

**PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN
HISTOPATOLOGI IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG
DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

TESIS

Oleh :
FAIZAL ZAKARIA
NIM. 156080100111006



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

**PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN
HISTOPATOLOGI IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG
DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

TESIS

Disusun Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Perikanan

Oleh :
FAIZAL ZAKARIA
NIM. 156080100111006



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019



TESIS

PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN
HISTOPATOLOGI IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG
DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

OLEH :
FAIZAL ZAKARIA
NIM. 156080100111006

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal : 1 Juli 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui :

Komisi Pembimbing,

Ketua

Dr. Ir. M. Fadjar, MSc.
NIP. 19621014 198701 1 001

19 JUL 2019

Anggota

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., MSi.
NIP. 19730404 200212 2 001

19 JUL 2019

Mengetahui :

Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

19 JUL 2019

Ketua
Program Magister

Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi.
NIP. 19660825 199203 1 001

19 JUL 2019

JUDUL TESIS

**PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN
HISTOPATOLOGI IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG
DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

Nama Mahasiswa : Faizal Zakaria

NIM : 156080100111006

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat Ilmu Studi : Penyakit dan Kesehatan Ikan

Komisi Pembimbing

Ketua : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, MSc.

Anggota : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., MSi.

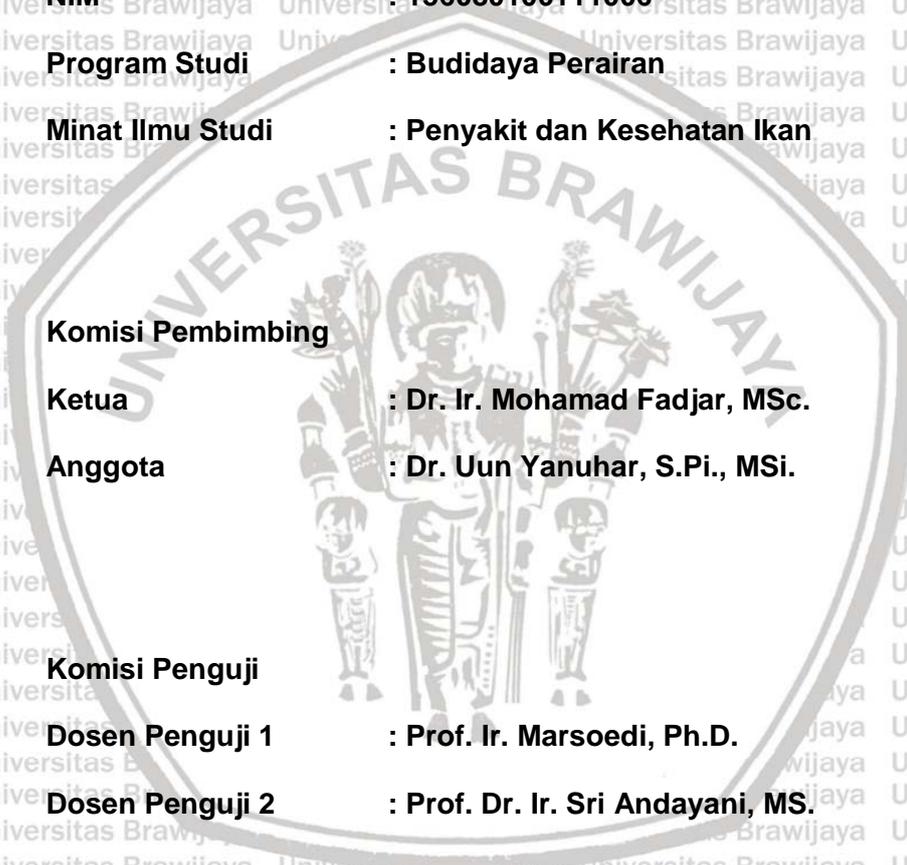
Komisi Penguji

Dosen Penguji 1 : Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D.

Dosen Penguji 2 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.

Tanggal Ujian : 1 Juli 2019

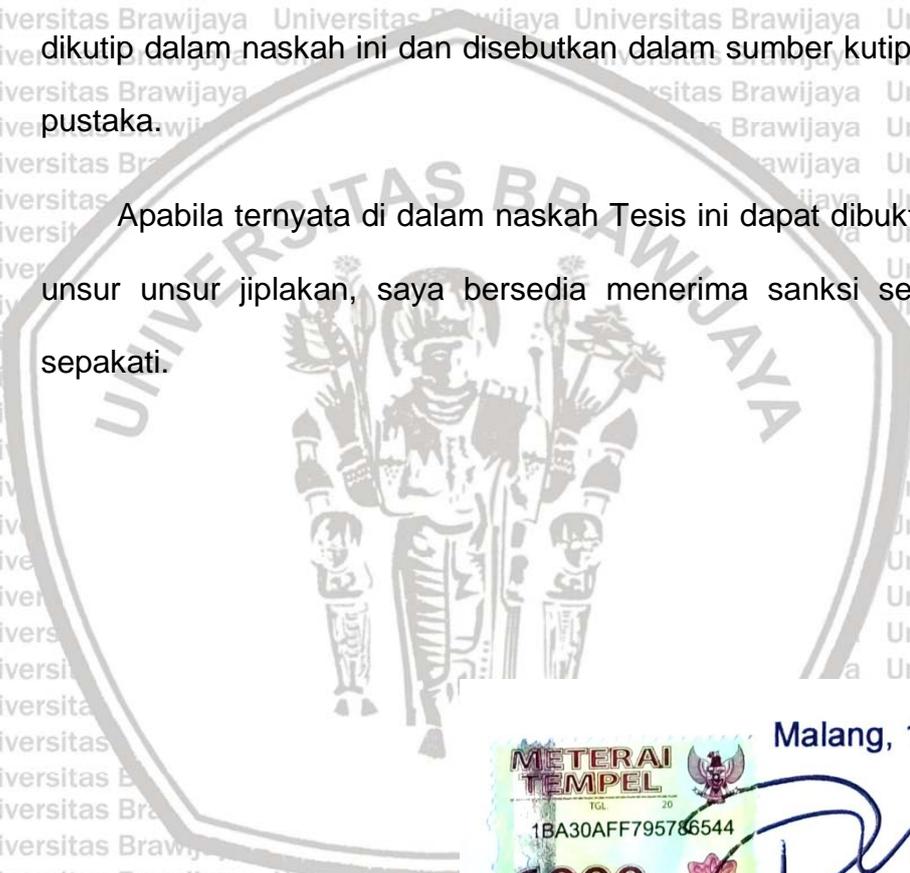
SK Penguji



PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur unsur jiplakan, saya bersedia menerima sanksi sesuai yang di sepakati.



Malang, 17 Juli 2019



[Handwritten Signature]
Penulis



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Faizal Zakaria (penulis) lahir di Gorontalo pada tanggal 4 Juni 1988. Anak kedua dari tiga bersaudara dari pasangan Rany Zakaria, S.Pd dan Serfin Ismail, S.Pd. Penulis pertama kali menempuh pendidikan di TK Mawar Gorontalo, kemudian melanjutkan ke Sekolah Dasar Negeri Padengo selama 6 tahun dan lulus pada tahun 2000.

Kemudian penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah menengah pertama, yaitu SMPN 1 Kabila selama 3 tahun dan lulus pada tahun 2003. Setelah lulus dari SMP, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah menengah atas, yaitu di Madrasah Aliyah Negeri (MAN) Insan Cendekia Gorontalo selama 3 tahun dan lulus pada tahun 2006.

Penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan ke Perguruan Tinggi.

Penulis melanjutkan ke Sekolah Tinggi Ilmu Perikanan (STIP) Malang dan lulus pada tahun 2015 dan memperoleh gelar Sarjana Perikanan. Setelah lulus dari STIP, penulis melanjutkan pendidikan S2 di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Malang, 17 Juli 2019

Faizal Zakaria
NIM. 156080100111006

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul

“PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI**IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila*”.**

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan ini. Penulis berharap semoga Tesis ini dapat bermanfaat, memberikan informasi, dan menambah wawasan serta meningkatkan IPTEK.

Malang, Juli 2019

Penulis



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Allah SWT atas berkah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tesis ini. Penulis menyadari bahwa penyusunan laporan tesis ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenankan penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

✚ Kedua orang tua, yang telah memberikan do'a, motivasi, dan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

✚ Dr. Ir. Mohamad Fajar, MSc dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., MSi sebagai dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan, nasehat yang memotivasi penulis selama menempuh tugas akhir.

✚ Prof. Ir. Marsoedi, P.hD dan Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS sebagai dosen penguji ujian komprehensif tesis yang telah memberikan kritik dan saran kepada penulis.

✚ Team YOIBCT, Febi Nadhilla Nurin, S.Pi., MP., Galih Ardi Nugroho, S.Pi., MP., Andhang Sebastian, S.Pi., MP., Ayu Azkiyah Azizah, S.Pi., MP., Lik Anatus Sholikhah, S.Pi., MP., M. E. S. Danny, S.Pi., MP., Achmad Mufti, S.Pi., Indra Suryawinata, S.Pi.

✚ Teman – teman Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Malang, 17 Juli 2019

Penulis

RINGKASAN

FAIZAL ZAKARIA. "PENGARUH EKSTRAK TINTA SOTONG (*Sepia sp.*) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI IKAN NILA MERAH (*Oreochromis niloticus*) YANG DITANTANG BAKTERI *Aeromonas hydrophila*". DIBIMBING OLEH DR. IR. MOHAMAD FADJAR, MSc. DAN DR. UUN YANUHAR, S.Pi., M. Si

Ikan nila merah (*O. niloticus*) merupakan salah satu komoditas budidaya perikanan yang banyak dikonsumsi, karena dagingnya enak juga merupakan sumber protein hewani, serta harganya terjangkau oleh masyarakat. Sistem budidaya secara intensif, melibatkan pemberian input yang telah melebihi daya dukung lingkungan. Dampak dari aktivitas ini menyebabkan gangguan pada keseimbangan dinamika alami populasi mikroorganisme dan perubahan lingkungan dalam pemeliharaan ikan, sehingga organisme patogen seperti parasit, bakteri dan virus dapat berkembang dengan cepat yang dapat menyebabkan timbulnya penyakit pada ikan. Salah satu jenis penyakit ikan yang merupakan masalah serius dalam budidaya ikan nila merah dapat disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Beberapa hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tinta yang dihasilkan sotong mengandung senyawa *Oleic Acid* (asam oleat) yang merupakan asam lemak tak jenuh, yang dapat berfungsi sebagai sumber antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk (1) Mendapatkan dosis ekstrak tinta sotong terbaik untuk meningkatkan system imun ikan nila merah (*O. niloticus*) yang ditantang bakteri *A. hydrophila*; (2) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) sebelum dan setelah ditantang bakteri *A. hydrophila* melalui pengamatan profil darah putih (leukosit), diferensial Leukosit, aktivitas fagositosis makrofag; (3) Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) sebelum dan setelah ditantang bakteri *A. hydrophila* melalui pengamatan gambaran histopatologi insang ikan nila merah (*O. niloticus*). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2018 sampai Januari 2019. Metode dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan tiga tahapan. Berdasarkan hasil penelitian tingkat kelangsungan hidup (Survival rate) didapat perlakuan dosis 250 ppm merupakan konsentrasi terbaik dengan tingkat kelangsungan hidup 70%. Pemberian ekstrak tinta sotong sebelum diinfeksi akan meningkatkan kadar leukosit kemudian menurun setelah 48. Setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*, penurunan kadar leukosit lebih cepat dibandingkan dengan control negatif setelah 96 jam. Persentase diferensial leukosit pada perlakuan pemberian dosis ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) 250, 300 dan 350 ppm menunjukkan peningkatan persentase limfosit untuk setiap perlakuan. Indeks fagositosis meningkat seiring meningkatnya dosis perlakuan. Pemberian ekstrak tinta sotong mampu menurunkan beberapa kerusakan histopatologi yang disebabkan infeksi bakteri. Jenis kerusakan yang terjadi terdiri dari 3 jenis yaitu hiperplasia, hemoragi dan edema. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) untuk menentukan dosis maksimal yang aman serta menentukan metode yang efektif dan efisien dalam pemberian ekstrak tinta sotong pada ikan nila merah (*O. niloticus*).

SUMMARY

FAIZAL ZAKARIA. "THE EFFECT OF CUTTLFISH INK EXTRACTS (*Sepia* sp.) AS IMMUNOSTIMULANTS ON THE HEMATOLOGY AND HISTOPATOLOGY PROFILE OF RED TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) WHICH IS ASSOCIATED BY *Aeromonas hydrophila*". THE PROMOTORS ARE DR. IR . MOHAMAD FADJAR, MSc. AND DR. UUN YANUHAR, S.Pi., M. Si

Red tilapia (*O. niloticus*) is one of the many aquaculture commodities consumed, because the meat is good is also a source of animal protein, and the price is affordable by the community. Intensive cultivation systems, involving the provision of inputs that have exceeded the carrying capacity of the environment. The impact of this activity causes disruption to the balance of the natural dynamics of microorganism populations and environmental changes in fish maintenance, so that pathogenic organisms such as parasites, bacteria and viruses can develop rapidly which can cause fish disease. One type of fish disease which is a serious problem in the cultivation of red tilapia can be caused by *A. hydrophila*. Some previous research showed that the resulting cuttlefish ink containing the compound Oleic acid (oleic acid) which is an unsaturated fatty acid, which can serve as a source of antimicrobial. This study aims to (1) obtain the best dose of cuttlefish ink extract to enhance the immune system of red tilapia (*O. niloticus*) which is challenged by *A. hydrophila* bacteria; (2) Analyzing the effect of giving cuttlefish extract to red tilapia (*O. niloticus*) before and after being challenged by *A. hydrophila* through observation of white blood profile (leukocytes), differential leukocytes, phagocytic macrophage activity; (3) Analyzing the effect of giving cuttlefish extract to red tilapia (*O. niloticus*) before and after being challenged by *A. hydrophila* through observing histopathology of gill red tilapia (*O. niloticus*). This research was conducted in May 2018 until January 2019. The method in this study used an experimental method with three stages. Based on the results of research on the survival rate obtained treatment dose of 250 ppm is the best concentration with a survival rate of 70%. Provision of cuttlefish extract before infection will increase leukocyte levels and then decrease after 48. After being infected with *A. hydrophila*, a decrease in leukocyte levels is faster than negative control after 96 hours. The percentage of differential leukocytes in the treatment of doses of cuttlefish extract (*Sepia* sp.) 250, 300 and 350 ppm showed an increase in the percentage of lymphocytes for each treatment. The phagocytic index increases with increasing treatment dose. Giving extract of cuttlefish ink can reduce some histopathological damage caused by bacterial infections. The type of damage that occurs consists of 3 types, namely hyperplasia, hemorrhage and edema. Further research is needed on the toxicity test of cuttlefish ink extract on red tilapia (*O. niloticus*) to determine the maximum safe dosage and determine an effective and efficient method in administering cuttlefish ink extract to red tilapia (*O. niloticus*).

DAFTAR ISI

RINGKASAN	ix
SUMMARY	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Sotong (<i>Sepia sp.</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	6
2.1.2 Penyebaran.....	8
2.1.3 Tinta Sotong.....	9
2.2 Biologi <i>A. hydrophila</i>	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	10
2.2.2 Gejala Klinis Serangan <i>A. hydrophila</i>	12
2.3 Ikan Nila merah (<i>O. niloticus</i>).....	12
2.4 Imunologi Ikan.....	15
2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik pada Ikan.....	15
2.4.2 Sistem Imun Spesifik pada Ikan.....	16
2.5 Hematologi Ikan.....	18
2.5.1 Leukosit.....	19
2.5.2 Diferensial Leukosit.....	20
2.5.3 Haemoglobin.....	22
2.6 Pemanfaatan <i>Chepalopoda</i> dalam bidang kesehatan.....	22
3. KERANGKA PENELITIAN	25
3.1 Kerangka Konseptual.....	25
3.2 Kerangka Konsep.....	26
3.3 Kerangka Operasional.....	27
3.4 Kebaharuan Penelitian.....	28
3.5 Strategi Publikasi.....	29
3.6 Hipotesis.....	30
4. METODE PENELITIAN	31
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	31
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	31
4.2.1 Alat Penelitian.....	31
4.2.2 Bahan Penelitian.....	31
4.4 Variabel Penelitian.....	32

4.5 Metode Penelitian.....	33
4.5.1 Tahap I.....	33
4.5.2 Tahap II.....	36
4.5.3 Tahap III.....	37
4.6. Rancangan Penelitian.....	37
4.7 Parameter Uji.....	38
4.7.1 Survival Rate.....	38
4.7.2 Total Leukosit.....	38
4.7.3 Diferensial Leukosit.....	39
4.7.4 Histopatologi.....	39
4.7.5 Aktivitas Fagositosis.....	41
4.8 Analisa Data.....	42
5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1 Rendemen Ekstrak Tinta Sotong (<i>Sepia sp.</i>).....	43
5.2 Hasil Analisis FTIR Ekstrak Tinta Sotong.....	44
5.3 Uji <i>Minimum Inhibiting Concentration</i> (MIC).....	45
5.3 Uji LD50 Bakteri <i>A. hydrophila</i>	47
5.4 Perlakuan Inti Penelitian.....	48
5.4.1 <i>Survival Rate</i>	48
5.4.2 Leukosit.....	50
5.4.3 Diferensial Leukosit.....	53
5.5 Histopatologi.....	57
5.6 Indeks Fagositosis.....	61
5.7 Parameter Penunjang.....	63
5.7.1 Pengamatan Kualitas Air.....	63
6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
6.1. Kesimpulan.....	65
6.2. Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	75



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Sotong *Sepia sp.* 6

Gambar 2. Foto mikroskopis *A. hydrophila* (Perbesaran 1000x) 11

Gambar 3. Nila merah (*O. niloticus*) 13

Gambar 4. Skema Sistem Imun 18

Gambar 5. Penampang limfosit diamati di bawah mikroskop perbesaran 10x10 kali, dengan ukuran diameter sel 8.2 μm 20

Gambar 6. Penampang Monosit Diamati Dibawah Mikroskop Perbesaran 10x10 kali, dengan ukuran diameter sel 10 μm 21

Gambar 7. Penampang neutrofil diamati di bawah mikroskop pembesaran 10x10 kali 22

Gambar 8. Kerangka konsep penelitian 26

Gambar 9. Kerangka operasional penelitian 29

Gambar 10. Denah Percobaan 38

Gambar 11. Hasil snalisis spektrokopi FT-IR serbuk tinta sotong 44

Gambar 12. Analisa Diferensial leukosit. (1) Neutrofil, (2) Limfosit, dan (3) Monosit 53

Gambar 13. Hasil pengamatan (%) limfosit Ikan Nila merah (*O. niloticus*) selama Penelitian 54

Gambar 14. Hasil Pengamatan (%) Monosit Ikan Nila merah (*O. niloticus*) Selama Penelitian 55

Gambar 15. Hasil pengamatan (%) neutrofil ikan nila merah selama penelitian 56

Gambar 16. Beberapa kerusakan yang terjadi pada insang ikan nila merah selama penelitian (Perbesaran 40x) 56

Gambar 17. Gambar K+, K-, A, B, dan C perubahan gambaran jaringan histopatologi insang ikan nila merah pada perlakuan K+ (Kontrol Positif), K- (Kontrol Negatif), A (Perlakuan ekstrak 250 ppm), dan B (Perlakuan ekstrak 300 ppm) dan C (Perlakuan ekstrak 350 ppm) (Perbesaran 40x) 59

Gambar 18. Indeks Fagositosis Ikan Nila merah Selama Penelitian 62



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jurnal Terkait Penelitian Ekstrak Tinta Sotong (*Sepia sp.*)..... 28

Tabel 2. Strategi Publikasi..... 29

Tabel 3. Skoring kerusakan jaringan..... 41

Tabel 4. Rata rata persentase rendemen ekstrak tinta sotong..... 43

Tabel 5. Bilangan gelombang dan gugus fungsi..... 45

Tabel 6. Hasil Uji MIC Ekstrak Tinta Sotong (*Sepia sp.*) terhadap bakteri *A. hydrophila*..... 46

Tabel 7. Mortalitas ikan selama pengujian LD 50 bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) 47

Tabel 8. Persentase tingkat kelangsungan hidup ikan nila merah setelah perlakuan pemberian bakteri *A. hydrophila* selama penelitian..... 49

Tabel 9. Nila merahi leukosit ikan nila merah selama penelitian..... 50

Tabel 10. Presentase tingkat kerusakan pada jaringan insang ikan nila merah selama peneltian. 59

Tabel 11. Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Nila merah Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri *A. hydrophila*..... 63



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu komoditas budidaya perikanan yang banyak dikonsumsi, karena dagingnya enak juga merupakan sumber protein hewani, serta harganya terjangkau oleh masyarakat. Selain itu, ikan nila merah disukai oleh konsumen karena memiliki tekstur daging yang mirip dengan tekstur daging ikan kakap (Amri dan Khairuman 2008). Pada tahun 2008 permintaan pasar dalam negeri terhadap ikan nila merah sebesar 293.806,83 ton dan pada tahun 2009 mengalami peningkatan menjadi 325.042,44 ton. Namun yang sudah terpenuhi hanya sekitar 68.259 ton atau sekitar 21% dari total permintaan (Tanjung, 2010).

Ikan nila merah (*O. niloticus*) telah lama pula dikembangkan sebagai komoditi ekspor baik dalam bentuk ikan utuh maupun dalam bentuk fillet. Permintaan ikan nila merah ini juga terus meningkat di pasar internasional terutama pasar Amerika dan Uni Eropa. Ekspor fillet nila merah dari Indonesia hingga saat ini hanya mampu memenuhi tidak lebih dari 0,1% dari permintaan pasar dunia (Caroko *et al.*, 2008). Untuk meningkatkan produksi nila merah di dalam dan luar negeri sehingga mampu menghasilkan jumlah yang memenuhi permintaan pasar lokal dan dunia diperlukan ketersediaan benih yang mencukupi.

Kondisi ini mendorong peningkatan jumlah pemeliharaan benih ikan nila merah, namun data kerugian secara ekonomi akibat penyakit pada ikan nila merah masih sangat terbatas, hanya dijelaskan bahwa penyakit pada ikan dapat menyebabkan kematian hingga 100% pada budidaya ikan. Penyakit pada ikan dapat terjadi karena adanya penurunan kualitas air yang menyebabkan keadaan kesehatan ikan memburuk. Kondisi seperti ini akibat diterapkannya sistem budidaya secara intensif, yang melibatkan pemberian input yang telah melebihi

daya dukung lingkungan. Dampak dari aktivitas ini menyebabkan gangguan pada keseimbangan dinamika alami populasi mikroorganisme dan perubahan lingkungan dalam pemeliharaan ikan, sehingga organisme patogen seperti parasit, bakteri dan virus dapat berkembang dengan cepat yang dapat menyebabkan timbulnya penyakit pada ikan.

Penyakit meliputi penyakit infeksi dan bukan infeksi. Penyakit infeksi merupakan masalah serius, meliputi penyakit-penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri, fungi, dan parasit (Irianto,2005). Salah satu jenis penyakit ikan yang merupakan masalah serius dalam budidaya ikan nila merah dapat disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Gejala klinis ikan nila merah yang terserang penyakit *Motile A. Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* ditandai dengan pendarahan, pembusukan pada bagian sirip, hemoragik pada insang dan pembengkakan pada organ internal (ginjal) (Tantu *et al.*,2013). Sehingga dapat menurunkan tingkat pertumbuhan serta derajat kelangsungan hidup ikan. Oleh karena itu, perlu ditingkatkan upaya pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada kegiatan budidaya ikan nila merah.

