

**EFEKTIVITAS IMMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR DAUN JAMBU BIJI  
(*Psidium guajava*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN PATIN  
(*Pangasius sp.*) YANG DIUJI TANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

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

Oleh:

**ADDELLIA NITYACHI  
NIM.125080501111057**



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

**EFEKTIVITAS IMMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR DAUN JAMBU BIJI  
(*Psidium guajava*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN PATIN  
(*Pangasius sp.*) YANG DIUJI TANTANG 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:

**ADDELLIA NITYACHI  
NIM.125080501111057**



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

**EFEKTIVITAS IMMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR DAUN JAMBU BIJI  
(*Psidium guajava*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG IKAN PATIN  
(*Pangasius sp.*) YANG DIUJI TANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

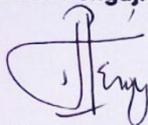
Oleh:

**ADELLIA NITYACHI**

**NIM. 125080501111057**

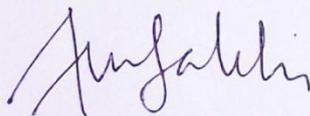
Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 13 September 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
SK Dekan No. :  
Tanggal :

Dosen Penguji I



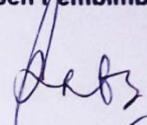
**Ir. Heny Suprastyani, MS**  
NIP. 19620904 198701 2 001  
Tanggal: 13 1 OCT 2016

Dosen Penguji II



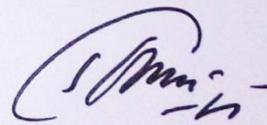
**M. Fakhri, S.Pi, MP, Msc**  
NIP. 19860717 201504 1 001  
Tanggal: 13 1 OCT 2016

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



**Dr. Ir. Maftuch, MSi**  
NIP. 19660825 199203 1 001  
Tanggal: 13 1 OCT 2016

Dosen Pembimbing II



**Ir. Ellana Sanoesi, MP**  
NIP. 19630924 199803 2 002  
Tanggal: 13 1 OCT 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan

**Dr. Ir. Arning Wiljeng Ekawati, MS**  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal: 13 1 OCT 2016

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya 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, September 2016

Penulis

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenalkan penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- Dr. Ir Maftuch, M.Si selaku dosen pembimbing 1 dan Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan saran, motivasi, bimbingan, arahan dan nasehat kepada penulis.
- Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen penguji 1 dan Muhammad Fakhri, S. Pi, M.Sc selaku dosen penguji 2 yang telah banyak memberikan saran, dan masukan yang mebangun demi kesempurnaan skripsi ini.
- Sholeha (Mamak) selaku orang tua yang telah memberikan do'a, motivasi, dukungan, dan nasehat kepada penulis.
- Febri Herison selaku Kakak yang telah sabar dan memberikan nasehat dan dukungan serta do'a kepada penulis
- Afrizal dan Ama selaku Adek yang telah memberikan do'a dan semangat kepada penulis
- Syukur dan Agisti, selaku orang tua dari sahabat yang selalu memberikan saran dan memotivasi kepada penulis
- Dwi, Fika, Mirza, Agnesia, Retie, Puput, Ary, Rifka, Iis, dan Khadijah, Sahabat yang selalu memotivasi, dan membantu dalam mengerjakan skripsi bagi penulis
- Teman-teman *Aquasean* BP 2012, yang telah mengukir sejarah bersama dalam kehidupan penulis selama menimba ilmu di kampus Universitas Brawijaya.

## RINGKASAN

**ADELIA NITYACHI.** Efektivitas Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) terhadap Histopatologi Insang Ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila* (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Maftuch, M.Si dan Ir. Ellana Sanoesi, MP**).

---

Ikan Patin (*Pangasius* sp.) merupakan ikan perairan tawar yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dan telah banyak ditemukan di daerah Sumatera, Kalimantan dan sebagian ada di daerah Jawa. Selain di Indonesia, ikan patin juga telah banyak ditemukan di kawasan Asia lainnya seperti Vietnam, Thailand, China dan sebagainya. Namun masalah terbesar dalam budidaya ikan patin (*Pangasius* sp.) sering mengalami kendala yang dapat menghambat budidaya ikan patin yaitu adanya bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophila*. Melihat dampak yang diakibatkan oleh infeksi bakteri ini maka perlu dilakukan upaya penanggulangan serta pengobatan dengan cara peningkatan immunostimulan pada Ikan Patin (*Pangasius* sp.) salah satunya yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) terhadap histopatologi insang pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila* dan mengetahui dosis terbaik pemberian immunostimulan ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) melalui pakan pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Ilmu Kelautan, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Nutrisi Makanan Ternak dan Histopatologi dilakukan di Rumah Sakit Saiful Anwar dan Laboratorium Patologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan dengan dua kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif dengan tiga kali ulangan. Sebagai perlakuan pemberian ekstrak daun jambu biji yaitu A = dosis 2%, B = dosis 4%, C = dosis 6% sedangkan K = dosis 0% dan Normal = 0% tanpa diuji tantang dan tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji. Parameter utama pada penelitian ini adalah analisis statistik pemberian skoring jaringan insang ikan Patin (*Pangasius* sp.), sebagai parameter penunjang SR dan kualitas air. setiap perlakuan mengalami kerusakan hiperplasia dan nekrosis. Pada perlakuan K (0%) jaringan mengalami kerusakan yang berat, perlakuan A (2%) jaringan mengalami kerusakan yang berat, perlakuan B (4%) jaringan mengalami kerusakan yang berat, perlakuan C (6%) jaringan mengalami kerusakan yang rendah, Parameter penunjang yang diamati dalam penelitian ini adalah SR dan kualitas air dan hasilnya air pada toples masih dikatakan baik untuk media hidup ikan Patin. Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap histopatologi jaringan insang ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*, dan pemberian dengan dosis yang optimal dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan insang pada ikan Patin adalah sebesar 6%.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul Efektivitas Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) terhadap Histopatologi Insang Ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Penulis sangat menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada laporan skripsi ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, September 2016

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	iv
<b>RINGKASAN</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Biologi Udang Jambu Biji ( <i>Psidium guajava</i> ).....	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Jambu Biji ( <i>Psidium guajava</i> ).....	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	6
2.1.3 Zat Anti Mikroba pada Daun Jambu Biji ( <i>Psidium guajava</i> ).....	6
2.2 Biologi Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ).....	7
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ).....	7
2.2.2 Habitat dan Penyebaran.....	8
2.2.3 Makan dan Kebiasaan Makan.....	8
2.2.4 Penyakit pada Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ).....	9
2.3 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	10
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	10
2.3.2 Habitat dan Pertumbuhan.....	11
2.3.3 Infeksi dan Tanda Penyebaran.....	12
2.4 Immunostimulan.....	14
2.5 Metode Pemberian Immunostimulan.....	14

2.6 Histopatologi .....	15
2.7 Insang .....	16
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Materi Penelitian .....	18
3.1.1 Peralatan Penelitian .....	18
3.1.2 Bahan-Bahan untuk Penelitian .....	20
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian .....	21
3.2.1 Metode Penelitian .....	21
3.2.2 Rancangan Penelitian .....	22
3.2.3 Penelitian Pendahuluan .....	22
3.2.4 Penelitian Utama .....	25
3.3 Prosedur Penelitian .....	26
3.3.1 Persiapan Penelitian .....	26
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian .....	32
3.4 Parameter Uji .....	37
3.4.1 Parameter Utama .....	37
3.4.2 Parameter Penunjang .....	38
3.5 Analisa Data .....	38
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
4.1 Gambaran Histopatologi Insang .....	39
4.1.1 Gambaran Histopatologi Insang Ikan Normal dan Insang yang Diuji Tatang bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	39
4.1.2 Gambaran Histopatologi Insang yang Diberi Perlakuan .....	41
4.2 Parameter Penunjang .....	50
4.2.1 Kelulushidupan (SR) Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ) .....	50
4.2.2 Kualitas Air .....	51
<b>5. PENUTUP .....</b>	<b>53</b>
5.1 Kesimpulan .....	53
5.2 Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>54</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>59</b>

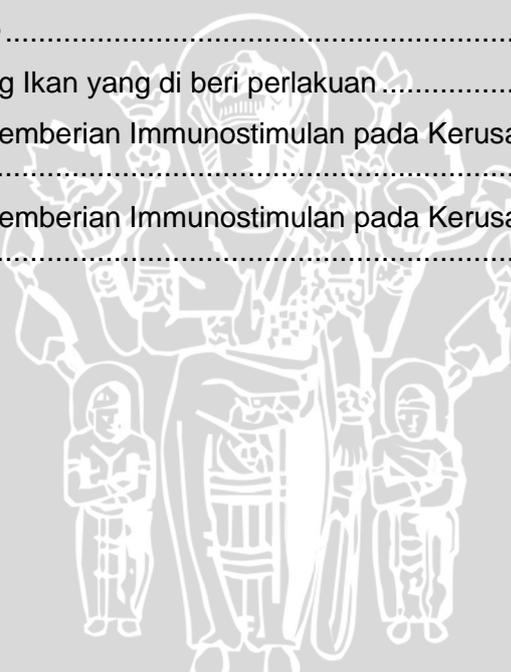
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peralatan Penelitian .....	18
2. Bahan-Bahan Penelitian .....	20
3. Uji Toksisitas Akut LD <sub>50</sub> Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	31
4. Presentse Nilai Skoring.....	37
5. Rerata Skoring Kerusakan Hiperplasia pada jaringan Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp.) .....	43
6. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Hiperplasia .....	43
7. Uji BNT Skoring Kerusakan Hiperplasia pada Jaringan Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp.) .....	44
8. Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis pada jaringan Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp.) .....	47
9. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Nekrosis .....	47
10. Uji BNT Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp.) .....	48
11. Rerata Nilai Kelulushidupan Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp).....	51
12. Hasil Pengamatan Kualitas Air.....	51



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun Jambu Biji ( <i>Psidium guajava</i> ) .....	5
2. Ikan Patin ( <i>Pangasius</i> sp) .....	8
3. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	11
4. Denah Penelitian Pendahuluan.....	24
5. Denah Uji LD <sub>50</sub> .....	25
6. Denah Penelitian Utama .....	26
7. Grafik Total Leukosit .....	30
8. Alur Skoring (Gerak Zig Zag) .....	36
9. Histopatologi Insang Normal dan Insang yang Diuji Tantang Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	39
10. Histopatologi Insang Ikan yang di beri perlakuan .....	41
11. Grafik Hubungan Pemberian Immunostimulan pada Kerusakan Hiperplasia .....	45
12. Grafik Hubungan Pemberian Immunostimulan pada Kerusakan Nekrosis.....	49



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Peralatan Penelitian.....	59
2. Bahan – Bahan Penelitian .....	62
3. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ) .....	64
4. Perhitungan Analisa Data Kerusakan Hiperplasia Pada Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ) .....	66
5. Perhitungan Analisa Data Kerusakan Nekrosis Pada Insang Ikan Patin ( <i>Pangasius sp.</i> ) .....	70
6. Proses Ekstraksi Daun Jambu Biji ( <i>P.guajava</i> ).....	74
7. Dokumentasi Kegiatan.....	75
8. Kualitas Air .....	77



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia, yang memiliki 13.667 pulau terbentang membentuk kelautan yang sangat luas, dengan total panjang garis pantai lebih dari 81.000 km. Gambaran geografis ini menunjukkan suatu potensi yang sangat besar bagi sumber dalam pengolahannya, untuk dapat memperoleh manfaat ekonomi yang optimal (Murtidjo, 2002).

Luasnya perairan dan melimpahnya berbagai jenis ikan di Indonesia, maka pemerintah mencanangkan atau mengharapkan bahwa dua per tiga kebutuhan protein hewani bangsa Indonesia dapat dipenuhi dari sub-sektor perikanan. Dengan demikian, tujuan dan sarana pembangunan sub-sektor perikanan, disamping meningkatnya devisa bagi negara, adalah untuk meningkatkan kesejahteraan rakyat dengan sasaran agar target tiap orang Indonesia dapat mengkonsumsi ikan kurang lebih 25 kg per orang per tahun tercapai. Bila target tersebut dapat dicapai, maka bangsa Indonesia pasti akan menjadi bangsa yang sehat dan cerdas (Mulyono, 2001).

Ikan Patin (*Pangasius* sp.) merupakan ikan perairan tawar yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dan telah banyak ditemukan di daerah Sumatera, Kalimantan dan sebagian ada di daerah Jawa. Selain di Indonesia, ikan patin juga telah banyak ditemukan di kawasan Asia lainnya seperti Vietnam, Thailand, China dan sebagainya (Ariyanto *et al.*, 2007). Namun masalah terbesar dalam budidaya ikan patin (*Pangasius* sp.) sering mengalami kendala yang dapat menghambat budidaya ikan patin yaitu adanya bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophila*.

Menurut Samsundari (2006), Bakteri *Aeromonas hydrophila* umumnya muncul pada saat musim kemarau dan saat kandungan bahan organik tinggi. Bakteri *Aeromonas hydrophila* biasanya banyak ditemukan pada bagian insang, kulit, hati, dan ginjal. Infeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* bisa terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau bisa melalui insang dan kemudian masuk kedalam pembuluh darah dan menyebar pada organ yang menyebabkan pendarahan.

Penanggulangan penyakit pada akuakultur telah sering dilakukan dengan menggunakan antibiotik seperti *ampicillin*, *chloramphenicol*, *tetracycline* dan disinfektan pada ikan. Penggunaan yang tidak tepat dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten terjadi penimbunan obat-obatan didalam tubuh ikan dan lingkungan perairan yang akhirnya berbahaya bagi konsumen yang mengkonsumsinya (Lukistyowati dan Henni, 2013). Untuk itu perlu adanya alternatif pengobatan yang ramah lingkungan. Upaya yang dapat dilakukan adalah meningkatkan daya tahan tubuh ikan dengan pemberian imunostimulan (Andayani, 2009).

Salah satu tumbuhan alami yang dapat dijadikan sebagai bahan antibiotik yang aman dan murah seperti daun jambu biji. Menurut Setyowati, *et al.* (2014), daun jambu biji (*Psidium guajava. L*) bermanfaat sebagai obat herbal dan dapat dimanfaatkan untuk pengobatan ikan yang terinfeksi penyakit. Daun jambu biji mengandung tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, fenol, minyak atsiri dan quersetin. Kandungan daun jambu biji lainnya adalah saponin termasuk kedalam golongan senyawa triterpenoid sebagai antimikroba. Saponin terdapat di dalam daun jambu biji, penggunaan saponin yang sesuai dapat berfungsi dengan baik dan membantu dalam pembentukan kollagen yaitu protein struktur berperan dalam proses penyembuhan dan sebagai antiseptik dan pembersih, saponin termasuk kedalam kelompok yang bersifat antibakteri dengan mengganggu

permeabilitas membran sel bakteri dapat menyebabkan kerusakan dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen yang ada pada sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida.

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian bagaimana efektivitas antimikroba daun jambu biji terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menginfeksi insang ikan patin (*Pangasius sp.*)

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka rumusan masalah yang dapat diambil yaitu sebagai berikut:

- Apakah pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) berpengaruh terhadap histopatologi insang pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*?
- Berapakah dosis terbaik pemberian immunostimulan ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) melalui pakan pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) terhadap histopatologi insang pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*
- Mengetahui dosis terbaik pemberian immunostimulan ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) melalui pakan pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*

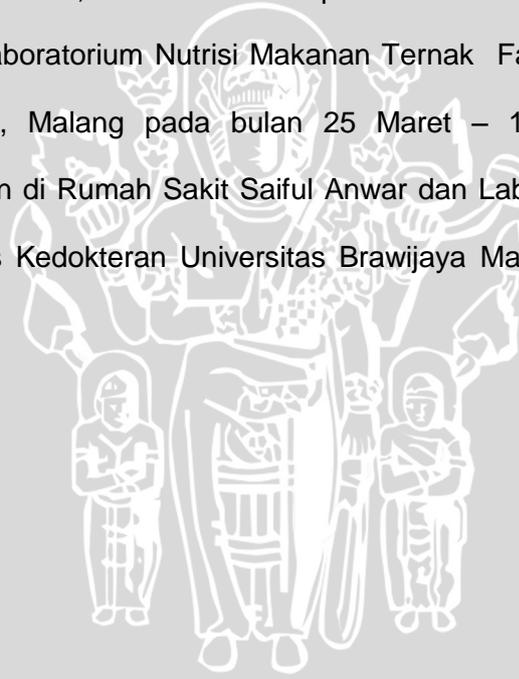
#### 1.4 Hipotesis

$H_0$  : Diduga pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P.guajava*) tidak berpengaruh terhadap histopatologi insang pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*

$H_1$  : Diduga pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P.guajava*) berpengaruh terhadap histopatologi insang pada ikan patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*.

#### 1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Ilmu Kelautan, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Nutrisi Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang pada bulan 25 Maret – 11 Juni 2016 dan Histopatologi dilakukan di Rumah Sakit Saiful Anwar dan Laboratorium Patologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada 24 Juni 2016.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Jambu Biji (*Psidium guajava*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Jambu Biji (*Psidium guajava*)

Klasifikasi daun jambu biji (*P. guajava*) menurut Utama (2002), sebagai berikut.

