

**PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR FENOL
Gracilaria sp. TERHADAP GEJALA KLINIS DAN HISTOPATOLOGI OTOT
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN BUDIDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**ISMANINGDYAH KURNIAWATI
NIM. 0910850021**



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

**PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR FENOL
Gracilaria sp. TERHADAP GEJALA KLINIS DAN HISTOPATOLOGI OTOT
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN BUDIDAYA PERAIRAN**

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

Oleh :
ISMANINGDYAH KURNIAWATI

NIM. 0910850021



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2013

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR FENOL *Gracilaria* sp.
TERHADAP GEJALA KLINIS DAN HISTOPATOLOGI OTOT IKAN MAS
(*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.

Oleh :
ISMANINGDYAH KURNIAWATI
NIM. 0910850021

Telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SK Dekan No. :
Tanggal : 30 Juli 2013

Menyetujui

Dosen Penguji I

Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS
NIP. 19590807 198601 1 001
Tanggal : 15 AUG 2013

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Maftuch, MSi
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal : 15 AUG 2013

Dosen Penguji II

Ir. Ellana Sanoesi, MP
NIP. 19630924 199803 2 002
Tanggal : 15 AUG 2013

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc
NIP. 19610310 198701 2 001
Tanggal : 15 AUG 2013

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal : 15 AUG 2013



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, 1 Agustus 2013
Mahasiswa

Ismaningdyah Kurniawati



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi dan Ibu Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc selaku dosen pembimbing.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen penguji.
3. Laboran Parasit dan Penyakit ikan, Laboran Reproduksi dan Pemuliaan ikan dan Laboran bagian Histopatologi BKI Kelas I Juanda yang banyak membantu demi terselesainya penelitian ini.
4. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas Pendanaan Dalam Penelitian Hibah Bersaing Institusi Batch I Tahun Anggaran 2012

Malang, 1 Agustus 2013

Penulis



LEMBAR PERSEMBAHAN

Karya kecil ini penulis persembahkan sebagai wujud rasa syukur atas nikmat yang tanpa henti diberikan oleh Allah SWT. Atas kesulitan dan kemudahan yang telah dilewati selama proses studi, itu semua membuat penulis semakin belajar untuk menjadi lebih baik.

Tak lupa juga kepada keluarga, kedua orang tua khususnya atas dukungan moril dan materiil, semangat, pengorbanan dan doa yang telah diberikan menjadi motivasi tersendiri bagi penulis untuk semakin berusaha memberikan yang terbaik yang bisa dilakukan. Bagi penulis kalianlah yang menjadikan penulis dapat bertahan melewati segala ujian.

Bapak Dr. Ir. Maftuch, Msi dan Ibu Anik Martinah Hariati, MSc selaku dosen pembimbing. Atas kesabaran dan keuletannya untuk membimbing. Ditengah kesibukan Bapak dan Ibu, atas waktu yang telah diberikan hanya untuk membantu penulis untuk menghasilkan karya yang lebih baik. Sungguh, semoga keikhlasan Bapak dan Ibu dibalas oleh Allah SWT. Amin.

Teman-teman terbaik yang pernah ada 'GK Foundation', bangga menjadi bagian dari kalian. Melewati suka dan duka bersama-sama, saling menguatkan tujuan. Bagi penulis, tiada kesan tanpa kehadiran kalian, karena kalian telah menjadi *mood booster* bagi penulis. Semoga kelak, apa yang menjadi tujuan kita bersama akan dapat menjadi kenyataan. Amin.

Teman-teman tim penelitian Pak Maftuch atas kebersamaan dan bantuannya selama penelitian. Kehadiran kalian menjadi sebuah semangat dalam melaksanakan kewajiban,

Mahasiswa Budidaya Perairan angkatan 2009, mengenal kalian semua adalah sebuah keberuntungan. Atas pompaan semangat yang telah diberikan, kebersamaan yang telah dijalin tidak akan didapatkan ditempat manapun.

Special one 'Dimas Galang Prakosa' atas keikhlasan atas bantuan yang telah diberikan, pompaan semangat dan kesabaran. Semoga tidak hanya saat ini, namun esok dan seterusnya. Amin.

Pihak-pihak yang banyak membantu demi kelancaran proses studi penulis, tak dapat penulis sebutkan satu per satu. Hanya Allah SWT yang mampu membalas keikhlasan pihak-pihak tersebut.

Semoga laporan ini banyak membawa manfaat dan memberikan pahala tersendiri bagi penulis atas sedikit ilmu yang telah ditorehkan. Amin.

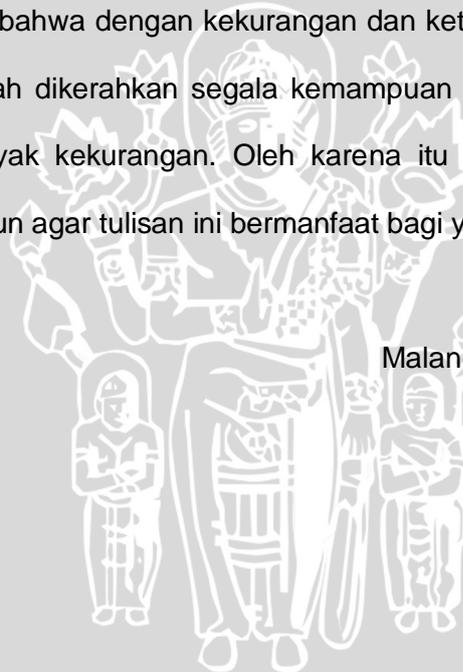
KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul Pengaruh Pemberian Imunostimulan Ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. Terhadap Gejala Klinis dan Histopatologi Otot Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Pasca Diinfeksi Bakteri *Aeromonas* sp. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan meliputi rendemen ekstrak kasar fenol *Gracilaria*, pembahasan penelitian pendahuluan tentang penentuan dosis, gejala patologi klinis, histopatologi otot ikan mas (*C. carpio*) serta kualitas air selama pemeliharaan.

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

Malang, 1 Agustus 2013

Penulis



DAFTAR ISI

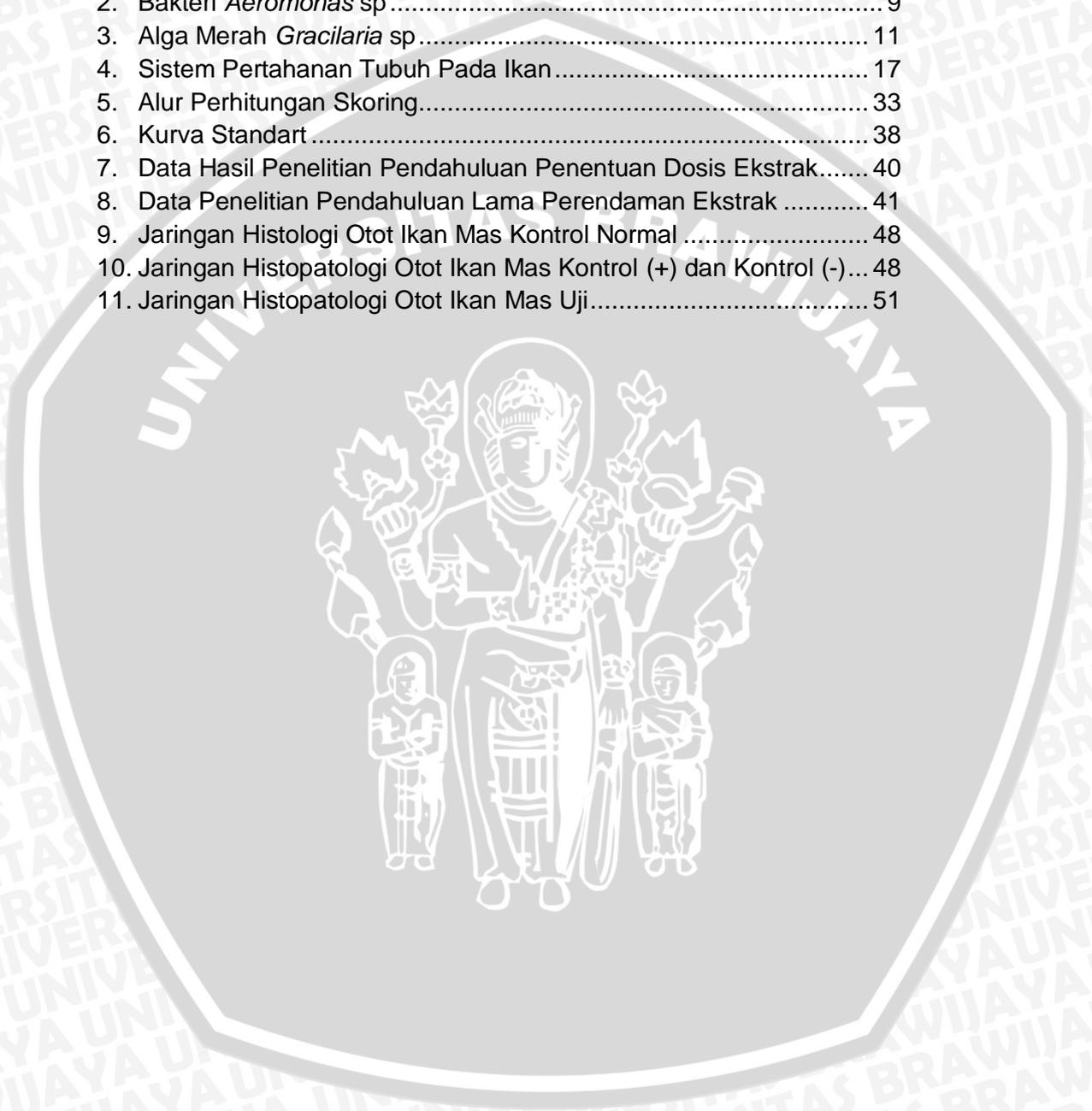
Halaman

PERNYATAAN ORISINALITAS	i
UCAPAN TERIMA KASIH	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Tempat dan Waktu Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Sifat Biologi Ikan Mas (<i>C. carpio</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Mas (<i>C. carpio</i>)	6
2.1.2 Habitat dan Daerah Penyebaran Ikan Mas (<i>C. carpio</i>)	7
2.1.3 Jenis Pakan dan Kebiasaan Makan Ikan Mas (<i>C. carpio</i>)	8
2.2 Sifat Biologi Bakteri <i>Aeromonas</i> sp	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>Aeromonas</i> sp	8
2.2.2 Pertumbuhan Optimal Bakteri <i>Aeromonas</i> sp. Saat Penginfeksi	9
2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan Bakteri <i>Aeromonas</i> sp	10
2.3 Alga Merah <i>Gracilaria</i> sp Sebagai Bahan Immunostimulan	11
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Alga Merah <i>Gracilaria</i> sp	11
2.3.2 Habitat dan Penyebaran Alga Merah <i>Gracilaria</i> sp	12
2.3.3 Manfaat dan Kegunaan Alga Merah <i>Gracilaria</i> sp	12
2.3.4 Kandungan Bahan Aktif <i>Gracilaria</i> sp	13
2.3.5 Kandungan Ekstrak Fenol pada <i>Gracilaria</i> sp	14
2.3.6 Peranan Ekstrak Fenol dalam Bidang Immunologi	15
2.3.7 Metode Ekstrak Fenol pada <i>Gracilaria</i> sp	16
2.3.8 Metode Pengujian Ekstrak Fenol	16
2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan (<i>C. carpio</i>)	17
2.4.1 Pertahanan Non-Spesifik	18
2.4.2 Pertahanan Spesifik	19
2.5 Immunostimulan untuk Meningkatkan Respon Imun	20
2.5.1 Metode Pemberian Immunostimulan	20