Upaya pengobatan terhadap penyakit oleh infeksi bakteri seringkali dilakukan dengan pemberian antibiotik. Antibiotik mengandung bahan kimia yang dapat menyebabkan resistensi terhadap lingkungan maupun organismenya sendiri, selain itu antibiotik ini juga memiliki harga yang cukup mahal. Umumnya pembudidaya sering melakukan pemberian berbagai macam antibiotik seperti oxytetracycline, cananycine, ampicillin, chloramphenicol, tetracycline dan disinfektan pada ikan. Selain itu penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten dan terjadi penimbunan residu obat-obatan di dalam tubuh ikan dan lingkungan perairan, akhirnya dapat membahayakan konsumen yang mengkonsumsinya (Abasali dan Mohamad,

2010; Wang *et al.*, 2011; Lukistyowati, 2011; Dangeubun *et al.*, 2013; Lengka, 2013).

Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan cara meningkatkan sistem kekebalan tubuh non spesifik pada ikan, melalui pemberian imunostimulan. Imunostimulan dapat meningkatkan resistensi terhadap penyakit menular dengan meningkatkan mekanisme kerja sistem imun non spesifik (sistem imun bawaan).

Komponen utama dari sistem imun bawaan pada ikan adalah makrofag, monosit, granulosit, lisozim, sel darah terutama leukosit. Imunostimulan bereaksi dengan cara meningkatkan aktivitas sel leukosit pada sistem pertahanan tubuh, terutama pada pertahanan tubuh terhadap bakteri patogen (Dotta *et al.*, 2014).

Seiring berjalannya waktu, semakin banyak penelitian terhadap cara dan bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai sumber imunostimulan, antara lain dengan memanfaatkan organisme laut salah satunya adalah Sotong (*Sepia sp.*). *Sepia*, biasa disebut sotong, yang tintanya terdiri dari granula melanin. Pigmen melanin diproduksi di sel-sel kelenjar tinta yang sangat khusus terletak di bagian bawah kantung tinta dan berperan untuk memproduksi tinta secara terus-menerus (Jerep dan Roper, 2005). Tinta sotong dalam dunia medis secara luas diaplikasikan untuk pengobatan homeopati dan untuk mengobati ketidakseimbangan hormon terutama pada wanita. Boiron *Sepia 3X* adalah seri Obat Tunggal Boiron dan paling umum digunakan sebagai obat homeopati untuk perubahan suasana hati (Boiron, 2014). Ini juga digunakan untuk mengobati batu ginjal, gonore dan juga bertindak sebagai anti-oksidan, anti-radiasi, antiretroviral, agen antibakteri dan antikanker (Suji, 2009). Tinta dari *S.inermis* juga telah diuji pengaruhnya dalam melawan Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLVRT), dan menunjukkan penghambatan yang kuat dari MMLVRT (Benjakul dan Vate, 2013).

Komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar badan dan ekstrak kasar tinta sotong adalah alkaloid, steroid, karbohidrat, peptida, dan asam amino.

Komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar cangkang sotong yaitu alkaloid, steroid, karbohidrat, dan asam amino (Nurzakiah, 2011). Ekstrak tinta mentah yang diperoleh dari berbagai jenis *Cephalopoda* telah dipelajari sebagai antimikroba terhadap bakteri biofilm, *Staphylococcus aureus*. Tinta sotong juga dipelajari sebagai bioaktif, mengandung berbagai protein, memiliki sifat *cytolytic*, dan fraksi antitumor (Girija, 2012). Namun eksplorasi terhadap manfaat tinta sotong sebagai sumber antimikroba masih dalam lingkup terbatas, sehingga perlu dilakukan uji tinta sotong pada beberapa objek penelitian, salah satunya adalah ikan nila merah (*O. niloticus*).

1.2 Rumusan Masalah

Dalam kegiatan budidaya tentu saja terdapat kendala, salah satunya adalah timbulnya penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* yang menyebabkan ikan sakit hingga mengalami kematian. Oleh karena itu perlu dilakukan pencegahan yang ramah lingkungan dan tidak memberikan dampak negatif pada ikan yaitu dengan penggunaan imunostimulan, Bakteri *A. hydrophila* biasanya menyerang ikan nila merah pada ukuran 10 cm. Maka dari itu dalam penelitian akan dilihat bagaimana tinta sotong (*Sepia sp.*) bermanfaat sebagai anti bakteri *A. hydrophila* melalui rumusan masalah sebagai berikut :

- Berapa dosis ekstrak tinta sotong terbaik sebagai imunostimulan terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) yang ditantang bakteri *A. hydrophila*?
- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) yang ditantang bakteri *A. hydrophila* terhadap profil darah putih

(leukosit), Diferensial Leukosit dan aktivitas fagositosis makrofag sebagai parameter respon imun nonspesifik?

- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap gambaran histopatologi insang ikan nila merah (*O. niloticus*) yang ditantang bakteri *A. hydrophila*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

- Mendapatkan dosis ekstrak tinta sotong terbaik untuk meningkatkan system imun ikan nila merah (*O. niloticus*) yang ditantang bakteri *A. hydrophila*.
- Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) sebelum dan setelah ditantang bakteri *A. hydrophila* melalui pengamatan profil darah putih (leukosit), diferensial Leukosit, aktivitas fagositosis makrofag.
- Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) sebelum dan setelah ditantang bakteri *A. hydrophila* melalui pengamatan gambaran histopatologi insang ikan nila merah (*O. niloticus*).

1.4 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi awal mengenai manfaat tinta sotong sebagai bahan alternatif imunostimulan pada ikan nila merah (*O. niloticus*) dalam kegiatan budidaya sehingga mampu mengatasi penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri khususnya bakteri *A. hydrophila*.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sotong (*Sepia sp.*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Mentari (2012), melakukan klasifikasi *Sepia sp.* sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Mollusca

Kelas : Cephalopoda

Ordo : Sepiida

Famili : Sepiidae

Genus : *Sepia*

Spesies : *Sepia sp.*



Gambar 1. Sotong *Sepia sp.* (Google image, 2019).

Bentuk sotong seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1. merupakan binatang lunak dengan tubuh berbentuk silindris dan bagian belakang meruncing dengan sirip-siripnya berbentuk trianguler atau bundar yang menjadi satu pada ujungnya. Sotong (cuttlefish) sering kali di salah artikan sebagai cumi-cumi (*Ioligo*).

Sotong memiliki tubuh yang lebih pipih, sementara cumi-cumi lebih berbentuk silinder. Sotong memiliki badan berbentuk bulat telur agak pendek dengan sirip daging melingkari seluruh badan dan bagian belakang tubuh bundar. Punggung sotong keras karena di dalam dagingnya terdapat kerangka dari kapur yang berbentuk lonjong dan berwarna putih. Sekitar mulut terdapat delapan tangan pendek dan dua tangan panjang (tentakel). Tangan yang pendek dilingkari dengan alat penghisap sepanjang tangan, sedangkan tangan yang panjang (tentakel) hanya terdapat pada ujungnya. Warna sotong bervariasi tetapi umumnya coklat atau kuning kecokelatan tergantung dari warna dasar perairan, pada bagian punggungnya terdapat garis bengkok-bengkok. Ukuran panjang sotong dapat mencapai 30-35 cm, tetapi biasanya 20-25 cm (KKP, 2005).

Sotong termasuk cephalopoda lainnya, pada dasarnya ialah hewan pelagis yang berenang dengan gaya dorong (*jet propulsion*). Tenaga dorong tersebut berasal dari air yang disemburkan dari rongga mantel yang keluar melalui sifon. Sotong dengan tubuhnya yang pendek dan agak pipih berenang lebih lambat dibandingkan dengan cumi-cumi yang tubuhnya lebih langsing. Dalam kondisi bahaya, sotong akan mengeluarkan cairan tinta berwarna coklat sampai hitam dengan kandungan pigmen melanin yang lebih tinggi. Tinta yang dikeluarkan akan menyebabkan air di sekitarnya akan menjadi gelap dan membingungkan predator sehingga sotong dapat kabur (Karleskinr *et al.*,2010).

Sotong juga mempunyai kemampuan berubah warna seperti bunglon, sehingga tersamar dengan pola warna latar belakangnya seperti pasir atau batu, kebanyakan spesies berubah warna apabila ketakutan. Perubahan warna tersebut terjadi disebabkan karena pada bagian kulit terdapat pigmen yang disebut kromatofor (Boal *et al.*,2000). Kebanyakan cephalopoda memiliki sistem peredaran darah tertutup, dimana darahnya mengandung hemocyanin. Aliran air dalam rongga mantel selain untuk tenaga gerak, juga menyediakan oksigen untuk

pernapasan. Sotong umumnya dioseus, dimana gonad terletak diujung posterior dan selalu terjadi perkawinan (Suwignyo *et al.*,2002). Sotong merupakan hewan karnivora yang biasanya memangsa ikan-ikan kecil, udang dan kepiting. Sotong mempunyai penglihatan yang tajam untuk mencari mangsa dan menggunakan tangan atau tentakelnya untuk menangkap mangsa tersebut (Boal *et al.*,2000). Alat ekskresi pada cephalopoda adalah nephridia, yang terletak pada rongga, pada beberapa pasang ganglia. Sotong bernilai merahi ekonomis tinggi dan banyak dikonsumsi oleh penduduk Asia, terutama Jepang, Korea, Filipina, Malaysia, Taiwan (Suwignyo *et al.*,2002).

2.1.2 Penyebaran

Sotong hidup di teluk dan laut terbuka namun terdapat pula di laut dalam. Sotong termasuk kedalam hewan demersal dan suka hidup menyendiri (soliter), serta lebih menyukai berada di sekitar karang. Pada malam hari, sotong bermigrasi ke perairan dangkal untuk mencari makan berupa ikan-ikan kecil dan pada umumnya nelayan menangkap sotong pada malam hari dengan menggunakan lampu *petromax*, adanya cahaya lampu membuat sotong mudah ditangkap mengingat sotong memiliki sifat fototaksis aktif (suka mendekati cahaya). Kemampuan berenang sotong merupakan yang paling menonjol karena adanya sirip lateral yang panjang dan lentur, dengan kemampuannya menghasilkan semburan air dan rongga mantel melalui sifon, dan umumnya merupakan pemangsa (predator) (Kordi dan Ghurfran, 2010).

Sama dengan cumi – cumi, sotong hidup pada perairan dengan suhu antara 8 sampai 32°C dan salinitas 8,5 sampai 30 ppt. Terjadinya kelimpahan cumi - cumi ditunjang oleh adanya zat hara yang terbawa arus (turn off) dari daratan. Zat hara tersebut dimanfaatkan oleh fitoplankton yang selanjutnya dimanfaatkan oleh

zooplankton, juvenil ikan ataupun ikan - ikan kecil yang merupakan makanan cumi - cumi. (Roper *et al.*,1984).

2.1.3 Tinta Sotong

Sotong termasuk cephalopoda lainnya, pada dasarnya ialah hewan pelagis yang berenang dengan gaya dorong (*jet propulsion*). Tenaga dorong tersebut berasal dari air yang disemburkan dari rongga mantel yang keluar melalui sifon.

Sotong dengan tubuhnya yang pendek dan agak pipih berenang lebih lambat dibandingkan dengan cumi-cumi yang tubuhnya lebih langsing. Dalam kondisi bahaya, sotong akan mengeluarkan cairan tinta berwarna cokelat sampai hitam dengan kandungan pigmen melanin yang lebih tinggi. Tinta yang dikeluarkan akan menyebabkan air di sekitarnya akan menjadi gelap dan membingungkan predator sehingga sotong dapat kabur (Karleskinr *et al.*,2010). Sotong merupakan sala satu jenis hewan yang tak bertulang belakang yang sangat digemari oleh masyarakat.

Sama dengan cumi-cumi, sotong merupakan komoditas yang bernilai jual yang tinggi. Ditinjau dari gizi, cumi-cumi memiliki kandungan gizi yang luar biasa karena kandungan proteinnya cukup tinggi, yaitu, 17,9 gr / 100 gr cumi segar. Daging cumi-cumi memiliki kelebihan dibanding dengan hasil laut lain, yaitu tidak ada tulang belakang, mudah dicerna, memilki rasa dan aroma yang khas, serta mengandung semua jenis asam amino essensial yang diperlukan oleh tubuh.

Asam amino essensial yang dominan adalah leusin, lisin dan fenila merahlanin.

Sementara kadar asam amino non essensial yang dominan adalah asam glutamate dan asam aspartat (Anggriawan, 2011).

Cairan tinta *Cephalopoda* cumi maupun sotong bersifat alkaloid, sehingga tidak disukai oleh predator, terutama ikan. Cairan berwarna gelap ini mengandung butir-butir melanin atau pigmen hitam. Melanin alami adalah melanoprotein yang

mengandung 10-15 persen protein. Melanin ini mengikat protein melalui asam amino yang mengandung sulfur, yaitu sistein.

Salah satu cara manfaat dari tinta *Cephalopoda* yaitu sebagai pengendalian penyakit bakterial adalah dengan memanfaatkan sotong yang mudah dijumpai dan jumlahnya melimpah di Indonesia, dengan cara memanfaatkan tinta sotong yang dianggap sebagai limbah. Pada *Cephalopoda* (termasuk sotong) ditemukan komponen bioaktif berupa berbagai amine sederhana dan paralyzing protein. Komponen bioaktif ini dapat dipergunakan untuk pencegahan terhadap bakteri patogenik (Veenila merah *et al.*,2011).

Dengan memanfaatkan tinta sotong sebagai bahan anti vibriosis maka akan dapat memanfaatkan limbah hasil produksi perikanan, menghasilkan bahan anti vibriosis sekaligus meningkatkan hasil perikanan budidaya Ikan Nila merah (*O. niloticus*) di Indonesia.

2.2 Biologi *A. hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *A. hydrophila* berdasarkan ilmu taksonomi sebagai berikut

(Holt *et al.*,1994) :

Filum : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Pseudanonadeles

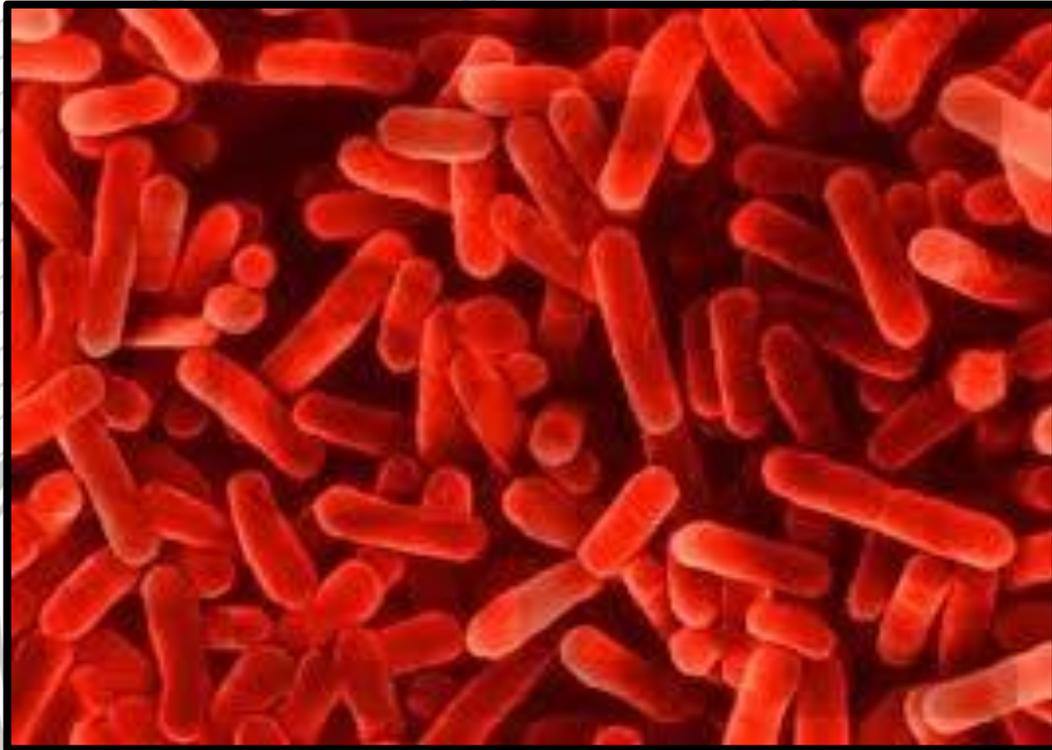
Family : Vibrionaceae

Genus : *Aeromonas*

Spesies: *A. hydrophila*

Awalnya *A. hydrophila* dikenal dengan nama *Bacillus hydrophilus fuscus*, pertama kali diisolasi dari kelenjar pertahanan katak yang mengalami pendarahan septicemia. Kluiver dan Van Niel pada tahun 1936 mengelompokkan genus

Aeromonas Tahun 1984, Popoff memasukan genus *Aeromonas* ke dalam family *Vibrionaceae*. *A. hydrophila* diisolasi dari manusia dan binatang sampai dengan tahun 1950. Bakteri ini memiliki nama sinonim *A. formicans* dan *A. liquefaciens* (Sismeiro *et al.*,1998).



Gambar 2. Foto mikroskopis *A. hydrophila* (Perbesaran 1000x) (Bioinfo, 2016)
A. hydrophila merupakan bakteri yang hidup di air tawar yang mengandung bahan organik tinggi. Ciri utama bakteri ini adalah bentuknya seperti batang, ukurannya 1–4,4 x 0,4–1 mikron, bersifat gram negatif, tidak berspora, bersifat motil (bergerak aktif) karena mempunyai satu flagel yang keluar dari satu kutubnya, hidup di lingkungan bersuhu 15–30 °C dan pH 5,5–9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Bakteri ini dapat bertahan dalam lingkungan aerob maupun anaerob dan dapat mencerna material-material seperti gelatin dan hemoglobin. *A. hydrophila* resisten terhadap chlorine serta suhu yang dingin (Krieg dan Holt, 1984). *A. hydrophila* menginfeksi semua jenis ikan air tawar. Infeksi biasanya berkaitan dengan kondisi stres akibat kepadatan, malnutrisi, infeksi parasit, kualitas air yang buruk dan fluktuasi suhu air yang ekstrim. Serangan bersifat akut.

Jika kualitas lingkungan air terus menurun, kematian yang ditimbulkan bisa mencapai 100% (Bachtiar, 2010). *A. hydrophila* menyebabkan penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) atau penyakit bercak merah. Bakteri ini menyerang berbagai jenis ikan air tawar seperti lele dumbo (*Clarius gariepinus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), gurami (*Osphronemus gouramy*) dan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*). Pengendalian bakteri ini sulit karena memiliki banyak strain dan selalu ada di air serta dapat menjadi resisten terhadap obat-obatan (Kamiso dan Triyanto, 1993).

2.2.2 Gejala Klinis Serangan *A. hydrophila*.

A. hydrophila dikenal juga sebagai bakteri oportunistis karena biasanya menimbulkan masalah pada ikan yang sedang mengalami stres. Penularan bakteri ini berlangsung melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang telah tercemar atau karena pemindahan ikan yang terserang *A. hydrophila* dari satu tempat ke tempat lain. Ikan yang terserang bakteri ini biasanya akan memperlihatkan gejala berupa warna tubuh berubah menjadi agak gelap; Kulit kasar, timbul pendarahan dan selanjutnya menjadi borok; Kemampuan berenang menurun dan sering megap-megap di permukaan air karena insang rusak dan sulit bernafas; dan Sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limpa, serta perut sering terlihat membengkak (Sartika, 2011).

2.3 Ikan Nila merah (*O. niloticus*)

Nila merah (*O. niloticus*) didatangkan ke Indonesia awal tahun 1981 oleh Balai Penelitian Perikanan Air Tawar (Santoso 2000). Ikan ini kemungkinan merupakan hasil persilangan antara *O. mossambicus* atau *O. niloticus* dengan *Oreochromis honorum*, *Oreochromis aureus*, atau *Oreochromis zillii* (Amri dan Khairuman, 2008).

Klasifikasi nila merah oleh Amri dan Khairuman (2008), adalah sebagai

berikut :

Filum : Chordata

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Osteichthyes

Sub Kelas : Acanthopterygi

Ordo : Percomorphi

Sub Ordo : Percoidea

Famili : Cichlidae

Genus : *Oreochromis*

Spesies : *Oreochromis niloticus*



Gambar 3. Nila merah (*O. niloticus*) (Mediatani, 2014)

Secara umum, bentuk nila merah panjang dan ramping, dengan sisik berukuran besar. Matanya besar dan menonjol. Gurat sisi (linea lateralis) terputus di bagian tengah badan kemudian berlanjut. Jumlah sisik pada gurat sisi sebanyak 34 buah. Sirip punggung, sirip perut, dan sirip dubur mempunyai jari jari lunak yang keras dan tajam seperti duri. Selain itu, terlihat adanya pola garis garis vertikal di sirip ekor ada enam buah dan di sirip punggung ada delapan buah. Garis dengan

pola yang sama (garis vertikal) juga terdapat di kedua sisi tubuh nila merah dengan jumlah delapan buah (Amri dan Khairuman, 2008). Nila merah memiliki lima buah sirip, yakni sirip punggung (dorsal fin), sirip dada (pectoral fin), sirip perut (ventral fin), sirip anus (anal fin) dan sirip ekor (caudal fin). Ada empat warna nila merah, yaitu oranye, pink/albino, albino dengan bercak merah dan hitam, serta oranye/albino dengan bercak merah (Iskandar, 2003).

Adaptasi ikan nila merah terhadap perubahan lingkungan sangat tinggi. Ikan ini hidup di perairan tawar, seperti kolam, sawah, sungai, danau, waduk, situ, dan genangan air lainnya. Selain itu ikan nila merah mampu hidup di perairan payau dengan salinitas salinitas 10-20 per mil, dan tumbuh dengan baik pada suhu 25-30 °C, sedangkan pada masa berpijah ikan nila merah membutuhkan suhu sekitar 22-27 °C, dengan nila merahi pH optimun untuk pertumbuhan yaitu sekitar 7-8 (Rukmana, 1997).

Pada kegiatan budidaya ikan nila merah cenderung digemari karena memiliki beberapa keunggulan antara lain pertumbuhan relatif cepat, mudah berkembang biak, dan memiliki toleransi luas terhadap pertumbuhan lingkungan (Santoso, 2000). Ikan nila merah bersifat omnivore yaitu jenis hewan yang memakan tumbuhan juga hewan. Pada stadium larva mempunyai kebiasaan makan diperairan yang dangkal, dimana jenis makanan yang disukai larva ikan nila merah yaitu zooplankton seperti zat-zat renik yang melayang di air, maupun udang-udang kecil. Sedangkan ikan nila merah dewasa pada umumnya mencari makanan di tempat yang lebih dalam, dengan jenis makanan seperti fitoplankton, algae, tumbuhan air, serta organisme renik yang melayang di air (Rukmana, 1997).

Pada habitat alam, ikan nila merah mampu memijah sepanjang tahun, namun paling banyak pemijahan terjadi pada musim hujan. Daur hidup sejak fase telur sampai menjadi induk berlangsung selama 5 - 6 bulan, dimana setiap tahun ikan nila merah mampu berpijah 6 - 7 kali, dan pemijahan biasanya berlangsung

di dasar perairan. Adapun ciri-ciri terjadinya perkawinan pada ikan nila merah salah satunya adalah terbentuk cekungan pada dasar perairan (substrat) sebagai tempat penyimpanan telur atau tempat perkawinan berlangsung (Rukmana, 1997).

2.4 Immunologi Ikan

Sama seperti udang, respon imun pada ikan dibentuk oleh jaringan limfoid yang menjadi satu dengan jaringan mieloid yang biasa disebut sebagai jaringan limfomiroid (Alifuddin, 2002; Purwaningsih, 2013). Sistem kekebalan pada ikan terbagi atas sistem pertahanan non spesifik dan spesifik. Ketika ikan mengalami infeksi mikroba patogen, mekanisme kekebalan non-spesifik akan bekerja untuk menghentikan proses infeksi tersebut. Jika mekanisme tersebut tidak bekerja efektif, maka infeksi akan berlanjut dan mampu menimbulkan gejala klinis penyakit. Pada saat itu respon kekebalan spesifik akan mulai terjadi dan jika ikan mampu bertahan hidup maka akan terbentuk antibodi spesifik terhadap agen infeksi pada level titer protektif dan terbentuk pula sel-sel memori.