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Myrtales

Famili : Myrtaceae

Genus : *Psidium*

Spesies : *Psidium guajava*

Menurut Rukmana (1996), jambu biji (*P. guajava*) pada Gambar 1, merupakan jenis tanaman perdu atau pohon kecil dengan tinggi sekitar 5-10 meter, dengan kulit kayu tanaman jambu biji halus dan mudah terkelupas. Jambu biji memiliki akar tunggang dan akar serabut. Batangnya berkayu keras, liat, dan tidak mudah patah, tumbuh tegak dan memiliki percabangan serta ranting-ranting dengan warna coklat. Daun berbentuk bulat panjang dan langsing dengan bagian ujungnya yang tumpul atau lancip, berwarna hijau terang atau hijau kekuning-kuningan, atau merah tua tergantung dari jenisnya.



Gambar 1. Jambu Biji (*P. guajava*) (Sudana, 2005)

### 2.1.2 Habitat Dan Penyebaran

Menurut Prihatman (2000), Tanaman jambu biji merupakan tanaman daerah tropis dan dapat tumbuh di daerah sub-tropis dengan intensitas curah hujan yang diperlukan berkisar antara 1000-2000 mm/tahun dan merata sepanjang tahun. Tanaman jambu biji dapat tumbuh berkembang serta berbuah dengan optimal pada suhu sekitar 23-28 °C di siang hari.

Pohon jambu biji (*Psidium guajava*) dapat tumbuh pada daerah dataran rendah dan tumbuh di tempat terbuka, pohon jambu biji (*Psidium guajava*) sering tumbuh liar dan dapat ditemukan pada ketinggian 1 m sampai 1.200 m dari permukaan laut. Jambu biji berbunga sepanjang tahun sehingga tidak mengenal musim hujan atau kemarau akan tetap menghasilkan buah. Pohon jambu biji (*Psidium guajava*) biasanya dapat tumbuh di pekarangan rumah, semak-semak, ladang dan persawahan baik di kota maupun di desa (Martha, 2006).

### 2.1.3 Zat Anti Mikroba pada Daun Jambu Biji (*P. guajava*)

Daun jambu biji termasuk salah satu jenis tanaman obat yang mudah ditemukan di Indonesia. Daun jambu biji (*P. guajava*) bermanfaat sebagai obat herbal dan dapat dimanfaatkan untuk pengobatan ikan yang terinfeksi penyakit. Daun jambu biji mengandung tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, fenol, minyak atsiri dan quersetin (Yuliani *et al.*, 2003).

Jambu biji mengandung senyawa tanin dan flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa bioaktif yang mengubah reaksi tubuh terhadap senyawa lain, sehingga flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antimikroba dan antioksidan, flavonoid berperan dalam penghambatan siklus sel mikroba. Quersetin dalam ekstrak daun jambu biji menghambat aktivitas enzim reverse transkriptase, yaitu enzim yang diperlukan virus untuk mereplikasi diri (Amelia, 2012).

Menurut Nuria *et al.* (2009), mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakter adalah membentuk senyawa kompleks dengan ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler dan mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar.

## 2.2 Biologi Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Klasifikasi ikan patin berdasarkan Taxonomicon (2000), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Actinopterygii
Order	: Siluriformes
Family	: Pangasiidae
Genus	: <i>Pangasius</i>
Species	: <i>Pangasius sp.</i>

Ikan patin (Gambar 2) memiliki tubuh memanjang, pipih, letak mulut agak kebawah dan memiliki empat buah sungut, terdapat garis-garis pita hitam lengkung yang memanjang dari kepala hingga pangkal ekor, sirip ekornya bercagak dengan tepinya berwarna putih, memiliki warna tubuh kehitaman dengan bagian perut berwarna putih keabu-abuan, dan sirip duburnya mempunyai garis putih ditengahnya (Cholik *et al.*, 2005).



**Gambar 2.** Ikan Patin (*Pangasius* sp.) (Yuliartati, 2011)

### 2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Ikan Patin merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di perairan tawar. Ikan ini banyak ditemukan di perairan umum seperti sungai, waduk, dan rawa. Ikan Patin cenderung bersifat nokturnal (Beraktifitas pada malam hari), lingkungan hidup yang dibutuhkan ikan Patin tidaklah rumit karena ikan Patin termasuk golongan *catfish* yang mampu bertahan hidup pada lingkungan perairan yang jelek misalnya keadaan perairan yang kekurangan oksigen. Kadar oksigen yang optimal bagi ikan Patin adalah  $> 5$  ppm sedangkan suhu yang optimal bagi ikan Patin adalah  $24-30^{\circ}\text{C}$  (Adria dan Jenny, 2006).

Menurut Khairuman dan Sudenda (2002), penyebaran ikan patin di Indonesia saat ini sedikitnya terdapat dua jenis ikan patin yang populer dan banyak dipelihara di kolam budidaya, yaitu patin lokal (*Pangasius pangasius*) dan patin siam (*Pangasius hypotalamus*). Patin lokal terdiri atas patin jambal (*Pangasius djambal Bleeker*) dan patin kunyit (ditemukan di sungai-sungai besar Riau).

### 2.2.3 Makan dan Kebiasaan Makan

Menurut Ramadhan *et al.* (2010), ikan patin termasuk ke dalam kelompok ikan pemakan segala (omnivora), tetapi ada pula yang menyebutkan bahwa ikan ini cenderung menjadi karnivora (pemakan daging). Hal tersebut terlihat dari kebiasaannya memakan ikan-ikan kecil. Ketika masih kecil ikan ini menyukai

plankton serta tumbuhan air. Namun setelah dewasa, selain pakan yang disebutkan tadi, ikan ini juga memangsa hewan seperti ikan kecil, udang kecil, atau serangga air. Apabila dibudidayakan di kolam, ikan patin dapat diberi pakan alami dan pakan tambahan seperti pellet. Kualitas dan kuantitas pakan sangat penting dalam budidaya ikan patin, karena hanya dengan pakan yang baik ikan dapat tumbuh dan berkembang sesuai dengan yang diinginkan. Pakan yang baik adalah pakan yang mempunyai gizi seimbang, baik protein, karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral. Untuk itu pellet yang diberikan sebagai pakan tambahan adalah pakan komersial dengan protein 30 – 40 %.

Ikan patin merupakan ikan dasar dan mempunyai sifat omnivora atau golongan ikan pemakan segala. Malam hari ia akan keluar dari lubangnya dan mencari makanan renek yang terdiri atas cacing, serangga, udang sungai, jenis – jenis siput dan biji–bijian. Dari sifat makanannya ikan ini juga tergolong ikan yang sangat rakus karena jumlah makannya yang besar. Untuk larva ikan patin yang dipelihara di kolam–kolam maupun akuarium dapat memberikan makanan alami seperti artemia untuk memenuhi kebutuhan hidupnya (Yuliartati, 2011).

Menurut Khairuman (2007), seperti ikan patin lain pada umumnya, patin jambal juga termasuk pemakan segala (omnivora). Khusus dalam kolam pemeliharaan, larva dapat diberi pakan berupa pakan alami (zooplankton), seperti *Artemia* sp. (*artemia*), *Moina* sp. (*moina*), dan *Daphnia* sp. (*daphnia*), dan bisa juga langsung diberikan pakan buatan (pellet).

#### **2.2.4 Penyakit pada Ikan Patin (*Pangasius* sp.)**

Penyakit pada ikan adalah terganggunya kesehatan ikan yang diakibatkan oleh berbagai sebab yang dapat mematikan ikan. Secara garis besar penyakit pada ikan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi (penyakit menular) dan non infeksi (penyakit tidak menular). Penyakit menular

adalah penyakit yang timbul disebabkan oleh masuknya makhluk lain kedalam tubuh ikan, baik pada bagian tubuh dalam maupun bagian luar. Makhluk tersebut antara lain adalah virus, bakteri, jamur dan parasit. Penyakit tidak menular adalah penyakit yang disebabkan antara lain oleh keracunan makanan, kekurangan makanan atau kelebihan makanan dan mutu air yang buruk (Gusrina, 2008).

Menurut Khairuman (2007), pada umumnya penyakit karena pathogen berupa penyakit infeksi yang sebabkan oleh gangguan organisme seperti parasit, bakteri, atau jamur yang bersifat menular. Penyakit parasit yang sering menyerang adalah bintik putih atau white spot, parasit lain yang juga dapat menginfeksi ikan patin adalah cacing tanpa segmen (*Monogenean: Thaparocleidus*). Penyakit bakteri yang biasa menyerang ikan patin adalah *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. sebagai parasit dan bakteri, infeksi jamur juga bisa menimbulkan penyakit.

### **2.3 Bakteri *Aeromonas hydrophila***

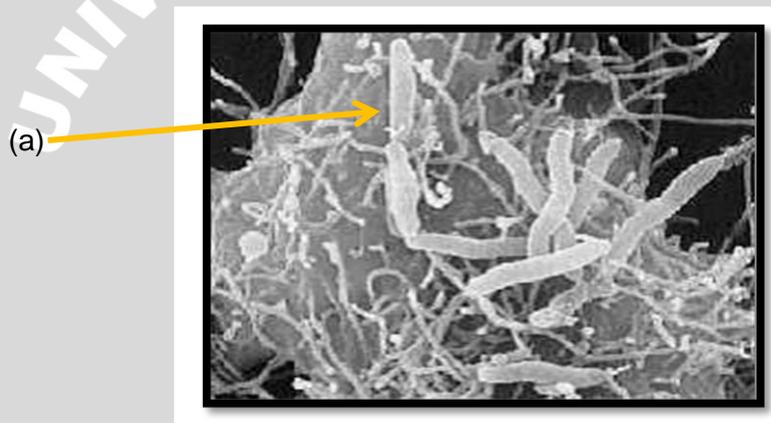
#### **2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi**

Menurut Holt *et al.* (1998), Klasifikasi *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut:

Divisio	: Protophyta
Class	: Schyzomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadineae
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Bakteri *A. hydrophila* adalah bakteri yang berbentuk batang. Bergerak dengan flagel monotorich pada ujung sel, Gambar 3. Berdasarkan pada pewarnaan defensial (pewarnaan gram) termasuk dalam bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif adalah organisme yang tidak dapat menahan zat warna setelah dicuci dengan alkohol (Kabata, 1985).

Menurut Kordi K (2004), ciri utama bakteri *Aeromonas* adalah bentuknya seperti batang, ukurannya 1-4 x 0,4-1 mikron, bersifat gram negatif, fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen), tidak berspora, mempunyai satu flagel (*monotrichous flagella*) yang keluar dari salah satu kutubnya.



**Gambar 3.** Bakteri *A. hydrophila* (a), (Aberoum dan Jooyandeh, 2010)

### 2.3.2 Habitat dan Pertumbuhan

Menurut Richards dan Robert (1974), habitat dari bakteri *Aeromonas* sp. adalah air tawar dan masih mampu hidup walaupun kandungan organiknya tinggi. Hal tersebut sesuai dengan Holmes *et al.* (1996), bahwa genus *A. hydrophila* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar, keberadaan aeromonas di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen dari hewan yang berdarah dingin.

Menurut Volk dan Wheeler (1993), bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-30°C, pH 5,5-9. Perkembangbiakannya secara aseksual dengan

memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit. Bakteri *A. hydrophila* umumnya hidup di air tawar yang mengandung organik. Hidup pada temperatur optimal 22-29°C. Bakteri ini senang hidup di lingkungan perairan bersuhu 15-30 °C dan pH antara 5,3-9 (Ayu *et al.*, 2006).

Menurut Holmes *et al.* (1996), bahwa bakteri *A. hydrophila* tidak dapat hidup lama tanpa inangnya, suhu optimal bagi pertumbuhannya 22-28°C pada suhu 35°C pertumbuhannya terhambat. Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan air tawar, keberadaan *A. hydrophila* erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen bagi hewan berdarah dingin.

Bakteri *A. hydrophila* tidak dapat hidup lama tanpa inangnya, suhu optimal bagi pertumbuhannya 22-28°C, pada suhu 35°C pertumbuhannya terhambat. Bakteri *A. hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen dan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Christian *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Infeksi dan Tanda Penyebaran

Tantu, Reiny, dan Sammy (2013), Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang hidup di air tawar. Penyakit ini menimbulkan beberapa gejala yang diantaranya yaitu hilangnya nafsu makan, luka – luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang dan , insang berwarna suram (agak kebiruan), perut membesar berisi cairan, sisik terkelupas, sirip ekor lepas, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada bagian jaringan hati, ginjal, dan limfa. Biasanya bakteri *A. hydrophila* menginfeksi ikan mas, gurami, mujair dan ikan nila. Penyakit ini bisa menyebabkan kematian diatas 80% dalam waktu yang singkat.

Menurut Richards dan Robert (1974), habitat dari bakteri *Aeromonas* sp. adalah air tawar dan masih mampu hidup walaupun kandungan organiknya tinggi. Hal tersebut sesuai dengan Holmes *et al.* (1996) bahwa genus *A. hydrophila* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar, keberadaan *aeromonas* di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen dari hewan yang berdarah dingin.

Menurut Sholikhah (2009), penyakit ikan yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* terjadi dalam empat tingkat berbeda, yaitu:

- ✚ Laten, tidak memperlihatkan gejala penyakit, namun pada organ dalam terdapat bakteri penyebab penyakit.
- ✚ Kronis, terlihat gejala tukak, bisul-bisul, dan abses yang perkembangannya berlangsung lama.
- ✚ Sub akut, terlihat gejala dropsi, lepuh, dan pendarahan pada sisik.
- ✚ Akut, merupakan septisemia yang fatal, infeksi cepat dengan akibat tanda-tanda penyakit yang terlihat.

Tanda-tanda yang terjadi pada ikan yang terinfeksi bakteri ini biasanya warna tubuh gelap, mata rusak dan agak menonjol, sisik terkelupas, seluruh siripnya rusak, insang berwarna merah keputihan, megap-megap di atas permukaan air, insang rusak sehingga kesulitan bernafas, kulit menjadi kasat dan timbul pendarahan yang selanjutnya diikuti dengan luka-luka borok, perut kembung, dan bila dibedah akan terlihat pendarahan pada hati, ginjal dan limfa (Kordi, 2010). Selain itu, pada beberapa jenis ikan lain sering ditemukan tanda klinis seperti sirip punggung dan sirip ekor rusak, serta pembengkakan pada perut dan berisi cairan (*Dropsy*), yang diikuti dengan kematian (Mangunwardono *et al.*, 2010).

## 2.4 Immunostimulan

Imunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen (Jasmanidar, 2009). Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Menurut Suhermanto *et al* (2011) mengatakan bahwa imunostimulan merupakan zat kimia, obat-obatan, yang bekerja meningkatkan respon imun ikan yang berinteraksi secara langsung dengan sel sistem imun.

Imunostimulan merupakan senyawa yang dapat merangsang aktivitas pertahanan tubuh. Keistimewaan imunostimulan dibandingkan vaksinasi adalah sifatnya yang non spesifik, artinya bahan tersebut mampu merangsang peningkatan ketahanan ikan dan udang terhadap berbagai penyakit. Menurut Treves-Brown (2000), imunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Imunostimulan dapat meningkatkan daya tahan terhadap penyakit infeksi, bukan karena dapat meningkatkan respon imun spesifik tapi oleh karena meningkatkan mekanisme pertahanan non spesifik dari organisme tersebut.

Tumbuhan alami yang dapat dijadikan sebagai bahan immunostimulan yang aman dan murah adalah tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan daun jambu biji (*Psidium guajava*) karena mudah didapat dan telah terbukti memiliki anti bakteri (Lukistyowati dan Henni, 2013).

## 2.5 Metode Pemberian Immunostimulan

Menurut Munandar (2009), menyatakan bahwa pemberian imunostimulan secara luas dengan maksud mengaktifkan sistem imun non spesifik sel seperti

makrofag pada vertebrata dan hemocyte pada avertebrata. Pemberian imunostimulan dapat dilakukan dengan :

- a. Perendaman yaitu memberikan respon imun non spesifik yang sedikit, tetapi lebih efektif dalam hal biaya daripada dengan penyuntikan. Namun dapat menimbulkan stres karena meningkatnya penanganan dan kepadatan dalam perendaman.
- b. Penyuntikan yaitu penyuntikan beta glucan dan stimulant imun lainnya dapat memberikan respon non spesifik yang kuat, tetapi biasa tidak praktis dan efektif dalam hal biaya dalam usaha budidaya.
- c. Oral yaitu memberikan respon imun spesifik yang baik dan merupakan metode yang efektif

Imunostimulan dapat diberikan pada ikan melalui injeksi, bersama pakan (*oral*) dan perndaman. Immunostimulan dapat diberikan pada larva ikan selama 1 minggu secara terus menerus selama masa pendederan. Pada tahap awal immunostimulan diberikn melalui perndaman, dan selanjutnya dapat diberikan bersama dengan pakan. Pemilihan cara aplikasi immunostimulan didasarkan atas kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya (Alifuddin,2002).

Menurut Alifuddin (2002) bahwa berbeda dengan vaksin, imunostimulan tidak direspon mensintesis antibodi, menaikkan peningkatan aktivitas dan reaktivitas sel pertahanan seluler maupun humoral.

## 2.6 Histopatologi

Histopatologi merupakan penelusuran penyakit secara mikroskopik dimana dalam pengamatan histopatologi informasi yang diperoleh dalam bentuk gambaran perubahan organ atau jaringan. Informasi yang diperoleh juga dapat digunakan sebagai data untuk mengetahui ada atau tidaknya infeksi penyakit

serta untuk meramalkan proses kejadian penyakit dan tingkat epidemik suatu penyakit (Pazra, 2008).

Menurut Setyowati *et al* (2010), menyatakan bahwa histopatologi dapat digunakan sebagai biomaker 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 organ pada suatu organism. Untuk penelitian yang dilakukan ini khusus mengambil organ insang pada ikan patin sebagai obyek yang diamati histopatologinya.