2.5.2 Mekanisme Kerja Immunostimulan.....	20
2.6 Pengamatan Histopatologi	21
2.7 Gejala Patologi Klinis pada Ikan.....	22
2.8 Jaringan Otot Sebagai Parameter Uji Histopatologi.....	23
2.9 Kualitas Air.....	23
3. MATERI DAN METODOLOGI	25
3.1 Materi Penelitian	25
3.1.1 Alat Penelitian	25
3.1.2 Bahan Penelitian	25
3.2 Metode Penelitian	25
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Penelitian Pendahuluan	27
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	29
3.6 Parameter Uji.....	32
3.6.1 Parameter Utama.....	32
3.6.2 Parameter Penunjang.....	32
3.7 Rancangan Percobaan	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Perhitungan Rendemen Ekstrak Fenol.....	35
4.2 Pelarut dan Waktu Perendaman Ekstrak Fenol <i>Gracilaria</i> sp.....	37
4.3 Penentuan Dosis Immunostimulan.....	39
4.4 Gejala Patologi Klinis Ikan Mas yang Diinfeksi Bakteri <i>Aeromonas</i> sp.....	43
4.5 Gambaran Histologi dan Histopatologi Otot	47
4.5.1 Gambaran Histologi Otot Normal dan Kontrol.....	47
4.5.2 Gambaran Histopatologi Otot Ikan Uji.....	50
4.7 Pengamatan Kualitas Air.....	55
5. KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA.....	58
LAMPIRAN.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan mas (<i>C. carpio</i>).....	7
2. Bakteri <i>Aeromonas</i> sp.....	9
3. Alga Merah <i>Gracilaria</i> sp.....	11
4. Sistem Pertahanan Tubuh Pada Ikan.....	17
5. Alur Perhitungan Skoring.....	33
6. Kurva Standart.....	38
7. Data Hasil Penelitian Pendahuluan Penentuan Dosis Ekstrak.....	40
8. Data Penelitian Pendahuluan Lama Perendaman Ekstrak.....	41
9. Jaringan Histologi Otot Ikan Mas Kontrol Normal.....	48
10. Jaringan Histopatologi Otot Ikan Mas Kontrol (+) dan Kontrol (-)....	48
11. Jaringan Histopatologi Otot Ikan Mas Uji.....	51



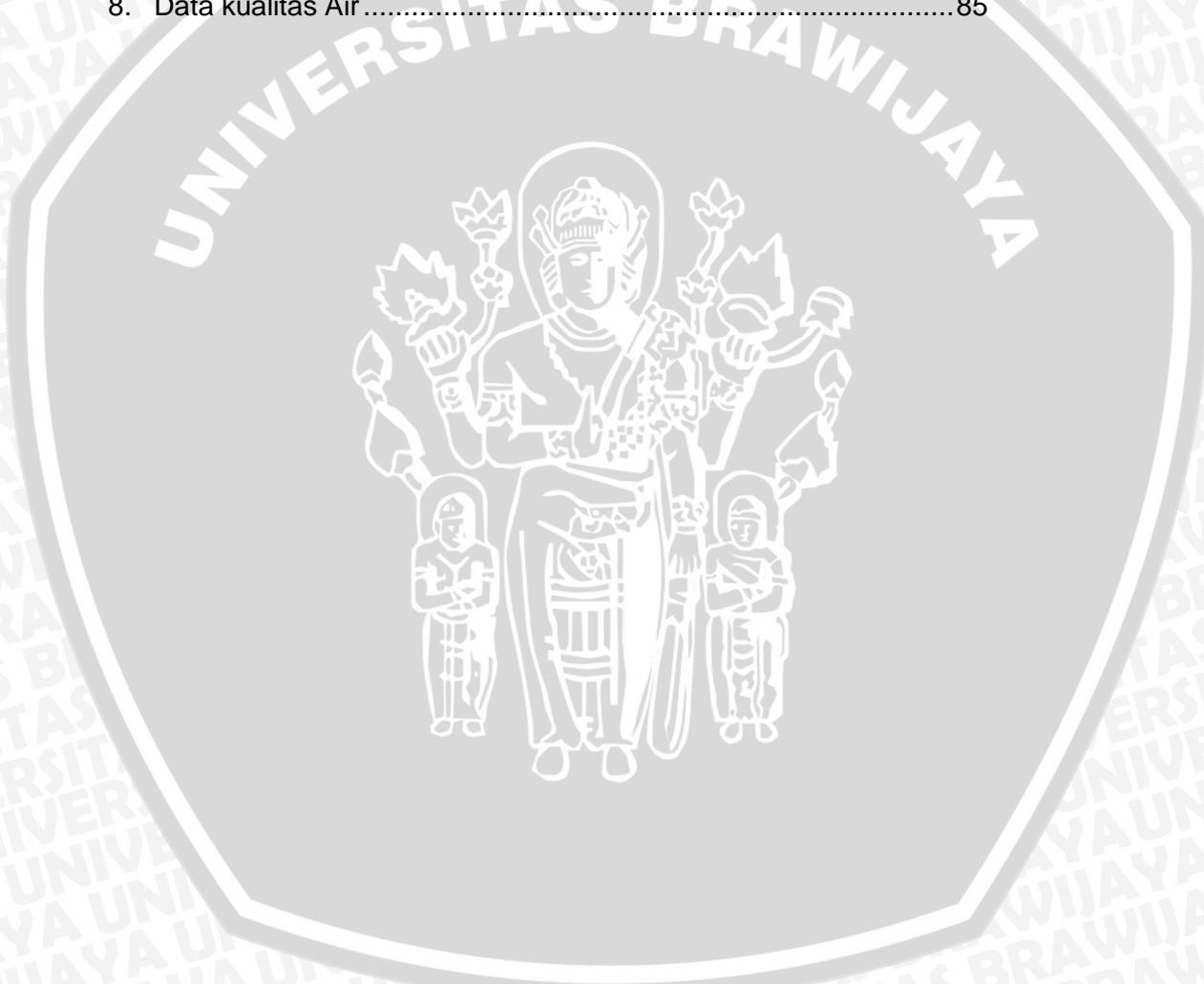
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Perlakuan Uji Imunostimulan	27
2. Persentase Nilai Skoring	34
3. Pengukuran Absorbansi Larutan Standart	37
4. Konsentrasi Ekstrak dengan Pelarut & Waktu Maserasi Berbeda..	38
5. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Uji	44
6. Data Skoring dan Notasi Histopatologi Otot	51
7. Pengukuran Parameter Kualitas Air	55



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian	65
2. Pembuatan Dosis Ekstrak	66
3. Tahapan Pembuatan Preparat Histopatologi.....	67
4. Penentuan Konsentrasi Fenol dengan Kurva Standart	69
5. Data hasil PP LC ₅₀ terhadap dosis dan lama perendaman.....	70
6. Nilai Skoring Histopatologi Otot	71
7. Skoring Kerusakan Otot (Nekrosis, Degenerasi Hialin dan Edema) dengan SPSS	73
8. Data kualitas Air	85



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini perkembangan perikanan budidaya mengalami kemajuan yang sangat pesat. Seiring dengan program nasional untuk mewujudkan Indonesia sebagai penghasil produk kelautan dan perikanan terbesar tahun 2015, maka untuk mencapai sasaran tersebut produksi perikanan budidaya pada tahun 2014 ditargetkan mencapai 16,89 juta ton atau meningkat 353% dibanding produksi tahun 2009 (Aslianti *et al.*, 2010). Hal tersebut tentu saja semakin membuat pembudidaya terus meningkatkan hasil produktivitas budidaya. Produksi perikanan budidaya pada tahun 2010 meningkat dari 4,78 juta ton ke 6,97 juta ton pada tahun 2011 (KKP, 2012).

Peningkatan produktivitas budidaya dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah kebutuhan masyarakat akan konsumsi ikan yang semakin meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2011, capaian sementara rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional adalah 31,64 kg/kapita, atau tercapai 100,22% dari target yang telah ditetapkan, yakni 31,57 kg/kapita. Rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional pada tahun 2011 meningkat sebesar 3,81% apabila dibandingkan dengan rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional pada tahun 2010, yakni sebesar 30,48 kg/kap. Peningkatan produksi budidaya air tawar sebesar 82,71% pada tahun 2011. Jenis komoditas air tawar yang bernilai ekonomis adalah ikan mas (*C. carpio*). Produksi ikan mas, pada tahun 2011 mencapai 112,73% dengan kenaikan sebesar 11,88% dibandingkan pada tahun 2010. Namun tetap saja dalam pelaksanaan budidayanya masih terdapat beberapa kendala yaitu serangan penyakit yang dapat menyebabkan kegagalan produksi, belum optimalnya penggunaan bibit unggul, dan kurang optimalnya penyediaan dan pengelolaan prasarana budidaya (LAKIP KKP, 2012).