2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik pada Ikan

Pada awal kehidupannya, sistem pertahanan ikan yang mula-mula berfungsi adalah sistem pertahanan non spesifik, sedangkan pertahanan spesifik pada ikan baru berkembang dan dapat berfungsi dengan baik sekitar umur beberapa minggu setelah telur menetas (Ellis, 1988). Anderson (1974), mengemukakan bahwa respon seluler pada ikan merupakan respon imun yang bersifat non spesifik. Kekebalan non-spesifik adalah suatu sistem pertahanan tubuh yang bersifat bawaan (innate immunity) dan berfungsi untuk melawan segala jenis patogen yang menyerang dan bersifat alami walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut. Respon ini meliputi pertahanan mekanik dan kimiawi (mukus, kulit, sisik dan insang) dan pertahanan seluler (sel makrofag, leukosit seperti limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil) (Purwaningsih, 2013).

Pertahanan pertama yaitu pertahanan fisik meliputi, sisik, kulit, dan mukus.

Mukus memiliki kemampuan menghambat kolonisasi mikroorganisma pada kulit, insang dan mukosa. Mukus ikan mengandung imunoglobulin (IgM) yang berfungsi sebagai antibodi alami yang dapat menghancurkan patogen yang menyerang tubuh dan bukan sebagai respon dari pemaparan antigen. Kerusakan pada sisik atau kulit dapat mempermudah patogen menginfeksi insang, ketika antigen sudah melewati sistem pertahanan pertama, sel-sel fagosit akan bereaksi dengan menghancurkan antigen melalui tiga tahap, yaitu pelekatan, fagositosis dan pencernaan.

Fagositosis merupakan langkah awal untuk mekanisme respon imunitas (Wintoko *et al.*,2012).

Proses fagositosis dapat terjadi apabila sel-sel fagosit berada dekat dengan antigen, atau jika antigen tersebut melekat pada permukaan sel fagosit (Setiawan *et al.*,2012). Sistem kekebalan tubuh ikan terhadap antigen yaitu melalui mekanisme fagositosis dengan perantara makrofag dan sel granular, sebagai contoh neutrofil menyerang mikroorganisma yang masuk melalui jaringan kulit ikan atau mukus. Sel makrofag dan netrofil memiliki kemampuan untuk melakukan mekanisme pertahanan non-spesifik melalui proses chemotaksis dan pinocytosis (Purwaningsih *et al.*,2014). Chemotaksis adalah proses dimana sel fagosit dipancing oleh berbagai jenis molekul asing sehingga sel fagosit teraktifasi untuk melakukan migrasi ke lokasi terjadinya inflamasi, kerusakan jaringan atau reaksi antigen-antibodi (immune reactions). Fenomena ini ditandai oleh proses pembukaan membran sel membentuk lubang (vakuola) kecil melalui proses endocytosis.

2.4.2 Sistem Imun Spesifik pada Ikan

Sistem imun spesifik pada ikan mempunyai kemampuan untuk mengenali benda yang bersifat patogen bagi dirinya, dan benda yang pertama kali muncul

atau masuk ke dalam badan ikan akan segera dikenali oleh sistem spesifik sehingga terjadi sensitifikasi sel-sel imun tersebut (Nur, 2006). Ada dua sistem pertahanan spesifik pada tubuh ikan, yaitu pertahanan seluler (antibody production) dan pertahanan humoral (*cell mediated immunity*) (Desi *et al.*,2012). Mekanisme pertahanan tubuh yang sinergis antara pertahanan humoral dan seluler dimungkinkan oleh adanya interleukin, interferon dan sitokin, yang berperan sebagai komunikator dan amplifikasi dalam mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan.

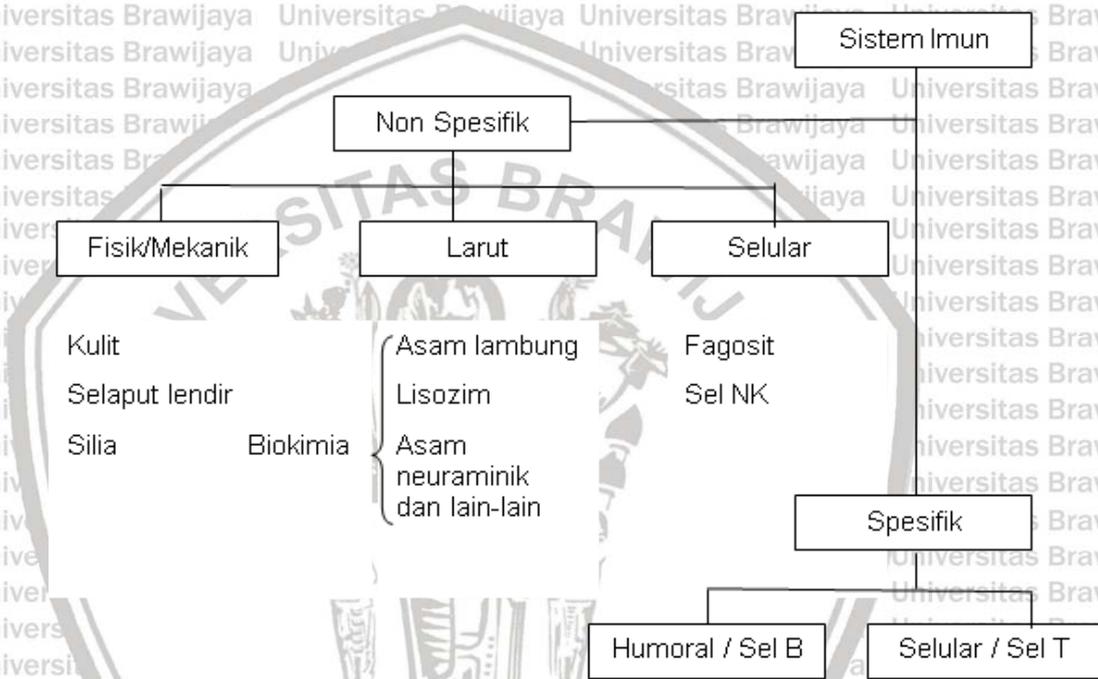
Paparan antigen menghasilkan stimulasi sejumlah sel limfosit yang akan mengadakan pembelahan secara mitosis dengan memproduksi sel limfosit muda yang dapat mengenali antigen melalui reseptor spesifik (Hazzulli *et al.*,2015). Ketika terjadi paparan antigen, produksi jumlah sel limfosit lebih banyak dari pada dengan jumlah monosit dan neutrofil (Setiawan *et al.*,2012), hal ini disebabkan sel limfosit berperan sebagai sel memori yang membentuk antibodi (Hardi *et al.*,2013). Sel yang berperan dalam sistem tanggap kebal terdiri dari dua jenis sel limfosit yaitu limfosit-B dan limfosit-T. Aktivitas yang pasti dari sel-T pada ikan belum banyak diketahui tapi yang jelas peran utamanya adalah dalam sistem kekebalan seluler (*cell mediated immunity*) dan sel-B berperan dalam produksi imunoglobulin melalui rangsangan antigen tertentu.

Ellis (2001), mengemukakan bahwa respon dan faktor humoral terdiri dari serum amiloid protein, antibodi, lisosim, transferin, interferon, antiprotease, lektin, lisin, protease, protein C-reaktif, dan komplemen. Sedangkan respon dan faktor seluler antara lain adalah makrofag, killer cell, neutrofil, reaksi penolakan allograft dan hipersensitifitas. Tanggap kebal adaptif dapat terbentuk pada kelompok teleostei seperti ikan dan dapat dideteksi dalam hitungan hari bahkan minggu (46 minggu) dari infeksi atau peradangan awal tergantung dari suhu lingkungan. Press & Evensen (1999), menyatakan bahwa tanggap kebal adaptif terdiri dari jaringan

sel protein kompleks, pengantar pesan biokimia (sitokin) dan gen yang bekerja sama untuk menghasilkan suatu induksi tanggap kebal spesifik yang memerlukan Abs (antibodi spesifik) dan Ags (antigen spesifik).

Fujaya (2004), mengemukakan bahwa perolehan kekebalan aktif pada ikan tergantung pada peran serta jaringan dan sel – sel hospes setelah bertemu dengan imunogen. Sebagaimana yang dijelaskan melalui skema sistem imun pada

Gambar 4. sebagai berikut :



Gambar 4. Skema Sistem Imun (Baratawidjaja, 1988).

2.5 Hematologi Ikan

Sistem hematologi ikan terdiri dua kelompok besar yaitu sel darah dan plasma darah. Darah dianggap sebagai jaringan khusus sirkulasi, terdiri atas berbagai macam sel dalam cairan yang disebut plasma. Darah tersusun atas cairan darah (plasma darah) dan elemen-elemen seluler (sel-sel darah). Plasma darah terdiri dari air, proteins (albumin, globulin, dan faktor-faktor koagulasi), lipid dan ion. Sel darah terdiri dari sel darah merah (eritrosit) dan sel darah putih

(leukosit). Sel dan cairan darah (plasma darah) mempunyai peran fisiologi sangat penting (Fujaya, 2004).

Berdasarkan warnanya sel darah dibagi menjadi sel darah merah dan sel darah putih. Darah mengandung sel-sel yang dirancang untuk mencegah infeksi, menghentikan pendarahan dan mengangkut hormon. Sel darah mempunyai peranan sangat penting dalam sistem kekebalan, terutama leukosit atau sel darah putih. Jenis-jenis leukosit mempunyai beberapa fungsi dalam melawan benda asing yang berhasil masuk ke dalam tubuh (Johnny *et al.*, 2003).

Darah ikan akan mengalami perubahan apabila terkena penyakit infeksi. Beberapa parameter yang dapat memperlihatkan perubahan patologi pada darah ikan adalah kadar hematokrit, hemoglobin, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih dan deferensial leukosit.

2.5.1 Leukosit

Bijanti (2005), menjelaskan bahwa Ikan mempunyai sel darah putih (leukosit) cukup banyak yaitu antara $137.000/\text{mm}^3$ – $798.000/\text{mm}^3$. Proses pembentukan leukosit pada mamalia terbatas pada sumsum tulang, limpa dan limfnode, sedangkan pada ikan selain pada tempat-tempat tersebut juga pada ginjal dan thymus turut berperan pada proses pembentukan leukosit. Fungsi primer sel darah putih adalah melindungi tubuh dari infeksi. Sel ini bekerja sama dengan erat bersama protein respon imun, immunoglobulin dan komplemen. Neutrofil, eosinofil, basofil dan monosit merupakan fagosit (Hoffbrand dan Atul, 2005).

Leukosit memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan sel darah merah, yaitu berkisar antara $20.000/\text{mm}^3$ hingga $150.000/\text{mm}^3$. Bentuk sel darah putih adalah lonjong hingga bulat. Leukosit terdiri dari agranulosit (monosit dan limfosit) dan granulosit (heterofil, eosinofi dan basofil). Leukosit memiliki bermacam-macam fungsi, erat kaitannya untuk menghilangkan benda asing

(termasuk mikroorganisme patogen). Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah leukosit adalah kondisi dan kesehatan tubuh ikan. Infiltrasi granulosit muncul 1224 jam setelah diinjeksi oleh bakteri pada ikan rainbow trout. Setelah itu persentase granulosit dan makrofag akan meningkat hingga 2-4 hari (Noercholis *et al.*,2013).

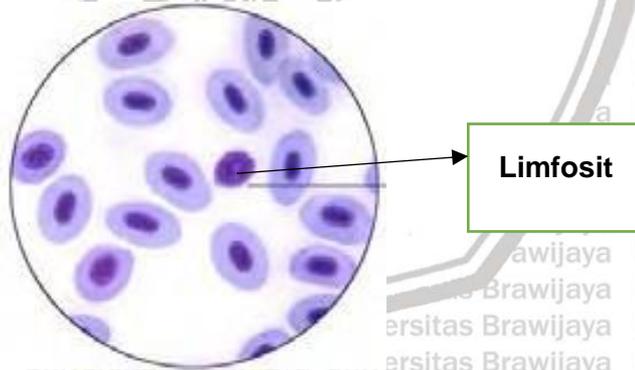
2.5.2 Diferensial Leukosit

a. *Limfosit*

Limfosit merupakan sel darah yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh.

Pada ikan teleostei, limfosit diproduksi di organ timus, limpa dan ginjal. Inti sel limfosit hampir memenuhi ruangan sel, berwarna gelap dengan sedikit sitoplasma yang mengelilingi inti, dan tidak bergranula (Mones, 2008).

Seperti halnya mamalia, ikan memiliki sel T dan sel B, dimana secara morfologi tidak dapat dibedakan jika menggunakan mikroskop cahaya. Kedua bentuk sel ini sama-sama memiliki ukuran inti besar, yang mengisi hampir seluruh sel. Jumlah limfosit yang bersirkulasi pada ikan adalah 12×10^3 limfosit/mm³ (Affandi dan Tang, 2002).



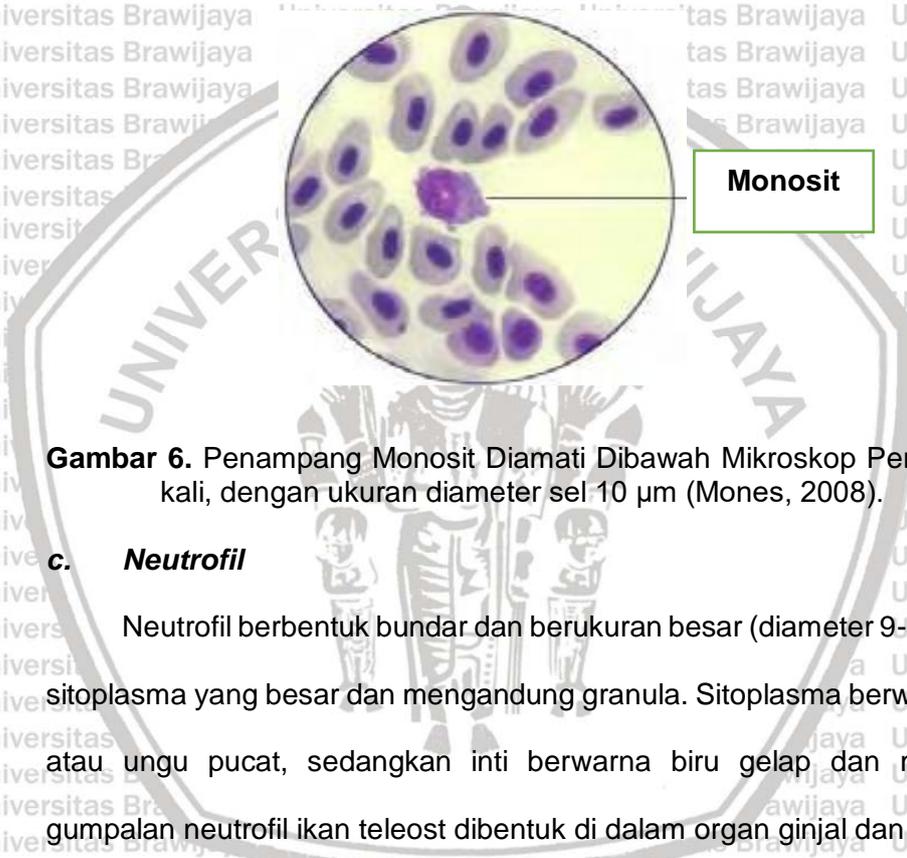
Gambar 5. Penampang limfosit diamati di bawah mikroskop perbesaran 10x10 kali, dengan ukuran diameter sel 8.2 µm (Mones, 2008).

b. *Monosit*

Monosit lebih kuat dibandingkan dengan neutrofil dalam memfagositosis bakteri, monosit matang disebut makrofag dan mampu memfagosit 100 bakteri di

dalam jaringan yang terinfeksi. Peningkatan jumlah monosit dapat dijadikan indikator peningkatan respon imun ikan (Fujaya, 2004).

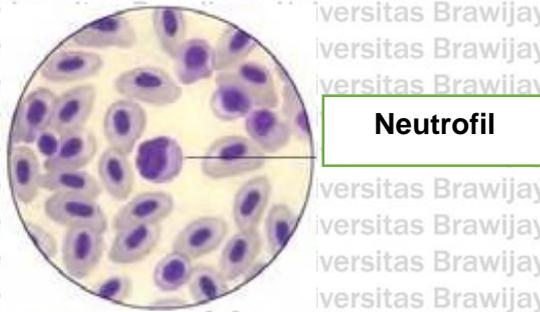
Monosit ikan berasal dari jaringan hematopoietik ginjal. Secara morfologi bentuk monosit ikan serupa dengan monosit mamalia. Persentase monosit pada ikan sebanyak 0.1 % dari populasi leukosit total yang bersirkulasi. Namun demikian, jumlahnya akan bertambah dalam waktu singkat (\pm 48 jam) setelah disuntik dengan benda asing seperti karbon (Mones, 2008).



Gambar 6. Penampang Monosit Diamati Dibawah Mikroskop Perbesaran 10x10 kali, dengan ukuran diameter sel 10 μ m (Mones, 2008).

c. Neutrofil

Neutrofil berbentuk bundar dan berukuran besar (diameter 9-13 μ m), dengan sitoplasma yang besar dan mengandung granula. Sitoplasma berwarna biru cerah atau ungu pucat, sedangkan inti berwarna biru gelap dan memperlihatkan gumpalan neutrofil ikan teleost dibentuk di dalam organ ginjal dan limpa. Proporsi neutrofil dalam populasi leukosit darah sangat rendah, yaitu sekitar 6 – 8 % (Mones, 2008).



Gambar 7. Penampang neutrofil diamati di bawah mikroskop pembesaran 10x10 kali (Mones, 2008).

2.5.3 Haemoglobin

Pengangkutan oksigen dalam darah oleh figmen pemapasan (haemoglobin) yang terdapat dalam butir darah merah. Dimana menurut Siakpere (1985), fungsi haemoglobin sendiri untuk mengikat oksigen yang kemudian digunakan untuk proses metabolisme sehingga menghasilkan energi. Stoskopf (1993), menyatakan bahwa kisaran nilai merahi Hb pada ikan karang tropis berkisar antara 8-10 g/dl, nilai merahi ini bervariasi tergantung spesies.

Haemoglobin terdapat pada eritrosit dan terdiri dari haem yang merupakan porfirin dan globin, dimana haemoglobin sendiri merupakan suatu protein mekul besar yang terdiri dari 4 sub unit protein mekul kecil. Masing-masing rantai tersebut akan mengikat 1 molekul oksigen dan membentuk ikatan peptide yang selanjutnya akan terikat lagi dengan cincin haem yang ada pada bagian tengahnya terdapat atom Fe. Setiap atom Fe, satu protein globin hanya mengikat satu molekul haem dan satu molekul haemoglobin terdiri atas empat buah kompleks molekul globin dan haem, sehingga satu molekul haemoglobin mengandung empat atom Fe dan dapat mengangkut empat molekul oksigen (Bijanti, 2005).

2.6 Pemanfaatan *Chepalopoda* dalam bidang kesehatan.

Chepalopoda merupakan salah satu jenis hewan yang tak bertulang belakang yang sangat digemari oleh masyarakat baik cumicumi maupun sotong. Sotong merupakan komoditas yang bernilai merahi jual cukup tinggi. Ditinjau dari nilai merahi gizi, sotong memiliki kandungan gizi yang luar biasa karena kandungan

proteinnya cukup tinggi, yaitu 17,9 gr/100 gr cumi segar. Daging sotong memiliki kelebihan dibanding dengan hasil laut lain, yaitu tidak memiliki tulang belkang, mudah dicerna, memiliki rasa dan aroma yang khas, serta mengandung semua jenis asam amino esensial yang diperlukan oleh tubuh. Asam amino esensial yang dominan adalah leusin, lisin, dan fenilalanin. Sementara kadar asam amino non esensial yang dominan adalah asam glutamate dan asam aspartate (Anggriawan, 2011).

Sotong di bawah keluarga Cephalopoda, dikenal menghasilkan tinta berpigmen hitam sebagai defensif taktik melawan predator. Dalam kedokteran, tinta telah dilaporkan menunjukkan nilai merahi positif dalam berbagai terapi. Tinta mentah ekstrak dari berbagai jenis Cephalopoda telah dipelajari sebagai antimikroba terhadap bakteri biofilm, *Staphylococcus aureus*, klinis Isolat bakteri dan ragi patogen, bersifat pengawet, Aktifitas antioksidan dan anti-retroviral. Tinta juga dipelajari memiliki bioaktif berbagai protein dan memiliki sifat cytolytic, fraksi antitumor juga berpotensi antimikroba (Girija, 2011).

Telah banyak penelitian terdahulu yang mempelajari kandungan dan efek positif dari tinta Cephalopoda tersebut, terutama dalam bidang medis sebagai anti tumor, di Jepang telah dilakukan penelitian dengan melakukan penelitian menggunakan hewan uji berupa tikus. Dengan investigasi aktivitas fraksi anti tumor peptidoglikan dari tinta terhadap Meth A fibrosarcoma pada tikus dalam fraksi mengandung peptida 7,8 %, 57 % polisakarida dan 30 % pigmen (Takaya *et al.*, 1994). Melanin ekstrak diperoleh dari tinta cumi-cumi bisa menghambat sekresi lambung pada tikus. Ekstrak terutama berisi melanoprotein terdiri dari pigmen melanin (90%), protein (5,8%) dan karbohidrat (0,8%) (Mimura *et al.*, 1982).

Derby *et al.*, (2007), menyatakan bahwa pada enam spesies cumi (cumi-cumi, sotong dan gurita) ditemukan tingkat millimolar total asam amino bebas (FAA) dan amonium dalam seketetions kelenjar tinta. FAA ini dalam konsentrasi

tertinggi adalah taurin, asam aspartat, asam glutamat, alanin, dan lisin. Krustasea dan ikan, yang merupakan predator utama cumi ini, memiliki sistem reseptor khusus untuk FAA ini, para penulis menyimpulkan bahwa tinta moluska ini memiliki potensi untuk menggunakan gangguan sensorik atau phagomimicry sebagai pertahanan kimia.

Ekstrak tinta cumi hasil penelitian terdahulu, beberapa turunan asam amino tampak pada hasil ekstraksi tinta cumi dengan hexan. Pada Cephalopoda (termasuk cumi-cumi) ditemukan komponen bioaktif berupa berbagai amine sederhana dan paralyzing protein. Komponen bioaktif ini dapat dipergunakan untuk pencegahan terhadap bakteri patogenik (Cariello dan Zantli, 1977; Walker dan Masuda, 1990). Selain itu, bahan alami gelap mengandung sembilan asam lemak (sekitar 1,34 %), sebesar 43,4 % asam lemak tak jenuh dan 56,6 % asam lemak jenuh. Selain itu terdapat enam belas asam amino dimana asam aspartat merupakan jenis asam terbanyak. Banyak elemen mineral yang menjadi komponen penting dari tinta sotong, dimana kalsium merupakan unsur yang paling umum (Takaya *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; Zhen *et al.*, 2002).

Dan dalam penelitian terbaru Fadjar *et al.*,(2016), ekstrak tinta cumi mengandung 9-octadecenoic acid / asam oleat sebagai antibakteri. Ikan kerapu macan yang terinfeksi dengan *A. hydrophila* mencapai tingkat ketahanan 100% setelah perlakuan ekstraksi tinta cumi-cumi dan memberikan pengaruh signifikan yang tinggi terhadap profil hematologi ikan kerapu macan.