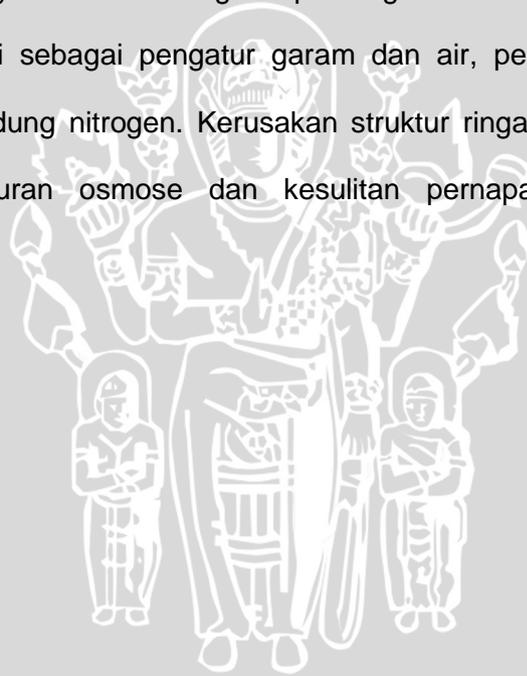
### **2.7 Insang**

Insang sebagai alat respirasi ikan memiliki fungsi mengatur homeostatis ikan. insang dilengkapi dengan sejumlah granula yang dikenal sebagai glandula brachial, yaitu sel-sel epitel insang yang mengalami spesialisasi. Glandula tersebut adalah glandula mukosa dan glandula asidofilik (sel-sel khlorida). Glandula mukosa berupa sejumlah sel-sel tunggal berbentuk buah pear atau oval dan menghasilkan mucus dan terdapat baik pada lengkungan insang, filament insang maupun lamella (Irianto,2005).

Menurut Saputra *et al* (2013), Insang pada ikan merupakan organ respirasi utama yang bekerja dengan mekanisme difusi permukaan dan gas-gas respirasi (oksigen dan karbondioksida) antara darah dan air. Oksigen yang terlarut dalam air akan diabsorpsi ke dalam kapiler-kapiler insang dan difiksasi oleh hemoglobin untuk selanjutnya didistribusikan ke seluruh tubuh.

Menurut Erlangga (2007), insang terbentuk dari lengkungan tulang rawan yang mengeras, dengan beberapa filamen insang di dalamnya. Tiap-tiap filament insang terdiri atas banyak lamella. Struktur lamella sendiri tersusun atas sel-sel epitel yang tipis pada bagian luar, membrane dasar dan sel-sel tiang sebagai penyangga pada bagian dalam. Pinggiran lamella yang tidak menempel pada lengkung insang sangata tipis. Ditutupi oleh epitelium dan mengandung jaringan darah kapiler.

Insang sebagai alat respirasi ikan memiliki fungsi mengatur homeostatis ikan. Lapisan epitel insang yang tipis dan berhubungan langsung dengan lingkungan luar menyebabkan insang berpeluang besar terinfeksi penyakit. Insang juga berfungsi sebagai pengatur garam dan air, pengeluaran limbah-limbah yang mengandung nitrogen. Kerusakan struktur ringan sekalipun dapat mengganggu pengaturan osmose dan kesulitan pernapasan (Nabib dan Pasaribu, 1989).



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1, sementara foto – fotonya pada Lampiran 1.

**Tabel 1.** Peralatan Penelitian

Peralatan	Kegunaan
- Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilkan peralatan yang digunakan.
- Kulkas	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin.
- Cawan Petri	Sebagai tempat agar untuk menumbuhkan bakteri
- Tabung Erlenmeyer	Sebagai tempat pembuatan media dan maserasi
- Botol Akuades	Sebagai tempat akuades
- Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat mengukur larutan
- Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
- Beaker Glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
- Tabung Reaksi	Sebagai tempat kultur bakteri
- Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
- Pipet volume	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam jumlah banyak
- Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit
- Bola hisap	Sebagai alat bantu untuk mengambil larutan
- Hot Plate	Sebagai alat pemanas media
- Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
- Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
- Timbangan digital	Sebagai alat penimbang dengan ketelitian $10^{-2}$ .
- Timbangan Analitik	Sebagai alat penimbang bahan dengan ketelitian $10^{-3}$
- Vortex Mixer	Sebagai penghomogen larutan
- Waterbath	Sebagai Alat Pemanas
- <i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat menyimpan akuades dan tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi
- Sprayer	Sebagai tempat menyimpan alkohol

Tabel 1. (Lanjutan)

Peralatan	Kegunaan
Masker	Sebagai pelindung mulut bagi peneliti
- Sarung tangan	Sebagai alat mencegah kontaminasi
- Inkubator	Sebagai alat menginkubasi
- Spatula	Sebagai alat penghomogen larutan
- Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan cawan petri
- Jarum ose	Untuk mengambil bakteri saat akan dikultur
- Aerator	Sebagai sumber oksigen pada wadah pemeliharaan ikan patin
- Selang aerasi	Untuk menyalurkan O <sub>2</sub> dari aerator ke media
- Batu aerasi	Untuk memecah O <sub>2</sub> yang dihasilkan oleh aerator ke air
- Selang aerator	Untuk menyalurkan air dari kran ke dalam akuarium
- Toples 10 liter	Sebagai wadah air media
- Heater	Untuk memberikan suhu panas yang sesuai
- Sesar	Untuk mempermudah dalam memindahkan udang
- pH meter	Untuk mengukur besarnya pH dalam media pemeliharaan
- Termometer	Untuk mengetahui suhu media pemeliharaan
- DO meter	Untuk mengukur kandungan DO dalam media pemeliharaan
- <i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat akuades
- <i>Mikrotom rotary</i>	Sebagai alat untuk pemotongan jaringan
- Spektrofotometer	Sebagai alat pengukur panjang gelombang bahan
- <i>Embedding machine</i>	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan ( <i>embedding</i> )
- <i>Coolbox</i>	Sebagai tempat wadah sampel
- Rotary evapometer	Sebagai alat untuk evaporasi
- Sectio set	Sebagai alat bedah pada jaringan
- Mikroskop	Sebagai alat untuk mengamati jaringan insang
- <i>Objek glass</i>	Untuk meletakkan sampel yang jaringan yang akan diamati
- <i>Cover glass</i>	Untuk menutup <i>objek glass</i>
- Botol film	Sebagai alat untuk ekstrak daun jambu biji ( <i>P.guajava</i> ), jaringan dan larutan histopatologi
- Eppendorf	Sebagai ntuk menampung darah ikan patin

### 3.1.2 Bahan – Bahan untuk Penelitian

Bahan – Bahan untuk penelitian beserta fungsinya terdapat pada Tabel 2 sementara foto – fotonya pada Lampiran 2.

**Tabel 2.** Bahan – Bahan Penelitian

Bahan – Bahan	Kegunaan
- Daun jambu biji ( <i>P.guajava</i> )	Sebagai bahan imunostimulan
- Aquades	Sebagai bahan pelarut
- Metanol	Sebagai bahan pelarut Daun jambu biji ( <i>P.guajava</i> )
- Alumunium foil	Sebagai bahan yang digunakan untuk membungkus semua alat dan bahan agar steril
- Alkohol 70%	Sebagai bahan untuk sterilisasi
- Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi
- Kertas label	Sebagai bahan penanda
- Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
- NB ( <i>Natrium Broth</i> )	Sebagai media kultur bakteri (cair)
- TSA ( <i>Trypton Soya Agar</i> )	Sebagai bahan media tumbuh bakteri
- Pakan Nutrisi	Sebagai nutrisi ikan uji
- Masker	Sebagai penutup mulut
- Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan
- Formalin 10 %/ Larutan <i>Bouin</i>	Sebagai pengawet jaringan insang
- Aseton	Sebagai bahan pengawet jaringan insang (proses dehidrasi)
- Parafin cair	Sebagai bahan pengawet jaringan insang (proses <i>impregnasi</i> )
- Parafin Blok	Sebagai bahan pengawet jaringan insang dan ginjal (proses <i>embedding</i> )
- <i>Xylo</i>	Sebagai bahan pengawet jaringan insang (proses <i>cleaning</i> )
- Alkohol 96 %	Sebagai bahan pengawet jaringan insang (proses <i>deparafinsasi</i> )
- Tisu	Sebagai bahan pembersih
- Air tawar	Sebagai media hidup ikan patin
- Kertas Koran	Sebagai pembungkus peralatan yang disterilisasi
- Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang disterilisasi
- Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk bunsen
- Eosin	Sebagai bahan pewarna pada jaringan insang

## 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah metode yang dilakukan untuk mengetahui hubungan sebab akibat antara dua variabel atau lebih yang sudah diatur dengan melakukan beberapa perlakuan yang berbeda pada objek penelitian tersebut (Zulnaldi, 2007).

Menurut Mardalis (1989), metode eksperimen bertujuan untuk menjelaskan apa-apa yang akan menjadi bila variabel-variabel tertentu di kontrol atau dimanipulasi secara tertentu. Fokus penelitian pada ukuran pada antar variabel. Dalam hubungan ini, kesengajaan mengadakan manipulasi terhadap sesuatu variabel, selamanya merupakan bagian yang tak terpisahkan dari metode eksperimen. Penelitian ini dapat dikatakan sebagai penelitian pengujian hipotesa yang menguji sebab akibat diantara variabel yang diteliti.

Metode penelitian dalam menganalisa histopatologi insang ikan patin menggunakan metode deskriptif. Menurut Hartoto (2009), penelitian deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasi objek sesuai dengan apa adanya. Penelitian ini juga sering disebut non eksperimen, karena pada penelitian tidak melakukan control dan manipulasi variabel penelitian. Dengan metode deskriptif, penelitian memungkinkan untuk melakukan hubungan antar variabel, menguji hipotesis, mengembangkan generalisasi, dan mengembangkan teori yang memiliki validitas universal. Di samping itu, penelitian deskriptif juga merupakan penelitian dimana pengumpulan data untuk melihat pertanyaan penelitian atau hipotesis yang berkaitan dengan keadaan dan kejadian sekarang. Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu teknik pengambilan data di mana peneliti mengadakan pengamatan yang dilakukan dalam kondisi yang

sebenarnya maupun yang dilakukan dalam kondisi buatan yang khusus diadakan (Surakhmad, 1989).

### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian adalah 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. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

$\mu$  = nilai rata-rata

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke- $i$

$\varepsilon_{ij}$  = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke- $i$  dan ulangan ke- $j$

### 3.2.3 Penelitian Pendahuluan

Untuk mengetahui dosis terbaik pada pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) yaitu ditinjau dari kenaikan sel darah putih ikan patin, Sel darah putih diketahui berhubungan langsung dengan sistem imun dari ikan patin itu sendiri, selain itu sel darah putih berperan dalam mencegah masuk dan berkembangnya antigen dalam tubuh, hal tersebut dijelaskan oleh Dontriska, *et al.* (2014) bahwa leukosit bertanggung jawab terhadap sistem imun tubuh dan bertugas untuk memusnahkan benda-benda yang dianggap asing dan berbahaya oleh tubuh, misal bakteri atau virus.

**a) Uji Penentuan Dosis Ekstrak Daun Jambu Biji (*P. guajava*)**

Uji dosis ekstrak daun jambu biji dilakukan untuk menentukan dosis yang akan digunakan pada penelitian utama. Penelitian pendahuluan ini untuk melihat adanya pengaruh ekstrak daun jambu biji terhadap peningkatan total leukosit pada ikan patin. Uji pendahuluan dilakukan secara *in vivo* dengan cara pemberian pakan yang telah dicampur dengan ekstrak daun jambu biji sebesar 2%, 6%, dan 10% dari berat pakan. Ditambahi dengan telur putih sebanyak 2% dari pakan sebagai perekat. Ikan patin ukuran 10-12 cm dipelihara dalam toples berisi 10 liter air, setiap toples diisi sebanyak 10 ekor ikan. Pengamatan total leukosit dilakukan pada hari ke-2, 4, 6, 8. Penelitian pendahuluan ini terdapat 3 perlakuan, 1 kontrol dan masing-masing diulang sebanyak 2 kali, sehingga terdapat 8 perlakuan.

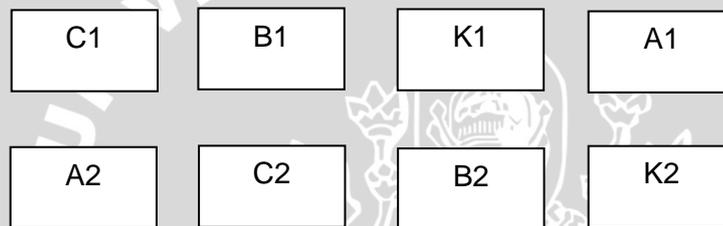
**b. Pemberian Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*)**

Penelitian pendahuluan dilakukan melalui pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) yang di campurkan kedalam pakan pellet (120 gr) dengan dosis 2,4 gram, 3,6 gram, 4,8 gram. Dosis ini berdasarkan dari percobaan *in vivo* ekstrak daun jambu biji terhadap bakteri *A. hydrophila*. Pada penelitian ini digunakan 3 perlakuan dengan 2 kali ulangan serta 2 kontrol sebagai pembanding kontrol normal dan kontrol infeksi. Kontrol normal sebagai perlakuan sampel tanpa penginfeksian bakteri *A. hydrophila* serta tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji. Kontrol infeksi sebagai perlakuan sampel dengan penginfeksian bakteri tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji. Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 8 sampel. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- A : Perlakuan penginfeksian bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak daun jambu biji 2% / pakan.

- B : Perlakuan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak daun jambu biji 3% / pakan.
- C : Perlakuan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak daun jambu biji 4% / pakan.
- K1 : Perlakuan sampel tanpa ujiantang bakteri *A. hydrophila* serta tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji
- K2 : Perlakuan sampel dengan ujiantang bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji

Denah penelitian disajikan pada Gambar 4 berikut ini



**Gambar 4.** Denah penelitian pendahuluan

Keterangan:

A-B-C : Perlakuan penelitian

1, 2 : Ulangan

K1 : Kontrol normal

K2 : Kontrol infeksi

### c. Uji Toksisitas Akut (LD<sub>50</sub>) Bakteri *A. hydrophila*

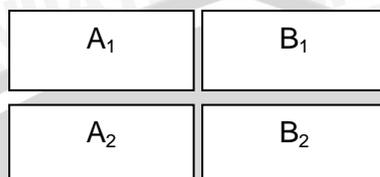
Uji LD<sub>50</sub> bertujuan untuk mengetahui tingkat virulensi bakteri *A. hydrophila* yang didapat dari Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan. Bakteri *A. hydrophila* diujikan pada ikan Patin dan ditunggu hingga ikan Patin mati sebanyak 50% dari total ikan yang dipelihara. Total ikan yang dipelihara sebanyak 8 ekor / akuarium. Uji LD<sub>50</sub> menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10<sup>5</sup> dan 10<sup>7</sup> dengan 2 kali ulangan.

Adapun rancangan uji immunostimulan yaitu sebagai berikut,

A = Ikan Patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan  $10^5$

B = Ikan Patin yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan  $10^7$

Denah uji LD<sub>50</sub> Bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 6 berikut ini.



**Gambar 5.** Denah Uji LD<sub>50</sub>

Keterangan :

A – B : Perlakuan penelitian

1 - 2 : Ulangan

### 3.2.4 Penelitian Utama

Pada penelitian utama ini digunakan 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan serta kontrol sebagai pembanding kontrol normal dan kontrol infeksi. Kontrol normal sebagai perlakuan sampel tanpa penginfeksian bakteri *A. hydrophila* serta tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji. Sedangkan kontrol infeksi sebagai perlakuan sampel dengan uji tantang bakteri tanpa pemberian ekstrak daun jambu biji. Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 12 sampel. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

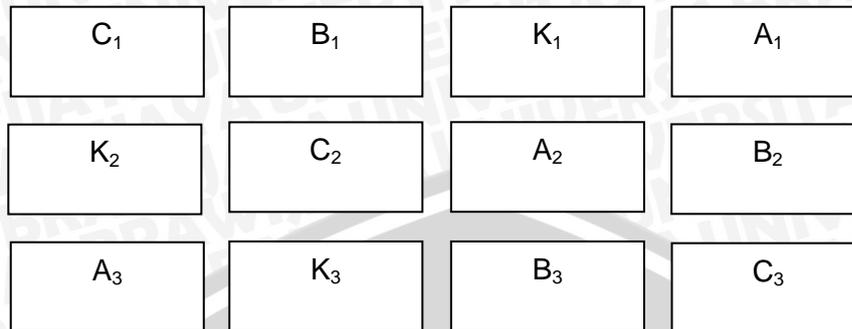
K = Ikan kontrol yang tidak diberi immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji dan diuji tantang *A. hydrophila*;

A = Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 2% dan di infeksi bakteri *A. hydrophila*;

B = Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 4% dan di infeksi bakteri *A. hydrophila*;

C = Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 6% dan di infeksi bakteri *A. hydrophila*.

Denah penelitian utama disajikan pada Gambar 7 berikut ini.