Keberhasilan budidaya ikan mas dipengaruhi oleh beberapa faktor yang sering muncul. Salah satu kendala yang perlu mendapat perhatian penting adalah serangan penyakit. Serangan penyakit pada ikan dibagi menjadi dua golongan, yaitu serangan penyakit infeksi dan non infeksi. Serangan penyakit infeksi, disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya virus, parasit, bakteri dan jamur. Salah satu penyebab serangan penyakit infeksi yaitu bakteri *Aeromonas* sp.

Menurut Swan and White (2000), ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. dapat menunjukkan gejala yang berbeda. Penyerangan pada ikan dimulai dari kematian massal yang dapat terjadi secara tiba-tiba, atau sebaliknya ikan akan menunjukkan gejala klinis yang abnormal seperti misalnya stres, berenang secara tidak normal, insang yang pucat, perut membengkak dan luka pada kulit. Organ-organ yang sering terinfeksi diantaranya insang, ginjal, hati, limpa, pankreas dan susunan otot. Bakteri tersebut dapat muncul dikarenakan oleh beberapa faktor yaitu resistensi ikan terhadap infeksi, tingkat stress pada ikan dan ada atau tidaknya gejala bakterimia atau septicemia.

Ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. umumnya menunjukkan gejala terinfeksi secara makroskopis yaitu adanya tanda klinis berupa *dropsy*. *Dropsy* merupakan gejala yang ditandai dengan perut ikan tampak menggelembung sebagai akibat adanya pelepasan *Aerolysin cytotoxic enterotoxin* (ACT-gene) yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Herupradoto dan Yuliani, 2010).

Pencegahan dan pemberantasan bakteri *Aeromonas* sp. dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan kimiawi atau antibiotik maupun bahan-bahan obat alami. Penanggulangan penyakit ikan budidaya dengan menggunakan obat kimiawi sangat beresiko karena menimbulkan resistensi terhadap bakteri, perlu biaya tinggi serta dapat mencemari lingkungan (Samsundari, 2006).

Salah satu alternatif pencegahan penyakit yang menyerang ikan yaitu dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan (sistem imun). Mutdjiutami *et al.* (2005), menyatakan bahwa imunostimulan adalah suatu zat yang termasuk dalam pencegahan, mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Penggunaan imunostimulan pada budidaya ikan merupakan sesuatu yang baru bagi kesehatan ikan dan pencegahan terhadap penyakit.

Aplikasi penggunaan imunostimulan biasa dilakukan dengan pemberian komponen mikrobial seperti β -glukan dan lipopolisakarida (LPS) atau sel bakteri yang telah dimatikan. Kelemahan dari imunostimulan ini adalah harganya relatif mahal, sehingga diperlukan usaha pencarian sumber alternatif imunostimulan yang murah dan mudah penanganannya, salah satunya adalah dari rumput laut (Ridlo dan Pramesti, 2009).

Rumput laut merupakan sumber bahan bioaktif, yang menghasilkan sejumlah senyawa sebagai sitotastik, antiviral, antihelmint, anticendawan dan aktifitas antibakterial. Senyawa aktif ini berasal dari rumput laut merah, hijau dan coklat (Jasmanidar, 2009). Bansemir *et al.* (2006), menambahkan bahwa beberapa jenis rumput laut dapat berperan sebagai antibakteri pada bakteri yang bersifat patogen pada ikan karena lebih aman dan efektif.

Rumput laut *Gracilaria* sp. merupakan salah satu jenis rumput laut yang ketersediannya melimpah di Indonesia. Alamsjah *et al.* (2009), menambahkan bahwa potensi perkembangan budidaya rumput laut *Gracilaria* sp. di tambak cukup besar, dari luas areal tambak di Indonesia seluas 450.000 ha dan diperkirakan seluas 2% yang dekat dengan pantai, sekitar 9000 ha merupakan area tambak yang potensial untuk budidaya *Gracilaria* sp. dengan produksi sekitar 6 ton/ha/tahun.

Lestario *et al.* (2008), melaporkan bahwa kadar fenolik total pada *Gracilaria* sp. sebesar 31,38 mg/g ekstrak dengan menggunakan pelarut etanol dapat menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar $24,37 \pm 1,63$. Hal tersebut dapat diartikan bahwa senyawa fenolik yang ada dalam *Gracilaria* sp. mempunyai peranan yang cukup besar dalam menyumbangkan aktivitas antioksidan. Simanjutak (1995), menambahkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung pada alga merah, merupakan senyawa aromatik yang mengandung unsur fenol dan dilaporkan mempunyai zat aktif yang bersifat sebagai antimikroba.

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam usaha budidaya ikan mas (*C. carpio*) adalah penyakit yang sering menyerang baik disebabkan oleh bakteri, virus maupun dari mikroorganisme berbahaya lainnya. Penyakit infeksi yang sering menyerang ikan mas adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* sp.

Bakteri *Aeromonas* sp. biasa menyerang ikan air tawar dan sangat merugikan bagi pembudidaya karena dapat menyebabkan kematian pada organisme budidaya. Pemberian antibiotik pada komoditas budidaya untuk menanggulangi penyakit maupun virus tidak lagi disarankan karena dapat mengakibatkan sifat resisten pada bakteri, selain itu akumulasi bahan antibiotik yang terkandung dalam tubuh ikan dapat berdampak pada manusia.

Ekstrak alga merah *Gracilaria* sp. diharapkan dapat meningkatkan respon imun pada ikan mas (*C. carpio*) dengan kandungan fenol yang ada didalamnya.

Sehingga berdasarkan uraian tersebut, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Berapa rendemen ekstrak kasar fenol yang dihasilkan dari rumput laut *Gracilaria* sp. ?

2. Berapa dosis ekstrak kasar fenol yang dapat memberikan efek penurunan tingkat gejala klinis dan tingkat kerusakan histopatologi otot pada ikan mas (*C. carpio*) ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Mendapatkan rendemen ekstrak kasar fenol dari *Gracilaria* sp.
2. Mendapatkan dosis ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. yang dapat memberikan efek penurunan tingkat gejala klinis dan tingkat kerusakan pada histopatologi otot ikan mas (*C. carpio*).

1.4 Tempat dan Waktu

Penelitian secara *in vivo* dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Islam Negeri Malang. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Veteriner Universitas Airlangga Surabaya dan Skoring histopatologi otot dilakukan di Balai Karantina Juanda Kelas I Surabaya pada bulan Desember 2012 - Februari 2013.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat Biologi Ikan Mas (*C. carpio*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Mas (*C. carpio*)

Klasifikasi ikan mas (*C. carpio*) menurut Khairuman *et al.* (2008), adalah :

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Super Kelas	: Pisces
Kelas	: Osteichthyes
Sub Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub Ordo	: Cripinoidea
Famili	: Cyprinidae
Sub Famili	: Cyprinenae
Genus	: Cyprinus
Spesies	: <i>C. carpio</i>

Ikan mas (*C. carpio*) berasal dari daratan Cina dan Rusia. Ikan mas mempunyai bentuk badan agak memanjang pipih ke samping (*compressed*). Mulut (bibir) berada di ujung tengah (*terminal*), dapat disembulkan dan bersifat lunak (elastis). Memiliki kumis (*barbel*) 2 pasang (empat buah), kadang-kadang mempunyai sungut satu pasang (*rudimentir*). Untuk membedakan ikan mas koki (*Carasius auratus*) dari jenis ikan hias dengan ikan mas (*C. carpio*) adalah adanya kumis ini. Ikan mas memiliki jari-jari sirip punggung (*dorsal*) yang keduanya dapat mengeras seperti gergaji. Sedangkan letak antara kedua sirip, punggung dan perut berseberangan. Sirip dada (*pectoral*) terletak di belakang tutup insang (*operculum*) (Santoso, 1993).

Menurut Williams (2008), ikan mas dan ikan maskoki sebenarnya mempunyai kemiripan yaitu senang mendiami tempat yang dangkal, namun keduanya dapat dibedakan dengan keberadaan barbel pada kedua sisi mulut ikan mas dan ukurannya yang lebih besar pada saat matang gonad. Ikan mas merupakan ikan dengan ukuran yang besar serta mempunyai sirip dorsal yang panjang sampai hampir mendekati bagian belakang tubuhnya. Penampang ikan mas ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Mas (*C. carpio*) (Williams, 2008).

2.1.2 Habitat dan Daerah Penyebaran Ikan Mas (*C. carpio*)

Menurut Cahyono (2000), ikan mas banyak dijumpai di sungai-sungai, danau-danau dan genangan-genangan air. Ikan mas mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Ikan mas mudah beradaptasi dengan fluktuasi lingkungan yang relatif tinggi, misalnya perubahan suhu sampai 5°C dan penurunan O₂ sampai 2 mg/liter .

Ikan mas menyukai tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang airnya deras dan tidak terlalu deras, seperti di penggiriran sungai atau danau. Ikan mas hidup baik di daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl) pada suhu 25-30°C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadar garam) 25-30 ppm (Khairuman *et al.*, 2008).

2.1.3 Jenis Pakan dan Kebiasaan Makan Ikan Mas (*C. carpio*)

Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), ikan mas termasuk ikan yang aktif, ikan mas akan bergerak cepat ke arah makanannya dan menangkap pakan tersebut. Ikan mas akan lebih agresif apabila dalam kepadatan tinggi. Ikan mas tergolong jenis ikan omnivora, yakni pemakan segala. Pakan utama ikan mas adalah tumbuhan dan binatang yang terdapat di dasar dan tepi perairan. Agar pertumbuhannya optimal, dalam budidaya ikan mas diperlukan pakan tambahan berupa pelet.

Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan mas menyukai memakan berupa jasad hewan atau tumbuhan yang hidup di dasar perairan/kolam. Selain itu, ikan mas juga memakan protozoa dan zooplankton seperti copepoda dan cladocera. Ikan mas sering mencari sumber makanan (jasad-jasad renik) di sekeliling pematang. Ikan mas juga suka mengaduk-aduk dasar kolam untuk mencari makanan yang bisa dimanfaatkan sebagai sumber makanan seperti larva *insecta*, cacing-cacingan dan sebagainya (Santoso, 1993).