Dalam penelitian terbaru Menurut Shiva Shakthi.,(2016), Penelitian ini mengungkapkan bahwa tinta S. prabahari kaya secara biokimia dengan jumlah air, mineral, protein, lipid dan karbohidrat yang baik, Selain itu memiliki aktivitas yang lebih tinggi sebagai agen antioksidan dan antikanker

3. KERANGKA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Salah satu jenis penyakit yang merupakan masalah serius dalam budidaya ikan Nila merah adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen terutama dari genus *Aeromonas*, khususnya *A. hydrophila*, yang pada kondisi puncak wabah dapat menyebabkan mortalitas sampai 100%. Hal ini membuat penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* merupakan penyakit bakterial utama

pada kegiatan budidaya (Aguirre-Guzman *et al.*,2004). Penyakit ini merupakan penyakit bakteri utama, terutama pada benih atau pada fase larva (Huang, 2005),

Infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila merah dapat menyebabkan terjadinya perubahan komposisi darah dalam tubuh ikan dan kerusakan jaringan karena adanya bakteri tersebut di dalam tubuh ikan. Jika ini tidak diatasi maka akan menyebabkan kematian pada ikan sehingga sintasan ikan menurun dan pada akhirnya akan menurunkan produksi ikan tersebut. Taufik (2001), menyatakan bahwa bakteri pathogen pada ikan nila merah adalah *A. hydrophila*.

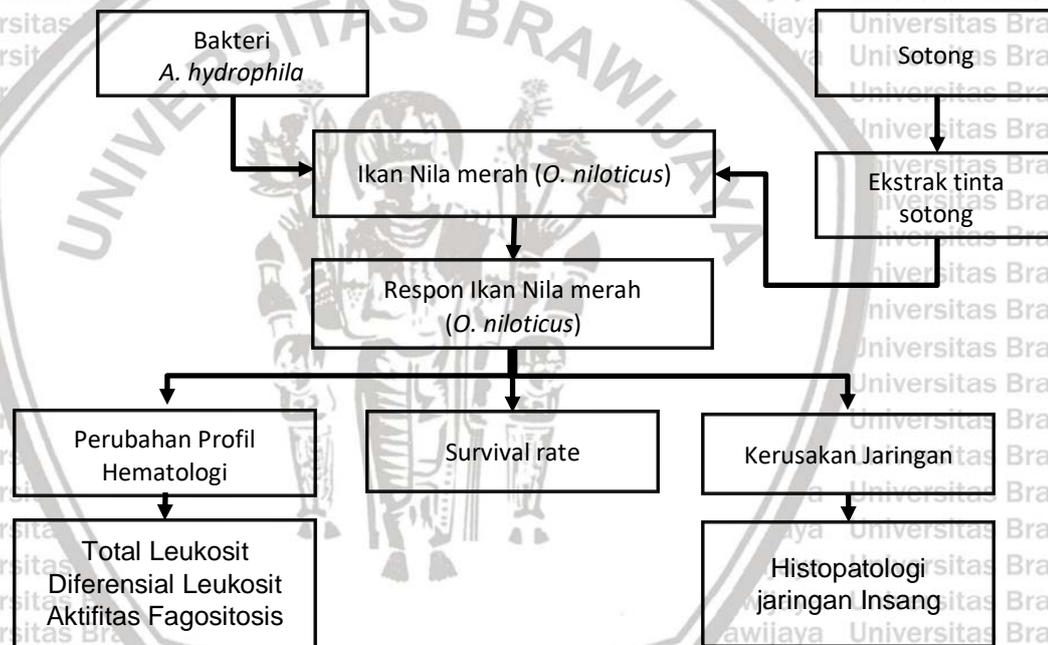
Cara yang umum dilakukan untuk membasmi bakteri patogen pada ikan nila merah adalah menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik untuk mengendalikan penyakit vibriosis pada ikan dapat bersistensi pada bakteri, memberi residu di tubuh ikan dan dapat mencemari lingkungan. Dengan demikian perlu dicari alternatif lain untuk mengatasi hal tersebut. Alternatif lain yang dapat dilakukan untuk mengendalikan *A. hydrophila* dengan aman dan ramah

lingkungan adalah dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang mempunyai keaktifan sebagai antibakteri yang salah satunya dapat berasal dari biota alami laut. Biota laut yang mungkin dapat digunakan untuk tujuan tersebut antara lain tinta sotong *Sepia sp.* Pada tinta sotong *Sepia sp.* pada umumnya ditemukan komponen bioaktif berupa berbagai amino sederhana dan paralyzing protein.

Kandungan kimia yang penting ialah Asam lemak tak jenuh terutama dari golongan PUFA (*Polyunsaturated fatty acids*) (Kordi dan Ghufran, 2010). Salah satu golongan tersebut yang terkandung dalam sotong yaitu asam oleat (Dewi *et al.*, 2015).

3.2 Kerangka Konsep

Merujuk pada landasan teori yang telah dipaparkan di atas, dirasa perlu untuk dilakukan penelitian tentang penggunaan ekstrak tinta yang serupa yaitu tinta sotong dalam menanggulangi serangan *A. hydrophila*. Kerangka konsep dalam penelitian ini ditunjukkan pada **Gambar 8.** berikut :

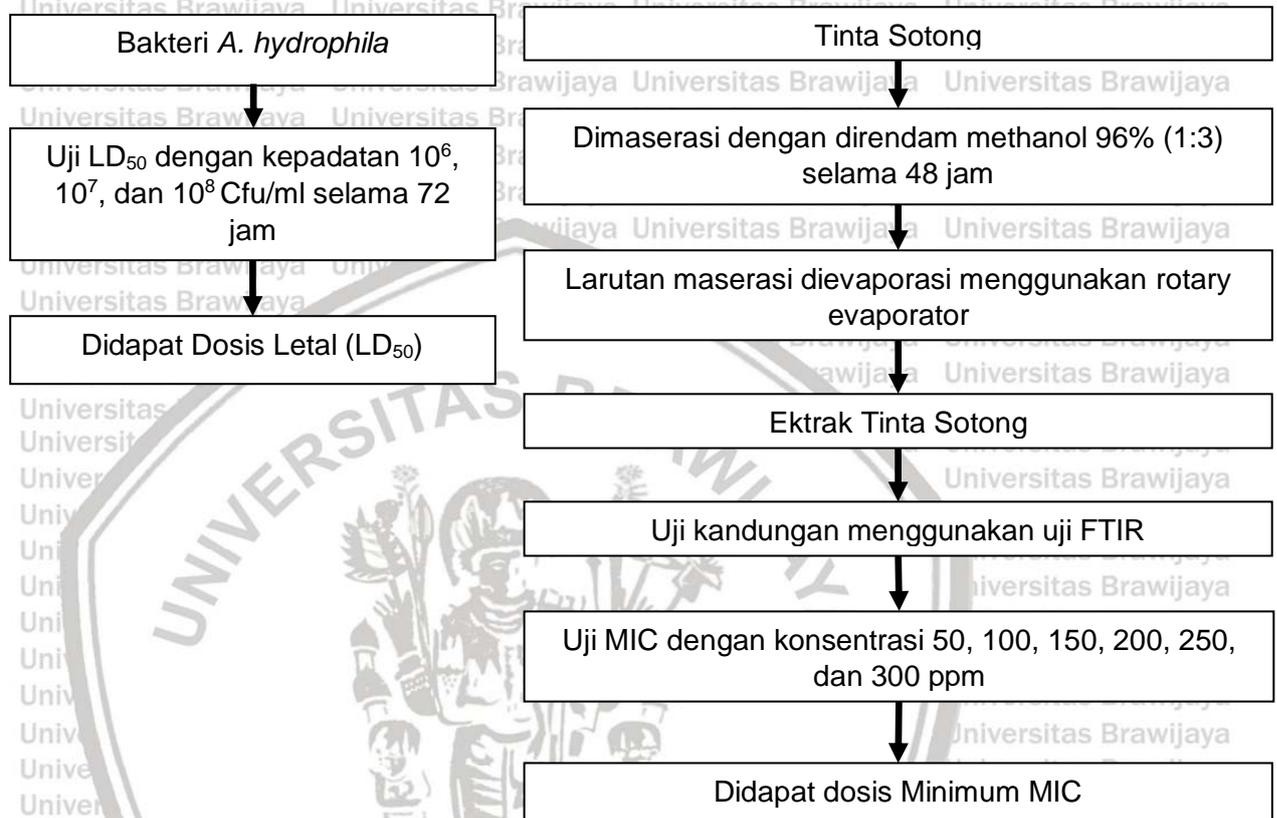


Gambar 8. Kerangka konsep penelitian

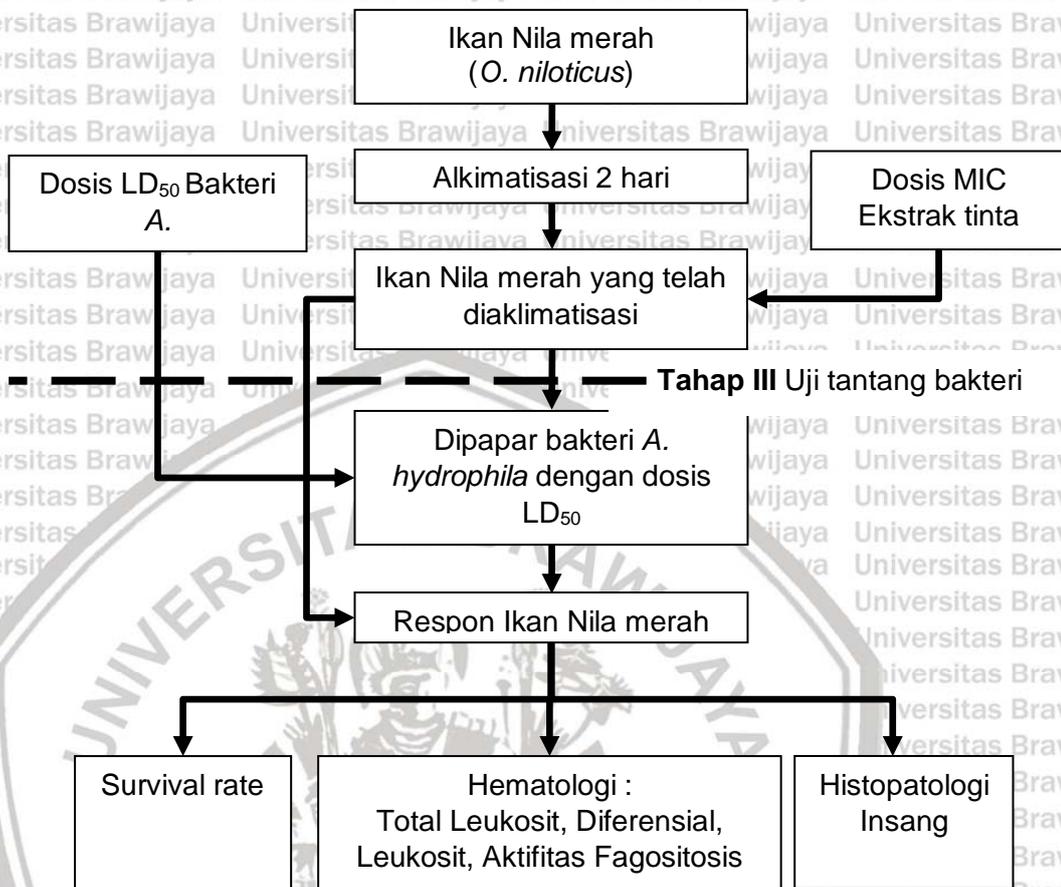
3.3 Kerangka Operasional

Adapun prosedur pelaksanaan penelitian yang dijelaskan dalam kerangka operasional penelitian sebagai berikut :

Tahap 1 Penentuan dosis Bakteri



Tahap II Pemberian imunostimulan ekstrak tinta sotong



Gambar 9. Kerangka oprasional penelitian

3.4 Kebaharuan Penelitian

Kebaharuan penelitian ini yaitu berusaha untuk melihat sejauh mana ekstrak tinta sotong sebagai imunostimulan untuk meningkatkan sistem imun ikan nila merah sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai informasi baru kedepannya.

Tabel 1. Jurnal Terkait Penelitian Ekstrak Tinta Sotong (*Sepia* sp.)

No.	Judul	Tahun	Peneliti	Jurnal
1	Squid (<i>Loligo edulis</i>) ink raw extract as an anti-vibriosis substance in grouperv (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>) juvenile culture infected by <i>Vibrio alginolyticus</i> .	2016	Mohamad Fadjar; Sri Andajani; Kartini Zaelani	AACL Bioflux

No.	Judul	Tahun	Peneliti	Jurnal
2	Evaluation of Cephalopoda extract against some nosocomial bacterial isolates	2014	Al-Maliky Kh. Haydar	Thi-Qar Medical Journal
3	Investigation of antimicrobial and plasma coagulation property of some molluscan ink extracts: Gastropods and cephalopods	2011	R. Vennila merah; R. K. Rajesh kumar; S. Kanchana; M. Arumugam; T. Balasubramanian	African Journal of Biochemistry Research

Berdasarkan **Tabel 1.** Penelitian pemanfaatan ekstrak tinta sotong untuk meningkatkan respon imun non spesifik ikan nila merah yang ditantang *A. hydrophila* belum dilakukan sehingga penelitian ini masih tergolong baru karena penelitian yang sudah dilakukan yakni ekstrak tinta sotong sebagai anti bakteri.

3.5 Strategi Publikasi

Publikasi karya ilmiah merupakan tahapan setelah pelaksanaan penelitian.

Publikasi dipersyaratkan pada Pelaksanaan Kurikulum Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya adalah Jurnal Nasional terakreditasi dan Jurnal Internasional.

Adapun publikasi jurnal penelitian dapat dilihat pada **Tabel 2.** sebagai berikut :

Tabel 2. Strategi Publikasi

Judul	Bulan	Jurnal	Status
Addition of cuttlefish (<i>Sepia sp</i>) ink raw extract as non specific immune response to Red Tilapia (<i>O. niloticus</i>) infected by <i>A. hydrophila</i>	Juni 2019	<i>The Journal Experimental Life Science</i>	<i>Under Review</i>

3.6 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah :

- **H₀** : diduga pemberian dosis ekstrak tinta sotong *Sepia sp.* yang berbeda tidak berpengaruh terhadap respon imun non spesifik ikan nila merah yang ditantang bakteri *A. hydrophila* .
- **H₁** : diduga pemberian dosis ekstrak tinta sotong *Sepia sp.* yang berbeda berpengaruh terhadap perbaikan jaringan insang ikan nila merah yang ditantang bakteri *A. hydrophila*.



4. METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2018 sampai Februari 2019 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang), Lab Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang Lab. Reproduksi Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang).

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari Aquarium 40x40x40 cm sebanyak 15 buah, aerator, selang aerasi dan batu aerasi digunakan sebagai media pemeliharaan hewan uji. Timbangan digital, pipet tetes, nampan, mikroskop cahaya, objek glass, cover glass, *hotplate*, petri disk, mikropipet, spuit 1 ml, pipet thoma leukosit, *handtally counter*, dan *haemocytometer*, incubator, *centrifuge*. Alat uji histopatologi insang. Peralatan yang digunakan untuk analisis kualitas air, yaitu; pH meter dan DO meter.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dibagi menjadi dua yaitu bahan baku dan bahan tambahan. Bahan baku yang digunakan meliputi, tinta sotong sebagai bahan utama pembuatan ekstrak tinta sotong, Ikan nila merah (*O. niloticus*) dengan ukuran 8-10 cm sebagai hewan uji, bakteri sebagai bahan ujiantang yaitu jenis *A. hydrophila*.

Bahan tambahan yang digunakan meliputi aquades, methanol, kertas label, alkohol 70%, aluminium foil, cotton swap, tissue, media NA (*Nutrient Broth*), media TSB (*Tryptitone Sot Broth*), larutan hayem, larutan turk, Na-fisiologis, anti

koagulan (Na-sitrat 3,8%), sampel darah ikan nila merah, safranin, larutan giemsa, larutan RPMI, larutan PBS, formalin, bahan-bahan histopatologi insang.

4.3 Pendekatan Penelitian

Pendekatan penelitian didasarkan dengan penelitian terdahulu, yakni dalam ilmu kedokteran tinta dari *Cephalopoda* telah dilaporkan bahwa mampu menunjukkan nila merah positif dalam berbagai aktivitas terapi kesehatan. Ekstrak tinta sotong telah dipelajari sebagai antimikroba terhadap biofilm, *Staphylococcus aureus*, klinis isolat bakteri dan ragi patogen, bersifat pengawet, aktivitas antioksidan dan anti-retroviral. Tinta sotong juga dipelajari memiliki bioaktif berbagai protein dan memiliki sifat *cytolytic*, fraksi antitumor juga berpotensi antimikroba.

4.4 Variabel Penelitian

Objek penelitian atau apa yang menjadi titik perhatian suatu penelitian disebut sebagai variabel (Arikunto, 2006). Disebut variabel karena secara kualitatif atau kuantitatif dapat bervariasi. Apabila sesuatu tidak dapat bervariasi maka hal tersebut bukan merupakan variabel melainkan konstanta (Azwar, 2007). Variabel dibagi menjadi dua yaitu variabel bebas dimana akan diselidiki pengaruhnya dan variabel terikat sebagai faktor yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan penambahan dosis ekstrak tinta sotong sebagai imunostimulan pada ikan nila merah. Sedangkan variabel terikatnya meliputi survival rate, kadar total leukosit, diferensial leukosit, fagositosis, makrofag, dan histopatologi insang serta kualitas air (pH, suhu, dan DO).

4.5 Metode Penelitian

Metode dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, yang menurut Simatupang (2000) bertujuan untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab-akibat serta berapa besar hubungan sebab-akibat, tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan.

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu penelitian tahap I, penelitian tahap II dan penelitian tahap III. Penelitian tahap I dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh senyawa antibakteri dari ekstrak tinta sotong, melalui uji FT-IR serta penentuan dosis, pada penelitian tahap II dilakukan metode pemberian secara perendaman ekstrak tinta sedangkan pada tahap III dilakukan metode penginfeksi dengan cara uji tantangan bakteri *A. hydrophila* yang menghasilkan respon imun non spesifik dan gambaran jaringan insang ikan nila merah terbaik yang ditantang bakteri *A. hydrophila* tahapan penelitian yang dilakukan dapat diuraikan sebagai berikut :

4.5.1 Tahap I:

A. Ekstrak Tinta Sotong

Metode ekstraksi yang digunakan dalam mengekstrak tinta sotong adalah metode masserasi. Masserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruang (Iswani, 2011). Mekanisme kerja yang dilakukan dalam mengekstrak tinta sotong dengan menggunakan metode masserasi yaitu mencampurkan tinta sotong yang sudah disentrifugasi dengan pelarut yang akan digunakan, pelarut yang dapat digunakan dapat berupa metanol, etanol, atau pelarut organik lainnya yang disesuaikan dengan kebutuhan.

Berdasarkan penelitian terdahulu ekstraksi menggunakan campuran metanol (1 : 3). Tinta sebanyak 5 g ditambahkan 150 mL methanol dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama 30 menit,

selanjutnya disimpan selama 24 jam pada suhu 10 °C. Endapan dipisahkan dari supernatan dengan menggunakan sentrifius (10.000 rpm pada suhu 50 °C).

B. Identifikasi Senyawa dengan FT-IR

Uji komposisi kimia ekstrak tinta sotong dengan metode FTIR berdasar pada penelitian Mishra dan Jha (2009). Fouries Transformed Infrared (FTIR) secara umum bertujuan untuk mendeteksi gugus fungsi dari senyawa tertentu, sehingga dapat diketahui komponen penyusun senyawa lebih detail dari sekedar uji fitokimia. Uji ini dilakukan dengan menghomogenkan 200 mg Kbr serta 2 mg bubuk/ekstrak tinta sotong di dalam mortar. Sampel yang telah homogen, dipadatkan dan dimasukkan ke dalam Tensor 37. Sampel uji diukur pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} , sehingga dapat menghasilkan spektra FTIR yang menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang sampel uji. Gugus-gugus fungsi ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terekspresi.

C. Pemiakan Bakteri *A. hydrophila*

- Media Padat TSA (*Tryptic Soya Agar*)

TSA merk OXOID dengan dosis 40 gram/L sebanyak 2,4 gram dilarutkan ke dalam 60 ml akuades pada Erlenmeyer. Media dipanaskan di atas hotplate hingga homogen. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen/aluminium foil lalu ditali dengan benang. Media disterilisasi 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.

- Media Cair TSB (*Tryptitone Sot Broth*)

TSB ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning. Erlenmeyer ditutup kapas dan aluminium foil lalu diikat menggunakan benang. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila dinokulasi pada media yang masih panas.

- **Pembiakan Bakteri *A. hydrophila***

Larutan TSB disiapkan sebanyak 6 gram dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml. Jarum osse dipanaskan diatas Bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse disentuhkan ke biakan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan pada TSB sebanyak 2 osse. Larutan TSB dibiarkan 12 – 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Disiapkan cawan petri yang berisi media TSA. Setelah TSB menjadi keruh, jarum osse dicelupkan ke TSB dan digoreskan ke permukaan TSA. Digoreskan ke dalam media TSA secara zig-zag dengan metode goresan sinabung, T, atau kuadran. Media TSA di inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

D. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Salah satu cara untuk pengujian antimikroba untuk memperoleh nilai merahi konsentrasi penghambat pertumbuhan bakteri terendah dilakukan dengan uji MIC dan MBC. Uji MIC adalah konsentrasi terkecil senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopik (Edberg, 1983). Uji MIC dapat dilakukan dengan menggunakan dosis 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, K+ (Kontrol positif menggunakan antibiotik oxytetracyclin dengan dosis 5 ppm) dan K- (Kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak tinta sotong dan antibiotik).

Pengujian ini dilakukan dengan memasukan inokulum bakteri sebanyak 1 ose kedalam masing-masing tabung, disimpan dalam inkubator pada suhu 30°C hingga 24 jam. Diamati kekeruhan pada masing-masing tabung dengan tingkat kekeruhan media. Dilakukan pengujian dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang yang digunakan pada *A. hydrophila* adalah 600nm untuk mengetahui nilai merahi absorpsi dari tiap kekeruhan pada masing-masing dosis.

Konsentrasi terkecil yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri (negatif) pada uji MIC, selanjutnya digunakan untuk penentuan nilai merahi MBC.

Ke dalam tabung dimasukkan minyak esensial pada konsentrasi MIC, selanjutnya ditambah indikator warna TTC dan diinokulasi bakteri *A. hydrophila*. Sampel diinkubasi pada suhu yang sama yaitu 30°C yang dilakukan selama 5 hari. Nilai merahi MBC ditentukan berdasar pada konsentrasi bakterisidal yang mana tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* setelah proses inkubasi selama 5 hari.

4.5.2 Tahap II:

Pada tahap 2 dilakukan pemberian imunostimulan ekstrak tinta sotong dengan dosis yang berbeda. Dilakukan persiapan aquarium sebanyak 15 buah dengan jumlah ikan nila merah masing-masing 10 ekor, kemudian diaklimatisasi selama satu minggu. Wu *et al.*, (2010) menyatakan kepadatan ikan untuk uji *in vivo* eksperimen dapat dilakukan dengan jumlah 10 ekor/aquarium. Setelah itu dilakukan pemeliharaan hewan uji selama 30 hari dengan pemberian pakan komersil 5% dari berat ikan sebanyak 2 kali sehari pada pukul 08.00 dan 16.00.

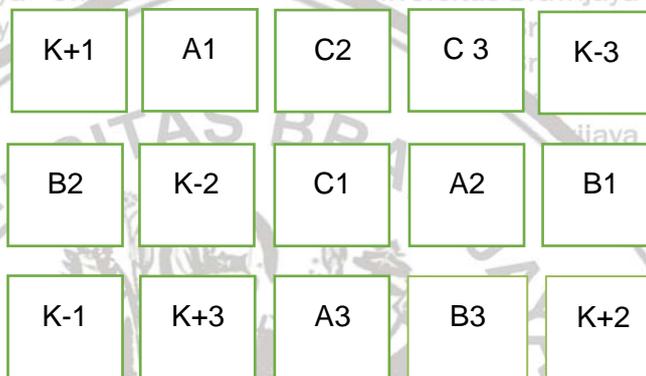
Pemberian imunostimulan ekstrak tinta sotong dengan hasil uji booster. Hewan uji (ikan nila merah) dibagi dalam 4 perlakuan.