**Gambar 6.** Denah Penelitian Utama

Keterangan :

A - B - C - K : Perlakuan penelitian  
1 - 2 - 3 : Ulangan

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Penelitian

##### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan menggunakan autoklaf, adapun prosedurnya adalah sebagai berikut,

- alat dicuci kemudian dikeringkan lalu dibungkus dengan kertas koran dan diikat menggunakan benang kasur;
- masukan akuades ke dalam ruang sterilisasi autoklaf sampai batas sistem pemanas dari autoklaf tersebut,
- masukan alat dan bahan yang hendak disterilisasi kedalam keranjang autoklaf, selanjutnya masukan keranjang tersebut kedalam autoklaf lalu tutup Autoklaf;
- pada saat menutup, tutup semua tuas secara diagonal agar seimbang kekuatan pada saat menutup autoklaf,
- pastikan klep keluaranya uap pada posisi berdiri/tegak;
- nyalakan autoklaf pada posisi ON (keatas), lampu power berwarna kuning;

- temperatur diputar pada posisi maksimal, sehingga warna lampu *heating* berwarna hijau;
- biarkan hingga keluar uap air dari klep lalu tutup atau arahkan ke samping
- tunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi (121°C);
- temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning;
- atur *timer* pada posisi 15 menit (waktu sterilisasi);
- alarm berbunyi tanda sterilisasi berakhir;
- turunkan temperatur pada posisi minimal;
- matikan autoklaf pada posisi kebawah (OFF);
- klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0;
- tutup autoklaf dapat dibuka.
- Alat dan bahan sudah tersterilisasi dan dapat digunakan.

#### **b. Persiapan Ikan Uji**

Ikan uji merupakan ikan Patin (*Pangasius* sp.) berasal dari Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, sebanyak 80 ekor dengan panjang per ekor 10-12 cm, bobot per ekor 5-7 gr, dan padat tebar ikan yaitu 1 ikan per liter.

Ikan diambil dengan menggunakan seser, lalu diadaptasikan ke dalam toples yang berkapasitas 10 liter selama 3 hari berturut-turut. Adaptasi ini berfungsi agar ikan Patin dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya selain itu untuk mengetahui kondisi kesehatan dari ikan Patin tersebut. Selama ikan diadaptasikan, ikan diberi makan 3 kali sehari, pagi pukul 08:00 WIB, siang pukul 13:00 WIB dan sore pukul 16:00 WIB. Pakan yang diberikan sebanyak 3% dari bobot tubuhnya. Selain itu penyiponan dilakukan jika air keruh akibat sisa pakan dan feses dari ikan tersebut.

### c. Persiapan Wadah Penelitian

Wadah yang digunakan yaitu menggunakan toples dengan kapasitas 10 liter dicuci dengan sabun lalu dikeringkan, setelah kering toples dipasang plastik hitam hingga menutupi seluruh bagian toples tersebut, hal ini dilakukan untuk menghindarkan ikan Patin dari cahaya secara langsung serta mencegah terjadinya fluktuasi suhu. Setelah itu, toples dipasang *Aerator set* dan diisi air sebanyak 10 Liter serta dipasang *heater* pada masing-masing toples untuk menyesuaikan suhu air yang baik bagi ikan Patin (*Pangasius sp.*).

### d. Pembiakkan Bakteri *A. hydrophila*

#### 1) Media Padat NA (*Nutrien Agar*)

- ✚ NA merk OXOID dengan dosis 40 g/L
- ✚ NA sebanyak 2,4 gram dilarutkan ke dalam 60 ml akuades pada erlemeyer
- ✚ media dipanaskan di atas hotplate hingga homogen
- ✚ erlemeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen/ aluminium foil lalu ditali dengan benang
- ✚ media sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit
- ✚ media dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas
- ✚ media dituang pada cawan petri lalu ditunggu hingga dingin dan digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi label.

#### 2) Media Cair NB (*Nutrien Broth*)

- ✚ NB ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlemeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna berwarna kuning
- ✚ erlemeyer ditutup kapas dan aluminium foil lalu diikat menggunakan benang

- ✚ media sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit
- ✚ media dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas

### 3) Pemiakan Bakteri *A. hydrophila*

- ✚ larutan NB disiapkan sebanyak 6 gram dalam erlemeyer sebanyak 220 ml
- ✚ jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse disentuhkan ke biakan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan pada NB sebanyak 2 osse
- ✚ larutan NB dibiarkan 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 37 C
- ✚ disiapkan cawan petri yang berisi media NA
- ✚ setelah NB menjadi keruh, jarum osse dicelupkan ke NB dan digoreakan ke permukaan NA
- ✚ digoreskan ke dalam media NA secara zig zag dengan metode goresan sinambung, T, atau kuadran
- ✚ media NA di inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.

### e. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*)

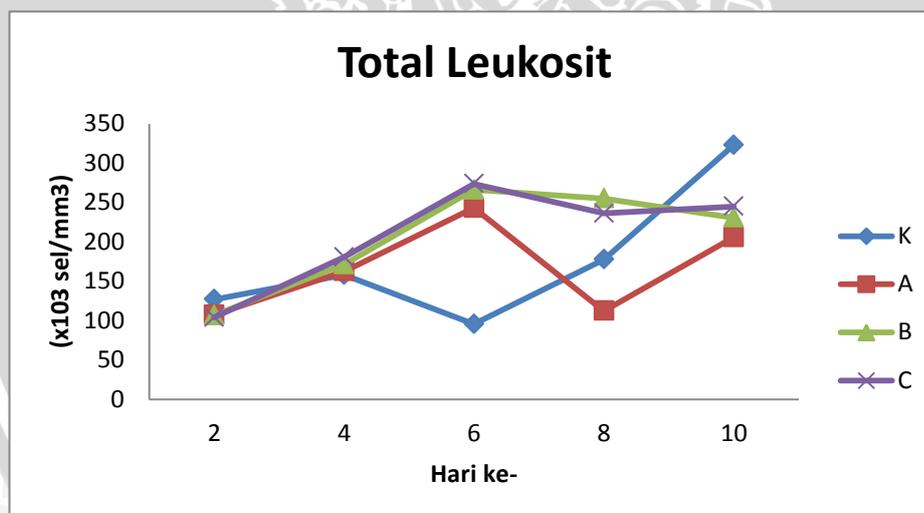
Pembuatan ekstrak kasar daun jambu biji diawali dengan membersihkan daun jambu biji 1 kg dengan air bersih, bilas hingga bersih, kemudian dikering anginkan menjadi 500 gr, setelah itu cacah daun jambu biji hingga menjadi bagian-bagian kecil, selanjutnya oven dengan suhu 50°C selama 11 Jam, setelah itu di haluskan menggunakan blender sehingga menghasilkan serbuk kering 424,2 gr.

Serbuk kering daun jambu biji 424,2 gr kemudian dimaserasi selama 2 x 24 jam. Maserasi dilakukan dengan melarutkan serbuk kering daun jambu biji 424,2

gr ke dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 6 (10 gr serbuk : 60 ml etanol 96%), kemudian di homogenkan dengan di aduk menggunakan spatula. Maserasi dilakukan selama 2 hari setelah itu hasil disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan endapan dengan pelarut tersebut menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 45° C dengan kecepatan 80 rpm selama 1 jam dan didapatkan hasil ekstrak kasar daun jambu biji dalam bentuk pasta sebanyak 38,7 g.

#### f. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji

Untuk menentukan dosis perlakuan dalam penelitian utama dilakukan terlebih dahulu uji pendahuluan terhadap total leukosit ikan patin dengan dosis perlakuan A (2%), B (6%), C (10%) dan K (0%) dengan 2 ulangan, diperoleh hasil sebagai berikut (Gambar 7):



Gambar 7. Grafik Total Leukosit Ikan Patin

Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa dari hari ke-2 menuju hari ke-4 semua perlakuan mengalami kenaikan leukosit, kemudian memasuki hari ke-6, perlakuan A, B, C mengalami kenaikan leukosit, sementara perlakuan K mengalami penurunan. Pada hari ke-8, perlakuan A, B, C mengalami penurunan, sedangkan perlakuan K mengalami kenaikan, pada hari ke-10, perlakuan K, A dan C mengalami kenaikan, sedangkan perlakuan B mengalami penurunan.

Puncak kenaikan tertinggi perlakuan A, B, C diperoleh pada hari ke-6, dengan yang paling tinggi adalah perlakuan C, kemudian B dan A. Sementara puncak perlakuan tertinggi K diperoleh pada hari ke-10. Hasil tersebut menunjukkan dosis ekstrak kasar daun jambu biji dengan perlakuan A (2%), B (6%) dan C (10%) bisa menaikkan total leukosit dibandingkan dengan kontrol. Kenaikan total leukosit menunjukkan adanya respon imun pada ikan patin ketika diberi perlakuan ekstrak kasar daun jambu biji. Sehingga dengan demikian dosis yang digunakan untuk uji penelitian utama dibuat menjadi 2%, 4% dan 6%, karena pada dosis 2% saja total leukosit sudah bisa naik dibandingkan dengan kontrol.

#### g. Uji Toksisitas Akut (LD<sub>50</sub>) Bakteri *A. hydrophila*

Uji LD<sub>50</sub> dilakukan untuk melihat patogenitas bakteri *A. hydrophila* yang dapat mematikan ikan uji sebesar 50% dari ikan yang diuji. Hasil pengujian LD<sub>50</sub> terhadap ikan patin melalui perendaman dengan perlakuan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>7</sup> sel/ml dan 10<sup>8</sup> sel/ml diperoleh hasil sebagai berikut:

**Tabel 3.** Uji Toksisitas Akut LD<sub>50</sub> Bakteri *A. hydrophila*

Konsentrasi Bakteri (cfu/ml)	Ikan Awal	Ikan Akhir	Mortalitas (%)	Waktu (Jam)	Gejala
10 <sup>7</sup>	6	6	0%	0	-
10 <sup>8</sup>	6	3	50%	48	Peradangan

Berdasarkan Tabel diatas dapat diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi 10<sup>7</sup> ikan patin tidak ada yang mengalami kematian yang berarti mortalitasnya 0%. Sementara pada konsentrasi 10<sup>8</sup> ikan mengalami kematian 3 ekor dari 6 ekor ikan yang berarti ikan mengalami mortalitas sebesar 50% dengan waktu 48 jam. Penginfeksi ikan patin dengan bakteri mengakibatkan gejala klinis berupa peradangan. Dengan demikian konsentrasi yang digunakan untuk infeksi pada penelitian inti adalah konsentrasi sebesar 10<sup>8</sup> sel/ml.

#### **h. Pencampuran Pakan Dengan Ekstrak Daun Jambu Biji (*P. guajava*)**

Ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) yang telah diperoleh digunakan untuk pencampuran pada pakan. Pemberian pakan dilakukan berdasarkan FR 3% per hari. Timbang kebutuhan pakan pada masing-masing perlakuan. Kemudian ekstrak kasar ditimbang sesuai dengan dosis 2%, 6% dan 10% dari total pakan. Sebelum ekstrak kasar dan pakan dicampur, terlebih dahulu ekstrak kasar daun jambu biji dicampur terlebih dahulu dengan putih telur sebesar 2% dari pakan sebagai perekat. Aduk ekstrak daun jambu biji dan putih telur sampai merata. Setelah itu, pakan yang sudah ditimbang sesuai dengan kebutuhan masing - masing perlakuan dimasukkan ke campuran tersebut. Aduk sampai merata. Pakan yang telah tercampur merata dengan ekstrak daun jambu biji kemudian dikeringudarkan. Pakan tersebut siap digunakan.

#### **3.3.2 Pelaksanaan Penelitian**

##### **a. Pembersihan Toples**

Toples dengan kapasitas 10 liter, dicuci dengan sabun lalu dibilas dengan air bersih dan dikeringkan, setelah kering, bagian luar toples dipasang plastik hitam guna untuk menghindari ikan Patin dari cahaya langsung dan guna memanipulasi lingkungan agar sama dengan habitat aslinya. Selanjutnya diberi air dan dipasang *Aerator set* serta *heater*.

##### **b. Pemberian Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*)**

Imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*) diberikan pada ikan Patin (*Pangasius sp.*) melalui pakan pellet. Ekstrak kasar daun jambu biji ditimbang sebanyak 2%, 6% dan 10% dari total pakan, setelah itu ekstrak kasar tersebut dicampur dengan putih telur (sebagai perekat) sebanyak 2% dari total pakan, selanjutnya ekstrak kasar yang sudah menyatu dengan putih telur diaduk hingga merata dengan pakan pellet. Kering anginkan pakan yang

mengandung ekstrak kasar daun jambu biji tersebut selama 1 hari, baru pakan yang mengandung ekstrak kasar daun jambu biji siap digunakan.

Pakan dengan kandungan ekstrak kasar daun jambu biji diberikan pada ikan patin sebanyak 3% dari bobot tubuh per harinya. Frekuensi pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu, pagi hari pukul 08:00 WIB, siang hari pukul 13:00 WIB, dan sore hari pukul 16:00 WIB.

### c. Penginfeksian Bakteri *A. hydrophila* pada Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Penginfeksian dilakukan dengan lama waktu maksimal 24 jam pada hari ke 9 pada masa pemeliharaan. Penginfeksian menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman pada toples. Perendaman ikan patin menggunakan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml dan  $10^8$  sel/ml. Perendaman ini dilakukan menggunakan kapasitas air 10 liter, sehingga dapat digunakan rumus pengenceran:

$$\begin{aligned} \text{a) } V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times (3 \times 10^9) &= 6000 \times 10^7 \\ V_1 &= \frac{6000 \times 10^7}{3 \times 10^9} \\ &= 20 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b) } V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times (3 \times 10^9) &= 6000 \times 10^8 \\ V_1 &= \frac{10.000 \times 10^8}{3 \times 10^9} \\ &= 200 \text{ ml} \end{aligned}$$

Hasil tersebut dapat diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan sebanyak 20 ml (kepadatan  $10^7$ ) dan 200 ml (kepadatan  $10^8$ ). Selanjutnya diambil sampel insang ikan patin, sebelum perendaman dan diamati insang ikan tersebut dari warna, struktur, dan bentuknya. Ikan Patin direndam masing - masing 10

ekor/toples, kemudian dilakukan perendaman dengan bakteri. Ditunggu ikan hingga gelisah pertama kalinya dengan ciri-ciri ikan bergerak tidak beraturan. Ikan Patin diamati gejala klinisnya selama 2 hari dan diambil sampel insang ikan Patin setelah perendaman.

#### **d.Pembuatan Histopatologi Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*)**

Ikan sampel yang akan diamati jaringan organ insang adalah ikan normal, ikan yang diuji tantang bakteri dan ikan yang diberi immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) dan diuji tantang bakteri *A. hydrophila*. Ikan setelah diuji tantang 48 jam diambil organ insang dari masing-masing perlakuan kemudian dibedah. Caranya yaitu patin dibedah mulai dari anus, dipotong kearah dorsal kembali kembali kearah insang. Setelah itu diambil organ insang lalu dimasukkan dalam botol sampel dan diberi larutan fiksasi dan larutan Formalin 10%, dilanjutkan dengan pembuatan preparat untuk histopatologi dan pengamatan preparat hasil histopatologi. Tahapan pembuatan histopatologi pada jaringan insang adalah sebagai berikut :

##### **✚ Tahap Fiksasi**

Sampel insang ikan yang akan diamati jaringannya diiris dengan ukuran 2 x 2 cm. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan *buffer* yaitu 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 1 jam, Alkohol absolute 1 selama 2 jam dan Alkohol absolute 2 selama 2 jam.

### ✚ Tahap *Clearing*

Tahap *clearing* bertujuan untuk menstransparankan serta menggantikan Alkohol dari jaringan. Dilakukan dengan mencelupkan sampel ke dalam larutan *Xylo* 1 selama 1 jam, *Xylo* 2 selama 2 jam, dan *Xylo* 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.

### ✚ Tahap *Embedding*

Tahap ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah selanjutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam *water bath* (temperatur 40 °C), kemudian pilih hasil sayatan terbaik dan disiapkan objek glass (untuk persiapan pewarnaan HE), sebelumnya objek glass harus diolesi perekat *polylisisin*. Berikutnya sampel dikeringkan pada oven dengan suhu 50-60°C kurang lebih selama 30 menit.

### ✚ Teknik Pewarnaan dengan Menggunakan HE

Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut :

- Deparafinisasi : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan berturut-turut ke dalam *Xylo* 1 selama 5 menit, *Xylo* 2 selama 5 menit dan *Xylo* 3 selama 5 menit.
- Hidrasi : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan berturut-turut ke dalam Alkohol absolute selama 4 menit, Alkohol 96% selama 3 menit, Alkohol 80% selama 2 menit, Alkohol 70% selama 2 menit, terakhir sampel dimasukkan ke dalam air mengalir selama 10 menit.

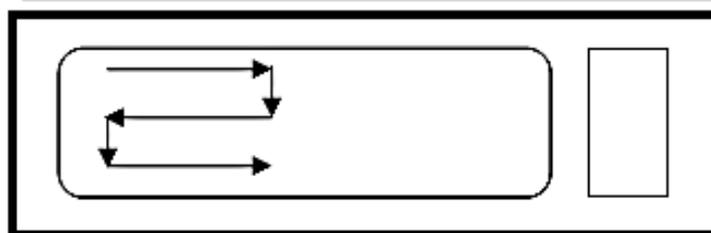
- Cat utama : dilakukan dengan menambahkan pewarna hematoksilin selama 5 menit dan Eosin 1% selama 3-5 menit.
- Dehidrasi : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan ke dalam Alkohol 70% selama 2 menit, Alkohol 80% selama 2 menit, Alkohol 90% selama 3 menit, Alkohol 96 % selama 4 menit, dan Alkohol absolute selama 5 menit.
- *Clearing* : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan ke dalam *Xyol* 1 selama 5 menit, *Xyol* 2 selama 5 menit, dan *Xyol* 3 selama 5 menit.

#### ✚ **Mounting**

Preparat dilem Entellen, kemudian ditutup dengan *cover glass* jangan sampai terjadi gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati di bawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh hematoksilin yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh Eosin yang bersifat asam.

