0,01 / 3} = 0,11 \\ \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\%} \times \text{SED} = 1,943 \times 0,11 = 0,27 \\ \text{BNT 1\%} &= t \text{ tabel 1\%} \times \text{SED} = 3,143 \times 0,11 = 0,40 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rerata	C	B	A	Notasi
		1.80	2.53	2.80	
C	1.80				a
B	2.53	0.73**			b
A	2.80	1.00**	0.27*		c

Keterangan : * = berbeda nyata
 ** = berbeda sangat nyata

Perhitungan Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadrat
A	8.40	-1	1
B	7.60	0	-2
C	5.40	1	1
Q=Σci*Ti		-3.00	-1.40
Hasil Kuadrat Ci		2	6
Kr= (Σci^2)*r		6	18
JK regresi =Q^2/Kr		1.5	0.108889

$$\begin{aligned} \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadrat} \\ &= 1,5 + 0,109 \\ &= 1,609 \end{aligned}$$

Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	1,61				
Linier	1	1,5	1,5	84,37**	5,99	13,75
Kuadrat	1	0,11	0,11	10*	5,99	13,75
Acak	6	0,11	0,02			
Total	8					

Keterangan: * = berbeda nyata
 ** = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

Menghitung R Square (R²)

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} = \frac{1,5}{1,5 + 0,11} = 0,934$$

Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 5,378 - 0,005x$ dengan perhitungan sebagai berikut:

Perlakuan	x	Y	xy	X ²
A1	500	2,8	1400	250000
A2	500	2,8	1400	250000
A3	500	2,8	1400	250000
B1	600	2,6	1560	360000
B2	600	2,4	1440	360000
B3	600	2,6	1560	360000
C1	700	1,6	1120	490000
C2	700	1,8	1260	490000
C3	700	2,0	1400	490000
Total	$\Sigma x = 5400$	$\Sigma y = 21,4$	$\Sigma xy = 12540$	$\Sigma x^2 = 3300000$
Rata-rata	$\bar{x} = 600$	$\bar{y} = 2.3778$	1393,333	366666,67

Mencari b₁

$$b_1 = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{n}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} = \frac{12540 - \frac{5400 \times 21,4}{9}}{3300000 - \frac{5400^2}{9}} = -0,005$$

Mencari b₀

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} = 2.3778 - (-0.005 \cdot 600) = 5,3778$$

Persamaan regresi linier adalah $y = b_0 + b_1 \cdot x$ sehingga didapatkan persamaan $y = 5,3778 - 0,005x$.

Lampiran 6. (Lanjutan)

c). Nekrosis

Perlakuan	Ulangan Rerata			Jumlah	Rerata	SD
	Lapang	Pandang				
	1	2	3			
500 ppm (A)	2,8	3,0	2,8	8,6	2,87	0,12
600 ppm (B)	2,6	2,6	2,4	7,6	2,53	0,12
700 ppm (C)	1,8	1,4	1,6	4,8	1,6	0,20
Total	7,2	7,0	7,2	21,0	7,00	0,43

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \text{Total}^2 / n.r \\ &= (21)^2 / 9 \\ &= 49\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat (JK) Total} &= (A1)^2 + (A2)^2 + (A3)^2 + (B1)^2 + \dots + (C3)^2 - \text{FK} \\ &= (2,8)^2 + (3,0)^2 + (2,8)^2 + (2,6)^2 + \dots + (1,6)^2 - 49 \\ &= 2,72\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan} &= \frac{\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{7,2^2 + 7,2^2 + 7,2^2}{3} - 49 \\ &= 2,59\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Kuadrat Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 2,72 - 2,59 \\ &= 0,13\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas (db) Total} &= (t) * (r) - 1 \\ &= (3) * (3) - 1 \\ &= 8\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Db Perlakuan} &= (t) - 1 = (3) - 1 = 2 \\ \text{Db Acak} &= \text{db Total} - \text{db Acak} = 8 - 2 = 6\end{aligned}$$

$$\text{Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} = \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db Perlakuan}} = \frac{2,59}{2} = 1,29$$

$$\text{KT Acak} = \frac{\text{JK Acak}}{\text{db Acak}} = \frac{0,13}{6} = 0,02$$

$$\text{F Hitung} = \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}} = \frac{1,29}{0,02} = 58,20$$