4.5.3 Tahap III :

Pada tahap tiga yaitu proses ujiantang bakteri *A. hydrophila* dilakukan pada minggu ke 4 dengan kepadatan bakteri yang diperoleh dari uji LD₅₀. Selama pemeliharaan dilakukan pengambilan darah pada hari ke- 0, minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga, minggu ke empat, dan pasca ujiantang. Setelah itu dilakukan pengamatan pada parameter-parameter yang telah ditentukan.

4.6. Rancangan Penelitian

Denah perlakuan Rancangan Acak Lengkap (RAL) disajikan sebagai berikut:



Gambar 10. Denah Percobaan

Keterangan :

A : Perlakuan perendaman ikan nila merah dengan ekstrak tinta sotong dengan dosis 250 ppm dan pemberian *A. hydrophila* dengan kepadatan 10⁷ cfu/ml.

B : Perlakuan perendaman ikan nila merah dengan ekstrak tinta sotong dengan dosis 300 ppm dan pemberian *A. hydrophila* dengan kepadatan 10⁷ cfu/ml

C : Perlakuan perendaman ikan nila merah dengan ekstrak tinta sotong dengan dosis 350 ppm dan pemberian *A. hydrophila* dengan kepadatan 10⁷ cfu/ml

K+ : Ikan nila merah yang diinfeksi *A. hydrophila* dan pemberian Antibiotik oxytetracyclin dengan dosis 5 ppm)

K- : Ikan nila merah yang diinfeksi *A. hydrophila* tanpa pemberian Imunostimulan ekstrak tinta sotong dan Antibiotik.

1, 2, 3 : Ulangan Perlakuan.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu percobaan yang mempunyai media atau

tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2002).

4.7 Parameter Uji

4.7.1 Survival Rate

Analisis kelangsungan hidup ikan berdasarkan rumus Effendie (1979) dalam Rudiyanti dan Ekasari, (2009) :

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

Keterangan:

SR = Kelangsungan hidup hewan Uji (%).

N_t = Jumlah ikan uji pada akhir penelitian (ekor).

N_o = Jumlah ikan uji pada awal penelitian (ekor).

4.7.2 Total Leukosit

Prosedur kerja dari perhitungan total leukosit menurut Bijanti (2005) sebagai berikut diambil darah ikan yang telah ditambahkan antikoagulan sebanyak 0,5 µl dengan menggunakan pipet leukosit. Kemudian diencerkan dengan larutan turk dalam pipet leukosit hingga 11 µl. Darah yang telah tercampur larutan turk dikocok hingga homogen. Dua tetes pertama dari hasil campuran tersebut buang, tetesan ketiga diletakkan pada kotak haemocytometer kemudian ditutup dengan cover glass dan diamati dengan mikroskop cahaya yakni dengan cara menghitung total leukosit pada semua kotak leukosit.

Perhitungan jumlah sel leukosit dideskripsikan berikut ini. Mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor diturunkan atau diafragma dikecilkan. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah lensa objektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis tersebut. Leukosit dihitung pada keempat bidang besar dimana kotak tersebut berwarna hijau. Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun kebawah dan dari kanan ke kiri. Metode ini diulang pada keempat bidang besar.

Menurut Svobodova (1991), perhitungan total leukosit yaitu :

$$SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan :

SDP = jumlah leukosit

A = jumlah sel leukosit terhitung

N = jumlah kotak haemocytometer yang diamati

V = volume kotak haemocytometer yang diamati

Fp = faktor pengenceran

4.7.3 Diferensial Leukosit

Prosedur kerja perhitungan differensial leukosit menurut Bijanti (2005)

adalah sebagai berikut. Darah ikan yang telah diberi antikoagulan diambil dengan

pipet kapiler dan diteteskan pada ujung objek glass untuk membuat hapusan darah

yakni dengan cara meletakkan objek glass lain pada ujung objek glass yang telah

ditetesi darah sehingga membentuk sudut 30-40 derajat, kemudian didorong

dengan sudut yang sama sehingga membentuk lapisan tipis pada objek glass lalu

dikeringkan. Setelah kering, objek glass difiksasi dengan menggunakan methanol

selama 1-2 menit. Dilakukan pengecatan dengan pengecatan giemsa pada

hapusan darah yang telah difiksasi dan ditunggu selama \pm 15 menit. Kemudian

dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan kembali. Hasil dari perlakuan tersebut

kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya.

4.7.4 Histopatologi

Menurut Susanto (2008), ikan dibedah kemudian diambil sebagian organ

insang dan diawetkan dalam larutan fiksatif *Bufer Netral Formalin* (BNF) 10%

selama 1-2 hari. Setelah itu organ ditrimming dan dimasukkan ke dalam kaset

plastik untuk dibuat blok lilin. Blok lilin yang terbentuk di potong dengan

menggunakan mesin mikrotom dan diletakkan di gelas objek. Setelah itu dilakukan

pewarnaan HE (Haematoxylin Eosin). Pertama kali dimasukkan ke dalam xylol I,

xylol II, alkohol absolut, alkohol 95% dan alkohol 85% masing-masing selama dua

menit. Setelah itu secara berurutan dicuci dengan air kran selama satu menit, direndam pada larutan pewarna Haematoxilin selama delapan menit, dicuci dengan air kran selama 30 detik, dimasukkan ke lithium carbonat selama 15-30 detik, kemudian dicuci dengan air kran selama 2 menit dan dimasukkan ke eosin selama 2-3 menit. Setelah itu secara berlawanan seperti perlakuan awal di celupkan ke dalam alkohol 85%, alkohol 95%, alkohol absolut, xylol I dan xylol II masing-masing dua menit. Preparat di keringkan dan ditutup dengan *cover glass* yang diberi perekat.

Untuk hasil uji histopatologi insang pada ikan nila merah di analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan insang ikan nila merah selama penelitian maka dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif. Menurut Kakkilaya (2002), yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya.

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang sehingga mendapatkan hasil yang maksimal pada tingkat kerusakan jaringan.

Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria nekrosis, degenerasi otot (kerusakan serabut otot), pyknosis (perubahan inti otot), hialinasi (pecahnya serabut otot), edema (meningkatnya jumlah cairan antar jaringan) (Panigoro *et al.*, 2007).

Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut Raza'l (2008) sebagai berikut :

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

Tabel 3. Skoring kerusakan jaringan (Raza', 2008).

Nilai merah	Skoring	Persentase Kerusakan (%)
1		0-5%
2		6-25%
3		26-50%
4		>50%

4.7.5 Aktivitas Fagositosis

Berdasar pada penelitian Lukistyowati (2011), sampel darah ikan yang akan digunakan untuk memfagositosis bakteri dipersiapkan dengan cara sebagai berikut, sampel darah dengan koagulan EDTA (1:10) disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Bagian supernatant dibuang yang merupakan plasma dengan menggunakan mikropipet. Bagian tengah yang merupakan bafiquat berisi sel-sel polimorfonuklear (PMN) diambil dengan mikropipet sebanyak 50 µl dan diletakkan dalam mikroplate. 50µl darah ikan dicampur dengan 50 µl suspensi sel bakteri dan keduanya digoyang perlahan-lahan selama 1 menit untuk memastikan adanya kontak antara bakteri dan sel leukosit. Campuran antara darah ikan dengan suspensi bakteri diinkubasi dalam suhu ruangan selama 20 menit. 5µl campuran tersebut diletakkan pada gelas objek untuk dibuat preparat apus darah tipis. Selanjutnya dikering anginkan pada suhu ruangan dan setelah itu difiksasi dengan methanol selama 5 menit dan dikeringanginkan lagi. Preparat diwarnai dengan safranin 1% selama 30 menit, kemudian dibilas dengan akuades hingga bersih. Jumlah sel bakteri yang ditelan/fagosit oleh sel leukosit ikan diamati dengan menggunakan mikroskop pembesaran 1000x.

Berdasarkan Irianto *et al.*,(2004), suspensi sel ditetaskan pada objek glass dan diratakan, diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar (26°C). Objek glass kemudian dicuci dengan RPMI 1640+, selanjutnya ditambah 1,0 suspensi bakteri. Diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar (26°C). Kemudian object glass

dicuci 3x dengan RPMI 1640+, difiksasi dengan methanol 96% (v/v) dan dibiarkan selama 3–5 menit pada suhu kamar (26°C). Dikeringkan dan ditetesi dengan larutan giemsa, dibiarkan selama 20–30 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir. Object glass dihitung dengan perbesaran 400 x. Dihitung untuk determinasi perbandingan yang menelan bakteri. Fungsi fagositosis makrofag dihitung dengan rumus sebagai berikut :

4.8 Analisa Data

Analisa data hasil penelitian ini mempergunakan program SPSS 16 for windows. Data yang didapatkan dilanjutkan analisa keragaman menggunakan ANOVA sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian diharapkan rataannya berbeda antara perlakuan, sedangkan standar devisiasinya diharapkan tidak begitu berbeda antara perlakuan (homogen). Analisa ragam dilakukan untuk menguji pengaruh dosis ekstrak tinta sotong terhadap parameter uji, apakah ada pengaruhnya atau tidak terhadap parameter uji. Analisis histopatologi kerusakan insang dilakukan menggunakan analisis statistik skoring dengan metode semi kuantitatif. Ini digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya.

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Rendemen Ekstrak Tinta Sotong (*Sepia sp.*)

Sotong (*Sepia sp.*) memiliki kantong tinta yang panjang dan besar. Tinta yang terdapat dalam kantong sangat ditentukan oleh kondisi terakhir sebelum ditangkap, jika sebelum ditangkap sudah banyak tinta yang dikeluarkan maka hanya sedikit yang tersisa di kantong.

Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut methanol. Analisis rendemen dari ekstrak tinta berdasarkan perbandingan berat kantong (berisi tinta) sampel terhadap berat ekstrak tinta yang dihasilkan.

Hasil rendemen tinta dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata rata persentase rendemen ekstrak tinta sotong.

Ulangan	Berat Sotong (Gram)	Berat Kantong Tinta (Gram)	Berat Ekstrak (Gram)	% Rendemen
1	197.7	5.4	0.280 ± 0.22	5.20%
2	205.9	5.6	0.263 ± 0.69	4.71%
3	173.2	4.2	0.195 ± 1.04	4.66%
Rata-rata				4.86%

Keterangan : 1, 2, dan 3 merupakan ulangan

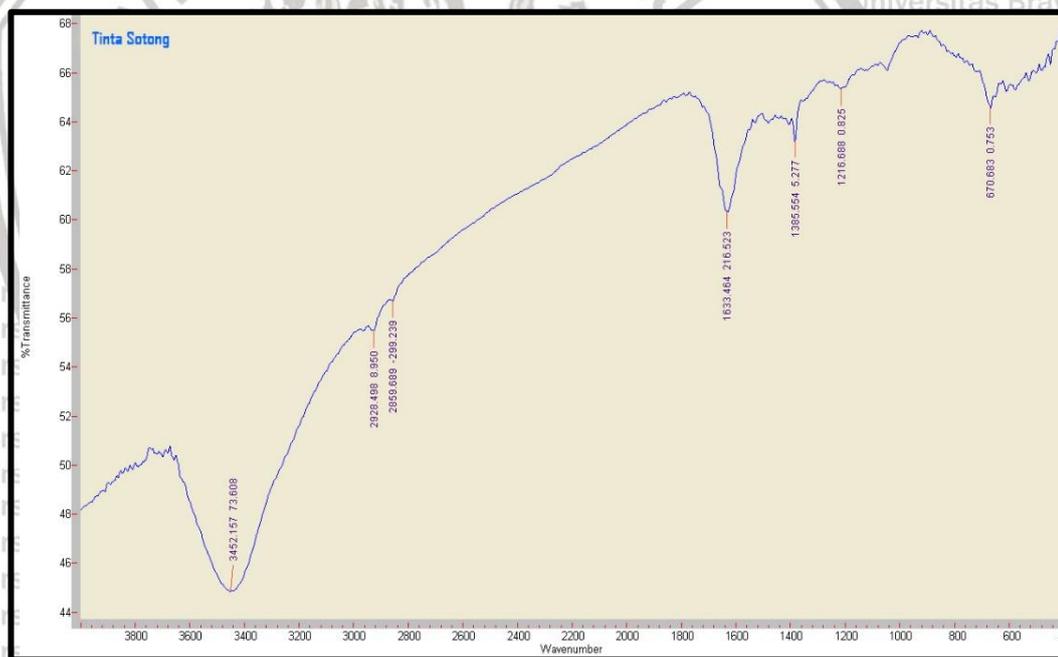
Berdasarkan tabel di atas, berat sotong yang digunakan pada penelitian ini yaitu pada sotong 1 memiliki berat 197.7 gram dan didapat berat kantong tinta sebesar 5.4 gram. Sotong 2 sebesar 205.9 dengan berat kantong sebesar 5.6 gram dan sotong 3 dengan berat 173.2 dengan berat kantong sebesar 4.2 gram.

Semakin berat sotong akan berbanding lurus dengan semakin beratnya bobot kantong tinta. Rendemen ekstrak yang didapat berturut turut adalah 0.280 ± 0.22gram; 0.263 ± 0.69gram; dan 0.195 ± 1.04. Rata rata persentase rendemen ekstrak tinta sotong yang didapat adalah 4.86%.

Rendemen ekstrak adalah perbandingan jumlah ekstrak dan hasilnya dinyatakan dalam persen. Tinta sotong (*Sepia sp.*) terdiri atas granula melanin dalam media yang kental tidak berwarna (Nair *et al.*, 2011). Pigmen melanin diolah dalam sel mature kelenjar tinta, terutama pada bagian dasar kantong tinta yang terus-menerus memproduksi tinta. Akhir proses pematangan, sel-sel kelenjar tinta menyimpannya dalam kantong tinta yang berperan sebagai penampung. Setiap kantong tinta sotong (*Sepia sp.*) mengandung ± 1 g melanin (Derby 2014).

5.2 Hasil Analisis FTIR Ekstrak Tinta Sotong

Hasil analisis spektroskopi FT-IR dari serbuk tinta sotong menunjukkan beberapa puncak serapan yang merupakan gugus fungsi. Seperti yang disajikan pada Gambar 11 dan dijelaskan pada Tabel 5 dibawah ini



Gambar 11. Hasil analisis spektroskopi FT-IR serbuk tinta sotong

Tabel 5. Bilangan gelombang dan gugus fungsi

Bilangan Gelombang	Gugus Fungsi
3452	Puncak vibrasi O-H atau N-H
2928 dan 2859	Puncak vibrasi dari kelompok C-H; Alifatik
1633	Model vibrasi ikatan cincin aromatik dari C=C dan C=N untuk memperkuat vibrasi utama.
1385	Memperkuat vibrasi C-H alifatik dan menunjukkan adanya vibrasi pada O-H Fenolik dan kelompok karboksil
1216	Memperkuat vibrasi C-H secara <i>in-plane</i> maupun <i>C-H out-of plane</i>
670	Memperkuat ikatan C-H pada cincin aromatik secara <i>out of plane</i>

Puncak vibrasi melebar diperlihatkan di daerah 3452 cm^{-1} yang menunjukkan bahwa pada daerah ini terdapat gugus O-H dan N-H, serapan pada bilangan gelombang 2928 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H sp^2 , serapan pada bilangan gelombang 1633 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan cincin aromatik dari C=C dan C=N, serapan yang muncul pada bilangan gelombang 1385 menunjukkan adanya vibrasi pada O-H fenolik dan kelompok karboksil, serapan yang muncul pada bilangan gelombang 1216 cm^{-1} menunjukkan bahwa dapat membantu memperkuat vibrasi C-H secara *in-plane* maupun *C-H out-of plane* dan serapan yang muncul pada bilangan gelombang 670 cm^{-1} membantu memperkuat ikatan C-H pada cincin aromatik secara *out of plane*.

5.3 Uji *Minimum Inhibiting Concentration* (MIC)

Uji MIC merupakan suatu uji untuk mengetahui dosis minimum ekstrak tinta Sotong (*Sepia sp.*) yang akan digunakan pada penelitian ini. Pengujian MIC menggunakan perlakuan ekstrak dengan dosis yang berbeda, kontrol positif menggunakan antibiotik oxytetracyclin dengan dosis 5 ppm dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak maupun antibiotik.

Hasil uji MIC yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan pada setiap perlakuan setelah dilakukan pengukuran nilai merahi absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang sebesar 600 nm. Nilai merahi absorbansi dihitung pada saat media sudah diberikan perlakuan, bakteri dan inkubasi selama 24 jam. Hasil dari uji MIC ekstrak tinta Sotong (*Sepia sp.*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hasil dari uji MIC pada Tabel 6. menunjukkan bahwa nilai merahi rata-rata absorbansi tertinggi diperoleh pada konsentrasi 50 ppm yaitu sebesar 1.716 nm dan absorbansi terendah diperoleh pada dosis perlakuan 300 ppm sebesar 0.841 nm sedangkan pada tabung McFarland senila merahi 0.933 nm. Jumlah sel bakteri dapat diukur dengan mengetahui kekeruhan atau turbiditas kultur, apabila semakin keruh suatu media kultur maka jumlah selnya semakin banyak (Munfaati, *et al.*, 2015). Nilai OD dapat menunjukkan besarnya cahaya yang dapat diserap oleh sel dinyatakan berbanding lurus dengan jumlah sel yang ada, sehingga dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari ekstrak yang diberikan maka semakin besar aktivitas penghambatannya. Bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu zat antibakteri maka semakin tinggi daya antibakterinya (Rahmawati, *et al.*, 2015).

Tabel 6. Hasil Uji MIC Ekstrak Tinta Sotong (*Sepia sp.*) terhadap bakteri *A. hydrophila*.

Perlakuan (ppm)	Absorbance (nm)			Rata-rata	STD
	1	2	3		
K-	2.109	1.983	2.042	2.044	0.06
50	1.713	1.738	1.698	1.716	0.02
100	1.610	1.579	1.586	1.592	0.02
150	1.392	1.406	1.421	1.406	0.01
200	1.136	1.175	1.132	1.148	0.02
250	0.939	0.916	0.945	0.933	0.08
300	0.837	0.847	0.839	0.841	0.01
K+ (McFarland)	0.911	0.988	1.079	0.993	0.02

Pada **Tabel 6** menunjukkan bahwa dengan adanya pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) maka pertumbuhan dari bakteri *A. hydrophila* mengalami penghambatan seiring peningkatan konsentrasi. Tabel diatas juga menunjukkan hasil pengukuran dengan alat spektrofotometer didapatkan hasil MIC senila merahi konsentrasi 250 ppm. Hal ini ditunjukkan dengan nila merahi absorbansi pada perlakuan konsentrasi tersebut yaitu 0.933 nm, yang lebih kecil dari nila merahi absorbansi standar Mc Farland yaitu 0.993 nm sedangkan pada perlakuan konsentrasi 200 ppm dengan nila merahi absorbansi rata-rata yaitu 1.148 nm telah melewati standar Mc Farland. Hasil ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 250 ppm telah terjadi penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan uji MIC, ditentukan dosis yang akan dipakai dalam penelitian ini menggunakan dosis K+ (Kontrol positif menggunakan antibiotik oxytetracyclin), 250 ppm, 300ppm 350 ppm dan K- (kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak tinta sotong dan antibiotik oxytetracyclin).

5.3 Uji LD50 Bakteri *A. hydrophila*

Uji LD50 bakteri *A. hydrophila* dilakukan untuk mendapatkan dosis letal bakteri *A. hydrophila* yang dapat membunuh 50% populasi organisme uji. Total kepadatan bakteri yang dipakai adalah 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml dan 10^8 cfu/ml. Data mortalitas ikan selama pengujian LD 50 bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) dapat dilihat pada Tabel 7 dibawah.

Tabel 7. Mortalitas ikan selama pengujian LD 50 bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*)

WAKTU DOSIS	12	24	36	48	60	72	TOTAL IKAN MATI
10^6	10	10	10	10	9	9	1
10^7	10	10	8	8	6	5	5
10^8	10	8	7	5	5	3	7

Note : Jumlah ikan uji per dosis adalah 10 ekor

Berdasarkan data pada Tabel 6 diatas, mortalitas ikan nila merah (*O. niloticus*) selama masa ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila* terendah pada kepadatan 10^6 cfu/ml dengan kematian ikan 1 ekor. Sedangkan tertinggi yaitu pada dosis 10^8 cfu/ml dengan kematian ikan sebesar 7 ekor. Pada perlakuan dengan kepadatan 10^7 cfu/ml didapat total kematian 50% dari populasi ikan yaitu 5 ekor dari 10 ekor ikan. Menurut Wahjuningrum *et al.*, (2013), kepadatan bakteri *A. hydrophila* tertentu dalam uji LD50 yang dapat mematikan populasi ikan uji sebanyak 50% selama masa uji merupakan kepadatan LD50. Hal ini dapat dikatakan bahwa LD50 bakteri *A. hydrophila* berada pada kepadatan 10^7 cfu/ml.

Berdasarkan Tabel 6, mortalitas ikan selama uji LD 50 diketahui bahwa semakin tinggi kepadatan bakteri yang dipaparkan pada ikan dan semakin lamanya waktu pemaparan menyebabkan peningkatkan mortalitas ikan uji. Hal ini dapat dikatakan bahwa tingkat patogenitas bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) semakin tinggi seiring peningkatan dosis kepadatan dan waktu pemaparan

5.4 Perlakuan Inti Penelitian

5.4.1 Survival Rate

Tabel dibawah menyajikan hasil perhitungan persentase tingkat kelangsungan hidup ikan nila merah setelah perlakuan pemberian bakteri *A. hydrophila* selama penelitian disajikan pada Tabel 8 di bawah ini. Berdasarkan tabel tersebut dapat dijelaskan bahwa rata-rata kelangsungan hidup ikan nila merah tertinggi didapatkan pada pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) perlakuan dosis 350 ppm dengan tingkat kelangsungan hidup 87% dan terendah adalah pada perlakuan dosis 250 ppm dengan tingkat kelangsungan hidup 70%.

Tabel 8. Persentase tingkat kelangsungan hidup ikan nila merah setelah perlakuan pemberian bakteri *A. hydrophila* selama penelitian.

Perlakuan (ppm)	Jam			
	0	48	72	96
250	100%	93%	90%	70%
300	100%	93%	87%	80%
350	100%	97%	87%	87%
Positif	100%	100%	100%	97%
Negatif	100%	100%	73%	43%

Menurut Chopra *et al.*, (2000), *A. hydrophila* termasuk ke dalam kelompok bakteri patogen dengan virulensi yang tinggi. Tingkat virulensi bakteri tersebut ditentukan oleh kemampuan bakteri menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Sebagai faktor-faktor virulensi, kitinase, lesitinase, dan hemolysin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila*, bekerja dengan mendegradasi jaringan dan menimbulkan luka serta pendarahan pada ikan inang (Del Coral *et al.*,1990). Ikan-ikan yang terinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya mengalami pendarahan yang meluas pada permukaan kulit (*Haemorrhagic septicemia*), yang diikuti dengan timbulnya luka terbuka (ulcer) pada permukaan tubuh atau hingga ke dalam jaringan.