#### ✚ **Pengamatan Preparat**

Untuk mengetahui tingkat kerusakan insang ikan Patin maka dilakukan perhitungan dengan menggunakan metode kuantitatif yaitu skoring. Jumlah lapang pandang yang diamati dalam perhitungan kerusakan insang yaitu sebanyak lima lapang pandang. Pembacaan preparat histopatologi insang ikan Patin adalah dengan gerak zig zag seperti pada Gambar 8 di bawah ini.



**Gambar 8.** Alur Skoring (Gerak Zig Zag) (Siswandari, 2005)

### 3.4 Parameter Uji

#### 3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi jaringan insang ikan Patin (*Pangasius sp.*). Pengamatan ini dilakukan untuk melihat perbedaan insang ikan Patin sehat dengan insang ikan Patin yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, namun sebelum diuji tantang bakteri *A. hydrophila*, ikan Patin sudah diberi perlakuan penambahan immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) pada pakan ikan Patin selanjutnya ditinjau kesehatannya dari ikan Patin.

Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan insang dilakukan uji *scoring* menggunakan metode semi kualitatif dan semi kuantitatif. Metode semi kualitatif dilakukan dengan menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual. Metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang sehingga didapatkan hasil yang maksimal pada tingkat kerusakan sel pada jaringan insang. Setiap lapang pandang diamati tingkat kerusakan selnya dengan kriteria hiperplasia dan nekrosis, Persentase kerusakan setiap luas bidang pandang dihitung berdasarkan rumus menurut Alifia (2013), yaitu:

$$\% \text{ Kerusakan} = \frac{\text{Jumlah Sel Rusak}}{\text{Jumlah Sel Analisis}} \times 100\%$$

Setelah dilakukan perhitungan persentase kerusakan, data diberi nilai skoring seperti pada tabel yang disajikan di bawah ini.

**Tabel 4.** Persentase Nilai Skoring (Pantung *et al.*, 2008)

Nilai Skoring	Persentase Kerusakan (%)	Keterangan
0	0	Tidak terdapat kerusakan
1	0 - 5	Sedikit
2	6 - 25	Sedang
3	26 - 50	Banyak
4	>50	Sangat Banyak

### 3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini yang pertama adalah kelulushidupan atau *Survival Rate* (SR) dari ikan Patin yang dipelihara dengan pakan yang mengandung ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*) selama 10 hari dengan masa adaptasi 3 hari. Rumus SR yaitu,

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Kelangsungan hidup hewan uji (%)

N<sub>t</sub> : Jumlah ikan uji akhir penelitian (ekor)

N<sub>o</sub> : Jumlah ikan uji pada awal penelitian (ekor)

Parameter penunjang yang kedua dalam penelitian ini adalah kualitas air yang meliputi beberapa parameter yaitu :

- Suhu yang diukur menggunakan thermometer
- pH air yang diukur dengan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter.

### 3.5 Analisis Data

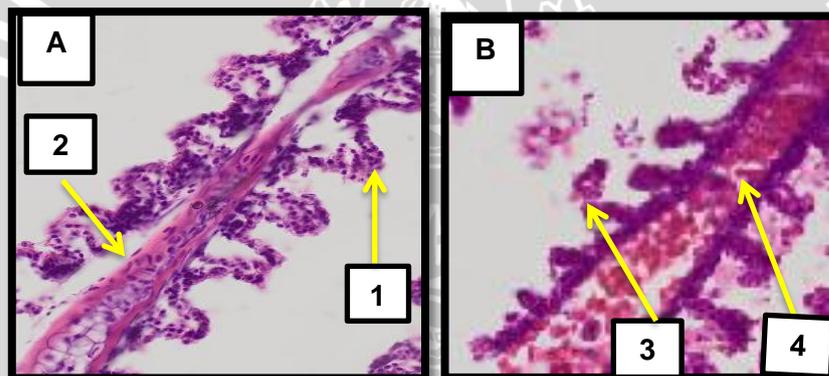
Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, dilakukan uji F atau sidik ragam. Apabila berbeda nyata atau sangat berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui bentuk hubungan antara perlakuan dengan jumlah kerusakan jaringan pada histopatologi insang ikan patin digunakan regresi atau uji polynomial orthogonal.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Gambaran Histopatologi Insang

#### 4.1.1 Gambaran Histopatologi Insang Ikan Normal dan Insang yang Diuji Tantang Bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan hasil penelitian, gambaran histopatologi insang ikan patin (*Pangasius sp.*) normal tanpa immunostimulan ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) dan tanpa adanya infeksi bakteri (*A. hydrophila*) dan gambaran histopatologi insang ikan patin tanpa immunostimulan ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) dan yang terinfeksi bakteri (*A. hydrophila*) dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Histopatologi Insang Normal (A) dan Insang yang diuji Tantang oleh Bakteri (B) Tanda panah No. 1 Lamella Insang Primer; 2. Lamella sekunder; 3.Lamella Insang mengalami Hiperplasia; 4 Nekrosis. Perbesaran 400x

Berdasarkan Gambar 9A diatas, menunjukkan bahwa jaringan insang ikan yang normal atau sehat tidak menunjukkan adanya kerusakan struktur dari lamella primer nomor 1 dan lamella sekunder nomor 2 masih terlihat jelas. Susunan dan struktur lamella yang dilengkapi gill raker berperan penting untuk menyaring partikel –partikel kecil yang masuk ke dalam tubuh ikan melalui insang. Menurut Syahida *et al* (2013), insang normal terdiri dari dua rangkaian yaitu Lamella primer dan Lamella sekunder. Lamella primer permukaannya mengalami perluasan oleh adanya lamella sekunder yang merupakan lipatan

semilunar yang menutupi permukaan dorsal dan ventral. Pada bagian tepi tengah anterior dilengkapi stuktur (*gill racker*) yang berperan menyaring partikel-partikel pakan.

Berdasarkan Gambar histopatologi insang ikan yang diuji tantangi bakteri *A. hydrophila* (Gambar 9B) banyak mengalami kerusakan seperti hiperplasia dan nekrosis sehingga dapat menghambat pada proses pernafasan dan apabila semakin meningkat tingkat kerusakan pada insang dapat menyebabkan adanya kematian pada ikan patin tersebut.

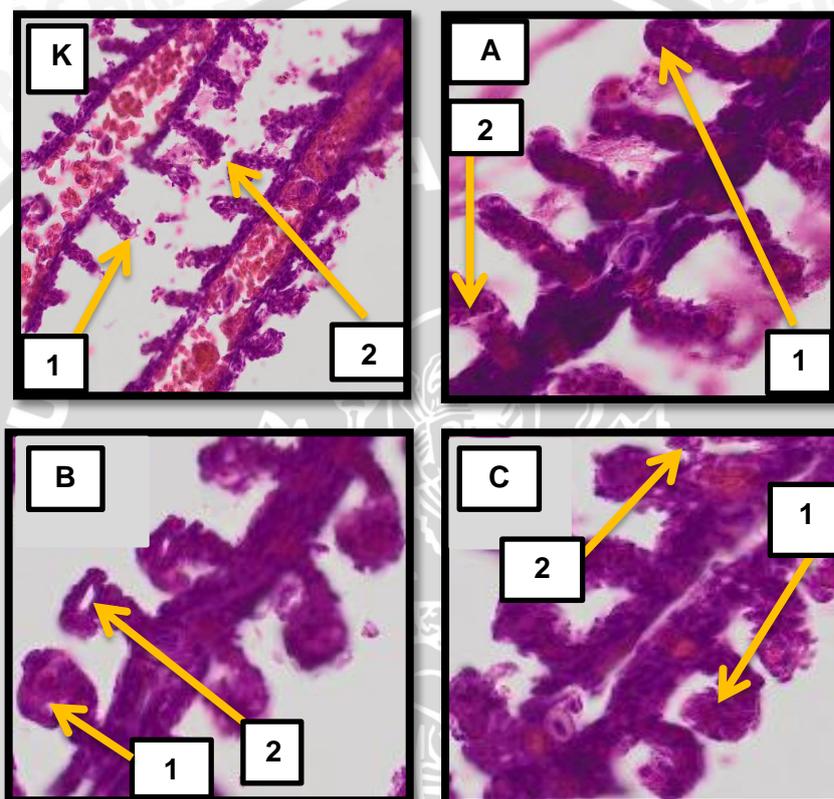
Berdasarkan Gambar 9B nomor 3, merupakan insang yang mengalami hiperplasia yang ditandai dengan penebalan jaringan epitel di ujung filament yang memperlihatkan bentuk seperti pemukul bismbol. Selain itu kerusakan hiperplasia juga ditandai dengan peningkatan ukuran dari suatu organ oleh karena meningkatnya jumlah dari sel di dalam organ tersebut (Kurniasih, 1999).

Menurut Feist (2002), hiperplasia merupakan penebalan jaringan epitel di ujung filament yang memperlihatkan bentuk seperti pemukul bisbol. Dapat terjadi juga pada dekat dasar lamella yang membengkak pada bagian epiteliumnya. Pada penjelasan Robert (2001), mengatakan bahwa hiperplasia lamela sekunder pada insang terjadi akibat adanya pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol, sedangkan pada lamela primer disebabkan oleh sel-sel chlorid secara berlebihan.

Berdasarkan Gambar 9 B nomor 4, merupakan insang yang mengalami nekrosis. Jaringanya terlihat berlubang, dan berwarna agak pucat akibat sel-sel insang mengalami kematian. Menurut Harper dan Jeffrey (2008), nekrosis merupakan kerusakan jaringan sel pada insang yang terjadi akibat kematian sel. Hal ini terjadi akibat kurang atau tidaknya darah yang mengalir ke jaringan. Apabila sel-sel darah yang mengalir ke jaringan tidak mencukupi maka akan mendorong terjadinya hipoksia.

#### 4.1.2 Gambaran Histopatologi insang yang di beri perlakuan

Berdasarkan penelitian diperoleh hasil bahwa gambar histopatologi insang dengan perlakuan pemberian immunostimulan ekstrak daun jaun biji Mengalami kerusakan jaringan insang yang sama yaitu hiperplasia, dan nekrosis (Gambar 10).



**Gambar 10.** Histopatologi Insang Ikan, (K) Pemberian Ekstrak (0%), (A) Pemberian 2% , (B) Pemberian Ekstrak 4%, (C) Pemberian Ekstrak 6%. 1 Hiperplasia; 2. Nekrosis; Perbesaran 400x

Berdasarkan Gambar 10 diatas, pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*) dengan konsentrasi yang berbeda sebagai immunostimulan pada ikan patin memiliki pengaruh yang berbeda terhadap tingkat kerusakan jaringan insang. Hasil analisa menunjukkan bahwa kerusakan insang yang teridentifikasi yaitu insang mengalami, hiperplasia, dan nekrosis yang memiliki hasil berbeda sangat nyata.

Berdasarkan perlakuan K 0% pada (Gambar 10 K menunjukkan tingkat kerusakan yang sangat banyak berkisar >50%. Hal ini dapat dilihat dari lamella insang yang mengalami hiperplasia terlihat membengkak dan ukurannya lebih lebar. Jaringan insang juga memiliki banyak lubang karena mengalami nekrosis atau kematian sel hampir seluruh bagian insang.

Berdasarkan perlakuan A 2% (Gambar 10 A) terlihat bagian jaringan insang mengalami hiperplasia yang hampir menyeluruh pada bagian lamella insang di tandai dengan ukuran lamella primer maupun sekunder yang melebar, kemudian lamella insang mengalami nekrosis yang terlihat dari banyaknya sel yang mengalami kematian dan hampir seluruh lamella sekunder mengalami yang dapat mengakibatkan terjadinya fusi dari analisa tersebut menunjukkan adanya kerusakan jaringan insang yang banyak yaitu (50%).

Berdasarkan perlakuan B 4% (Gambar 10 B) jaringan insang mengalami hiperplasia yang ditandai dengan membengkaknya lamella primer. Lamella insang mulai tersusun dengan teratur dan mengalami kerusakan nekrosis pada lamella dan penampang jaringan insang. Kerusakan jaringan insang pada perlakuan B memiliki kerusakan yang sama dengan perlakuan A namun pada perlakuan B tidak menunjukkan kerusakan yang banyak melainkan sedang yaitu berkisar 26 - 50%.

Berdasarkan perlakuan C 6% (Gambar 10 C) kerusakan jaringan pada insang yang terlihat yaitu mengalami hiperplasia dan nekrosis namun pada perlakuan C lamella sekunder terlihat tersusun teratur di lamella primer, hiperplasia yang di tandai dengan sedikit lamella yang mengalami pembengkakan, hal ini menunjukkan adanya kerusakan yang sedikit (6 - 25%) pada jaringan insang.

Adapun analisa data kerusakan pada histopatologi jaringan insang yang diuji tentang bakteri *A. hydrophila* yang diberi immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) adalah sebagai berikut:

a. Hiperplasia

Adapun hasil perhitungan rerata skoring kerusakan hiperplasia pada jaringan insang ikan patin (*Pangasius sp.*) dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Rerata Skoring Kerusakan Hiperplasia pada Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata $\pm$ SD
	1	2	3		
K (0%)	3,40	3,00	3,80	10,20	3,40 $\pm$ 0.40
A (2%)	3,00	3,00	3,20	9,20	3,07 $\pm$ 0.12
B (4%)	3,00	2,60	2,60	8,20	2,73 $\pm$ 0.23
C (6%)	2,00	1,40	1,40	4,80	1,60 $\pm$ 0.35

Berdasarkan Tabel 5 di atas, maka dilakukan uji sidik ragam, sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) terhadap kerusakan pada insang yang mengalami hiperplasia. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan jaringan insang yang mengalami hiperplasia dapat dilihat pada (Tabel 6). Adapun perhitungan lengkapnya ada pada Lampiran 4.

**Tabel 6.** Sidik Ragam Skoring Kerusakan Hiperplasia

Sumber Keragaman	Db (Derajat bebas)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F.Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,51	1,84	21,18**	4,07	7,59
Acak	8	0,69	0,09			
Total	11	6,20				

Keterangan: \*\* = Berbeda Sangat Nyata

Berdasarkan uji sidik ragam pada Tabel 6 di atas, menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ( $F$  hitung  $>$   $F_{5\%}$  dan  $F_{1\%}$ ). Artinya pemberian ekstrak kasar daun jambu biji berpengaruh sangat nyata sehingga dapat

dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan hiperplasia pada jaringan insang ikan patin (*Pangasius sp.*). Selanjutnya, untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), dapat dilihat pada Tabel 7 dibawah ini.

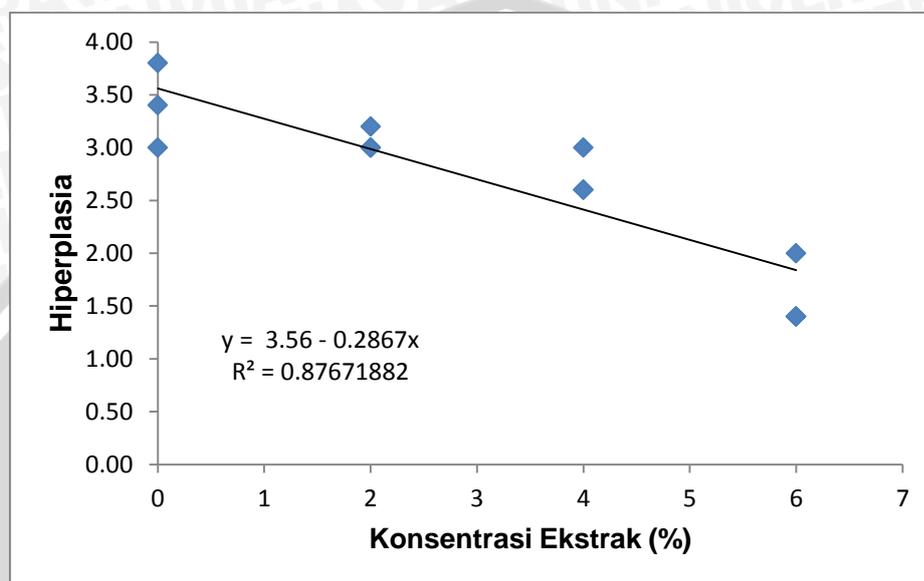
**Tabel 7.** Uji BNT Skoring Kerusakan Hiperplasia pada Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Rerata	C	B	A	K	Notasi
		1,60	2,73	3,07	3,40	
C	1,60	-	-	-	-	a
B	2,73	1,13*	-	-	-	b
A	3,07	1,47**	0,33 <sup>ns</sup>	-	-	bc
K	3,40	1,80**	0,67*	0,33 <sup>ns</sup>	-	c

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
 (\*) = berbeda nyata  
 (\*\*) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan Tabel 7 di atas, menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami hiperplasia yaitu notasi a, b, bc, dan c. Hal ini berarti perlakuan C (ekstrak 6%) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (ekstrak 2%) dan B (ekstrak 4%) yang di tunjukkan dengan notasi bc, dan b serta berbeda sangat nyata dengan perlakuan K (tanpa immunostimulan), yang di tunjukkan dengan notasi c. Kerusakan hiperplasia pada jaringan insang yang paling parah kerusakannya adalah pada perlakuan K, kemudian diikuti dengan perlakuan A dan B. semakin banyak dosis immunostimulan yang diberikan maka semakin baik untuk kekebalan ikan patin. Menurut Sukmaningtyas (2012), bahwa dosis immunostimulan yang ter lalu kecil dapat menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Berdasarkan pada tabel 7 Untuk mengetahui hubungan antara pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*), dengan konsentrasi yang berbeda dengan nilai skoring kerusakan maka dilakukan analisa regresi dan uji *polynomial orthogonal* yang dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Grafik Hubungan antara Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*) dengan Konsentrasi yang Berbeda dengan Nilai Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Hiperplasia pada Jaringan Insang

Berdasarkan Grafik pada Gambar 11 di atas, menunjukkan bahwa hubungan antara rerata nilai skoring dan pemberian dosis berbanding terbalik, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka nilai kerusakan dari hiperplasia semakin menurun dan didapatkan persamaan yaitu  $y = 3.56 - 0.2867x$  dan dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) = 0.87671882 yang berarti bahwa ekstrak tersebut mampu memberikan pengaruh terhadap persentase kerusakan insang akibat hiperplasia sebesar 87,67 % dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain dan korelasi ( $r$ ) yakni 0,94 yang memiliki arti bahwa hubungan antara sumbu X dan sumbu Y adalah sangat rekat (hampir mendekati 1).