Analisis Sidik Ragam

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	2	2,59	1,29	58,20**	5,14	10,92
Acak	6	0,13	0,02			
Total	8	2,72				

Keterangan: * = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

Karena didapatkan hasil nilai F hitung berada diantara F tabel 5% dan F tabel 1%, maka dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Menghitung Nilai BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{2 \text{ KT acak/r}} = \sqrt{2 \times 0.013 / 3} = 0.12 \\ \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\%} \times \text{SED} = 1.943 \times 0.12 = 0.30 \\ \text{BNT 1\%} &= t \text{ tabel 1\%} \times \text{SED} = 3.143 \times 0.12 = 0.45 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rerata	C	B	A	Notasi
		1,60	2,53	2,87	
C	1,60	-			a
B	2,53	0.93**	-		b
A	2,87	1,27**	0.33*	-	c

Keterangan: * = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

Perhitungan Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	8.6	-1	1
B	7.6	0	-2
C	4.8	1	1
Q=Σci*Ti		-3.8	1.8
Hasil Kuadrat Ci		2	6
Kr= (Σci^2)*r		6	18
JK regresi =Q^2/Kr		2.406667	0.18

$$\begin{aligned} \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} \\ &= 2,4067 + 0,18 \\ &= 2,5867 \end{aligned}$$

Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	2,59	-	-	-	-
Linier	1	2,41	2,41	108,30**	5,99	13,75
Kuadratik	1	0,18	0,18	8,10*	5,99	13,75
Acak	6	0,13	0,02			
Total	8	1,182				

Keterangan: * = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

Mencara R Square (R^2)

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} = \frac{2,41}{2,41 + 0,13} = 0,948$$

Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 6,133 - 0,006x$ dengan perhitungan sebagai berikut:

Perlakuan	x	y	xy	x^2
A1	500	2,8	1400	250000
A2	500	3,0	1500	250000
A3	500	2,8	1400	250000
B1	600	2,6	1560	360000
B2	600	2,6	1560	360000
B3	600	2,4	1440	360000
C1	700	1,8	1260	490000
C2	700	1,4	980	490000
C3	700	1,6	1120	490000
Total	$\Sigma x = 5400$	$\Sigma y = 21,00$	$\Sigma xy = 12220$	$\Sigma x^2 = 3300000$
Rata-rata	$\bar{x} = 600$	$\bar{y} = 2,33$	1357,78	366666,7

Mencari b_1

$$b_1 = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{n}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} = \frac{12220 - \frac{5400 \cdot 21,2}{9}}{3300000 - \frac{5400^2}{9}} = -0,006$$

$$\begin{aligned} b_0 &= \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} \\ &= 2,33 - (-0,006 \cdot 600) \\ &= 6,133 \end{aligned}$$

Persamaan regresi linier adalah $y = b_0 + b_1 \cdot x$ sehingga didapatkan persamaan $y = 6,133 - 0,006x$.