Data pada Tabel 7 di atas dapat dilihat jika ikan yang diberikan perlakuan dosis ekstrak tinta sotong tingkat keberlangsungan hidupnya berkisar antara 70%-87%. Ikan dengan perlakuan ekstrak tinta sotong memiliki tingkat keberlangsungan hidup yang baik dan mendekati kontrol positif yang menjadi indikator ikan sehat. Hal ini dikarenakan ekstrak tinta sotong mengandung melanin. Tinta sotong bersifat alkaloid, alkaloid merupakan kelompok terbesar dari metabolit sekunder yang beratom nitrogen dan bersifat basa, beberapa alkaloid memiliki manfaat dalam proses pengobatan. Tinda sotong dan tinta cumi hampir sama maka dengan itu dalam Derby (2014), Tinta cumi memiliki kemampuan sebagai *antimicrobial* karena kandungan Kandungan asam 9-oktadekenoat / asam

oleat dalam ekstrak mentah tinta cumi bisa membunuh bakteri secara langsung dan mempertahankan kondisi pH asam untuk bakteri. Asam oleat dalam tinta cumi bisa menempel di membran bakteri dan merusak struktur dinding sel. Aktivitas ini akan membunuh bakteri. Dalam penelitian ini juga dapat dilihat bahwa peningkatan dosis ekstrak yang diberikan, maka tingkat kelangsungan hidup ikan juga semakin naik.

Ikan tanpa pemberian ekstrak tinta sotong (kontrol negatif) memiliki tingkat keberlangsungan hidup yang rendah yaitu 43% setelah 4 minggu perlakuan. Hal ini dikarenakan system imun ikan tidak mendapat support sebagaimana halnya ikan yang diberi ekstrak tinta sotong. Sehingga, bakteri dengan mudah menginfeksi ikan dan menyebabkan kematian. Serangan bakteri *A. hydrophila* dikenal dengan nama *Motil A. Septicemia* (MAS) atau penyakit bercak merah dimana dapat mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi (80-100%) dalam waktu 1-2 minggu (Cipriano, 2001; Musallamah *et al.*, 2011).

5.4.2 Leukosit

Leukosit memiliki bermacam-macam fungsi yang erat kaitannya untuk menghilangkan benda asing (termasuk mikroorganisme patogen). Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah leukosit adalah kondisi dan kesehatan tubuh ikan.

Jumlah total leukosit merupakan salah satu indikator adanya infeksi tertentu pada ikan. Hasil pengamatan total leukosit ikan nila merah (*O. niloticus*) selama penelitian disajikan pada Gambar 9 di bawah :

Tabel 9. Nila merahi leukosit ikan nila merah selama penelitian.

Perlakuan (ppm)	Total Leukosit (x10 ⁵ sel/ml)			
	0	48	72	96
250	2.76	2.27	2.58	1.95
300	2.51	2.31	2.47	2.18
350	2.34	2.23	2.49	2.56
Positif	1.38	1.35	1.37	1.44
Negatif	1.42	1.56	1.69	2.74

Pada perlakuan 250 ppm, didapat nilai merahi leukosit saat pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) sebesar 2.76×10^5 sel/ml. Setelah 48 jam pemberian ekstrak, nilai merahi leukosit mengalami penurunan menjadi 2.27×10^5 sel/ml. Setelah 72 jam, ikan diberikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sell/ml dan didapat nilai merahi leukosit mengalami peningkatan menjadi sebesar 2.58×10^5 sel/ml dan setelah 96 jam menurun menjadi sebesar 1.95×10^5 sel/ml.

Pada perlakuan 300 ppm, didapat nilai merahi leukosit saat pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) sebesar 2.51×10^5 sel/ml. Setelah 48 jam pemberian ekstrak, nilai merahi leukosit mengalami penurunan menjadi 2.31×10^5 sel/ml. Setelah 72 jam, ikan diberikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 cfu/ml dan didapat nilai merahi leukosit mengalami peningkatan menjadi sebesar 2.47×10^5 sel/ml dan setelah 96 jam menurun menjadi sebesar 2.18×10^5 sel/ml.

Pada perlakuan 350 ppm, didapat nilai merahi leukosit saat pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) sebesar 2.34×10^5 sel/ml. Setelah 48 jam pemberian ekstrak, nilai merahi leukosit mengalami penurunan menjadi 2.23×10^5 sel/ml. Setelah 72 jam, ikan diberikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 cfu/ml dan didapat nilai merahi leukosit mengalami peningkatan menjadi sebesar 2.49×10^5 sel/ml dan setelah 96 jam meningkat menjadi sebesar 2.56×10^5 sel/ml.

Pada perlakuan kontrol positif, didapat nilai merahi leukosit saat pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) sebesar 1.38×10^5 sel/ml. Setelah 48 jam pemberian ekstrak, nilai merahi leukosit mengalami penurunan menjadi 1.35×10^5 sel/ml. Setelah 72 jam, ikan diberikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 cfu/ml dan didapat nilai merahi leukosit mengalami

peningkatan menjadi sebesar 1.37×10^5 sel/ml dan setelah 96 jam meningkat menjadi sebesar 1.44×10^5 sel/ml.

Pada perlakuan kontrol negatif, didapat nilai merahi leukosit saat pemberian ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) sebesar 1.42×10^5 sel/ml. Setelah 48 jam pemberian ekstrak, nilai merahi leukosit mengalami penurunan menjadi 1.56×10^5 sel/ml, setelah 72 jam, ikan diberikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 cfu/ml dan didapat nilai merahi leukosit mengalami peningkatan menjadi sebesar 2.69×10^5 sel/ml dan setelah 96 jam meningkat menjadi sebesar 2.74×10^5 sel/ml.

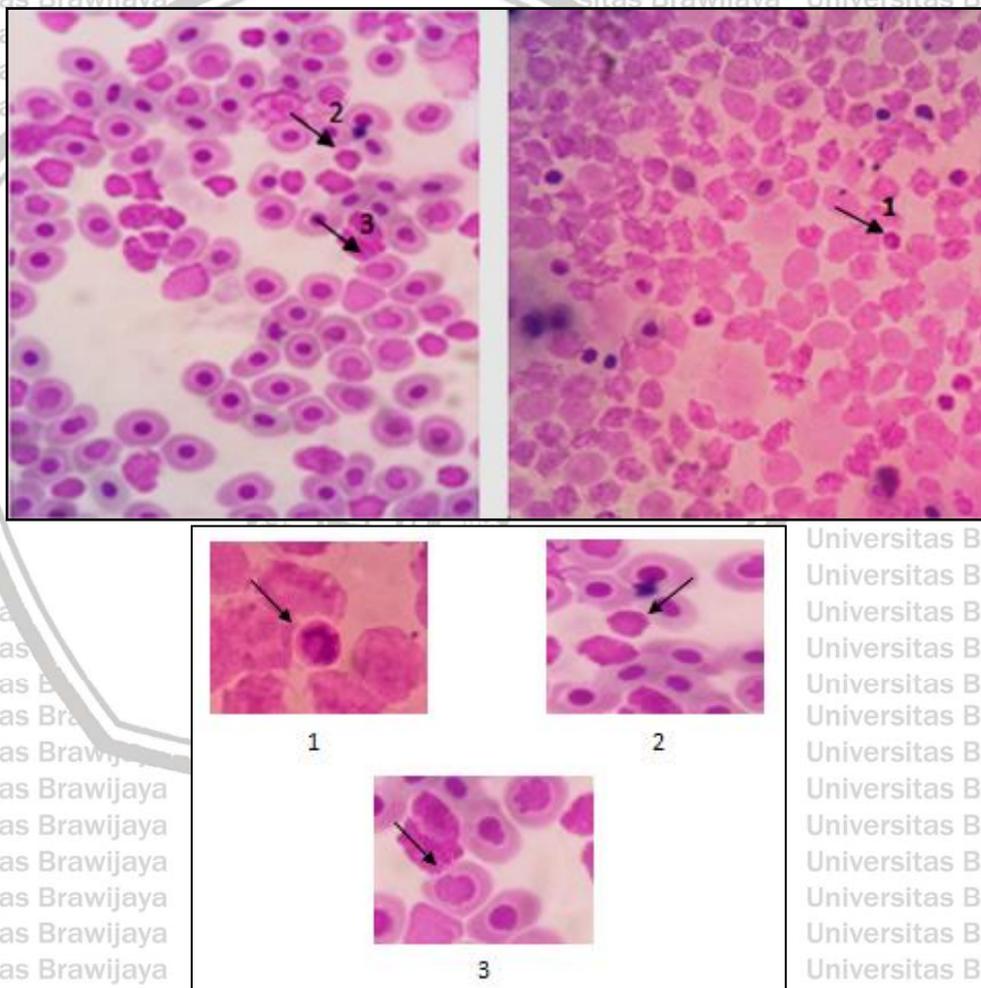
Berdasarkan data di atas, pada setiap perlakuan pemberian ekstrak, terjadi kenaikan kadar leukosit. Namun, penurunan jumlah leukosit terjadi setelah 48 jam dibandingkan dengan awal pemberian ekstrak. Hal ini dapat dikatakan bahwa system pertahanan tubuh mampu mengkonfirmasi ekstrak yang masuk ke dalam tubuh ikan dalam waktu 48 jam. Walaupun demikian, perlu adanya penelitian lanjutan terkait hubungan tersebut.

Perbedaan total leukosit pada tiap perlakuan menunjukkan adanya perbedaan pertahanan tubuh pada ikan, seperti yang dikemukakan oleh Alexander *et al.*, (2010), bahwa hasil produksi leukosit akan diarahkan menuju daerah terinfeksi sebagai pertahanan ikan. Naiknya jumlah leukosit merupakan indikator adanya infeksi yang mengakibatkan terjadinya inflamasi. Kemampuan leukosit untuk membunuh mikroba patogen merupakan salah satu mekanisme perlindungan paling penting dalam tubuh ikan dengan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan nitrogen yang dianggap beracun untuk bakteri patogen pada ikan. Sel darah putih mampu memproteksi adanya infeksi yang dihasilkan oleh mikroba.

5.4.3 Differensial Leukosit

Fungsi utama differensial leukosit adalah merusak bahan-bahan infeksius dan toksis melalui proses fagositosis dengan membentuk antibody (Marentek *et al.*,2013).

Differensial leukosit terdiri dari neutrophil, monosit dan limposit yang berperan terhadap sistem imun bawaan (*innate immunity*) yang berfungsi melawan segala jenis pathogen yang masuk keedalam tubuh ikan meskipun tubuh belum pernah terpapar oleh zat tersebut (Purwaningsih, 2014). Gambaran bentuk sel differensial leukosit dapat dilihat pada Gambar 11.

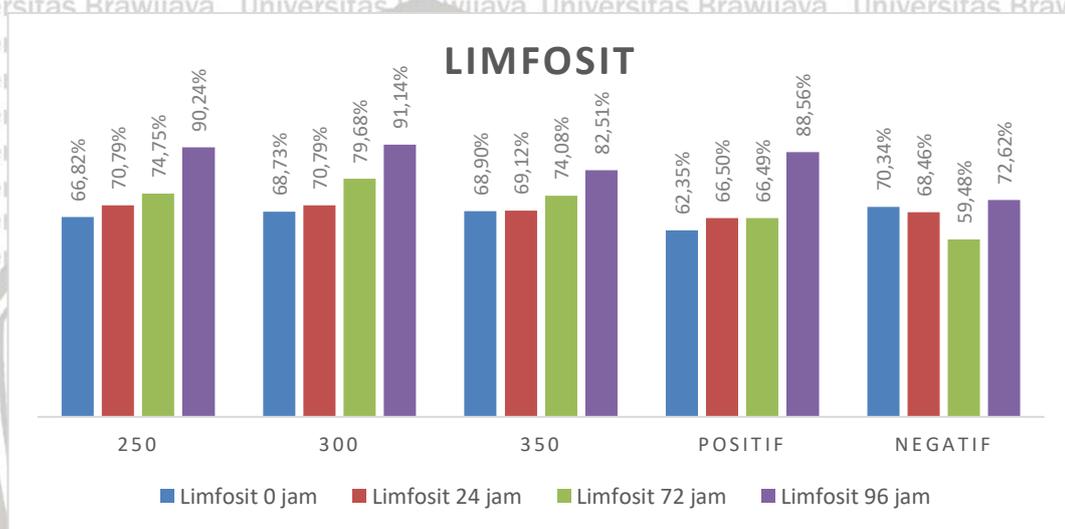


Gambar 12. Analisa Diferensial leukosit. (1) Neutrofil, (2) Limfosit, dan (3) Monosit.

A. Limfosit

Peningkatan limfosit ini diduga terjadi karena adanya senyawa bioaktif tertentu pada ekstrak tinta sotong yang dianggap asing oleh tubuh ikan nila merah sehingga menyebabkan limfosit berproliferasi untuk mengenali senyawa tersebut.

Bone *et al.*, (2013) bahwa sejumlah senyawa bioaktif pada sebuah ekstrak yang terbukti bermanfaat sebagai imunostimulan dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan aktivasi makrofag aktivasi makrofag



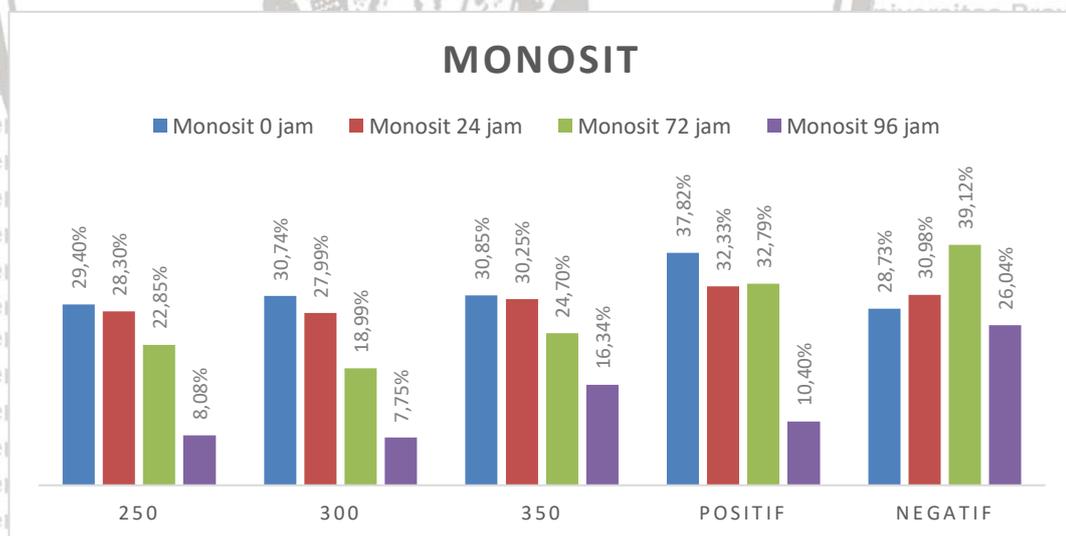
Gambar 13. Hasil pengamatan (%) limfosit Ikan Nila merah (*O. niloticus*) selama Penelitian

Pada gambar diatas, hasil data menunjukkan presentase limfosit meningkat pada setiap perlakuan. Menurut Ilmayati *et al.*, (2015), mekanisme kerja sel limfosit dalam peranannya sebagai sistem kekebalan tubuh berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh dengan cara mengenali antigen melalui reseptor spesifik pada membran sel. Pada limfosit T, ketika tubuh atau jaringan terpapar oleh antigen, maka limfosit T tidak mampu mengenali antigen tersebut sendirian tanpa melalui reseptor spesifik. Dengan adanya sel reseptor spesifik ini memungkinkan sel T lebih cepat mengenali antigen yang ada sehingga langsung memberikan reaksi kekebalan dan menstimulasi sel B untuk mengeluarkan antibodi.

Meningkatnya nilai merahi limfosit setiap perlakuan dosis setelah 72 ini jam diduga karena adanya respon imun non spesifik dari dalam tubuh ikan karena adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* sedangkan rendahnya nilai merahi limposit pada ikan kontrol setelah infeksi disebabkan sistem imun ikan secara non spesifik masih bekerja dengan pengenalan antigen yang masuk. Purwaningsih, *et al.*, (2014) menjelaskan rendahnya nilai merahi limposit pada darah menunjukkan rendahnya antibodi ikan yang dipelihara sehingga ikan akan cepat steres dan terserang penyakit. Sehingga dalam parameter diffrensial leukosit nilai merahi yang menjadi acuan adalah tinggi rendahnya nilai merahi limposit yang diperoleh.

B. Monosit

Monosit dalam melaksanakan fungsi sistem imun berperan sebagai makrofag yakni menelan dan menghancurkan sel, mikroorganisme dan benda asing yang bersifat pathogen (Isroli, S. *et al.*, 2009).



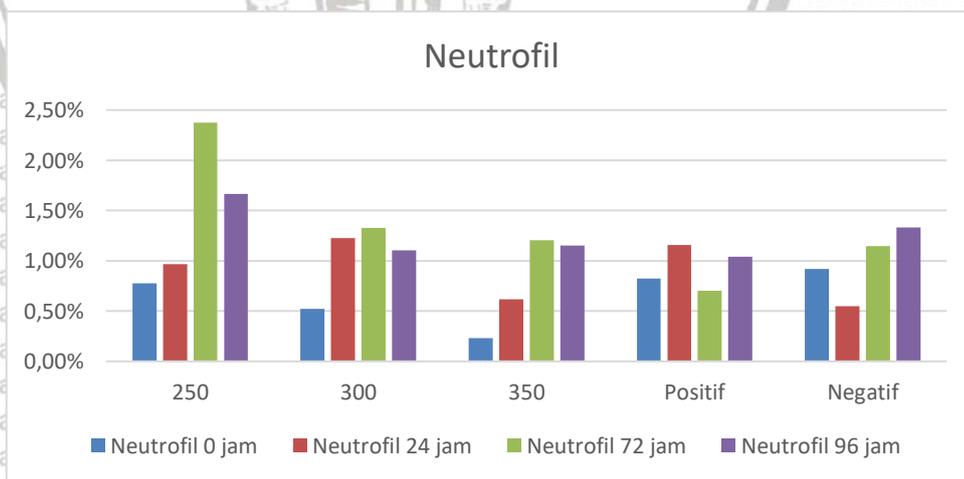
Gambar 14. Hasil Pengamatan (%) Monosit Ikan Nila merah (*O. niloticus*) Selama Penelitian Berbeda dengan limfosit, hasil pengamatan monosit pada gambar 14 diatas menunjukkan adanya penurunan persentase monosit pada ikan nila merah di setiap perlakuan dosis ekstrak (250ppm, 300ppm dan 350ppm). Fujaya (2004)

menjelaskan bahwa monosit akan meninggalkan pembuluh darah menuju daerah yang terinfeksi dan memfagosit bakteri karena monosit memiliki kemampuan memfagosit lebih besar dari pada neutrofil. Terjadinya penurunan ini diduga dikarenakan benda asing yang masuk kedalam tubuh ikan bukan berupa antigen infeksius sehingga peran kemungkinan tubuh ikan merubah sel leukosit menjadi sel lain yang lebih sesuai untuk merespon antigen yang berupa senyawa.

Setelah 48 jam, ikan diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophyla* dan diamati hematologinya pada 72 jam masa pemeliharaan. Walaupun demikian, penurunan persentase monosit terus terjadi. Hal ini diduga karena system imun ikan nila merah yang sebelumnya telah diberi imunostimulan ekstrak tinta sotong menjadi lebih selektif sehingga sel imun yang diaktivasi bukanlah diprioritaskan pada sel monosit.

C. Neutrofil

Persentase neutrophil akan mengalami peningkatan ketika terdapat penyakit infeksi bakteri dalam tubuh (Napirah *et al.*, 2013).



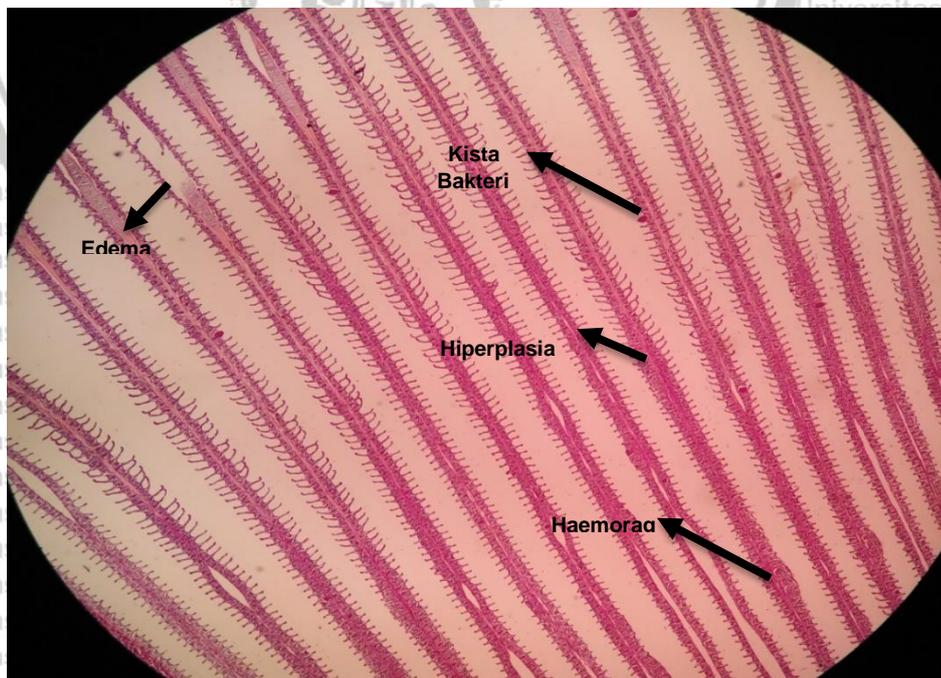
Gambar 15. Hasil pengamatan (%) neutrofil ikan nila merah selama penelitian

Hasil pengamatan pada gambar 15 di atas menunjukkan bahwa jumlah neutrofil makin meningkat pada setiap perlakuan. Dalam tubuh ikan telah terbentuk

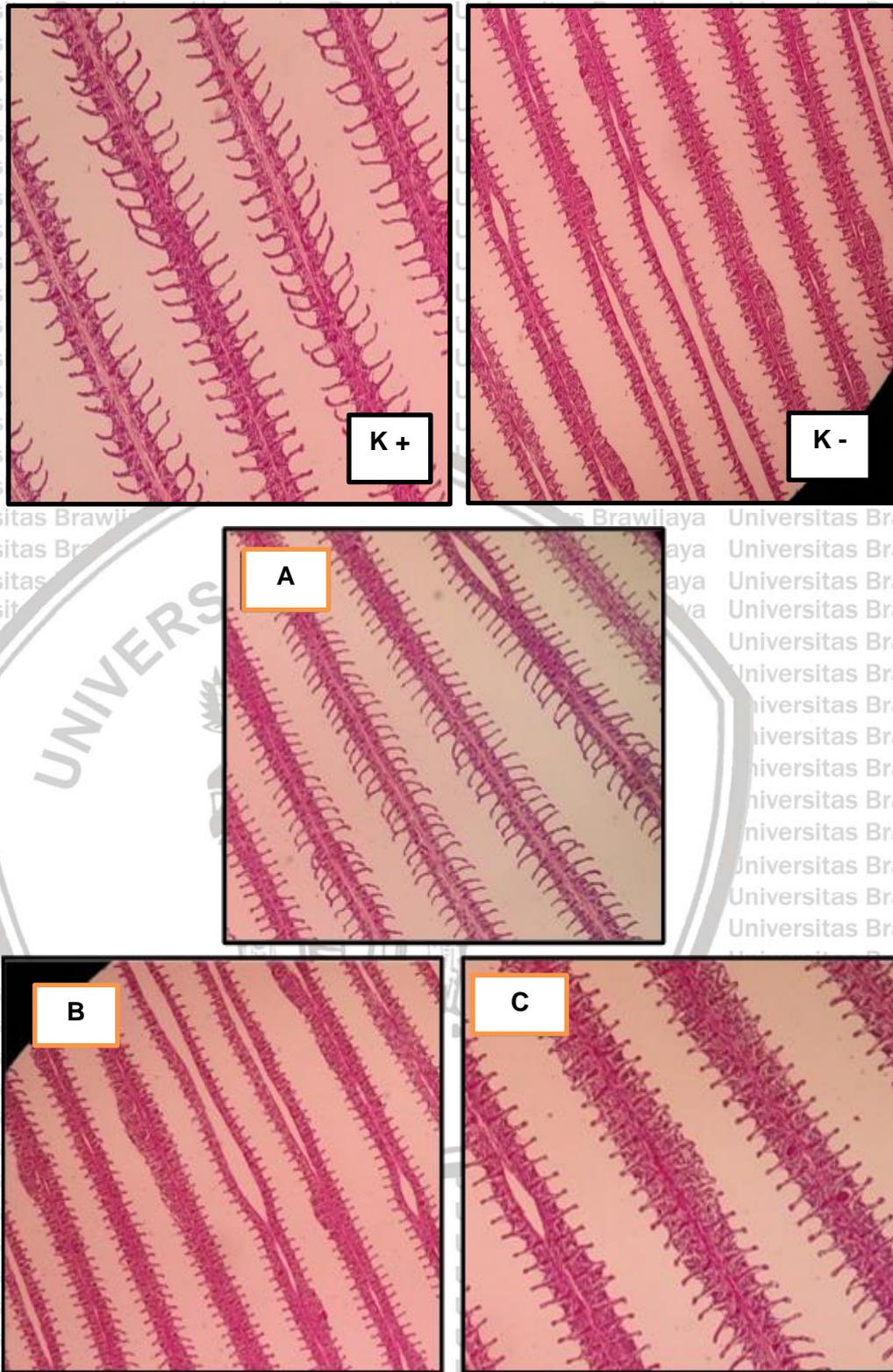
sistem pertahanan tubuh sehingga saat terjadi infeksi, netrofil menuju tempat terjadinya infeksi (Sukenda 2008). Neutrofil yang teraktivasi memiliki kemampuan menghasilkan jenis oksigen (ROS) dan nitrogen (RNS) relative (reactive oxygen dan nitrogen species) yang bersifat toksik terhadap berbagai spesies bakteri, parasit dan protozoa (Himaya *et al.*, 2010). Berdasarkan literatur dan data yang tersaji pada gambar 12, dapat dikatakan bahwa system imun pada tubuh ikan yang diberi imunostimulan ekstrak tinta sotong lebih cenderung menyebabkan aktivasi sel neutrophil dalam merespon adanya infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*.