Perlakuan K dengan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa immunsostimulan ekstrak kasar daun jambu biji *P. guajava* menunjukkan adanya

tingkat kerusakan jaringan yang paling banyak yaitu sebesar 3.4. Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (2%) yaitu pada perlakuan (A) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang juga berat yaitu sebesar 3,1. Pada pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (4%) yaitu pada perlakuan (B) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang juga banyak yaitu sebesar 2,7. Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (6%) yaitu pada perlakuan (C) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang sedikit yaitu sebesar 1,6. Hal ini menunjukkan adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* pada jaringan insang ikan dan dari keempat perlakuan yang diberikan pada ikan patin menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (6%) memiliki tingkat kerusakan jaringan insang yang mengalami hiperplasia paling sedikit. Hal ini menunjukkan aktifitas dari ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) dengan konsentrasi 6% dalam meningkatkan respon imun pada tubuh ikan patin. Kerusakan hiperplasia pada jaringan insang menurun seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak daun jambu biji yang diberikan, sesuai dengan pendapat Ajizah (2004) bahwa ekstrak daun jambu biji mengandung tanin yang mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein. Menurut Ngajow, Abidjulu dan Kamu (2013), tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel.

## b. Nekrosis

Adapun hasil perhitungan dari rerata skoring kerusakan nekrosis pada jaringan insang ikan patin (*Pangasius sp.*) disajikan pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Rerata skoring kerusakan jaringan insang yang mengalami Nekrosis pada ikan patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± SD
	1	2	3		
K (0%)	3,20	2,80	3,60	9,60	3,20 ± 0,40
A (2%)	2,80	3,00	3,20	9,00	3,00 ± 0,20
B (4%)	2,60	2,60	3,00	8,20	2,73 ± 0,23
C (6%)	0,80	1,20	1,40	3,40	1,13 ± 0,31

Berdasarkan Tabel 8. dilanjutkan dengan uji sidik ragam (Tabel 9). Sidik ragam digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) terhadap kerusakan jaringan insang yang mengalami nekrosis. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan jaringan insang yang mengalami nekrosis dapat dilihat pada (Tabel 9). Adapun perhitungan lengkapnya ada pada Lampiran 5.

**Tabel 9.** Sidik Ragam Skoring Kerusakan Nekrosis

Sumber Keragaman	Derajat bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	7,983	2,661	30,705**	4,07	7,59
Acak	8	0,693	0,087			
Total	11	8,677				

Keterangan: \*\* = Berbeda Sangat Nyata

Uji sidik ragam pada Tabel 9 di atas, menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ( $F_{hitung} > F_{5\%}$  dan  $F_{1\%}$ ). Artinya pemberian ekstrak kasar daun jambu biji berpengaruh sangat nyata sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan insang ikan patin (*Pangasius sp.*). Selanjutnya,

untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), dapat dilihat pada Tabel 10 dibawah ini.

**Tabel 10.** Uji BNT skoring kerusakan nekrosis pada jaringan Insang Ikan patin (*Pangasius sp.*).

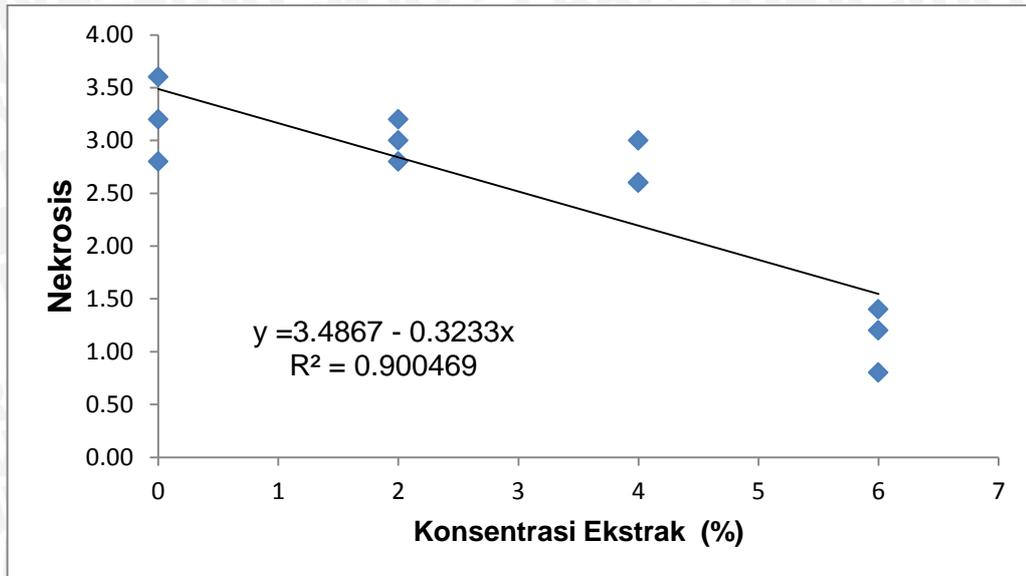
Perlakuan	Rerata	C	B	A	K	Notasi
		1,13	2,73	3,00	3.20	
C	1,13	-	-	-	-	a
B	2,73	1,6**	-	-	-	b
A	3,00	1,87**	0,26 <sup>ns</sup>	-	-	c
K	3,20	2,06**	0,47*	0,2 <sup>ns</sup>	-	cd

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(\*) = berbeda nyata

(\*\*) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan tabel 10 di atas, menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami Nekrosis yaitu notasi a, b, c, dan cd . Hal ini berarti perlakuan C (ekstrak 6%) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (ekstrak 2%) dan B (ekstrak 4%) yang di tunjukkan dengan notasi b, dan c serta berbeda sangat nyata dengan perlakuan K tanpa immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*), yang ditunjukkan dengan notasi cd. Kerusakan Nekrosis pada jaringan insang yang paling parah kerusakannya adalah pada perlakuan K, kemudian diikuti dengan perlakuan A dan B. Berdasarkan pada tabel 10 di atas, maka dapat digambarkan grafik hubungan pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*), dengan konsentrasi yang berbeda dengan nilai rerata skoring hasil pengamatan yang mengalami Nekrosis jaringan insang dapat dilihat pada Gambar 12.



**Gambar 12.** Grafik Hubungan antara Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*) dengan Konsentrasi yang Berbeda dengan Nilai Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Insang

Berdasarkan Grafik pada Gambar 12 diatas, menunjukkan bahwa hubungan antara rerata nilai skoring dan pemberian dosis berbanding terbalik, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka nilai kerusakan dari nekrosis semakin menurun dan didapatkan persamaan yaitu  $y = 3,4867 - 0,3233x$  dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,900469 yang berarti bahwa ekstrak tersebut mampu memberikan pengaruh terhadap persentase kerusakan insang akibat nekrosis sebesar 90 % dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain dan korelasi ( $r$ ) yakni 0,95 yang memiliki arti bahwa hubungan antara sumbu X dan sumbu Y adalah sangat rekat (hampir mendekati 1). Kemudian diketahui bahwa perlakuan K dengan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) menunjukkan adanya tingkat kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis paling berat yaitu sebesar 3,2. Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (2%) yaitu pada perlakuan (A) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang juga berat yaitu sebesar 3,0. Pada

pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P.guajava*) konsentrasi pemberian (4%) yaitu pada perlakuan (B) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang juga berat yaitu sebesar 2,7. Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (6%) yaitu pada perlakuan (C) menunjukkan nilai rerata skoring kerusakan jaringan insang yang sedang yaitu sebesar 1,1. Hal ini menunjukkan adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* pada jaringan insang ikan dan dari keempat perlakuan yang diberikan pada ikan patin menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) konsentrasi pemberian (6%) memiliki tingkat kerusakan jaringan insang yang mengalami nekrosis paling sedikit. Hal ini menunjukkan aktifitas dari ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) dengan konsentrasi 6% dalam meningkatkan respon imun pada tubuh ikan patin. Kerusakan jaringan insang yang mengalami nekrosis menurun hal ini terjadi karena adanya kandungan zat aktif pada ekstrak daun jambu biji salah satunya adalah flavonoid. Menurut Asti (2009), flavonoid selain berfungsi sebagai bakteriositik juga berfungsi sebagai anti inflamasi. Flavonoid yang bersifat lipofilik mempunyai kemampuan akan merusak membran sel mikroba.

## **4.2 Parameter Penunjang**

### **4.2.1 Kelulushidupan (SR) Ikan Patin (*Pangasius* sp.)**

Berdasarkan hasil penelitian kelulushidupan Ikan Patin (*Pangasius* sp.), dari jumlah keseluruhan ikan yang diuji pada awal dan akhir penelitian diperoleh data kelulushidupan seperti yang tersaji pada Tabel 14.

Tabel 14. Rerata Nilai Kelulushidupan Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
K (0%)	100,00	100,00	100,00	300,00	100,00
A (2%)	100,00	100,00	100,00	300,00	100,00
B (4%)	100,00	100,00	100,00	300,00	100,00
C (6%)	100,00	100,00	100,00	300,00	100,00

Berdasarkan Tabel 14 di atas, menunjukkan bahwa ikan patin yang dipelihara dengan pakan yang mengandung immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) baik setelah diberi perlakuan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) lewat pakan maupun setelah diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ikan patin yang diberi ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) tidak menimbulkan kontaminasi atau racun yang dapat mengakibatkan kematian ikan, Ikan yang sudah diberi infeksi tidak juga mengalami kematian dimungkinkan ikan patin memiliki kondisi kekebalan tubuh yang sehat tubuh yang sehat sehingga bakteri yang diberikan tidak sampai menimbulkan kematian.

#### 4.2.2 Kualitas Air

Berdasarkan penelitian parameter kualitas air juga harus diperhatikan selama masa pemeliharaan ikan patin saat proses penelitian berlangsung karena akan mempengaruhi kelulushidupan ikan. Parameter kualitas air yang diukur antara lain suhu, pH dan DO atau oksigen terlarut. Adapun hasil pengukuran kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 15 dan pada Lampiran 9.

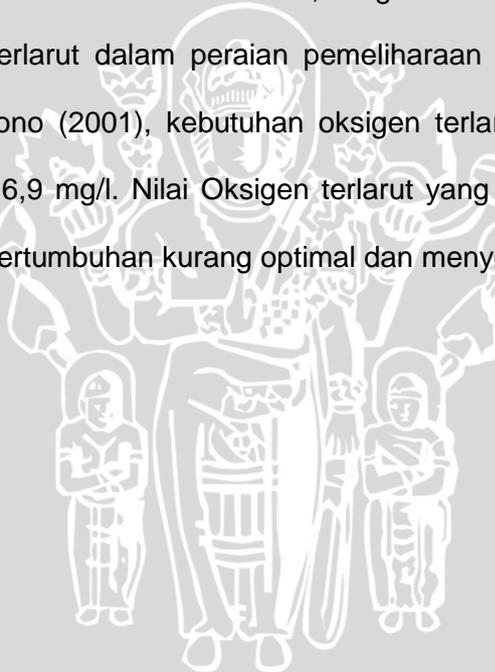
Tabel 15. Hasil Pengamatan Kualitas Air selama Penelitian

Parameter Kualitas Air	Hasil Penelitian	Sumber Pustaka
Suhu	28,2 - 29,1°C	25 °C -30 °C (Subachri, 2011)
pH	6,8 - 7,1	7 -8,5 (Kordi, 2005)
DO ( <i>Disolved oxygen</i> )	5,9 – 9,4	4,56 – 6,9 mg/l (Cahyono, 2011)

Berdasarkan hasil pengamatan kualitas air pada tabel diatas, parameter suhu berada dalam kisaran 28,2 – 29,1 °C. Menurut Subachri, *et al.* (2011), dalam pemeliharaan ikan harus diperhatikan beberapa faktor salah satunya suhu, kisaran suhu yang baik untuk ikan patin yaitu berkisar antara 25°C - 30°C.

Parameter pH berada dalam kisaran 6,8 - 7,1 dengan nilai rata – rata sebesar 7 masih di katakana baik didalam perairan. Menurut Kordi (2005) pH yang digunakan untuk pemeliharaan ikan patin harus memenuhi kebutuh yang optimal ikan, pH yang baik untuk pemeliharaan ikan patin adalah sebesar 7 -8,5.

Oksigen terlarut (DO) diperoleh hasil pengamatan yaitu pada kisaran sebesar 5,9 – 9,4 dengan nilai rata – rata sebesar 6,4 mg/l dan masih menunjukkan bahwa oksigen yang terlarut dalam perairan pemeliharaan ikan dalam kondisi normal. Menurut Cahyono (2001), kebutuhan oksigen terlarut pada ikan patin berkisar antara 4,56 – 6,9 mg/l. Nilai Oksigen terlarut yang rendah merupakan dapat mengakibatkan pertumbuhan kurang optimal dan menyebabkan kematian.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

- Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap histopatologi jaringan insang ikan Patin (*Pangasius sp.*) yang diuji tantang bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) pada ikan Patin (*Pangasius sp.*) yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila* belum mendapatkan dosis terbaik, namun didapatkan dosis 6 % yang mampu menurunkan tingkat kerusakan jaringan insang.

### 5.2 Saran

Berdasarkan dari hasil penelitian disarankan sebagai berikut :

- Pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) untuk ikan Patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* menggunakan dosis 6%.
- Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis pemberian immunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) yang dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan insang pada ikan Patin (*Pangasius sp.*) yang diuji tantang bakteri *A. hydrophila*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aberoum, A., dan H. Jooyandeh. 2010. A Review on Occurrence and Characterization of the Aeromonas Species from Marine Fishes. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 2(6): 519-523
- Adria, PM dan M. U.Jenny . 2006. Pengaruh Formula Pakan Terhadap Perkembangan Ikan Patin (*Pangasius Sp.*) yang Dipelihara di Waring Apung. *Risalah Seminar Ilmiah*. Vol.1.No. 1.Hal.217-220.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas Salmonella typhirium terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. *Jurnal Bioscientie*. 1(1): 31-38
- Alifia, F. 2013. Histopatologi Insang Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forskall) yang Tercemar Logam Timbal (Pb). *Jurnal Balik Diwa*. 4(1): 38-45.
- Alifuddin, M. 2002. Imunostimulasi Pada Hewan Akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 1(2):87-92.
- Amelia, N dan B. Prayitno. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) untuk Menginaktifkan Viral Nervous Necrosis (VNN) pada Ikan Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal Of Aquaculture Management and Technology*.1 (1): 264-278.
- Andayani, S. 2009. Respon Non-Spesifik Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Terhadap Immunostimulan Senyawa aktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainivilla sp.*) Melalui Pakan. Universitas Brawijaya, Malang, Berk Penelitian Hayati Edisi Khusus : 3B : 67-73.
- Anderson, D. P., and A.K Siwicki. 1993. Basic Hematology and Serology for fish Health Programs. *Second Symposium On Diseases in Asian Aquaculture Aquatic Animal Health and the Environment*. Phuket, Thailand. 25-29<sup>th</sup> October 1993.
- Ariyanto, D., B. Gunadi dan Sularto. 2007. Pengaruh Formula Pakan Terhadap Perkembangan Ikan Patin (*Pangasius sp.*) yang Dipelihara di Waring Apung. *Jurnal Perikanan*. Vol. 9. No. 1. hlm. 49-55.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan Di Perairan Umum. Kanisius: Yogyakarta 83 hlm.
- Cholik, F., Ateng, G.J., Poernomo, P., dan Ahmad, J. 2005. Akuakultur. MSTK dan TAAT, TMII. Jakarta 390 hlm.
- Christian, C., C. Volk, R. Creason, J. Jarosh., J. Robinshon dan C.Wames. 2001. Detection of *hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Can. J. Microbiol*. 47(8): 782-786.