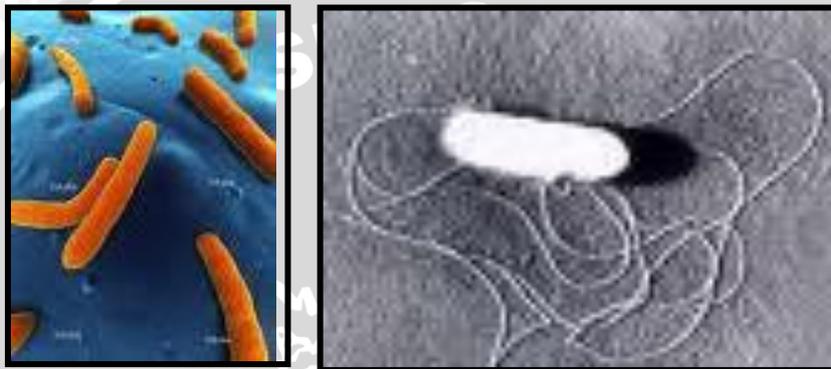
2.2 Sifat Biologi *Aeromonas* sp.

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Aeromonas* sp.

Menurut Janda dan Abbott (2010), klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Filum : Protobacteria
- Klas : Gammaproteobacteria
- Ordo : Aeromonadales
- Family : Aeromonadaceae
- Genus : *Aeromonas*
- Spesies : *A. hydrophila*

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0-1,5 μm dan lebar 15,7-15,8 μm , termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakulatif anaerobik dan merupakan bakteri peyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C (Kabata, 1985). Penampang secara mikroskopik bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri *Aeromonas sp.* (Aberoum dan Jooyandeh, 2010).

2.2.2 Pertumbuhan Optimal Bakteri *Aeromonas sp.*

A. hydrophila termasuk kelompok bakteri gram negatif yang tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38-41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0-5°C dengan kisaran pH 5,5-9. Perkembangbiakan bakteri *A. hydrophila* secara aseksual dengan pemanjangan sel yang diikuti pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel kurang lebih 10 menit (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Menurut Mangunwardoyo *et al.* (2010), bakteri *Aeromonas* diperkirakan mencapai pertumbuhan optimal pada fase eksponensial, yaitu pada jam ke 4 – ke 12. Bakteri selanjutnya akan mengalami fase stasioner pada masa inkubasi sampai dengan 48 jam. Pada fase tersebut, presentase antara bakteri yang hidup dan yang mati adalah sama. Bakteri akan mengalami fase kematian

setelah melewati fase 24 jam. Kondisi tersebut terkait dengan ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang tepat untuk kehidupan bakteri tersebut.

2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan Bakteri *Aeromonas sp.*

Pada kondisi normal *out break* penyakit tidak muncul, tetapi interaksi dengan lingkungan perairan, kondisi inang dan patogen yang tidak harmonis akan mudah menyebabkan munculnya *out break* penyakit. Oleh karena itu, penyebaran penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas sp.* ini sangat cepat, sehingga perlu suatu upaya penanggulangan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen ini (Wardiyanto *et al.*, 2008).

Aeromonas sp. adalah bakteri gram negatif dan merupakan penyebab penyakit pada ikan air tawar. Gejala penyakit yang ditimbulkan bakteri *Aeromonas sp.* dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada sirip dan ekor, sisik, pendarahan pada pangkal ekor dan kerusakan insang dan organ dalam ikan (Cipriano, 2001).

Menurut Sniezko dan Axelrod (1971), serangan bakteri ini dapat terjadi dalam empat tingkat berbeda, sebagai berikut :

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

2.3 Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

Menurut Sinulingga dan Darmanti (2010), ciri khusus dari *Gracilaria* sp. adalah thalus berbentuk silindris dan permukaannya licin. Thalus tersusun oleh jaringan yang kuat, bercabang-cabang dengan panjang 250 mm, garis tengah antara 0,5-2,0 mm. Percabangan *alternate* yaitu posisi tegak dengan percabangan yang berbeda tingginya, bersebelahan atau pada jarak tertentu berbeda satu dengan yang lain, kadang-kadang hampir *dichotomous* dengan pertulangan lateral yang memanjang menyerupai rumput. Bentuk cabang silindris dan meruncing di ujung cabang.

Menurut Bird *et al.* (1990), klasifikasi *Gracilaria* sp. adalah sebagai berikut, morfologi *Gracilaria* sp. ditunjukkan pada Gambar 3.

Divisio : Rhodophyta

Classis : Rhodophyceae

Familia : Gracilariaceae

Genus : Gracilariopsis

Species : *Gracilaria* sp.



Gambar 3. Rumput Laut *Gracilaria* sp. (Sinulingga dan Darmanti, 2010).

Ditinjau dari panjang thalus *Gracilaria verrucosa* mempunyai thalus yang paling panjang yaitu sekitar 10-60 mm apabila dibandingkan dengan rumput laut

jenis *Gracilaria coronopifolia*, *Gracilaria salicornia* dan *Gracilaria gigas* yang ukuran thalusnya rata-rata 5-20 mm. Apabila ditinjau dari bentuk tetrasporangia *G. verrucosa* mempunyai bentuk yang agak bulat sampai oval, sementara rumput laut *Gracilaria coronopifolia* bentuknya lebih lonjong dengan ukuran yang paling panjang yaitu sekitar 40-70 μm (Sjafrie, 1990).

2.3.2 Habitat dan Penyebaran Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

Sjafrie (1990), menyatakan bahwa *Gracilaria* sp. umumnya hidup sebagai fitobentos, melekat dengan bantuan cakram pelekat pada substrat padat. Terdiri dari kurang lebih 100 spesies yang menyebar luas dari perairan tropis sampai subtropis. Hal ini menyebabkan beberapa ilmuwan menyebutnya sebagai spesies yang kosmopolit. *Gracilaria* sp. hidup di daerah litoral dan sub litoral, sampai kedalaman tertentu, yang masih dapat dicapai oleh penetrasi cahaya matahari. Beberapa jenis hidup di perairan keruh, dekat muara sungai.

Rumput laut jenis *Gracilaria* sp. merupakan salah satu jenis alga merah (*Rhodophyta*) yang tumbuh di daerah tropik dan subtropik yang tumbuh dominan di perairan laut dangkal (Komarawidjaja dan Kurniawan, 2008).

2.3.3 Manfaat dan Kegunaan Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

Rasyid *et al.* (1999), menyatakan bahwa agar terutama digunakan dalam pengolahan bahan makanan. Dalam bidang farmasi agar digunakan untuk pencetakan gigi dan suppositoria. Dalam bidang bioteknologi, agar digunakan sebagai media pemeliharaan mikroorganisme, dengan kemajuan teknik rekombinasi DNA dan fusi sel, maka kegiatan seleksi, cloning dan propagasi mikroorganisme yang direkayasa dilakukan dalam media agar. Agar diekstraksi secara komersial dari sejumlah alga merah terutama dari jenis *Gracilaria* sp.

Rumput laut merupakan alga multiselular yang mengandung substansi yang aktif secara imunologi. Ekstrak rumput laut *Gracilaria* telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai antitumor, meningkatkan aktivitas kemotaksis

makrofage, menstimulasi aktivitas sekresi radikal oksigen dan fagositosis pada makrofage (Castro *et al.*, 2004).

Selim (2012), menyatakan bahwa potensi rumput laut yang mempunyai efek farmasi yang telah dibuktikan pada penelitian *in vivo* yaitu kemampuannya sebagai antioksidan, imunostimulan dan aktivitas antibakteri. Pada penelitian secara *in vitro* telah dibuktikan bahwa ekstrak rumput memungkinkan untuk digunakan sebagai antioksidan. Beberapa penelitian telah mempelajari kemampuan ekstrak pada rumput laut untuk menghambat peroksidasi lemak dan dapat mengurangi beberapa efek dari radikal bebas.

Rumput laut *Gracilaria* sp. merupakan salah satu bahan alami yang tidak menimbulkan resistansi untuk mengatasi penyakit pada makhluk hidup karena memiliki metabolit sekunder yang dapat membunuh bakteri. Melki *et al.* (2011), dalam penelitiannya melaporkan bahwa ekstrak *Gracilaria* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. Coli* sebesar $14,33 \pm 3,22$ mm dan *S. Aureus* sebesar $12,67 \pm 2,08$ mm. Milasari (2009), menambahkan bahwa ekstrak *Gracilaria* sp. bersifat bakteristatik menghambat pertumbuhan *Vibrio alginoliticus* pada konsentrasi 40% dan *Vibrio Anguillarum* pada konsentrasi 30%.

2.3.4 Kandungan Bahan Aktif pada Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

Menurut Reskika (2011), karagenan senyawa polisakarida yang dihasilkan dari beberapa jenis alga merah memiliki sifat antimikroba, antiinflamasi, antipiretik, antikoagulan dan aktivitas biologis lainnya. Rumput laut memproduksi berbagai senyawa yang terdiri dari senyawa primer yaitu merupakan senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup dan bersifat esensial bagi proses metabolisme sel seperti fikokoloid, vitamin, asam lemak tak jenuh (UFA) dan karbohidrat. Senyawa sekunder (metabolit sekunder) adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk

yang berbeda seperti terpenoid, steroid, kumarin, flavonoid dan alkaloid. Fungsi metabolit sekunder adalah untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan.

Komponen berbeda pada rumput laut seperti carotenoid, mycosporine yang berhubungan dengan asam amino dan terpenoid bersama-sama membentuk komponen fenol seperti asam sinamik, phlorotanin, dan bromofenol telah terbukti dapat ditemukan pada ekstrak rumput laut. Komponen-komponen kimia tersebut berperan penting terhadap aktivitas antimikroba dan telah banyak ditemukan pada makroalga (Selim, 2012).

Menurut Prajitno (2006), E. *Cottoni*, *Gracilaria* maupun H. *Opuntia* pada konsentrasi 3% mempunyai sifat bakteriostatik dan bakteriosidal terhadap bakteri. Pada ekstrak H. *Opuntia* mengandung 52,25% fenolik. Wiyanto (2010), menambahkan bahwa golongan senyawa kimia utama yang mempunyai sifat antibakteri adalah fenol, alkohol, halogen, logam berat, zat warna, senyawa kuarter asam dan basa.

2.3.5 Kandungan Ekstrak Fenol pada *Gracilaria* sp.

Anwariyah (2011), menyatakan bahwa senyawa fenol merupakan senyawa yang banyak terdapat pada hampir semua jenis rumput laut. Senyawa fenol dapat menangkap radikal-radikal peroksida dan dapat mengkelat logam besi yang mengkatalisa peroksida lemak. Sebagian besar senyawa fenol merupakan senyawa aromatik yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan sinar UV.