5.5 Histopatologi

Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan insang ikan nila merah selama penelitian maka dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif. Menurut Kakkilaya (2002), yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Gambaran kerusakan yang terjadi selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Beberapa kerusakan yang terjadi pada insang ikan nila merah selama penelitian (Perbesaran 40x)



Gambar 17. Gambar K+, K-, A, B, dan C perubahan gambaran jaringan histopatologi insang ikan nila merah pada perlakuan K+ (Kontrol Positif), K- (Kontrol Negatif), A (Perlakuan ekstrak 250 ppm), dan B (Perlakuan ekstrak 300 ppm) dan C (Perlakuan ekstrak 350 ppm) (Perbesaran 40x).

Berdasarkan hasil histopatologi, selanjutnya dilakukan uji skoring kerusakan histopatologi insang ikan. pada penelitian tahap ini didapat nilai merah skoring pada masing masing kerusakan. Pemberian skor dilakukan menurut Raza'1 (2008) yaitu 1-4 dimana skor 1 untuk presentase kerusakan 0-5%, skor 2 untuk presentase kerusakan 6-25%, skor 3 untuk presentase kerusakan 26-50%, dan skor 4 untuk presentase kerusakan >50%. Hasil skoring kerusakan insang ikan nilai merah pada penelitian ini tersaji pada Tabel 10.

Tabel 10. Presentase tingkat kerusakan pada jaringan insang ikan nila merah selama peneltian.

Kerusakan	Perlakuan	Rata-rata	STD
Hiperplasia	250	2,6	0,89
	300	3	0,55
	350	3,6	0,55
	Positif	2,2	0,84
	Negatif	3,8	0,45
Haemoragi	250	1,8	0,84
	300	2,2	0,84
	350	2	0,71
	Positif	1,6	0,89
	Negatif	3,2	0,84
Edema	250	2	1,00
	300	2,4	0,89
	350	2,4	1,14
	Positif	2,2	0,84
	Negatif	3,8	0,45

Kerusakan hiperplasia adalah pembengkakan pada jaringan atau sel karena bertambahnya jumlah sel. Kerusakan hiperplasia dapat diakibatkan oleh infeksi bakteri, virus dan parasit serta bahan beracun lainnya yang mengakibatkan terjadinya kerusakan hiperplasia pada jaringan insang Ikan Nila merah (O.

niloticus). Routledge (1978) dalam Mahasri *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa, hiperplasia diantaranya disebabkan oleh adanya infestasi parasit dan toksin. Zat spesifik (mucus spesifik) *Zoothamnium* sp. dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada organ. Hiperplasia terjadi pada tingkat iritasi dengan ujung filament yang memperlihatkan bentuk seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*), atau penebalan jaringan epitelium yang terletak disekitar dasar lamella (basal hiperplasia). Hiperplasia ini dapat terjadi akibat stimulasi kimia dari polutan-polutan, infeksi parasit, bakteri, desinfeksi asam pantotenat dan bentuk pencemaran lingkungan yang lain misalnya pH yang terendah (Feist, 2002).

Hemoragi adalah adanya perdarahan pada suatu organ. Ikan air tawar, seperti ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan Lele (*Ictalurus punctatus*), ikan Gurame (*Osfronemus goremi* Lac.), dan ikan Nila merah (*O. niloticus*) yang terinfeksi *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis salah satunya adalah adanya hemoragi pada organ insang yang dapat diidentifikasi dari adanya eritrosit pada preparat histopatologinya (Badjoeri, 2008; Tantu *et al.*, 2013).

Edema merupakan bentuk patologi karena adanya penumpukan cairan pada rongga-rongga antar serabut otot. Edema akan menyebabkan lokasi antar serabut menjauh dan meregang (Hibiya 1995). Edema adalah meningkatnya volume cairan ekstraseluler dan ekstraseluler disertai dengan penimbunan cairan ini di dalam sela-sela jaringan dan rongga serosa (Saleh 1979). Guyton dan Hall (1996) dalam Pazra (2008) menyatakan bahwa penyebab dari edema adalah meningkatnya tekanan hidrostatik intra vaskula sehingga menimbulkan perembesan cairan plasma darah keluar dan masuk ke dalam ruang interstisium.

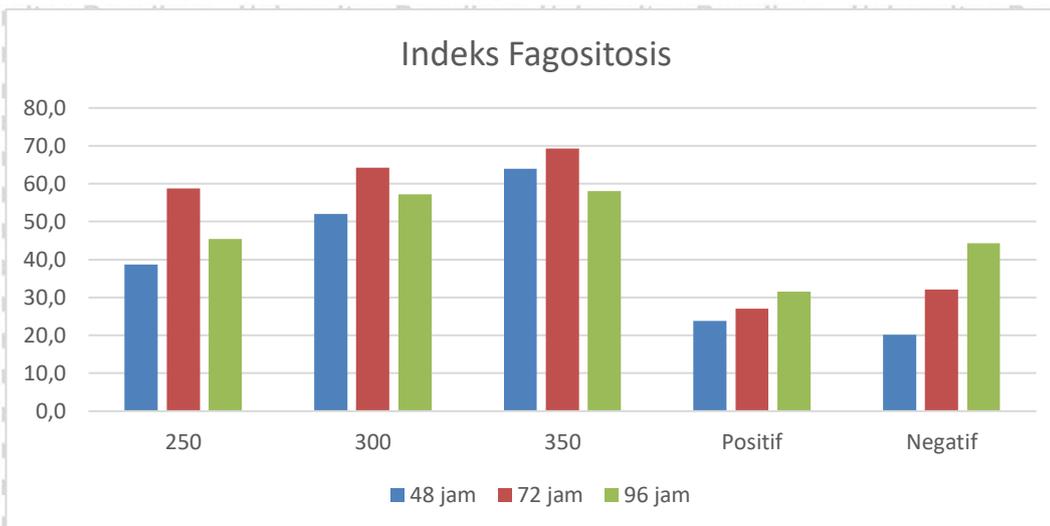
Kondisi peningkatan tekanan hidrostatik sering ditemukan pada pembuluh vena dan edema sebagai resiko paska kongesti.

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa jenis kerusakan yang terjadi terdiri dari 3 jenis yaitu hiperplasia, hemoragi dan edema. Pada masing masing

jenis kerusakan, nilai merah tertinggi terdapat pada kontrol negatif. Sedangkan terendah pada kontrol positif. Pada masing-masing jenis kerusakan juga terdapat fluktuasi status kerusakan. Pada perlakuan dosis 250 ppm merupakan dosis terbaik yang memiliki nilai merah yang mendekati kontrol positif. Sedangkan dosis 300 masih tinggi. Hal ini diduga karena dosis yang masih kurang dalam memperbaiki kondisi kesehatan histopatologi. Sedangkan dosis 350 ppm memiliki nilai merah skoring yang tinggi. Hal ini diduga karena efek toksisitas ekstrak tinta sotong. Dosis imunostimulan yang tinggi dapat menekan mekanisme pertahanan dan dosis yang rendah bisa tidak efektif atau tidak cukup untuk memberikan respon imun (Jasmanidar, 2009).

5.6 Indeks Fagositosis

Fagositosis adalah proses penyerapan dan eliminasi mikroba atau partikel lain oleh sel-sel khusus yang disebut fagosit. Fagosit adalah sel-sel darah putih atau sel-sel yang berasal dari sel-sel darah putih tersebut, yang terdapat di dalam aliran darah. Di dalam proses penghancuran bakteri atau kuman, fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau virus berada. Peningkatan kekebalan tubuh dapat diketahui dari aktivitas sel fagosit dari hemosit. Sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan (Brown, 2000 dalam Amrullah, 2004). Data pengamatan indeks fagositosis selama penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah.



Gambar 18. Indeks Fagositosis Ikan Nila merah Selama Penelitian

Berdasarkan gambar di atas, peningkatan indeks fagositosis pada masing-masing perlakuan pemberian ekstrak terjadi pada 72 jam masa pemeliharaan yaitu pada 24 jam setelah ikan diinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Pada control positif dan negative juga terjadi peningkatan. Hal ini diduga akibat respon imun ikan dalam proses adaptasi dan pengenalan ekstrak. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Tingginya nilai merahi aktivitas fagositosis mengindikasikan bahwa bahan yang diberikan dapat meningkatkan respon imun non spesifik pada ikan yang terinfeksi bakteri patogen sehingga merangsang kerja sel fagositosis yang mempunyai fungsi ganda sebagai sel pencernaan dan sel detentif yang menelan organism asing (Purwaningsih *et al.*, 2014). Setelah diinfeksi oleh bakteri, nilai merahi indeks fagositosis semakin meningkat seiring meningkatnya dosis ekstrak yang diberikan. Hal ini diduga bahwa system imun ikan sedang merespon adanya dua masukan asing yaitu dosis fraksi dan infeksi. Indeks fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan kontrol negatif diduga system imun ikan dalam merespon infeksi bakteri didukung oleh ekstrak tinta sotong yang berperan sebagai imunostimulan. Hal ini dibuktikan setelah 96 jam pemeliharaan, nilai

merahi indeks fagositosis menurun yang menandakan bahwa sel sel fagosit ikan berangsur selesai dalam memakan sel bakteri yang masuk sehingga dengan begitu maka indeks fagositosis menjadi menurun. Namun pada perlakuan tanpa pemberian dosis ekstrak, indeks fagositosis semakin meningkat yang mana dapat dikatakan proses fagositosis masih berlangsung. Putri *et al.*, (2013) juga menyatakan bahwa mekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang sistem imun tubuh adalah dengan cara meningkatkan aktivitas sel-sel fagosit. Selain dipengaruhi oleh jumlah leukosit, aktivitas fagositosis juga dipengaruhi oleh dosis fraksi, dimana dosis aplikasi pemberian imunostimulan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi peningkatan respon imun.

5.7 Parameter Penunjang

5.7.1 Pengamatan Kualitas Air

Kondisi kualitas air media pemeliharaan merupakan kunci utama terkait perubahan kondisi ikan, kondisi air yang baik dan memenuhi persyaratan dapat menekan terjadinya stress atau bahkan serangan penyakit. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO) dimana pengukuran dilakukan 2 kali dalam sehari yaitu pagi dan sore hari. Untuk mempertahankan kualitas air dilakukan pergantian air 3 hari sekali sebanyak 30% dari volume. Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Nila merah Sebelum Dan Sesudah Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

No	Parameter	Kisaran parameter pemeliharaan	Akbar <i>et al.</i> ,(2010)
1	Suhu	25 °C – 26 °C	22 °C – 37°C
2	pH	7.0 – 7.5	6.5 – 8
3	Oksigen Terlarut	6.5 mg/l – 7.7 mg/l	> 4 mg/l

Pada tabel diatas dapat dilihat bahwa hasil nila merahi kualitas air media pemeliharaan selama pemeliharaan menunjukkan nila merahi yang memenuhi syarat sehingga tidak mempengaruhi kondisi fisiologis ikan. Boyd (1979), menyatakan kandungan kualitas air hasil metabolisme yang meningkat cenderung menyebabkan gangguan yang bersifat fisiologis dan memicu stress pada ikan, sehingga perlu dilakukan monitoring secara berkala selama pemeliharaan.



6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- Berdasarkan hasil penelitian tingkat kelangsungan hidup (Survival rate) didapat perlakuan dosis 250 ppm merupakan dosis terbaik dengan tingkat kelangsungan hidup 70%.
- Pemberian ekstrak tinta sotong sebelum diinfeksi menyebabkan naiknya kadar leukosit dan setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*, kadar leukosit mengalami penurunan yang lebih cepat dibandingkan dengan kontrol negatif. Begitu pula hasil uji diferensial leukosit, dan aktivitas fagositosis, lebih mendekati hasil kontrol positif (ikan sehat).
- Secara histopatologis, pemberian ekstrak tinta sotong sebelum diinfeksi tidak berpengaruh terhadap kondisi histopatologis ikan nila merah, sedangkan yang tidak diberikan perlakuan ekstrak dan dipapar dengan bakteri *Aeromonas hydrophilla*, terdapat beberapa kerusakan yakni Hiperplasia , Haemoragi, dan Edema. Pemberian ekstrak tinta sotong pada ikan nila merah mampu mempercepat penurunan kerusakan histopatologi yang disebabkan infeksi bakteri.

6.2. Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas ekstrak tinta sotong terhadap ikan nila merah (*O. niloticus*) untuk menentukan dosis maksimal yang aman serta menentukan metode yang efektif dan efisien dalam pemberian ekstrak tinta sotong pada ikan nila merah (*O. niloticus*).

DAFTAR PUSTAKA

Abasali Hajibeglou dan Mohamad sudagar, 2010. Immune Response of Common Carp (Cyprinus carpio) Fed with Herbal Immunostimulants Diets. Agricultural Journal. 5 (3) 163-172.

Affandi R, Tang U.M. 2002. Fisiologi Hewan Air. Riau. Uni Press.

Aguirre G., Ruiz H. M., Ascencio F., 2004 A review of extracellular virulence product of Vibrio species important in disease of cultivated shrimp. Aquaculture Research 35:1395–1404.

Agusandi AS, Shanti DL. 2013. Pengaruh penambahan tinta cumi-cumi (Loligo sp.) terhadap kualitas nutrisi dan penerimaan sensoris mie basah. Jurnal Fishtech. 2(1):22-37

Alifuddin, M. 2002. Immunostimulasi pada hewan akuatik. Jurnal Akuakultur Indonesia.

Al-Maliky Kh. Haydar, 2014. Evaluation of Cephalopoda extract against some nosocomial bacterial isolates. Thi-Qar Medical Journal (TQMJ):Vol(8) No(1) (25-38).

Amri, K., dan Khairuman. 2008. Buku Pintar Budidaya 15 Ikan Konsumsi. AgroMedia. Jakarta

Amrullah, I. K. 2004. Nutrisi Ayam Petelur. Cetakan ke-3. Bogor : Lembaga Satu Gunung Budi.

Anderson, D. P. 1974. Fish Immunologi. T.F.H. Publication, Inc. Ltd. Hongkong. 239 p.

Anggriawan F. 2011. Identifikasi bakteri batang gram negatif penghasil extended spectrum β lactamase dari ulkus diabetikum derajat I dan II Waigner di bangsal penyakit dalam RSUD Arifin Achmad Provinsi Riau. Riau : Fakultas Kedokteran Universitas Riau.

Arikunto, S. 2006. Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik. Ed Revisi VI, Penerbit PT Rineka Cipta: Jakarta.

Azwar, Saifuddin. 2007. Metode Penelitian. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.

Bachtiar, Y. 2010. Budidaya dan Bisnis Gurami. Agro Media Pustaka. Jakarta

Badjoeri, M. 2008. Uji Kemampuan Bacillus megaterium Menyerap Logam Berat Merkuri. Pusat Penelitian Limnologi LIPI: Bogor.

Baratawidjaja, K. G. 1988. Immunologi Dasar. Edisi Kedelapan. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Benjakul S and Vate NK. 2013. Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (Loligoformosana). International Aquatic Research; 5(1):9.

Bijanti, R. 2005. Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Boal.J.G, Dunham A. W, Hanlon R. T, Williams. K. T 2000. Experimental evidence for spatial learning in octopuses (*Octopus bimaculoides*)

Boiron USA, 2014; <http://www.boironusa.com/products/sepia/>

Boyd, C. E. and F. Lichkoppler. 1979. Water quality management in pondfishculture. Auburn univ, Alabama, International for aquaculture. Agric.EXP. Station Research and Development series.

Brown, D. H. (2000). Principles of language learning & teaching. (4th ed.). New York:Longman. (pp. 49-58)

Cariello, L., & Zanetti L. 1977. A- and b-cephalotoxin: two paralyzing proteins from posterior salivary glands of. *Comparative Biochemistry and Physiology*. C57, 169-173

Caroko, E. E, Wisnu Arto S., dan Muhamad Al-azhari. 2008. Berharap Menjaring Devisa dari Si Nila merah. Majalah Trust. Malang.

Chan, K.M.L. Woo, L.Y.Lenn, and G.L.French, 1989. *Vibrio Parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hongkong. *J.Appl.Bacteriol*, 66: 57-64.

Chen Y, et al. (2000) The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol Cell Biol* 20(18):7037-48

Chopra, M., Gu, G.G., Singh, S. (2000). Mutations affecting the delayed rectifier potassium current in *Drosophila*. *J. Neurogenet*. 14(2): 107--123.

Cipriano, Rocco, Bullock, G. L. and Pyle, S. W., 1984. *A. hydrophila* And Motile Aeromonad septicemias of fish. US Fish & Wildlife Publications. 134.

Dangeubun F. D. W., Tetelepta J. M. S., 2013 Problem of fisher community and it's implication on the management of South-East Aru conservation region. *AAFL Bioflux* 6(6):518-529.

Del Coral, Citarasu,T., A.K. Dhas, S. Velmurugan, V.T. Thanga, T. Kumaran, M.M. Babu & T. Selvaraj. 1990. Action of *A. hydrophila* complexon carbohydrate substrates. *Fish Pathology*. 20: 23 - 35.

Derby, C.D., C.E. Kicklighter, P.M. Johnson, and X. Zhang. 2007. Chemical composition of inks of diverse marine mollusks suggest convergent chemical defenses. *J. Chem. Ecol*, 33(5) : 1105-1113

Derby., 2014. Cephalopod Ink: Production, Chemistry, Functions and Applications *Marine Drugs* 12(5):2700-2730

Desi, H. Bernad, C., dan Yenie, E., 2012. Ekstraksi Zat Warna Dari Kulit Manggis. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia Universitas Riau.

Desrina, A. 2006. Uji Keganasan bakteri *Vibrio* pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*, 11(3): 119-125.

Dewi S T, Indra T M, Livia S. 2015. Analisis Kandungan Asam Lemak pada Sotong (*Sepia* sp.) dengan Metode Kg-Sm. Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba.

- Dotta, G., J. I. A. D. Andrade, E. L.T.Goncalves, A. Brum, J. J. Mattos, M. Maraschin and Martins. 2014. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and Aloe barbadensis. *Journal Fish & Shellfish Immunology* 39: 280-284
- Edberg, S.C. 1983. Tes Kerentanan Antimikroba. dalam: Antibiotika dan Infeksi. Alih Bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Ellis, A.E. 1988. General Principles of Fish Vaccination. Fish Vaccination. Academic Press Inc, San Diego. 255 p
- Ellis, A. E. 2001. Fish vaccination. Academic Press. San Diego. P : 255.
- Evelyn, T. P.T. 1984. Immunization Against Pathogenic Vibrio symposium Fish Vaccination. OIE. Paris 20-22 February 1984
- Fadjar M., Andajani S., Zaelani K., 2016 Squid (*Loligo edulis*) ink raw extract as an anti-vibriosis substance in grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) juvenile culture infected by *Vibrio alginolyticus*. *AAFL Bioflux* 9(2):422-428
- Fahri, M. 2009. Bakteri Pathogen Pada Budidaya Perikanan *Vibrio*.
- Feist S Thain J dan Forlin C. 2002. Molecular , or cellular Process and The Health of The Individual. p 147-152. In A. JLawrence and K. L Hemingway (Eds.). *Effects of Pollution on Fish*. Blackwell Publishing. UK.
- Fitrial Y, Khotimah IK. 2017. Aktivitas antibakteri dari melanin tinta sotong dan cumi-cumi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 266-274.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknik Perikanan. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hlm
- Girija S. 2012. Antimicrobial Protein From The Ink Of Indians Quid *Loligo Duvauceli*. *International Journal Of Current Research and Review*. Vol. 03 issue 07.
- Girija, S., Hariprasad G, Vijayashree Priyadharsini J, Pandi Suba K, Raghuraman R, Gnanavendhan SG. 2011. Isolation And Characterization Of Lolduvin-S: A Novel Antimicrobial Protein From The Ink Of Indians Quid *Loligo Duvauceli*. *International Journal Of Current Research and Review*. Vol. 03 issue 07 July 2011.
- Gritter, R.J., 1991. Pengantar Kromatografi. Edisi ke-1. ITB. Bandung.
- Guyton A. C., Hall J. E. 1996. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 9. Jakarta : EGC. P. 208 – 212.
- Hardi, E.H., C.A. Pebrianto., T. Hidayanti dan R.T. Handayani. 2013. Infeksi *A. hydrophila* Melalui Jalur yang Berbeda pada Ikan Nila merah (*O. niloticus*) di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran*. 8(2):130 – 133.
- Hartika R., Mustahal, Putra A. N., 2014, Gambaran darah ikan nila merah (*O.niloticus*) dengan penambahan dosis prebiotik yang berbeda dalam pakan, *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 4 (1) :459-267.