- Dontriska., A.D. Sasanti., Yulisman. 2014. Efektivitas Tepung Jintan Hitam (*Nigella sativa*) untuk Mencegah Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Patin. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 2 (2). 188-201.
- Erlangga. 2007. Efek Pencemaran Sungai Kampar Di provinsi riau Terhadap Ikan Baung (*Hemibagrus nemurus*). Tesis. Institut Pertanian Bogor. 66 hlm. Tidak dipublikasikan
- Feist. 2002. Polusi Air dan Polusi Udara Fakultas Pangan Dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 35 hlm.
- Firdausi, N. P. 2013. Pengaruh Ekstrak Kasar Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla*) Terhadap Daya Hambat *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Tidak Dipublikasikan
- Gusrina. 2008. BUDIDAYA IKAN JILID 3. Direktorat Jenderal Manajemen Pendidikan Dasar Menengah : Departemen Pendidikan Nasional. 105 hlm.
- Hartoto. 2009. Penelitian Deskriptif. [Online]. Tersedia: <http://www.penalaran.unm.org/index.php/artikel-nalar/penelitian/163-penelitian-deskriptif.html>. (diakses 28 Februari 2016).
- Holmes P., L. M. Niccolls & D. P. Sartory, 1996, The Ecology of Mesophilic *Aeromonas* in Aquatic Environment. *In*: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.) *The Genus Aeromonas*, John Wiley & Sons, New York, NY: 39-76.
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., JT Staley. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Insani, D. S. 2002. Inventarisasi Bakteri Pada Ikan Hias Mas Koki (*Carassius auratus*), Maanvis (*Pterophyllum scalare*), Black Ghost (*Apterenotus albifrons*) dan Cupang (*Betta splendens*) di Jakarta Timur. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 73 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hlm.
- Jasmanidar, Y. 2009. Penggunaan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang *Vannamei Litopenaeus vannamei*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 97 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and disease of fish cultured in the tropics*. Taylor and Francis, London and Philadelphia. 318 hal.
- Khairuman dan Dodi.S. 2002. *Budi Daya Patin secara Intensif*. Agromedia Pustaka. Jakarta Selatan. 116 hlm.

- Kurniasih. 1999. Deskripsi Histopatologi dari Beberapa Penyakit Ikan. Pusat Karantina Pertanian, Departemen Pertanian. Jakarta. 54 hlm.
- Kordi, K.M.G.H. 2005. Budidaya Ikan Patin. Biologi, Pembenihan dan Pembesaran. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta. 170 hal.
- Kordi, M. G. H. 2010. Panduan Lengkap Memelihara Ikan Air Tawar di Kolam Terpal. Lily Publisher. Yogyakarta. 279 hlm.
- Lukistyowati, I dan H. Syawal. 2013. Potensi Pakan yang Mengandung Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) untuk Menanggulangi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Baung (*Mystus nemurus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 1 (2). 135-147.
- Mardalis. 1989. Metode Penelitian (Suatu Pendekatan Penelitian). Jakarta: PT Bumi Aksara.120 hlm.
- Martha, R. 2006. Analisa Kelayakan Industri Filletlkan Patin Beku (*Pangasius hypophthalmus*) di Kabupaten Bogor. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mangunwardono, B; R. Ismayasari; dan E. Riyani. 2010. Uji Patogenesis dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stainer Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *J. Ris Akuakultur*. 5 (2) : 245-255
- Murtidjo, B. A. 2002. Budi Daya Kerapu dalam Tambak. Kanisius: Yogyakarta. 80 hlm.
- Mulyono, D. 2001. Budi Daya Ikan Betutu. Kanisius. Yogyakarta. 168 hlm.
- Nababan, E. dan Hasruddin. 2015. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Omicum sanctum* L.) pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*. *Jurnal Biosains*. 1(2): 51-56
- Nabib, R dan Pasaribu F H. 1989. Patologi dan Penyakit Ikan. Bogor. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor. 158 hlm.
- Ngajow, M; J. Abidjulu dan V.S. Kamu. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus auerus* secara in vitro. *Jurnal MIPA UNSTRAT Online*. 2(2): 128-132.
- Nuria, M.C., A. Faizatun., Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediargo*. 5 (2). 26-37.
- Pazra, D. F. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot dan Usus pada Ikan Lele (*Clarias* sp.) Asal dari Daerah Bogor. *Skripsi*. IPB. Bogor.52 hlm Tidak dipublikasikan.
- Pantung, N., K.G. Helander, H.F. Helander and V. Cheevaporn. 2008. Histopathological Alterations of Hybrid Walking Catfish (*Clarias*

*macrocephalus x Clarias gariepinus*) in Acute and Subacute Cadmium Exposure. *EnviromentAsia*. **1**(1): 22-27.

- Prajitno, A. 2005. Penyakit Ikan-Udang Bakteri. UM Press. Malang. 115 hlm.
- Prihatman, K. 2000. Tentang Budidaya Pertanian Kedelai. Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Permasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.
- Ramadhan, M.A., A. Azam, M. S. Pradana, H. Junian, M. Y. Akbar. 2010. Teknik Pembesaran Ikan Patin (*Pangasius hypopthalmus*) dengan Sistem Resirkulasi Tertutup. Universitas Airlangga Surabaya. 12 hlm.
- Richards, R. H and R. J Robert. 1974. The Bacteriology of teleost. In Fish Pathology. (R. J. Robert Ed). In London. 318 p.
- Robert R. J. 2001. Fish Pathology. USA: W. B. Saunders. 472 hlm.
- Rukmana, R. 1996. Tambulapot, Jambu Biji. Kanisius. Yogyakarta: 64 hlm.
- Samsundari, Sri. 2006. Pengujian Ekstrak Temulawak Dan Kunyit Terhadap Resistensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang Menyerang Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *GAMMA*. Vol. 2. No.1. 83 hlm.
- Saputra, H. M., Marusin dan P. Santoso. 2013. Struktur Histologi Insang dan Kadar Hemoglobin Ikan Asang (*Osteochilus hasseiti* CV) di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. **2**(2): 138-144.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Buku. Kanisius. Malang. 267 hlm.
- Setyowati, E., S.B. Prayitno., Sarjito. 2014. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*. L) terhadap Kelulushidupan dan Histologi Hati Ikan Patin 2 (*Pangasius hypophtalamus*) yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3**(4). 174-182.
- Setyowati, A., D. Hidayati, P.D.N. Awik dan N. Abduganis. 2010. Studi Histopatologi Hati Ikan Belanak (*Mugil cephirnus*) di Muara Sungai Aloo Sidoarjo. *Jurnal Ristek Akuakultur*. **2**(1): 22-29.
- Sholikhah, E.H. 2009. Efektivitas Campuran Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) dalam Pakan untuk pengendalian infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.). Skripsi. IPB. Bogor. 74 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Siswandari, W. 2005. Nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit sediaan apus darah tepi dibandingkan analisis kromosom pada penderita dengan dugaan sindroma *fragile* x. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang. 47 hlm.

- Subachri, W., Zainuddin, D. Yanuarita. 2011. Budidaya Kerapu Sistem Keramba Jaring Apung dan Tancap. *Seri Panduan Perikanan Skala Kecil*. Vol 1, 5-44.
- Sudana. 2005. Jambu Biji, Budi Daya dan Ragam Pemanfaatannya. Penebar Swadaya. Depok. 131 hlm.
- Surakhmad, W. 1989. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tansito. Bandung. 118 hlm.
- Sutama, I.K.J. 2002. Efektivitas Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L), Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* L<sub>31</sub> pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.). Skripsi. IPB. Bogor. 86 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Syahida, I.E. A., Sarjito, S. B. Prayitno dan A. Mariana L. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocantum*) Terhadap Profil Darah dan Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 2(4):94-107
- Taxonomicon.2000. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?src=0&id=182534>. Diakses pada tanggal 16 maret 2016. Pukul 20.22
- Treves-Brown, K. M. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publisher, London. 251-259 p.
- Volk, W dan M. Wheller. 1993. Mikrobiologi Dasar. Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hlm.
- Yanto, H., H.Hasan., Sunarto. 2015. Studi Hematologi untuk Diagnosa Penyakit Ikan Secara Dini di Sentra Produksi Budidaya Ikan Air Tawar Sungai Kapuas Kota Pontianak. *Jurnal Akuatika*. 6(1). 11-20.
- Yuliani, S., L. Udarno dan E. Hayani. 2003. Kadar Tanin dan Quersetin Tiga Tipe Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*). Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. 8 hlm.
- Yuliartati, Eka. 2011. Tingkat Serangan Ektoparasit Pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*) Pada Beberapa Pembudidaya Ikan Di Kota Makassar. UNHAS: Makassar. 65 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Zulnaidi. 2007. Metode Penelitian. Universitas Sumatera Utara. Medan. 20 hlm.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Peralatan Penelitian



Oven



Autoklaf



Kulkas



Timbangan Digital



Timbangan Analitik



Inkubator



Hotplate



Vortex mixer



Laminary Air Flow

Lampiran 1. (Lanjutan)



Tabung Reaksi



Jarum ose



Erlemeyer 50 ml



Bunsen



Cawan Petri



Jangka sorong digital



pH meter



Nampan



Gelas ukur 100 ml



Spektrofotometer



DO meter



Rotary Evaporator

Lampiran 1. (Lanjutan)



Mikrotom



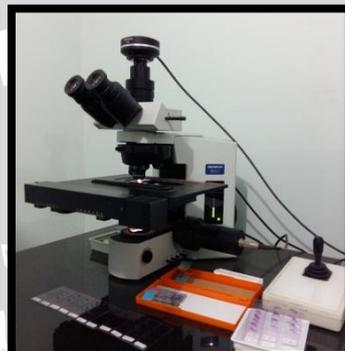
Tissue Processor



Auto Staining



Inkubator



Mikroskop



Section set



Gunting



Penggaris



Kabel Rol

### Lampiran 2. Bahan – Bahan Penelitian



Ekstrak Daun Jambu biji



Akuades



Alkohol 70%



Bakteri *A. hydrophila*



Tissu



Alumunium Foil



Benang kasar dan kapas



Spirtus



Sarung tangan



Etanol 96 %



Kertas label



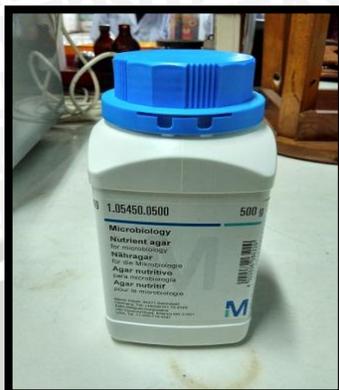
Masker



Lampiran 2. (Lanjutan)



NB



NA



TSB



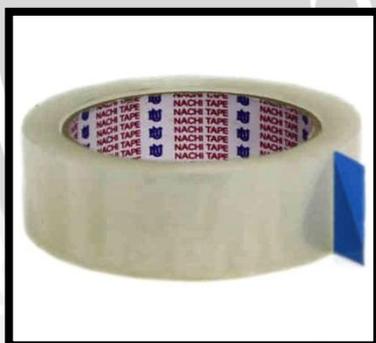
Kertas Saring



Plastik Hitam



Klip plastik



Isolasi



Koran Bekas



**Lampiran 3.** Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

• Kelainan Patologi Insang Hiperplasia

Sampel	Ulangan	Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata sampel
		1	2	3	4	5		
A	1	3	3	4	2	3	3,00	3,07
	2	2	4	3	3	3	3,00	
	3	3	2	4	4	3	3,00	
B	1	2	3	4	3	3	3,00	2,73
	2	4	1	3	3	2	2,60	
	3	3	2	2	3	3	2,60	
C	1	2	1	2	3	2	2,00	1,60
	2	1	2	1	2	1	1,40	
	3	2	0	1	2	2	1,40	
K	1	4	3	4	3	3	3,40	3,40
	2	3	2	4	3	3	3,00	
	3	4	3	4	4	4	3,80	
Normal	1	0	1	1	1	0	0,60	0,53
	2	0	0	0	1	1	0,40	
	3	1	0	1	0	1	0,60	

• Kelainan Patologi Insang Nekrosis

Sampel	Ulangan	Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata sampel
		1	2	3	4	5		
A	1	4	2	3	2	3	2,80	3,00
	2	2	3	4	3	3	3,00	
	3	3	3	3	3	4	3,20	
B	1	2	3	4	2	2	2,60	2,73
	2	2	3	2	3	3	2,60	
	3	3	3	2	3	4	3,00	
C	1	0	0	2	1	1	0,80	1,13
	2	0	1	2	1	2	1,20	
	3	1	2	2	1	1	1,40	
K	1	3	4	4	3	2	3,20	3,20
	2	4	2	2	3	3	2,80	
	3	3	4	4	4	3	3,60	
Normal	1	1	0	0	0	0	0,20	0,47
	2	1	0	0	1	1	0,60	
	3	1	1	0	0	1	0,60	

Keterangan :

Nilai 1 = Sedikit (Kerusakan 0 -5 %)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6 - 25 %)

Nilai 3 = Banyak (Kerusakan 26 - 50 %)

Nilai 4 = Sangat Banyak (Kerusakan >50 %)



**Lampiran 4.** Perhitungan Analisa Data Kerusakan Hiperplasia Pada Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

- Rerata Skoring Kerusakan Hiperplasia Pada Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± SD
	1	2	3		
K (0%)	3,40	3,00	3,80	10,20	3,40 ± 0,40
A (2%)	3,00	3,00	3,20	9,20	3,07 ± 0,12
B (4%)	3,00	2,60	2,60	8,20	2,73 ± 0,23
C (6%)	2,00	1,40	1,40	4,80	1,60 ± 0,35

Faktor Koreksi =  $\text{Total}^2 / n.r$   
 =  $(32.40)^2 / 12$   
 = 87,48

Jumlah Kuadrat (JK) Total =  $(K1)^2 + \dots + (A1)^2 + \dots + (B2)^2 + \dots + (C3)^2 - FK$   
 =  $(3.4)^2 + \dots + (3)^2 + \dots + (3)^2 + \dots + (2)^2 - 87.48$   
 = 6,20

Jumlah Kuadrat Perlakuan =  $\frac{K^2 + A^2 + B^2 + C^2}{3} - FK$   
 = 5.51

Jumlah Kuadrat Acak = JK Total – JK Perlakuan  
 = 6,20 – 5,51  
 = 0,69

- Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db (Derajat bebas)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F.Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,51	1,84	21,18**	4,07	7,59
Acak	8	0,69	0,09			
Total	11	6,20				

Keterangan: \*\* = berbeda sangat nyata

**Lampiran 4.** (Lanjutan)

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas (db) Total} &= (t) \cdot (r) - 1 \\ &= (4) \cdot (3) - 1 \\ &= 11\end{aligned}$$

$$\text{Db Perlakuan} = (t) - 1 = (4) - 1 = 3$$

$$\text{Db Acak} = \text{db Total} - \text{db Perlakuan} = 11 - 3 = 8$$

$$\text{Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} = \frac{JK \text{ Perlakuan}}{db \text{ Perlakuan}} = \frac{5.51}{3} = 1.84$$

$$\text{KT Acak} = \frac{JK \text{ Acak}}{db \text{ Acak}} = \frac{0.69}{8} = 0.09$$

$$\text{F Hitung} = \frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}} = \frac{1.84}{0.09} = 21.18$$

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

- Uji BNT skoring kerusakan hiperplasia pada jaringan Insang Ikan patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Rerata	C	B	A	K	Notasi
		1.60	2.73	3.07	3.40	
C	1.60	-	-	-	-	A
B	2.73	1.13**	-	-	-	B
A	3.07	1.47**	0.33 <sup>ns</sup>	-	-	Bc
K	3.40	1.80**	0.67*	0.33 <sup>ns</sup>	-	C

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
(\* ) = berbeda nyata  
(\*\* ) = berbeda sangat nyata

$$\text{SED} = \sqrt{2 \text{ KT acak/r}} = 0.24$$

$$\text{BNT 5\%} = t \text{ tabel 5\%} \times \text{SED} = 0.45$$

$$\text{BNT 1\%} = t \text{ tabel 1\%} \times \text{SED} = 0.70$$

**Lampiran 4. (Lanjutan)**

- Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)		
		Linier	Kuadratik	Kubik
K (0%)	10.20	-3	1	-1
A (2%)	9.20	-1	-1	3
B (4%)	8.20	1	-1	-3
C (6%)	4.80	3	1	1
$Q = \sum Ci \cdot Ti$		-17.2	-2.4	-8.88
Hasil Kuadrat		20	4	20
$Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$		60	12	60
$JK = Q^2 / Kr$		4.93	0.48	1.31
JK Regresi Total	= JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik = 4.93 + 0.48 + 1.31 = 5.411			

- Analisis Sidik Ragam Regresi

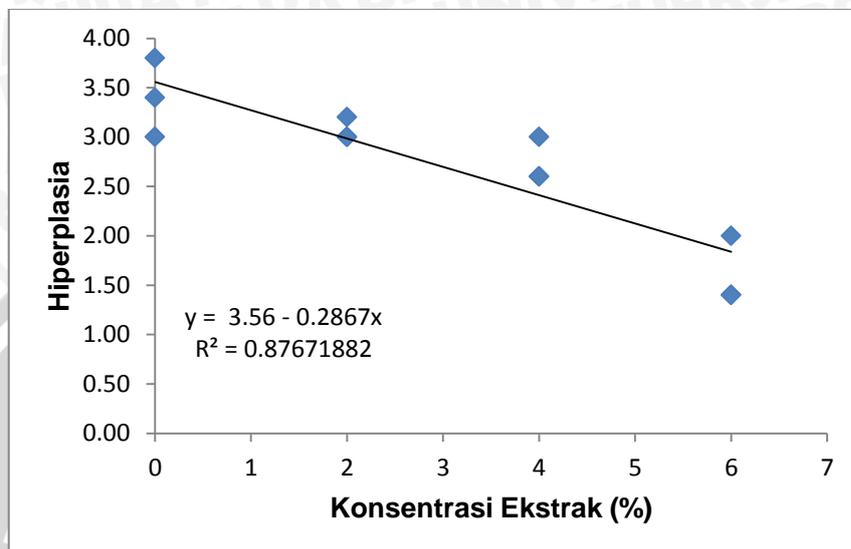
Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,411	-	-	-	-
Linier	1	4,931	4,931	56,892	4,07**	7,59
Kuadratik	1	0,480	0,480	5,538	-	-
Kubik	1	0,000	0,000	0,000	-	-
Acak	8	0,693	0,087	-	-	-
Total	11					

Keterangan : \*\* = berbeda sangat nyata



## Lampiran 4. (Lanjutan)

- Grafik Hubungan antara Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*) dengan Nilai Rerata Skoring Kerusakan Hiperplasia



**Lampiran 5.** Perhitungan Analisa Data Kerusakan Nekrosis Pada Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

- Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis Pada Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± SD
	1	2	3		
K (0%)	3,20	2,80	3,60	9,60	3,20 ± 0,40
A (2%)	2,80	3,00	3,20	9,00	3,00 ± 0,20
B (4%)	2,60	2,60	3,00	8,20	2,73 ± 0,23
C (6%)	0,80	1,20	1,40	3,40	1,13 ± 0,31

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= \text{Total}^2 / n.r \\ &= (30.20)^2 / 12 \\ &= 76.00 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat (JK) Total} &= (K1)^2 + \dots + (A1)^2 + \dots + (B2)^2 + \dots + (C3)^2 - \text{FK} \\ &= (3.2)^2 + \dots + (2.8)^2 + \dots + (2.6)^2 + \dots + (0.8)^2 - 76.00 \\ &= 8.76 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat Perlakuan} &= \frac{K^2 + A^2 + B^2 + C^2}{3} - \text{FK} \\ &= 7.98 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 8.76 - 7.98 \\ &= 0.69 \end{aligned}$$

- Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Derajat bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	7.983	2.661	30.705**	4.07	7.59
Acak	8	0.693	0.087			
Total	11	8.677				

Keterangan: \*\* = Berbeda Sangat Nyata

**Lampiran 5. (Lanjutan)**

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas (db) Total} &= (t) \cdot (r) - 1 \\ &= (4) \cdot (3) - 1 \\ &= 11\end{aligned}$$

$$\text{Db Perlakuan} = (t) - 1 = (4) - 1 = 3$$

$$\text{Db Acak} = \text{db Total} - \text{db Perlakuan} = 11 - 3 = 8$$

$$\text{Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} = \frac{JK \text{ Perlakuan}}{db \text{ Perlakuan}} = \frac{7,98}{3} = 2,6$$

$$\text{KT Acak} = \frac{JK \text{ Acak}}{db \text{ Acak}} = \frac{0,69}{8} = 0,08$$

$$\text{F Hitung} = \frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}} = \frac{2,6}{0,08} = 30,70$$

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

- Uji BNT Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Insang Ikan Patin (*Pangasius sp.*).