Gracilaria sp., L dengan pelarut aseton adalah sebesar 45,29 mg/g. Hasil ekstrak tersebut lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kandungan fenolik total rumput laut merah dari spesies yang berbeda yaitu *Gracilaria edulis* sebesar 16,26 mg/g ekstrak, maupun *Gracilaria changii* sebesar 5,0 mg/g (Lestario *et al.*, 2008).

Julyasih *et al.* (2009), dalam penelitiannya menyatakan bahwa persentase total fenol pada rumput laut *Gracilaria* sp. sebesar 0,9 % dapat menghasilkan aktivitas antiradikal sebesar 9,7%. Nilai tersebut lebih tinggi apabila dibandingkan dengan aktivitas antiradikal pada rumput laut *E. Spinosum* sebesar 2,2 %.

2.3.6 Peranan Ekstrak Fenol dalam Bidang Immunologi

Katekin merupakan senyawa fenol, aktivitasnya sebagai antioksidan yang lebih tinggi daripada antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol). Katekin mempunyai efek anti-proliferasi dan bersifat toksik terhadap sel kanker. Kebanyakan senyawa fenol telah diuji secara *in vitro* dan *in vivo* memperlihatkan kemampuan antioksidan, antiinflamasi dan antialergi. Sedangkan senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai imunostimulan agen adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoids, alkaloid dan polifenol (Suhirman dan Winarti, 2010).

Pada umumnya minyak atsiri, tanin dan flavonoid berkhasiat antimikroba dan meningkatkan sistem imun tubuh dengan menstimulasi sel sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler. Pada penelitian sebelumnya flavonoid yang merupakan senyawa dari polifenol telah menunjukkan efek antimikroba dan meningkatkan sistem imun (Chrisnaningsih, 2006).

Menurut Samsundari (2006), beberapa grup senyawa kimia utama yang bersifat anti mikroba adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, logam berat dan senyawanya, zat warna dan deterjen, senyawa ammonium khemosterilan. Kandungan fenol dapat menyebabkan protein mengalami denaturasi. Prosesnya didahului oleh perubahan struktur molekul yang menyebabkan protein tidak dapat melakukan fungsinya sehingga sel bakteri mengalami kematian.

Wiyanto (2010), menambahkan bahwa sifat daya hambat senyawa fenol terhadap mikroba disebabkan karena gugus hidroksil yang dimilikinya dapat berinteraksi dengan protein membran sel mikroba melalui ikatan hidrogen, sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya.

2.3.7 Metode Ekstrak Kasar Fenol pada *Gracilaria* sp.

Ekstraksi adalah proses pemisahan dari bahan padat, cair atau senyawa organik dari campurannya dengan memanfaatkan perbedaan sifat kelarutan dari masing-masing komponen dengan bantuan pelarut. Proses ekstraksi rumput laut menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses penyaringan dengan cara perendaman dengan pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat yang mudah larut akan melarut (Reskika, 2011).

Hukmah (2007), menambahkan bahwa pemilihan metode maserasi dikarenakan senyawa polifenol rentan terhadap panas sehingga tidak bagus menggunakan metode soxhlet. Penggunaan ekstraksi dengan metode soxhlet dapat merusak senyawa polifenol.

Pelarut ekstraksi yang digunakan untuk melarutkan rumput laut *E.spinosum*, *Bulung Boni* (*Caulerpa* spp.), dan *Bulung Sangu* (*Gracilaria* spp.) dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar. Etanol mudah menguap, sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*). Selain itu juga aman digunakan untuk bahan pangan. Penggunaan pelarut paling berpengaruh dalam mempengaruhi kepekatan dari hasil ekstraksi atau penentuan pigmen yang terdeteksi. Aturan umum dari polaritas adalah polar menyukai yang polar, dan yang tidak polar menyukai tidak polar (Julyasih *et al.*,2009).

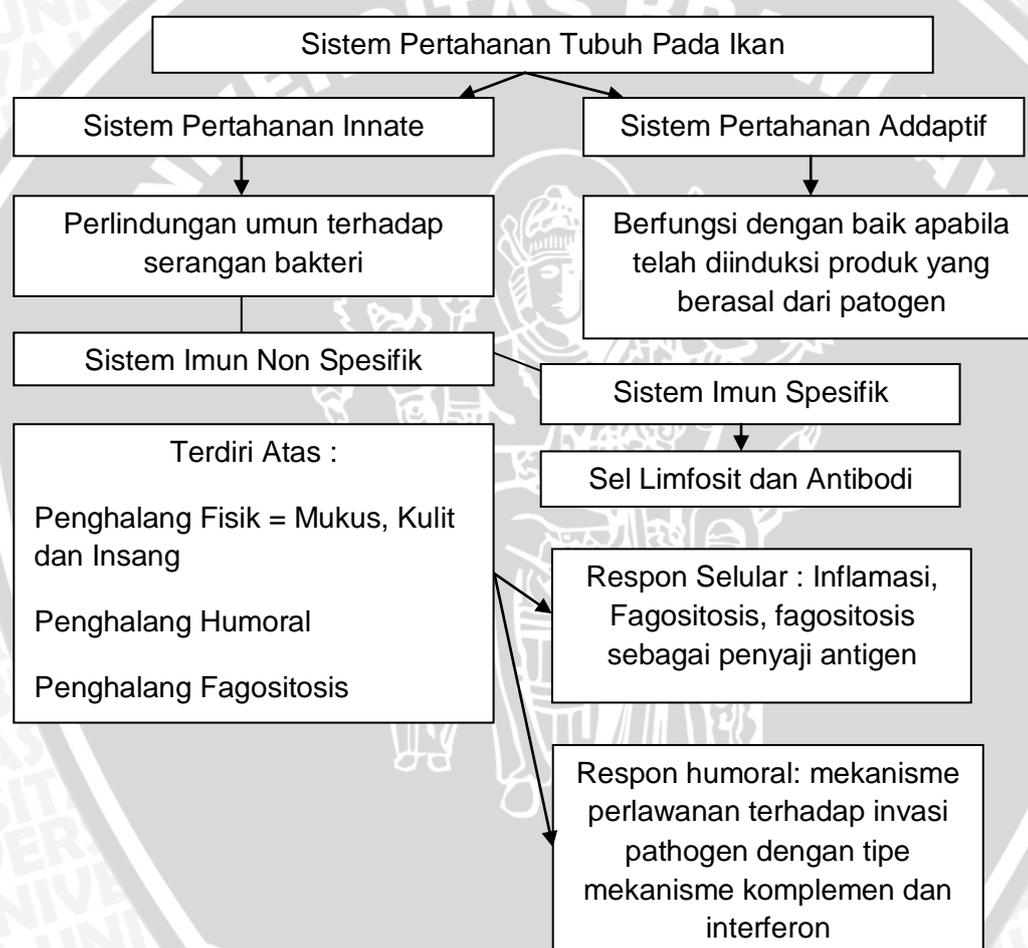
2.3.8 Metode Pengujian Ekstrak Fenol

Menurut Indrani (2012), karakterisasi dengan menggunakan FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam sampel. Pengukuran menggunakan spektrofotometer FTIR.

Sampel dicampurkan dengan KBr, untuk kemudian di scan dengan jangkauan energi inframerah dalam ukuran bilangan gelombang antara 4000-4500 cm^{-1} , energi gelombang elektromagnetik dinyatakan dalam bilangan gelombang.

Beberapa turunan senyawa fenol dapat dideteksi dengan menganalisa spektrometer massa pada kromatogram GC MS, kemudian dicocokkan dengan database untuk mengetahui fraksi tertinggi (Parwata *et al.*, 2009).

2.4 Sistem Pertahanan Pada Tubuh Ikan Mas (*C. carpio*)



Gambar 4. Sistem Pertahanan Tubuh Pada Ikan (Maswan, 2008).

Menurut Alifuddin (2002), respon dan faktor humoral antara lain antibodi, transferin, interferon, protein C-reaktif; respon dan faktor seluler seperti sel makrofag, sel killer (neutrofil reaksi penolakan allograft dan hipersensitivitas).

Selain itu, baris mekanik dan kimiawi permukaan seperti kulit, sisik dan mukus pada permukaan tubuh dan insang juga merupakan alat pertahanan tubuh ikan yang bersifat non spesifik. Respon humoral merupakan respon yang bersifat spesifik dilakukan oleh suatu substansi yang dikenal sebagai antibodi atau imunoglobulin, sedangkan respon seluler ikan bersifat non spesifik dilakukan oleh "cell mediated imunity". Komunikator dan amplikator dalam fungsi dan mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan dilakukan oleh limfokin, interleukin, interferon dan sitokin.

2.4.1 Pertahanan Non Spesifik

Makhluk hidup telah dilengkapi dengan dua sistem kekebalan tubuh yaitu kekebalan non-spesifik/alamiah (*innate immune system*) dan spesifik/didapat (*adaptive immune system*). Pada ikan, respon imun baru terbentuk secara sempurna disaat ikan telah dewasa. Ikan-ikan muda tidak mempunyai respon imun spesifik yang sempurna dan bergantung pada respon selular non-spesifik untuk bertahan dari serangan infeksi mikroba. Pertahanan non-spesifik merupakan pertahanan utama pada ikan stadia benih dan ikan *fingerling* (Suhermanto *et al.*, 2011).

Utomo (2001), menyatakan bahwa pada ikan yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik adalah meliputi mukus, epidermis, dermis dan sisik. Sistem ini akan melindungi ikan terhadap benda asing baik hidup maupun tak hidup. Pertahanan paling luar adalah mukus yang terdapat pada sisik ikan, mukus dihasilkan dari jaringan epidermis, sehingga bila ada parasit yang menyerang menghambat ikan maka mukus dapat menghambat pelekatan parasit tersebut. Mukus mengandung enzim lisozim yaitu enzim yang bersifat proteolitik dan memiliki pH yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Sisik ikan mas merupakan lapisan yang keras dan merupakan perisai untuk melindungi tubuh dari serangan parasit atau bakteri. Bila sisik lepas

maka pertahanan tubuh akan relatif lemah. Dermis melindungi kulit yang paling bawah dan lapisan ini terdiri atas jaringan konektif fibrosa yang banyak mengandung pembuluh darah.