Lampiran 7. Data Kualitas Air

a). Suhu

Akuarium	Rabu		Kamis		Jumat		Sabtu		Minggu		Senin	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
A1	26,4	27,5	26,6	27,5	27,2	29,3	27,2	29,3	26,9	28,2	27,4	28,9
A2	26,9	28,5	26,6	27,6	26,8	28,5	26,7	28,5	27,1	28,7	26,3	27,9
A3	26,9	28,3	26,7	28,5	26,9	28,4	26,9	28,4	27,2	28,5	26,4	28,3
Rata-rata	26,7	28,1	26,6	27,9	27,0	28,7	26,9	28,7	27,1	28,5	26,7	28,4
B1	26,6	28,3	26,4	27,4	26,3	28,3	26,3	28,4	26,4	28,5	27,3	29,3
B2	26,5	27,9	26,3	27,9	26,7	27,8	26,7	28,7	26,8	28,9	26,4	28,7
B3	26,9	27,3	26,6	27,3	27,1	28,4	27,4	28,4	27,3	28,6	27,4	28,4
Rata-rata	26,7	27,8	26,4	27,5	26,7	28,2	26,8	28,5	26,8	28,7	27,0	28,8
C1	26,4	27,4	26,3	27,6	26,5	27,9	26,5	28,4	26,3	28,5	27,1	28,5
C2	26,8	27,8	26,7	27,9	26,6	28,3	26,7	28,3	26,4	28,2	27,2	28,4
C3	26,4	27,4	26,7	27,9	26,8	28,8	26,8	28,3	26,5	28,4	26,9	28,4
Rata-rata	26,4	27,5	26,6	27,8	26,6	28,3	26,7	28,3	26,4	28,4	27,1	28,4
K(+)-1	26,3	28,7	27,2	28,3	26,8	28,3	27,1	28,4	27,4	28,3	27,3	28,4
K(+)-2	26,8	28,3	26,8	28,4	26,4	28,4	27,3	28,9	27,4	28,9	26,9	28,3
K(+)-3	26,9	28,4	26,6	28,9	26,8	28,5	27,4	28,5	27,2	28,8	27,2	28,8
Rata-rata	26,7	28,5	26,9	28,5	26,7	28,4	27,3	28,6	27,3	28,7	27,1	28,5
K(-)-1	26,7	27,5	26,9	27,5	26,9	28,3	26,6	28,4	26,9	28,1	26,5	28,8
K(-)-2	26,3	27,8	27,1	27,8	27,1	29,1	27,1	29,4	27,3	29,1	26,4	28,3
K(-)-3	26,9	27,6	26,7	27,6	26,4	28,7	26,3	28,7	26,4	28,1	26,8	27,8
Rata-rata	26,6	27,6	26,9	27,6	26,8	28,7	26,7	28,8	26,9	28,4	26,6	28,3

- Kisaran suhu selama penelitian adalah 26,4-29,4° C

Lampiran 7. (Lanjutan)

b). Oksigen Terlarut (DO)

Akuarium	Rabu		Kamis		Jumat		Sabtu		Minggu		Senin	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
A1	7,7	7,6	7,7	7,4	7,3	8,0	7,8	7,0	5,0	4,9	8,1	7,9
A2	7,3	7,2	7,4	6,9	7,9	8,5	8,3	7,9	8,1	8,0	8,4	8,4
A3	6,9	6,2	7,1	5,7	6,5	7,2	6,4	7,3	5,9	6,7	7,3	7,8
Rata-rata	7,3	7,0	7,4	6,6	7,3	7,9	7,5	7,4	6,3	6,5	7,9	8,1
B1	7,2	7,4	6,2	6,3	7,5	7,3	6,8	6,6	7,6	7,7	8,0	8,0
B2	6,2	5,6	7,7	6,1	7,0	5,9	6,7	5,6	5,8	6,6	7,8	6,9
B3	7,4	7,0	7,3	6,9	7,3	7,6	7,4	7,3	7,1	7,4	7,7	7,8
Rata-rata	6,9	6,7	7,1	6,4	7,3	6,9	7,0	6,5	6,9	7,2	7,8	7,6
C1	7,1	6,2	7,3	6,8	7,1	7,1	7,3	7,2	6,8	7,4	7,7	7,6
C2	7,4	7,4	7,9	7,5	7,6	7,6	7,6	7,9	7,8	7,9	7,9	7,8
C3	6,9	7,0	7,5	7,2	7,3	7,2	7,4	7,6	7,6	7,9	8,0	7,8
Rata-rata	7,1	6,9	7,6	7,2	7,3	7,3	7,4	7,6	7,4	7,7	7,9	7,7
K(+)-1	7,8	7,3	8,0	7,5	7,9	8,5	7,5	7,9	7,9	7,3	8,0	8,1
K(+)-2	7,9	7,6	7,8	7,1	7,5	7,8	7,4	7,2	7,2	7,1	7,6	7,5
K(+)-3	6,9	6,5	8,2	7,5	7,9	8,7	8,3	7,4	7,4	7,8	7,8	7,8
Rata-rata	7,5	7,1	8,0	7,4	7,7	8,3	7,7	7,5	7,5	7,4	7,8	7,8
K(-)-1	7,3	6,8	6,8	6,8	6,5	7,1	6,4	5,8	5,8	7,3	7,8	7,8
K(-)-2	6,9	5,5	6,4	6,1	6,3	6,8	6,2	6,1	7,5	7,5	8,0	7,4
K(-)-3	7,3	7,0	7,2	7,4	7,4	7,2	7,2	7,5	7,6	7,6	7,8	7,9
Rata-rata	7,2	6,4	6,8	6,8	6,7	7,0	6,6	6,5	6,7	7,4	7,9	7,7