Perlakuan	Rerata	C	B	A	K	Notasi
		1,13	2,73	3,00	3,20	
C	1,13	-	-	-	-	a
B	2,73	1,6**	-	-	-	b
A	3,00	1,87**	0,26 <sup>ns</sup>	-	-	c
K	3,20	2,06**	0,47 <sup>ns</sup>	0,2 <sup>ns</sup>	-	cd

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
(\*) = berbeda nyata  
(\*\*) = berbeda sangat nyata

$$\text{SED} = \sqrt{2 \text{ KT acak}/r} = 0,24$$

$$\text{BNT 5\%} = t \text{ tabel 5\%} \times \text{SED} = 0,45$$

$$\text{BNT 1\%} = t \text{ tabel 1\%} \times \text{SED} = 0,70$$

**Lampiran 5. (Lanjutan)**

- Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)		
		Linier	Kuadratik	Kubik
K (0%)	9.60	-3	1	-1
A (2%)	9.00	-1	-1	3
B (4%)	8.20	1	-1	-3
C (6%)	3.40	3	1	1
Q= $\sum c_i \cdot T_i$		-19.4	-4.2	-4.4
Hasil Kuadrat		20	4	20
Kr= $(\sum c_i^2) \cdot r$		60	12	60
JK=Q <sup>2</sup> /Kr		6.27	1.47	3.29
JK Regresi Total	= JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik = 6.27 + 1.47 + 3.29 = 7.74			

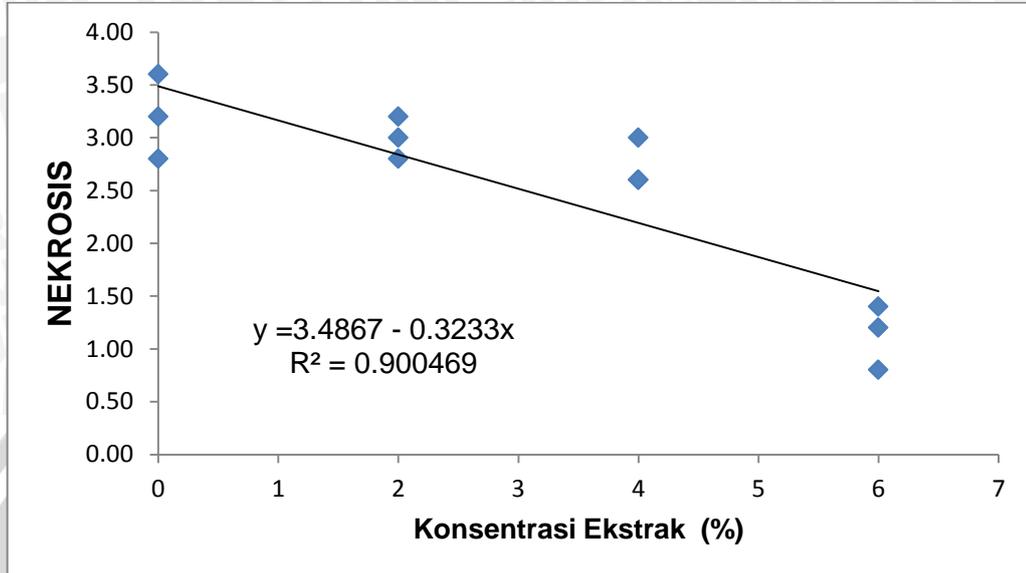
- Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	7.742	-	-	-	-
Linier	1	6.272	4.931	72.376	4.07**	7.59
Kuadratik	1	1.470	1.47	16.96	-	-
Kubik	1	0.000	0.000	0.000	-	-
Acak	8	0.693	0.087	-	-	-
Total	11					

Keterangan : \*\* = berbeda sangat nyata

Lampiran 5. (lanjutan)

- Grafik Hubungan antara Pemberian Immunostimulan Ekstrak (*P. guajava*) dengan Nilai Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis



Lampiran 6. Proses Ekstraksi Daun Jambu Biji (*P.guajava*)

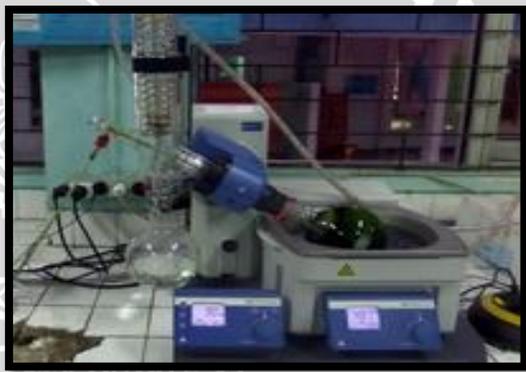


Daun jambu biji di Maserasi selama 48 jam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 6 (daun jambu biji : etanol)

Penyaringan Daun Jambu Biji

Proses Evaporasi

Proses evaporasi dilakukan dengan suhu 50°C dan kecepatan 80 rpm dengan *Vaccum Rotary Evaporator*



Ekstrak Kasar Daun jambu biji

### Lampiran 7. Dokumentasi Kegiatan



Daun Jambu basah



Daun Jambu kering



Serbuk Daun Jambu



Ikan Patin



Pemeliharaan sebelum Perlakuan



Pemeliharaan Ikan



Pengambilan darah Ikan Patin



Apendrof yang berisi darah

Lampiran 7. (Lanjutan)



Pembedahan Insang Ikan



Pengamatan di mikroskop



## Lampiran 8. Data Kualitas Air Penelitian

## a. Oksigen Terlarut (DO)

Hari ke-	Perlakuan																							
	K1		K2		K3		A1		A2		A3		B1		B2		B3		C1		C2		C3	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
1	6,9	7,5	6,4	7,6	7,1	6,5	7	5	5,2	6,2	7,5	7,3	6,2	6,2	6,3	6,4	6,8	6,5	6,1	6,3	6,5	7,2	5,8	6,4
2	6,7	7	7,1	5,7	7,2	6,6	5,4	5,4	7	6,3	4,3	6,6	7,7	5	5,5	6,4	6,5	7,1	6	7,1	7	5,8	5,7	6,3
3	7,2	7,2	7	7	6,8	7	6,5	6,3	7,1	7,5	6,2	6,5	7	6,5	7	6,2	6,8	7,2	6,7	7	6,5	6,7	6,5	6,6
4	7,6	6,6	7,6	5,1	6,7	7	4,3	6,6	6,9	5,3	7,3	7	6,6	7,4	7,8	6,9	7	5,5	5,7	7,2	6,5	6,7	7	6,3
5	7,1	6,5	4,9	4,4	7	6,6	7,4	4,8	4,6	5,5	5,4	5,5	4,8	7	5,8	6	7,2	5,9	7	6,3	6	5,6	7,2	7,4
6	7,2	6,6	7,4	5,1	7,9	7,2	4,5	5	6,7	5,6	7,3	7	5,5	5,4	7,3	7,2	7	6,8	7,8	7,5	6,9	7	7,7	7,5
7	7,6	7,5	7,6	7,6	7,1	7,1	7,5	7,3	7,2	7	7,1	7,3	7	7,4	7,8	7,5	7	7,6	6,9	7,5	7,1	7,6	7,5	7,2
8	7,1	7	4,9	5,7	4,6	6,9	4,3	6,6	6	6,7	5,2	6,2	6,2	7	5,8	6,9	4,9	6,9	5,5	6,9	6	4,3	7,3	7
9	7	6,5	6,4	4	7,2	4,9	7,4	4,8	7,2	6,2	7	6,3	7,7	6,3	7	5,9	7,2	6	7	6,3	7	6,3	7	6,3
10	7,6	6,6	7,1	5,7	7,1	5,1	7	5	7,2	5,4	5,4	4,6	6,6	6,8	7,8	7	5,5	6,9	6,9	6,9	7,3	7	6,5	6,5
11	6,9	6,6	7	5,1	6,2	5,6	7,3	7	7,6	6,9	7,1	6,4	7,7	6,4	7,1	6,2	7,2	6,5	6,7	6,5	7	6,5	7	6,9
12	6,7	7	7,2	5,1	7,2	6,1	5,4	5,5	6,7	7,4	4,8	4,6	4,8	6,2	6,3	7,7	6,4	7	6,6	6,2	5,9	6,4	6,6	7,1
13	7	6,6	7,1	5,1	7,2	4,9	7	5	6,9	5,3	6,4	5,7	6,6	6,2	6,3	6,3	6,3	6,4	6,4	6,4	6	6,3	6,1	6,3
14	6,7	6,5	4,3	4,4	6,2	6,7	5,4	5,4	4,6	5,5	6	6,2	4,8	5	5,5	4,5	5,1	6,4	6,2	5,8	5,6	7,9	6	7,1
15	6,7	6,6	7,2	6,1	7	5,2	5,4	5,5	4,7	5,5	6,2	5,7	6,6	6,8	5,7	6	6,5	6,4	6,5	6,8	5,8	6	5,7	6,7
<b>Total</b>	208,3		182,9		195,9		177		187,9		186,1		191,4		196,1		196,5		198,7		194,4		201,2	
<b>Rata-Rata</b>	6,94333333		6,0966667		6,53		5,9		6,263333333		6,203333333		6,38		6,536666667		6,55		6,62333333		6,48		6,70666667	

## b. pH

Hari ke-	Perlakuan																							
	K1		K2		K3		A1		A2		A3		B1		B2		B3		C1		C2		C3	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
1	7,5	7,4	7,8	6,7	6,6	7,5	6,5	7,7	6,5	6,7	7,5	7,5	7,5	6,9	6,7	6,2	6,3	7,1	6,7	6,4	7,1	6,2	7,8	7,9
2	6,6	6,7	7,3	6,5	6,2	7,8	7,8	7	6,6	7,2	6,5	7,3	7,1	6,7	6,5	6,8	7	7	6,5	6,8	7,2	6,5	7,3	8,1
3	6,2	6,2	6,6	6,3	7,2	7,5	7,2	7,5	6,2	7,4	6,4	6,7	7,2	7,3	6,8	6,9	6,3	6,6	7,3	7,5	6,4	6,7	6,3	6,2
4	7,5	6,8	6,8	7,2	6,2	6,4	7	7,2	7,5	7,2	6,3	6,5	6,6	6,4	6,5	6,8	6,7	6	7,2	7	6,8	6,3	5,8	6,2
5	6,6	6,6	6	6,3	6,2	6,4	6,5	6,4	7	7,1	6,5	6,7	6,5	6,3	6,4	6,5	5,8	6	7,3	7	6,4	6	6,5	6,5
6	7,7	7,6	7,9	7,6	7,9	7,8	7,4	7,6	7	8	7,8	7,5	7,8	7,2	7,7	7,9	7,6	7,7	8	7,9	7,7	7,5	8	7,8
7	6,4	7,4	8,1	6,5	7,2	6,5	6,7	6,4	6,6	7,5	7,4	6,6	7,5	7,2	6,8	7,4	7,6	7,2	7,2	6,4	6,8	6,5	6,4	6,8
8	6,5	7	6,6	7,8	6,8	7,3	6,8	7,3	7,2	7,8	6,5	7,2	7,2	7,8	6,6	7,9	7	7,7	6,7	7,8	7,5	7,7	7	7,9
9	6,5	7,4	6,5	7,3	6,7	7,3	7,2	7,4	6,4	7,8	7,3	7,6	6,6	8	6,4	7,5	7	7,6	6,6	7,2	7,5	7,5	6,9	7,5
10	6,9	7,3	7,6	6,2	6,8	6,4	7,5	7,3	6,8	7,6	7,3	7,6	7,8	7,9	7,7	6,6	6,4	7,5	6,2	6,3	6,9	7,8	7,3	7,1
11	6,2	7,3	6,3	7,2	6,4	7,1	7,2	7,7	6,4	7,6	7,1	7,4	6,7	7	7	6,7	6,4	7,5	6,7	7	7,2	7,5	7,2	7,3
12	6,8	6,8	6,2	6,4	6,9	7,2	7	7,2	6,8	7,4	7	7,5	6,5	7,4	7,1	6,8	6,9	7,7	6,6	6,9	7,2	6,5	7,3	6,8
13	6,2	7,5	6,5	7,2	6,7	7,1	7,2	7,5	6,6	7,5	7,2	7,7	7,7	7,3	8	7,1	7,5	7	7,6	6,8	7,6	6,8	7	7,3
14	6,8	7	6,5	6,4	6,5	6,3	7	7,3	6,6	6,5	6,4	6,8	7	7,2	6,4	7	6,7	7	6,9	6,8	6,1	6,5	6,6	6,5
15	6,2	7,6	6,4	7,4	6,7	7,3	7,1	7,6	6,4	7,1	6,3	7,5	7,1	7,5	6,6	7,9	7,1	7,5	6,3	7,2	6,3	7,6	6,8	7,8
<b>Total</b>	207,2		206,1		206,9		215,2		211		211,6		214,9		209,2		209,4		208,8		208,3		211,9	
<b>Rata-Rata</b>	6,906666667		6,87		6,896666667		7,173333333		7,033333333		7,053333333		7,163333333		6,973333333		6,98		6,96		6,943333333		7,063333333	

## c. Suhu

Hari ke-	Perlakuan																							
	K1		K2		K3		A1		A2		A3		B1		B2		B3		C1		C2		C3	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
1	30	30	30	27	29	28	27	30	31	29	29	30	28	27	29	27	30	28	30	27	29	28	28	30
2	29	27	28	28	28	27	28	28	30	27	28	29	30	29	29	30	29	29	28	28	28	27	30	29
3	29	31	27	29	28	29	27	28	27	28	29	30	30	31	28	30	30	31	29	31	27	29	26	28
4	28	27	30	30	27	29	26	29	28	28	30	31	31	31	28	29	29	30	27	28	29	28	26	25
5	28	29	28	30	27	29	28	28	27	29	28	30	29	29	29	30	29	29	29	29	29	29	30	29
6	29	27	30	29	29	28	30	30	28	27	30	29	28	28	27	30	28	30	27	28	29	27	29	27
7	29	28	28	30	29	29	29	28	28	29	27	28	27	30	29	28	29	28	29	29	30	27	29	30
8	29	30	28	31	30	28	30	27	31	31	28	32	29	30	30	32	28	29	29	31	31	27	29	31
9	28	27	28	30	29	29	28	28	27	31	29	28	30	29	28	30	28	28	27	30	28	30	28	29
10	27	28	30	30	29	28	28	30	27	27	28	31	27	30	28	28	29	28	27	28	30	28	29	30
11	28	27	28	30	28	29	28	29	27	30	31	28	29	31	30	28	29	29	29	28	30	30	30	29
12	31	31	28	30	27	30	28	28	28	27	28	28	28	29	28	30	28	29	28	31	29	27	29	30
13	29	28	28	30	30	29	29	28	26	28	27	29	27	30	27	29	27	28	26	27	27	28	28	27
14	27	27	30	29	27	28	28	27	27	28	29	29	30	29	28	30	27	28	27	28	29	29	30	29
15	29	28	28	29	29	29	29	29	28	28	28	28	29	28	28	28	27	28	28	28	28	28	29	29
<b>Total</b>	855		871		855		850		847		869		873		865		859		851		855		862	
<b>Rata-Rata</b>	28,5		29,03333333		28,5		28,33333333		28,23333333		28,96666667		29,1		28,83333333		28,63333333		28,36666667		28,5		28,73333333	