Menurut Maswan (2008), respon selular imun non spesifik meliputi beberapa tipe mekanisme : inflamasi, fagositosis, fagositosis sebagai penyaji antigen (*antigen presenting cells*) dan *non specific cytotoxic cells*. Inflamasi merupakan upaya proteksi reaksi restoratif dari tubuh sejak ikan berusaha menjaga kondisi kestabilan sistem dari pengaruh lingkungan yang kurang baik. Irianto (2005), menambahkan bahwa inflamasi ditandai dengan rasa sakit, pembengkakan, kulit memerah atau peradangan, suhu tubuh naik atau kehilangan fungsi-fungsi fisiologis. Hal tersebut merupakan respon protektif awal tubuh dalam upaya menghalangi patogen dan menghancurkannya.

2.4.2 Pertahanan Spesifik

Kresno (2001), menyatakan bahwa sistem imun spesifik (*adaptive immunity*) merupakan mekanisme interaksi antara sel limfosit dan fagosit. Respon spesifik ini diawali dengan aktifitas sel-sel fagosit atau *antigen presenting cells* (APC) yang memproses dan mempresentasikan potongan-potongan antigen pada sel-sel imun spesifik. Sel limfosit merupakan inti dalam respon imun spesifik karena sel-sel ini merupakan sel yang mengenal berbagai antigen, baik antigen yang terdapat intraselular maupun ekstraselular (dalam cairan tubuh ataupun dalam darah).

Antigen yang masuk kedalam tubuh ikan yang utama akan melalui insang, tetapi kontribusinya lebih kecil jika dibandingkan dengan jalan lain seperti lewat saluran pencernaan. Untuk mengetahui adanya antigen maka dapat dideteksi pada organ limfoid yaitu organ yang berperan dalam pertahanan spesifik seperti limpa, ginjal dan timus. Fungsi organ ini antara lain antibodi spesifik yang dapat menghancurkan benda asing (Utomo, 2001).

2.5 Imunostimulan untuk Meningkatkan Respon Imun

2.5.1 Metode Pemberian Imunostimulan

Menurut Jasmanidar (2009), imunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Imunostimulasi merupakan cara untuk memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut. Imunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu.

Sakai (1999), menambahkan bahwa imunostimulan meningkatkan daya tahan terhadap penyakit infeksi, bukan karena meningkatnya respon imun spesifik oleh karena meningkatnya mekanisme pertahanan non spesifik.

Seperti halnya dengan vaksin, imunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (oral) dan perendaman. Imunostimulan ini dapat diberikan secara terus menerus selama 1 minggu kepada larva ikan ketika masih dalam hapa pendederan, kemudian dihentikan pemberiannya dan diberikan kembali pada minggu ke 3 selama satu minggu. Karena itu, pada tahap awal, imunostimulan diberikan melalui perendaman, dan pada pemberian selanjutnya dapat diberikan bersama pakan. Pemilihan cara aplikasi imunostimulan didasarkan atas kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya (Alifuddin, 2002).

2.5.2 Mekanisme Kerja Imunostimulan

Berbeda dengan vaksin, imunostimulan tidak direspon ikan dengan mensintesis antibodi, melainkan peningkatan aktivitas dan reaktivitas sel pertahanan seluler ataupun humoral. Peningkatan ini didasarkan atas

kemampuan imunostimulan menginduksi berlangsungnya transformasi limfoblastik yang ditunjukkan dengan memakai isotop tritium (H^3). Aktivitas fagositik ini merupakan manifestasi peningkatan respon seluler dan pada akhirnya akan meningkatkan respon humoral (Alifudin, 2002).

Ikan yang diberikan imunostimulan biasanya menunjukkan peningkatan aktivitas sel fagositik. Aktifitas sel fagositik dapat dideteksi dengan fagositosis, *killing* dan *chemotaxis*. Limfosit juga diaktifkan oleh imunostimulan, aktifitas lisozim juga dipengaruhi oleh pemberian imunostimulan (Jasmanidar, 2009).

Ekstrak kasar dari *Gracilaria sp.* telah dibuktikan mempunyai kemampuan untuk mempertinggi aktivasi pada sel-T dan oleh karena itu, dapat meningkatkan aktivitas imunostimulan secara potensial. Bagaimanapun juga, ditemukan juga kandungan sitotoksik pada konsentrasi yang lebih tinggi. Hal tersebut bisa terjadi, saat toksik timbul bersamaan dengan penambahan ekstrak yang dapat mengaktifasi kematian sel. Komponen yang ada pada ekstrak kasar dari tumbuhan dapat memberikan respon yang positif terhadap kerja imunostimulan (Kumar *et al.*, 2012).

2.6 Pengamatan Histopatologi Jaringan

Menurut Setyowati *et al.* (2012), analisa histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ-organ yang menjadi sasaran utama dari bahan pencemar seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring lingkungan dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme.

Persiapan jaringan melalui tahap fiksasi, pemotongan jaringan, pelabelan specimen, refiksasi, dan dekalsifikasi. Selanjutnya, pengolahan jaringan dilakukan dengan tahap dehidrasi, penjernihan, penyusupan parafin dan pembuatan blok. Jaringan berparafin dalam bentuk blok yang akan dibuat irisan tipis jaringan dengan mikrotom sehingga menjadi preparat yang dapat diwarnai dengan beberapa jenis pewarna jaringan, seperti pewarnaan hematoksilin eosin, giemsa dan lain-lain (Panigoro *et al.*, 2007).

2.7 Gejala Patologi Klinis Pada Ikan

Taukhid *et al.* (2004), menunjukkan beberapa gejala-gejala yang timbul pada ikan mas dan koi yang terinfeksi bakteri : 1) produksi lendir (mukus) berlebih sebagai respon fisiologis terhadap kehadiran patogen, selanjutnya produksi lendir menurun drastis sehingga tubuh ikan terasa kasar, 2) insang berwarna pucat dan terdapat bercak putih atau coklat (sebenarnya adalah kematian sel-sel insang atau nekrosa insang), selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tapis insang dan akhirnya membusuk. Secara mikroskopis terjadi adanya kerusakan jaringan yang serius serta kematian sel yang berat, 3) pendarahan (hemoragi) disekitar pangkal dan ujung sirip serta permukaan tubuh lainnya, 4) adanya kulit melepuh, 5) hati berwarna pucat selanjutnya menjadi rusak, 6) ginjal (anterior dan posterior) berwarna pucat.

Sistem infeksi dapat dilihat dari karakterisasi difusi nekrosis pada beberapa organ dalam dan ada juga pada muatan-muatan melanin pada makrofage darah. Secara internal, pada lambung dan ginjal merupakan organ infeksi septicemia akut. Lambung dapat menjadi pucat dan berwarna kehijauan sedangkan ginjal akan menjadi bengkak dan rapuh. Organ-organ tersebut rupanya diserang oleh toksik pada bakteri dan kehilangan integritas strukturalnya (Cipriano, 2001).

2.8 Jaringan Otot sebagai Parameter Uji Histopatologi

Beberapa penelitian telah mempelajari tentang perubahan histopatologi otot yang ditengarai dapat mengindikasikan penyakit akut dan menunjukkan gejala dini adanya infeksi. Bagaimanapun juga, beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa nekrosis dan degenerasi otot pada ikan ditimbulkan oleh infeksi *Aeromonas sp.* Gejala selanjutnya adalah Inflamasi akut dan penebalan lamella, inflamasi pada vakuola dan lemak di hepatocyte, nekrosis pada otot cardiac. Menurut hasil observasi, kesemuanya itu adalah infeksi bakteri *Aeromonas sp.* (Aydin and Ciltas, 2004).

Miyazaki *et al.* (2001), Akibat serangan bakteri *Aeromonas* akan menyebabkan edematous dan pendaharan, sehingga memperluas kerusakan pada jaringan kulit dan memisahkan jaringan epidermis kemudian diikuti dengan pemisahan jaringan ikat longgar yang akan mengakibatkan deposisi fibrin pada lapisan kulit. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan myofibril yang terfragmentasi sehingga berpengaruh pada otot akibat merosotnya mitokondria dan kerusakan retikula endoplasma. Pada bagian jantung, serat otot yang mengandung myofibril mengalami degenerasi vacuolar, dan myofibril digumpalkan dalam keadaan atrofi dalam lapisan miokardium. Pada lapisan miokardium, pendarahan kadang-kadang terjadi diantara serat otot.

2.9 Kualitas Air

Suhu adalah kapasitas panas. Pengukuran suhu sebaiknya secara siklus harian dengan termometer, sehingga suhu yang terukur benar-benar akurat tanpa banyak dipengaruhi oleh suhu sekitarnya (Sutisna dan Ratno, 1995).

Ikan mas masuk kedalam golongan family *cyprinidae*. Ikan Mas memiliki tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang tidak terlalu dalam dan tidak terlalu deras, misalnya di pinggiran sungai atau danau. Ikan ini dapat hidup baik pada

ketinggian 150-600 m di atas permukaan laut (dpl) dan pada suhu 25⁰-30⁰C (Praseno *et al.*, 2010).

Derajat keasaman (pH) adalah suatu ukuran dari konsentrasi ion hidrogen yang menunjukkan suasana air tersebut bereaksi asam atau basa. Menurut Susanto (1990), pada umumnya pH yang sangat cocok untuk semua jenis ikan berkisar antara 6,7 – 8,6. Saputra *et al.* (2010), menambahkan bahwa keasaman (Ph) air pada media pemeliharaan berkisar antara 6,32-7,85. Kondisi keasaman perairan pada media pemeliharaan tidak mempengaruhi pertumbuhan ikan mas yang dipelihara, karena masih dalam kondisi optimum untuk pertumbuhan yaitu berkisar antara 6-8.

Kandungan oksigen terlarut (DO) pada media pemeliharaan berkisar antara 6,30-9,03 mg/L. Kondisi ini sangat baik untuk pertumbuhan ikan mas yang dipelihara, karena nilai DO sekitar 4-5 mg/L saja sudah sangat baik untuk pemeliharaan ikan mas (Saputra *et al.*, 2010). Mantau dan Sudarty (2011), menambahkan bahwa kisaran oksigen terlarut untuk ikan mas yang optimal antara 3-6 ppm.