- Hazzulli, Nurma J., Agus S., Esti H. 2015. Imunogenisitas Kombinasi Vaksin Inaktif Whole Cell *A. salmonicida* Dan Vitamin C Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. 3(2): 359-365.
- Heemstra P.C. and Randall J.E. 1993. Groupers of the world. FAO species catalogue, volume 16. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome
- Hibiya T dan Takashima, F. 1995. Gonad In. an Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. 2nd Edited by Fumio Takhasima and T.Hibiya Kodansu, Ltd. Tokyo. pp : 128-153.
- Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Moss, P.A.H. 2005. Kapita selekta hematologi; 4th Ed. Jakarta: Kedokteran EGC
- Holt, J.G, Bromage And Hjeltnes, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Ed. AWolters Kluwer Company. Philadelphia. Hal 562-570.
- Huang R. F., 2005 *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Sci 24:13
- Inglis, V., R. J. Robert, N. R. Bromage And Hjeltnes. 2003. Bacterial Disease of Fish. Blackwell Science Ltd. USA. p 109-121
- Irianto, A. 2005. Patologi ikan teleostei. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Irianto, Kus dan Kusno Waluyo. 2004. Gizi dan Pola Hidup Sehat. Bandung. Yrama Widya
- Iskandar Y, Rusmiati D, Dewi RR. 2003. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* dan *Bacillus Cereus*, Maspari Journal.
- Iswani. 2011. Manajemen Mutu dalam Industri Pangan. Jurnal dan Buletin No. 18. Vol 1
- Johnny, F., Trijoko dan D. Roza. 2003. Studi pendahuluan pengaruh hormone steroid terhadap keragaan hematology induk ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Jurnal Veteriner, 4(4):127-136.
- Kakkilaya, B.S. 2002. Peripheral Smear Examination for Malarial Parasite. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site
- Kamiso, H.N. 1996. Vibriosis pada Ikan dan Alternatif Penanggulangannya. *Jurnal Perikanan I. (I) : 78-86*
- Karlenski G., J., Turner, R. dan Small, J. 2010. Introduction to Marine Biology. Third edition. Cengage Learning. United States of America
- Kasonchandra, J. 1999. Major Viral Bacterial Disease of Marine Fishes with Emphasions Seabass and Grouper. Paper Contributed to the Fourth Symposium on Disease in Asian Aquaculture. Cebu International Convension Centre, Water front Cebu City Hotel, Cebu City. Philipines
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2005. Produksi Perikanan Nasional. Jakarta



Kordi, M.G.H. 2010. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hlm.

Krieg, N.R. and Holt, J.G. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, London

Lagler KF, Bardach JE, RR Miller, Passino DRM.1977. Ichthyology. John Willey and Sons. Inc. new York-London. 506 hal.

Lei M, Wang JF, Pang L, Wang YM, Chen SG, Xue CH. 2007a. Effects of Sepia on the metabolization of blood lipid and antioxidant ability in hyperlipidemia rats. The Chinese Journal of Marine Drugs. 3: 30-33.

Lei M, Wang JF, Wang YM, Pang L, Wang Y, Xu W, dan Xue CH. 2007b. Study of the radioprotective effect of cuttlefish ink on hemopoietic injury. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 16: 239-243.

Lengka K. 2013. Peningkatan Respon Imun Non-Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Melalui Pemberian Bawang Putih (*Allium sativum*). SRIPSI. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT. Manado.

Lukistyowati, I. 2011. Efektivitas Bawang Putih (*Allium sativum*) Untuk Meningkatkan Ketahanan Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Terhadap Penyakit *A. septicemia*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Maftuch. 2006. *Outer Membran Protein (Omp) Vibrio alginolyticus Sebagai Vaksin Untuk Mengendalikan Penyakit Vibriosis yang Disebabkan A. hydrophila Pada Ikan Kerapu Tikus Di Perairan*, Disertasi, Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya.

Mahasri, G. 2008. Survival Rate (SR) Udang Windu (*Penaeus monodon*) yang Diimunisasi dengan Whole protein *Zoothamnium penaei* asal dari Tambak di Pantai Utara dan Selatan Jawa Timur sebagai Agen Penyebab *Zoothamniosis*. *Jurn. Berkala Ilmiah Perikanan*, 3(2): 23-30.

Marentek.G.A., H.Manoppo, dan S.N.J.Longdong. 2013. Evaluation to The Use of Garlic (*Allium sativum*) in Enhancing Nonspecific Immune Response and Growth of Nile Tilapia (*O. niloticus*). *Jurnal Budidaya Perairan*. 1(1) : 1-7.

Mentari, Rahayu S. Absorbansi Tersedia dalam: <http://www.scribd.com/doc/95126973/m>. Makassar. 2012. Diakses 12 Juli 2018

Mimura, T., Nishiuchi, K., Abe, M., Shibatomi, A., & Kobayashi, M. (1985). Status and trends of hemt technology. *Superlattices and Microstructures*, 1(5), 369–373.

Mishra, A., & Jha, B. (2009). Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*, 100(13), 3382–3386.

Mones, Ronaldo, A. 2008. Gambaran Darah pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* linn) Strain Majalaya yang Berasal Dari Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. IPB.

Moriarty., D.J.W. 1997. The role of Mikro Organism in Aquaculture Ponds. *J. Aquaculture*. (151). p 333-349.

Munfaati, P.N., E. Ratnasari dan G. Trimulyono. 2015. Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. *Lentera Bio*. 4 (1) : 64-71. Musallamah et al., 2011

Nair U, et al. (2011) SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* 146(2):290-302

Nicklin, J.K. Graeme-Cook., T. Paget & R. Killington. 1999. *Instans Notes in Microbiology*. Springer Verlag. Singapore. Pte Ltd.

Noel, R., Krieg and John G. H. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol I. Williams and Wilkins. Baltimore USA. 964 p.

Noercholis W, Khumaida N, Syukur M, Bintang M, Ardyani I. 2013. Phitochemical screening, antioxidant and cytotoxic activities in extracts of different rhizome parts from *Curcuma aeruginosa* Roxb. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*. 6(5): 634-637. doi: 10.7897/2277-4343.065118.

Nur, I, Halipa, & Yasnaini. 2006. Peningkatan Imunitas Benih Ikan Nila merah (*O. niloticus*) Melalui Vaksinasi Induk. *Warta-wiptek*, 14(2): 6066.

Nurzakiah. 2011. Komposisi asam lemak dan kolesterol sotong (*Sepia recurvirostra*). Skripsi Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Nurcholis, A., Aziz, M. dan Muftuch. 2013. Ekstrasi Fitur Roudness untuk Menghitung Jumlah Eritrosit dalam Citra Sel Darah Ikan. *Jurnal EECIS*, 7(1).

Panigoro, N., I. Astuti, M. Bahnan, P.D.C. Salfira, dan K. Wakita. 2007. Teknik dasar histopatologi dan atlas dasar histopatologi ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi dan Japan International Cooperation Agency. 78p.

Pazra, 2008. Phitochemical screening, antioxidant and cytotoxic activities in extracts of different rhizome parts from *Curcuma aeruginosa* Roxb. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*. 6(5): 634-637.

Press, C. McL & Evensen, O., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol*, 9:309-318

Purwaningsih, T., A. Kusumastuti, and B. Sumiarto. 2014. The analysis of the existence antiparasitic treatment on parasitiasis calves breeding in Centra Java. Abstract Proceeding The 16th Asian-Australasian of Association of Animal Production. November 10 -14, 2014. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Purwaningsih, D., Indradewa., Kaburun, S. dan Shiddiq, D. 2013. Tanggapan Tanaman Kedelai Terhadap Inokulasi Rhizobium. Program Doktor Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. *Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada*. Yogyakarta.

Rahmawati, I., Suranto., Suryaningsih, R. 2015. Uji antibakteri bakteri asam laktat asal asinansawi terhadap bakteri patogen. *J. Bioteknologi* 2(2): 43-48

Rajaganapathi J, Thyagarajam SP, Edward JK. 2007. Study on cephalopod's ink for anti-retroviral activity. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38: 519-520.

- Raza', T. S. 2008. Analisis Histopatologi Organ Insang dan Usus Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus coloides*) yang diberi Khamir Laut (Marine Yeast) Sebagai Immunostimulan. Tesis. 95 hlm.
- Roper, C.F.E., M.J Sweeney, and Nauen. 1984. Cephalopods of The World. An annotated and Illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. FAO. Species Catalogue vol 3.
- Rudiyanti, S., dan Ekasari, A.D. (2009). Pertumbuhan Dan Survival Rate Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) Pada Berbagai Konsentrasi Pestisida Regent 0,3 G. *Jurnal Saintek Perikanan*. (5)1: 40.
- Rukmana, R. 1997. Ikan Nila merah, Budidaya dan Prospek Agribisnis. Yogyakarta :Kanisius.
- Saanin, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Penerbit Binacipta : Bogor.
- Salasia, S.I.O., Z. Khusnan, C. Lämmler, and M. Zschöck. 2001. Comparative studies on phenol and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.*5(2):103-109.
- Saleh S. 1979. Patologi Umum. Di dalam: Himawan, editor. Kumpulan Kuliah Patologi. Jakarta:Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Santoso, U. 2000. Budidaya Nila merah. Bharata Karya Akasara. Jakarta.
- Sartika Y. 2011. Efektivitas fitofarmaka dalam pakan untuk pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan lele dumbo *Clarias* sp. [Skripsi].Departemen Budidaya Perairan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sastrohamidjojo, H. dan H. D. Pranowo. 1985. "Kromatografi", Edisi kesatu, Penerbit Liberti. Yogyakarta.
- Sastrosupadi, 2002. Matematik Rancangan Percobaan. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Setiawan. R. 2012. Potensi Penggunaan Acepromazine Sebagai Bahan Alternatif Anestesi Ikan Nila merah (*O. niloticus*). Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor
- Siakpere-Kori, O. (1985). Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. *J. Fish Biol*, 27: 259-263.
- Silverstein, R.M. 1991. Spectrometric Identification of Organic Compounds. fifth
- Simatupang, Ferry M. (2000). *Observatorium Bosscha ITB-Lembang*.
- Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., and Danchin, A. (1998). A hydrophila adenyl cyclase 2: a new class of adenyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaebacteria. *J. Bacteriol.* 180, 3339–3344.
- Stoskopf, M.K. (1993) Fish medicine. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Suji S, 2009. Various uses of cephalopods. *Fishing chimes*; 29(8):24-26.

Susanto, D. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot dan Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) di Desa Cibanteng. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor

Sugama K. 1993. Status Budidaya Udang, Introduksi serta Prospek Pengembangannya dalam Tambak Air Tawar. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia* : hal 19-22.

Surachmad, W. 1988. Pengantar Penelitian Ilmiah (Dasar, Metode, Teknik). Bandung.

Suwignyo R A, Hayati R, Mardiyanto. 2002. Effect of early low salinity treatment on growth and salinity tolerant maize. Sriwijaya University, Palembang.

Svobodová Z., Vykusová B. (1991): Determining the maximum admissible concentrations of substances in water from the point of view of fish culture requirements. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany

Takaya, Y., H. Uchisawa, H. matsue, F. Narumi, J. Sasaki, and K.L. Iahida. 1994. An investigation of the antitumour peptidoglycan fraction from the squid ink. *Biol. Pharm. Bull*, 17(6) : 864-851

Tantu Y, Tina., Dan A.G.K. Sri. 2013. Penelusuran Antibakteri Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat dan Yogurt Asal Kabupaten Bandung Barat Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Padjajaran. Bandung

Tanjung. 2010. Mikrobiologi Industri. Yogyakarta: Andi Offset

Taufik, 2001. A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from human feces. *J. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61(6): 1049-1051.

Vennila merah R., Rajesh Kumar R. K., Kanchana S., Arumugam M., Balasubramanian T., 2011 Investigation of antimicrobial and plasma coagulation property of some molluscan ink extracts: gastropods and cephalopods. *African Journal of Biochemistry Research* 5(1):14-21.

Wahjuningrum, Sriyani, M. Hartawan, dan I G. Suranjaya. 2013. Studi mikrobiologi kefir dengan waktu simpan berbeda. *Majalah Ilmiah Peternakan Vol* (18) No.3 : 95-99.

Walker, MJA., and V.L. Masuda. 1990. Toxins from marine invertebrates. In: "Marine toxin (Origin, Structure and molecular Pharmacology)" (S.Hall and G.Strichartz eds.) American chemical society, Washington DC, pp. 113-332.

Wang, Y.C., Lee, C.M., Lee, L.C., Tung, L.C., Hsieh-Li, H.M., Lee-Chen, G.J., Su, M.T. (2011). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Contribute to the Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 12 (SCA12). *J. Biol. Chem.* 286(24): 21742--21754.

Widiyanti, Luluk. 2009. *Patogenesis Molekuler Infeksi Bakteri Vibrio Alginolyticus pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, UB: Malang.

Wintoko, F., A. Setyawan, S. Hudaidah, & M. Ali. 2012. Imunogenitas Heat Killed Vaksin Inaktif *A. hydrophila* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). e-Jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perairan , 2(1): 205210

Zheng, G. L., X. Y. Zhang, Y. G. Zhou, Q. C. Meng and W. G. Gong. 2002. Comparison between partial components and trace elements in sepia and squid ink. Chin. J. Mar. Drugs. 21(3):12-14.

Zhong JP, Wang G, Shang JH, Pan JQ, Li K, Huang Y, Liu HZ. 2009. Protective effects of squid ink extract towards hemopoieticinjuries induced by cyclophosphamine. Marine Drugs. 7: 9-18.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekapan Leukosit Selama Penelitian

0 jam

No	1	2	3	Rata-rata
A	274400	273700	279900	276000
B	253750	258100	241600	251150
C	235000	237150	230350	234166.7
Positif	143050	123850	148000	138300
Negatif	124550	125550	177350	142483.3

Sidik ragam

Perlakuan	Ulangan			Total
	1	2	3	
A	2.744	2.737	2.799	8.280
B	2.538	2.581	2.416	7.535
C	2.350	2.372	2.304	7.025
Positif	1.431	1.239	1.480	4.149
Negatif	1.246	1.256	1.774	4.275
Total				31.263

Perhitungan JK

$FK = G^2/n = 65.158$
 $JK\ Total = (K1)^2 + \dots - FK = 5.13037440$
 $JK\ Perlakuan = (EA)^2 + \dots - FK = 4.896$
 $JK\ Acak = JK\ Tot - JK\ Per = 0.234$

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	4.90	1.22	52.24	3.48	5.99
Acak	10	0.23	0.02			
Total	14	5.13				

F hit > F tabel = Berbeda Nyata

48 jam

No	1	2	3	Rata-rata
A	247000	248400	246000	247133.3
B	231900	238050	234150	234700
C	213950	214900	210750	213200
Positif	134650	121850	148700	135066.7
Negatif	107950	179950	181150	156350

Sidik ragam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A	2.470	2.484	2.460	7.414	2.471
B	2.319	2.381	2.342	7.041	2.347
C	2.140	2.149	2.108	6.396	2.132
Positif	1.347	1.219	1.487	4.052	1.351
Negatif	1.080	1.800	1.812	4.691	1.564
Total				29.594	

Perhitungan JK

FK $G^2/n = 58.385$

JK Total $(K1)^2 + \dots - FK = 3.296147$

JK Perlakuan $(EA)^2 + \dots - FK = 2.905$

JK Acak JK Tot - JK Per = 0.391

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	2.91	0.73	18.59	3.48	5.99
Acak	10	0.39	0.04			
Total	14	3.30				

F hit > F tabel = Berbeda Nyata

72 jam

No	1	2	3	Rata-rata
A	252050	264900	257150	258033.3
B	248700	255600	237700	247333.3
C	238750	247550	250400	245566.7
Positif	152150	147350	152150	150550
Negatif	161450	179700	164800	168650

Sidik ragam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A	2.521	2.649	2.572	7.741	2.580
B	2.487	2.556	2.377	7.420	2.473
C	2.388	2.476	2.504	7.367	2.456
Positif	1.522	1.474	1.522	4.517	1.506
Negatif	1.615	1.797	1.648	5.060	1.687
Total				32.104	



$FK = G^2/n = 68.711$
 $JK\ Total = (K1)^2 + \dots - FK = 3.091168$
 $JK\ Perlakuan = (EA)^2 + \dots - FK = 3.039$
 $JK\ Acak = JK\ Tot - JK\ Per = 0.052$

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	3.04	0.76	144.80	3.48	5.99
Acak	10	0.05	0.01			
Total	14	3.09				

F hit > F tabel = berbeda nyata

96 jam

No	1	2	3	Rata-rata
A	198600	194550	202050	198400
B	214200	219100	219650	217650
C	266850	264250	237100	256066.7
Positif	160400	154700	156400	157166.7
Negatif	164200	163600	162350	163383.3

Siddik ragam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A	1.986	1.946	2.021	5.952	1.984
B	2.142	2.191	2.197	6.530	2.177
C	2.669	2.643	2.371	7.682	2.561
Positif	1.604	1.547	1.564	4.715	1.572
Negatif	1.642	1.636	1.624	4.902	1.634
Total				29.780	

$FK = G^2/n = 59.123$
 $JK\ Total = (K1)^2 + \dots - FK = 2.047489$
 $JK\ Perlakuan = (EA)^2 + \dots - FK = 1.987$
 $JK\ Acak = JK\ Tot - JK\ Per = 0.061$

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	1.99	0.50	81.68	3.48	5.99
Acak	10	0.06	0.01			
Total	14	2.05				



Lampiran 2
Diferensial Leukosit Selama Penelitian
Diffrensial Leukosit
Sebelum infeksi
0 jam

Perlakuan	Limposit					STD	Monosit					STD	Neutrofil					STD
	1	2	3	Rerata	1		2	3	Rerata	1	2		3	Rerata				
250	60.90	68.22	71.33	66.82	5.35	29.10	31.78	27.33	29.40	2.24	1.00	0.00	1.33	0.78	0.69			
300	69.60	75.00	61.60	68.73	6.74	30.40	23.43	38.40	30.74	7.49	0.00	1.56	0.00	0.52	0.90			
350	65.11	72.46	69.13	68.90	3.68	34.88	26.81	30.87	30.85	4.04	0.00	0.70	0.00	0.23	0.40			
Positif	61.74	64.86	60.45	62.35	2.27	36.52	38.14	38.80	37.82	1.17	1.73	0.00	0.74	0.82	0.87			
Negatif	64.22	76.90	69.90	70.34	6.35	34.95	23.10	28.15	28.73	5.95	0.81	0.00	1.95	0.92	0.98			

24 jam

Perlakuan	Limposit					STD	Monosit					STD	Neutrofil					STD
	1	2	3	Rerata	1		2	3	Rerata	1	2		3	Rerata				
250	68.59	68.33	75.44	70.78	4.03	29.50	30.83	24.56	28.29	3.30	1.90	1.00	0.00	0.96	0.95			
300	71.90	69.18	71.30	70.79	1.42	27.39	28.77	27.80	27.98	0.70	0.68	2.00	1.00	1.22	0.68			
350	69.33	68.67	69.35	69.11	0.38	30.00	30.12	30.64	30.25	0.34	0.66	1.20	0.00	0.62	0.60			
Positif	64.91	65.60	68.99	66.50	2.18	33.91	34.40	28.68	32.33	3.17	1.16	0.00	2.32	1.16	1.16			
Negatif	70.14	68.29	66.94	68.45	1.60	29.85	31.70	31.40	30.98	0.99	0.00	0.00	1.65	0.55	0.95			

Setelah infeksi

72 jam

Perlakuan	Limposit					STD	Monosit					STD	Neutrofil					STD
	1	2	3	Rerata	1		2	3	Rerata	1	2		3	Rerata				
250	74.16	72.63	77.45	74.75	2.46	22.50	25.26	20.80	22.85	2.25	3.33	2.10	1.70	2.38	0.85			
300	79.51	82.38	77.14	79.68	2.62	19.67	16.58	20.71	18.99	2.15	0.81	1.03	2.14	1.33	0.71			
350	73.98	72.06	76.19	74.08	2.07	24.85	26.25	23.01	24.70	1.62	1.15	1.67	0.79	1.20	0.44			
Positif	62.12	70.00	67.34	66.49	4.01	36.36	30.00	32.00	32.79	3.25	1.50	0.00	0.60	0.70	0.75			
Negatif	57.69	65.29	55.45	59.48	5.16	40.65	34.71	42.00	39.12	3.88	1.64	0.00	1.80	1.15	1.00			

96 jam

Perlakuan	Limposit					STD	Monosit					STD	Neutrofil					STD
	1	2	3	Rerata	1		2	3	Rerata	1	2		3	Rerata				
250	88.46	96.22	86.05	90.24	5.31	10.57	2.83	10.85	8.08	4.55	0.96	0.94	3.10	1.67	1.24			
300	94.87	90.76	87.80	91.14	3.55	5.13	7.56	10.57	7.75	2.73	0.00	1.68	1.63	1.10	0.96			
350	75.24	83.85	88.44	82.51	6.70	23.81	15.38	9.83	16.34	7.04	0.95	0.77	1.73	1.15	0.51			
Positif	90.57	91.10	84.00	88.56	3.96	8.90	7.60	14.70	10.40	3.78	0.52	1.30	1.30	1.04	0.45			
Negatif	70.23	74.72	72.91	72.62	2.26	28.84	23.59	25.69	26.04	2.64	0.93	1.68	1.38	1.33	0.38			



Perhitungan JK
 FK G^2/n 37930.227
 JK Total $(K1)^2 + \dots - FK$ 5217.604
 JK Perlakuan $(EA)^2 + \dots - FK$ 4490.453
 JK Acak JK Tot - JK Per 727.151

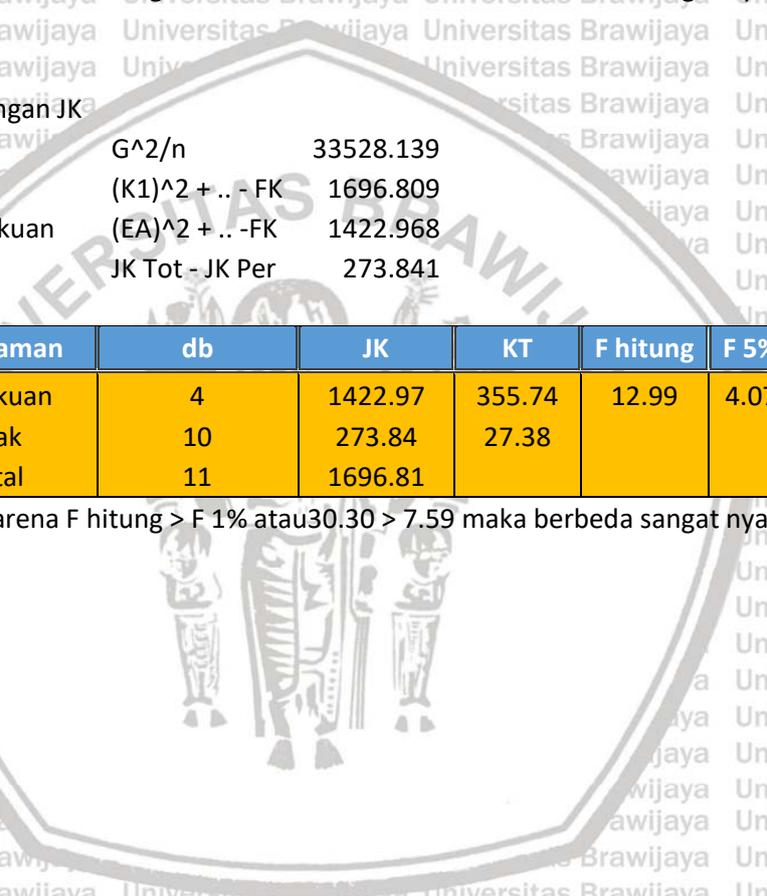
Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	4490.45	1122.61	15.44	4.07	7.59
Acak	10	727.15	72.72			
Total	11	5217.60				

Karena $F_{hitung} > F_{1\%}$ atau $30.30 > 7.59$ maka berbeda sangat nyata

Perhitungan JK
 FK G^2/n 33528.139
 JK Total $(K1)^2 + \dots - FK$ 1696.809
 JK Perlakuan $(EA)^2 + \dots - FK$ 1422.968
 JK Acak JK Tot - JK Per 273.841

Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	1422.97	355.74	12.99	4.07	7.59
Acak	10	273.84	27.38			
Total	11	1696.81				

Karena $F_{hitung} > F_{1\%}$ atau $30.30 > 7.59$ maka berbeda sangat nyata



Lampiran 4. Foto penelitian
Sampling dan Ekstraksi



(Letak Kantong Tinta Pada Sotong)



(Kantong Tinta Pada Sotong)



(Ekstrak Tinta Sotong)



(Ekstraksi Tinta Sotong)



(Ekstrak Tinta Sotong)



(Ekstrak cair Tinta Sotong)



(Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila*)