- Kisaran DO selama penelitian adalah 4,9-8,7 mg/l

Lampiran 7. (Lanjutan)

c). pH

Akuarium	Rabu		Kamis		Jumat		Sabtu		Minggu		Senin	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
A1	7,8	7,9	8,0	8,1	8,1	8,2	8,1	7,3	7,1	6,7	6,8	6,9
A2	7,6	7,8	8,1	8,0	8,0	8,1	8,0	7,9	8,1	8,1	8,0	8,0
A3	7,3	7,5	7,4	7,4	7,2	7,6	7,5	7,3	7,7	7,4	7,2	7,2
Rata-rata	7,6	7,7	7,8	7,8	7,8	8,0	7,9	7,5	7,6	7,4	7,3	7,3
B1	7,5	7,6	7,4	7,4	7,4	7,5	7,7	7,6	8,0	7,7	7,9	8,2
B2	7,3	7,4	7,4	7,4	7,3	7,6	7,6	7,4	7,6	7,4	7,5	7,6
B3	7,5	7,8	7,9	8,0	7,9	7,9	8,2	7,9	8,1	7,7	7,9	8,0
Rata-rata	7,4	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,8	7,7	7,9	7,6	7,8	8,0
C1	7,3	7,6	7,7	7,7	7,6	7,7	8,0	7,9	8,1	7,9	8,0	8,1
C2	7,6	7,9	8,0	8,1	8,0	8,1	8,1	8,1	8,1	8,0	8,1	8,1
C3	7,9	8,1	7,8	8,0	7,9	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
Rata-rata	7,6	7,8	7,8	7,9	7,8	7,9	8,1	8,0	8,1	8,0	8,1	8,1
K(+)-1	7,6	7,9	7,9	7,8	7,9	7,9	7,8	7,8	8,1	7,5	7,6	7,7
K(+)-2	7,4	7,7	7,9	7,8	7,8	7,8	8,1	7,8	7,9	7,5	7,6	7,6
K(+)-3	7,0	7,2	8,0	8,0	7,8	7,9	7,8	7,7	8,0	7,8	7,7	7,8
Rata-rata	7,4	7,6	7,9	7,9	7,8	7,8	7,9	7,8	8,0	7,6	7,6	7,7
K(-)-1	7,4	7,6	7,2	7,2	7,5	7,4	7,8	7,5	7,5	7,7	7,9	7,9
K(-)-2	7,5	7,6	7,4	7,5	7,5	7,5	7,7	7,8	7,7	7,8	8,0	7,8
K(-)-3	7,7	7,9	7,8	7,8	7,8	7,8	8,1	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Rata-rata	7,4	7,6	7,9	7,9	7,8	7,8	7,9	7,8	8,0	7,6	7,6	7,7

- Kisaran pH selama penelitian adalah 6,7-8,1

Lampiran 8. Hasil Identifikasi Klasifikasi Daun Sembung

71



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI**

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046 Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0191 /IPH.06/HMI/2016

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

Muhammad Charis Firmansyah, NIM : 125080500111046

Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 26 Januari 2016 berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume II, tahun 1965, halaman 387 dan PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 12 (1) ; Medicinal and poisonous plants 1, editor L.S. de Padua, N. Bunyapraphatsara dan R.H.M.J. Lemmens, tahun 1999, halaman 155

nama ilmiahnya :

Genus : *Blumea*
Species : *Blumea balsamifera* (L.) DC.

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XVII adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Asteridae*
Ordo : *Asterales*
Family : *Asteraceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 04 Februari 2016

An. Kepala
Kepala Balai Konservasi Ex-situ,



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

Lampiran 9. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. hydrophila*



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU**

LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA

Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418

Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724

Email : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com

HASIL UJI BIOKIMIA

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

Lab Mikrobiologi BBPBAP Jepara



Sn Murdi Astuti, SP.