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini (Lampiran 1) diantaranya adalah timbangan analitik, hot plate, beaker glass, baskom, rotary evaporator, akuarium, peralatan aerasi, scoop net, toples, termometer, pH meter, DO meter, spektrofotometer, sectio set, botol film, tissue processor, *embedding machine*, mikrotom, dan fotomikroskop.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah ikan mas (*C. carpio*) ukuran 8-10 cm berasal dari Balai Benih Ikan (BBI), Punten – Batu, rumput laut *Gracilaria* sp. sebanyak 3 kg berasal dari Kota Pasuruan dan bakteri *Aeromonas* sp. (kepadatan 10^7 sel/ml) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan awal 10^9 sel/ml. Bahan penunjang lain adalah pakan ikan, akuades, etanol 80%, etanol 96%, aseton, formalin 10%, hematoksilin eosin, parafin, litium karbonat dan entellan (Lampiran 1).

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan metode eksperimen. Menurut Setyanto (2005), penelitian eksperimen bertujuan untuk meneliti kemungkinan sebab akibat dengan mengenakan satu atau lebih kondisi perlakuan pada satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Definisi eksperimen secara lebih singkat, adalah merupakan cara mengatur kondisi suatu eksperimen untuk mengidentifikasi variabel-variabel dan menentukan sebab akibat suatu kejadian.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau dengan perantara sebuah alat, baik alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

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

Pada penelitian ini, variabel bebas yang digunakan adalah perlakuan pemberian ekstrak fenol *Glacilaria* sp. dengan dosis 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l sebagai bahan imunostimulan. Perlakuan kontrol dilakukan untuk mempermudah penganalisaan hasil. Kontrol pembanding adalah kontrol normal, kontrol positif

dan kontrol negatif. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 18 sampel. Rancangan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1. berikut :

Tabel 1. Rancangan perlakuan uji imunostimulan pada ikan Mas (*C. carpio*)

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

Keterangan :

Kn : Kontrol normal (tanpa pemberian ekstrak fenol *Gracilaria* sp. serta tanpa penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp.)

K(+): Kontrol positif (dilakukan pemberian ekstrak fenol *Gracilaria* sp. tanpa penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp.)

K(-): Kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dilakukan penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp.)

Perlakuan pemberian ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dan penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp. serta perendaman dengan dosis :

A : 1 gr/l

B : 1,5 gr/l

C : 2 gr/l

3.4 Penelitian Pendahuluan

3.4.1 Penentuan pelarut terbaik untuk maserasi

- Rumput laut *Gracilaria* sp. kering dibersihkan dari pengotornya dan dipotong kecil-kecil.

- Bahan yang telah disiapkan kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 300 gram dan dimaserasi (direndam) dengan pelarut yang berbeda yaitu akuades, aseton, etanol 80% dan atanol 96% selama 24 jam.
- Bahan selanjutnya disaring untuk memperoleh bahan aktif yang terkandung.
- Hasil penyaringan tersebut, selanjutnya diuji dengan mengukur nilai absorbansi untuk kemudian dibandingkan konsentrasi fenol tertinggi dengan menggunakan kurva standart fenol.
- Konsentrasi fenol tertinggi pada pelarut etanol 96%.

3.4.2 Penentuan waktu terbaik maserasi *Gracilaria* sp.

- Rumput laut *Gracilaria* sp. kering disiapkan masing-masing sebanyak 300 gr.
- Bahan tersebut direndam dengan menggunakan etanol 96% selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam.
- Setelah proses maserasi, bahan disaring untuk memperoleh bahan aktif yang terkandung.
- Hasil penyaringan tersebut, selanjutnya diuji dengan mengukur nilai absorbansi untuk kemudian dibandingkan konsentrasi fenol tertinggi dengan menggunakan kurva standart asam galat.
- Konsentrasi fenol tertinggi pada maserasi yang dilakukan selama 48 jam.

3.4.3 Penentuan dosis ekstrak fenol *Gracilaria* sp.

- Ekstrak fenol *Gracilaria* sp. ditimbang sebanyak 1; 1,5; 2; 3; 4 dan 5 gr.
- Masing-masing bahan ekstrak dilarutkan kedalam 5 liter air
- Ikan mas (*C. carpio*) sebanyak 10 ekor, dimasukkan dalam akuarium dengan dosis ekstrak yang berbeda.
- Perendaman dilakukan sampai kematian ikan mencapai 50% dalam range waktu 24 jam.
- Hasil yang diperoleh adalah kematian ikan sampai 50% terjadi pertama pada dosis 3 gr/l sehingga diasumsikan dosis yang digunakan adalah kurang dari 3 gr/l.

3.4.4 Penentuan waktu perendaman terbaik dengan ekstrak fenol

- Ikan mas (*C. carpio*) masing-masing 10 ekor direndam dengan ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dilakukan selama 10, 12 dan 14 jam.
- Ekstrak fenol *Gracilaria* sp. disiapkan dengan dosis 1; 1,5 dan 2 gr/l
- Masing-masing perwakilan Ikan mas (yang sebelumnya telah diberi tanda) dari proses perendaman dengan waktu yang berbeda, dimasukkan kedalam akuarium dosis.
- Dilakukan ujiantang dengan bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7
- Pengamatan dilakukan dengan melihat kematian ikan sebanyak 50%
- Hasil yang diperoleh adalah kematian ikan sebesar 50% terjadi pertama pada perendaman 12 jam, sehingga diasumsikan perendaman yang dilakukan adalah kurang dari 12 jam.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Persiapan Wadah Penelitian

Wadah yang digunakan yaitu akuarium ukuran $30 \times 30 \times 30$ cm³ sebanyak 15 buah. Sebelum digunakan, akuarium dicuci bersih, diberi desinfektan dan dikeringkan selama sehari. Akuarium dibersihkan dengan memberikan *chlorine* (untuk menghindari kontaminasi bakteri), untuk kemudian dinetralsisir dengan menggunakan *Na Thiosulfat*. Dosis *chlorine* 50 gr/m³ dan dosis *Na Thiosulfat* adalah 25 gr/m³. Kemudian diisi air tawar sebanyak 9,9 liter dan dilengkapi instalasi aerasi untuk menjaga ketersediaan oksigen.

3.5.2 Persiapan Ikan Mas (*C. carpio*)

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan mas (*C. carpio*) dengan ukuran 8-10 cm, sebanyak 10 ekor. Wu *et al.* (2010), menyatakan kepadatan ikan untuk eksperimen sebanyak 10 ekor per akuarium. Selanjutnya dilakukan aklimatisasi selama 7 hari pada akuarium. Selama aklimatisasi ikan mas diberi pakan pelet secara adlibitum sebanyak 2 kali sehari dan dilakukan penyiponan apabila air pemeliharaan sudah kotor.

3.5.3 Pembuatan ekstrak fenol *Gracilaria* sp.

- Rumput laut *Gracilaria* sp. ditimbang bahan basah.
- Kemudian dijemur dan dibersihkan dari kotoran yang menempel, dipotong kecil-kecil dan ditimbang bahan kering.
- Bahan tersebut dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 (*Gracilaria* sp.) : 3 (etanol 96%) selama 48 jam.
- Disaring menggunakan kertas saring.
- Bahan hasil ekstrak tersebut, diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak fenol.
- Ekstrak fenol dipanaskan dengan menggunakan waterbath dengan suhu 50°C, sampai menjadi padatan (serbuk).
- Hasil ekstrak fenol ditimbang sebagai bahan ekstrak.

3.5.4 Pemberian dosis senyawa fenolik sebagai imunostimulan

Ikan mas (*C. carpio*) dengan ukuran 8-10 cm diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian dilakukan pemberian ekstrak fenol *Gracilaria* sp. sebagai imunostimulan dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l. Volume air yang digunakan untuk media perendaman sebanyak 5 liter, kemudian dicampurkan dengan ekstrak fenol sesuai dengan dosis yang ditentukan (Lampiran 2).

Perendaman dengan ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dilakukan sebanyak dua kali. Masing-masing perendaman dilakukan selama 10 jam dengan waktu adaptasi setelah perendaman pertama selama 3 hari, dilanjutkan dengan perendaman kedua. Setelah 3 - 4 jam setelah perendaman kedua, penginfeksian dengan menggunakan bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml dilakukan selama 24 jam.

3.5.5 Penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp.

Bakteri *Aeromonas* sp. diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dengan kepadatan 10^9 sel/ml sebanyak 1000 ml. Bakteri yang

digunakan untuk menginfeksi ikan mas yaitu dengan kepadatan 10^7 sel/ml (Selvaraj *et al.*, 2009 dalam Samad, 2010).

Sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri yang diinginkan tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran bakteri terlebih dahulu dengan menggunakan rumus pengenceran.

Menurut Cappucino (1988), rumus pengenceran adalah sebagai berikut :

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

Dimana :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

Dari hasil perhitungan di atas, dapat diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan untuk penginfeksian sebanyak 0,1 liter dan air tawar sebanyak 9,9 liter. Selanjutnya, 10 ekor ikan mas dimasukkan dalam akuarium dan direndam selama 24 jam sampai ikan menunjukkan gejala-gejala terserang *Aeromonas sp.* (warna tubuh pucat, berenang tidak seimbang dan sering ke permukaan). Sebelum penginfeksian ikan dipuasakan selama satu hari. Kemudian setelah diinfeksi, ikan diadaptasikan selama 3 hari dan diamati gejala klinisnya. Selama masa penginfeksian ikan tidak diberi pakan.

3.5.6 Pengamatan gejala klinis dan pengambilan jaringan otot

Pengamatan gejala klinis dilakukan pada saat masa adaptasi setelah penginfeksian. Ikan uji diamati gejala klinisnya dan dilihat apa saja perubahan yang terjadi. Setelah masa adaptasi selesai, ikan diambil sampel dagingnya untuk diamati histopatologi ototnya. Sampel daging dimasukkan kedalam botol

film dan diberi bahan pengawet yaitu formalin 10%, dilanjutkan dengan pembuatan preparat untuk histopatologi (Lampiran 3) dan pengamatan preparat hasil histopatologi.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah mengetahui berapa rendemen ekstrak fenol *Gracilaria* sp. serta pengamatan gejala klinis dan histopatologi otot ikan mas (*C. carpio*).

- Persentase berat kering/berat basah dari masing-masing rumput laut dihitung dengan rumus berikut (Zainuddin dan Malina, 2009).

$$\text{Rendemen fenol} = \frac{\text{Berat bahan kering (g)}}{\text{Berat bahan basah (g)}} \times 100 \%$$

- Pengamatan gejala klinis dan jaringan otot ikan mas

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat tingkat gejala klinis pada ikan mas yang telah diberi perlakuan. Selain itu histopatologi jaringan otot dilakukan untuk melihat perbedaan jaringan otot pada ikan mas kontrol normal, ikan kontrol positif dan negatif sera ikan mas dengan perlakuan pemberian imunostimulan dan penginfeksi.

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah kualitas air. Pada pengukuran kualitas air, parameter yang diukur meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut, dimana :

- Suhu yang diukur menggunakan termometer
- pH air yang diukur menggunakan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter

3.7 Rancangan Percobaan

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan gejala klinis dan jumlah kerusakan jaringan pada histopatologi otot secara kuantitatif, digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

Untuk hasil uji histopatologi otot pada ikan mas (*C. carpio*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan otot ikan mas yang telah diberi imunostimulan 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. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala kemudian turun ke bawah dan bergeser ke arah ekor kembali (gerak zig zag) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zigzag) (Siswandari, 2005).

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

kriteria 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) dengan rumus:

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

Tabel 2. Persentase nilai skoring (Raza'l, 2008).

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

Pengolahan data pada pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif. Pengamatan dilakukan selama 3 hari setelah ikan diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas* sp. Pengamatan gejala klinis dilakukan dengan mengamati tingkah laku ikan dan kerusakan fisik yang mungkin ditimbulkan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kadar air dan Rendemen Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria* sp.

Hasil pengukuran kadar air *Gracilaria* sp. kering pada penelitian ini adalah 10%. Nilai tersebut didapatkan dari persentase pembagian selisih berat basah sebesar 3000 gr dan berat kering sebesar 2700 gr dengan berat basah sebesar 3000 gr. Nilai kadar air tersebut, masih dalam range nilai kadar air pada rumput laut kering. Menurut Astawan *et al.* (2001), komposisi kimia rumput laut bervariasi antar individu, spesies, habitat, umur panen dan kondisi lingkungan. Kandungan air rumput laut segar, sama seperti tanaman pada umumnya yaitu berkisar antara 80-90% dan setelah pengeringan dengan udara menjadi 10-20%.

Rendemen hasil ekstraksi bergantung pada sifat kelarutan komponen bioaktifnya. Dari hasil ekstraksi dengan menggunakan etanol 96%, dapat dilihat bahwa komponen bioaktif dari *Gracilaria* sp. cenderung bersifat polar. Nilai rendemen bahan kering pada *Gracilaria* sp. adalah sebesar 0,9% . Hasil tersebut diperoleh dari persentase perbandingan berat bahan ekstrak sebesar 24,24 gr dan berat bahan kering sebesar 2700 gr.

Anwariyah (2011), dalam penelitiannya mengukur nilai rendemen rumput laut *C. rotundata* dengan menggunakan pelarut etil asetat (semi polar) sebesar 0,57% dan dengan pelarut N heksan (non polar) sebesar 0,16%. Maulida (2007), dalam penelitiannya mengukur nilai rendemen rumput laut dari jenis alga *Caulerpa lentillifera* dengan menggunakan pelarut etil asetat dan N heksan berturut-turut adalah 0,70% dan 0,08%. Reskika (2011), melakukan perhitungan rendemen terhadap berbagai jenis alga coklat dan alga hijau dengan pelarut N heksan, diklorometana dan etil asetat menunjukkan kisaran hasil rendemen yaitu 0,3%-0,66%.

Pada dasarnya, nilai rendemen tidak dapat dibandingkan karena jenis dan karakteristik kelarutan senyawa yang berbeda. Hal tersebut bisa terjadi karena senyawa aktif pada masing-masing jenis rumput laut mempunyai spesifikasi yang berbeda dalam melarutkan bahan aktifnya. Menurut Julyasih (2009), penggunaan pelarut paling berpengaruh dalam mempengaruhi kepekatan atau penentuan pigmen yang terdeteksi. Aturan umum dari polaritas adalah polar menyukai yang polar sebaliknya yang tidak polar menyukai tidak polar.

Kadar air pada rumput laut merupakan komponen yang penting karena berhubungan dengan mutu rumput laut. Tingginya kadar air pada rumput laut dapat mempercepat terjadinya kerusakan akibat adanya aktivitas mikroorganisme. Anwariyah (2011), menambahkan bahwa persentase kadar air ini dipengaruhi oleh habitat dan lingkungannya. Kandungan air dalam suatu bahan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran dan daya tahan bahan tersebut. Sehingga dapat disimpulkan, semakin rendah kandungan kadar air pada suatu bahan, maka kualitas bahan tersebut akan semakin baik.

Senyawa fenol pada *Gracilaria* sp. diduga lebih mudah larut dalam senyawa polar. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Harborne (1984), bahwa senyawa fenol cenderung larut dalam pelarut polar. Namun demikian, rendemen yang dihasilkan pada proses ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp. masih tergolong rendah, karena pelarut etanol yang digunakan adalah pelarut yang bersifat universal.

Sehingga ada kemungkinan karena banyaknya senyawa polar yang tertarik dari ekstrak, senyawa fenol yang diinginkan menjadi tidak optimal karena bercampur dengan senyawa polar yang lainnya. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Julyasih (2009) yang mengatakan bahwa pelarut etanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar.

4.2 Penentuan Pelarut dan Waktu Perendaman Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria* sp.

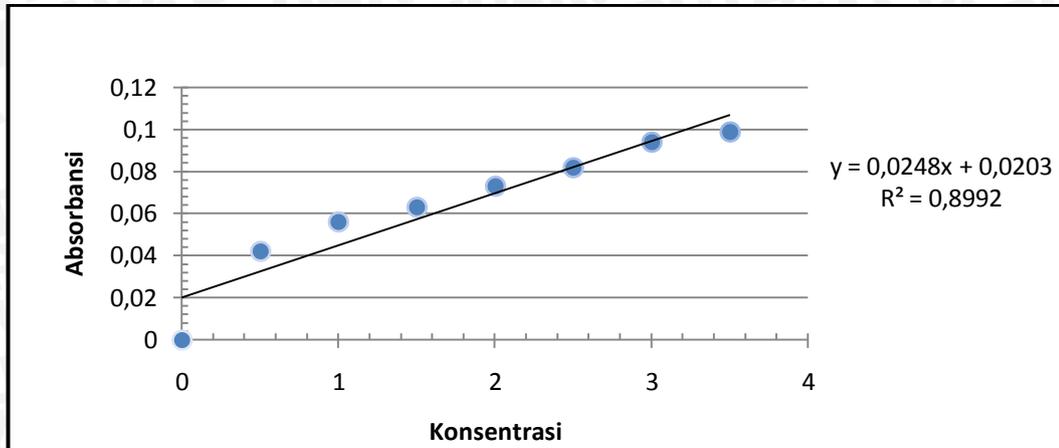
Pada proses maserasi, dibutuhkan pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolaran suatu bahan aktif yang terkandung pada rumput laut. Pemilihan jenis pelarut yang sesuai dilakukan untuk dapat mengikat senyawa aktif lebih banyak sehingga didapatkan rendemen yang tinggi. Pada penelitian ini digunakan berbagai bahan pelarut yang bersifat polar diantaranya etanol 80%, etanol 96% aseton dan akuades sebagai pembanding. Hal tersebut didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Zaheer *et al.* (2011), yang menggunakan pelarut polar chloroform, petroleum ether dan kloroform untuk maserasi rumput laut *Spathodea campalunata* dan menghasilkan kandungan senyawa fenol positif pada pelarut polar yang digunakan. Range waktu untuk maserasi yaitu 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Perlakuan tersebut didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Reskika (2011), yang melakukan maserasi selama 24 jam. Sehingga waktu yang ditentukan adalah kelipatan 24 jam. Berikut ditampilkan kurva standart fenol beserta nilai absorbansinya pada Tabel 3 dan Gambar 6.

Tabel 3. Pengukuran absorbansi larutan standar pada panjang gelombang 760 nm.

No	Konsentrasi fenol (ppm)	Absorbansi (Spektrofotometer)
1	0	0,000
2	0,5	0,042
3	1	0,056
4	1,5	0,063
5	2	0,073
6	2,5	0,082
7	3	0,094
8	3,5	0,099

Hasil penelitian kemudian diuji dengan menggunakan pengukuran konsentrasi fenol dengan persamaan yang diperoleh dari perhitungan kurva standart pada masing-masing hasil maserasi. Nilai absorbansi hasil maserasi selama 24 dan 48 jam yang sebelumnya diukur dengan menggunakan

spektrofotometer kemudian dimasukkan pada persamaan pada kurva standart untuk mengetahui konsentrasi fenol yang tertinggi.



Gambar 6. Kurva Standart Fenol

Pada kurva tersebut didapatkan persamaan $Y = 0,0248 x + 0,0203$. Perhitungan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak kasar fenol pada jenis pelarut dan waktu maserasi yang berbeda ditampilkan pada Tabel 4. Perhitungan secara detail pada Lampiran 4.

Tabel 4. Konsentrasi ekstrak kasar fenol pada pelarut dan waktu maserasi yang berbeda

Pelarut	Konsentrasi Ekstrak Kasar Fenol (ppm)		
	24 jam	48 jam	72 jam
Aseton	-	-	-
Akuades	0,75	2,33	-
Etanol 80%	2,04	4,91	-
Etanol 96%	3,17	7,16	-

Pada penelitian yang telah dilakukan, maserasi dengan menggunakan aseton ternyata telah menguap sebelum 24 jam sehingga tidak dapat dilakukan penyaringan bahan ekstrak. Hal tersebut diduga karena pengaruh jenis pelarut aseton yang mudah menguap. Pada maserasi yang dilakukan selama 72 jam mengalami penguapan pada semua pelarut yang dicobakan. Hal itu dipengaruhi juga oleh lama perendaman yang tidak optimal. Reskika (2011), menyatakan bahwa lamanya waktu maserasi berbeda-beda tergantung pada sifat atau ciri

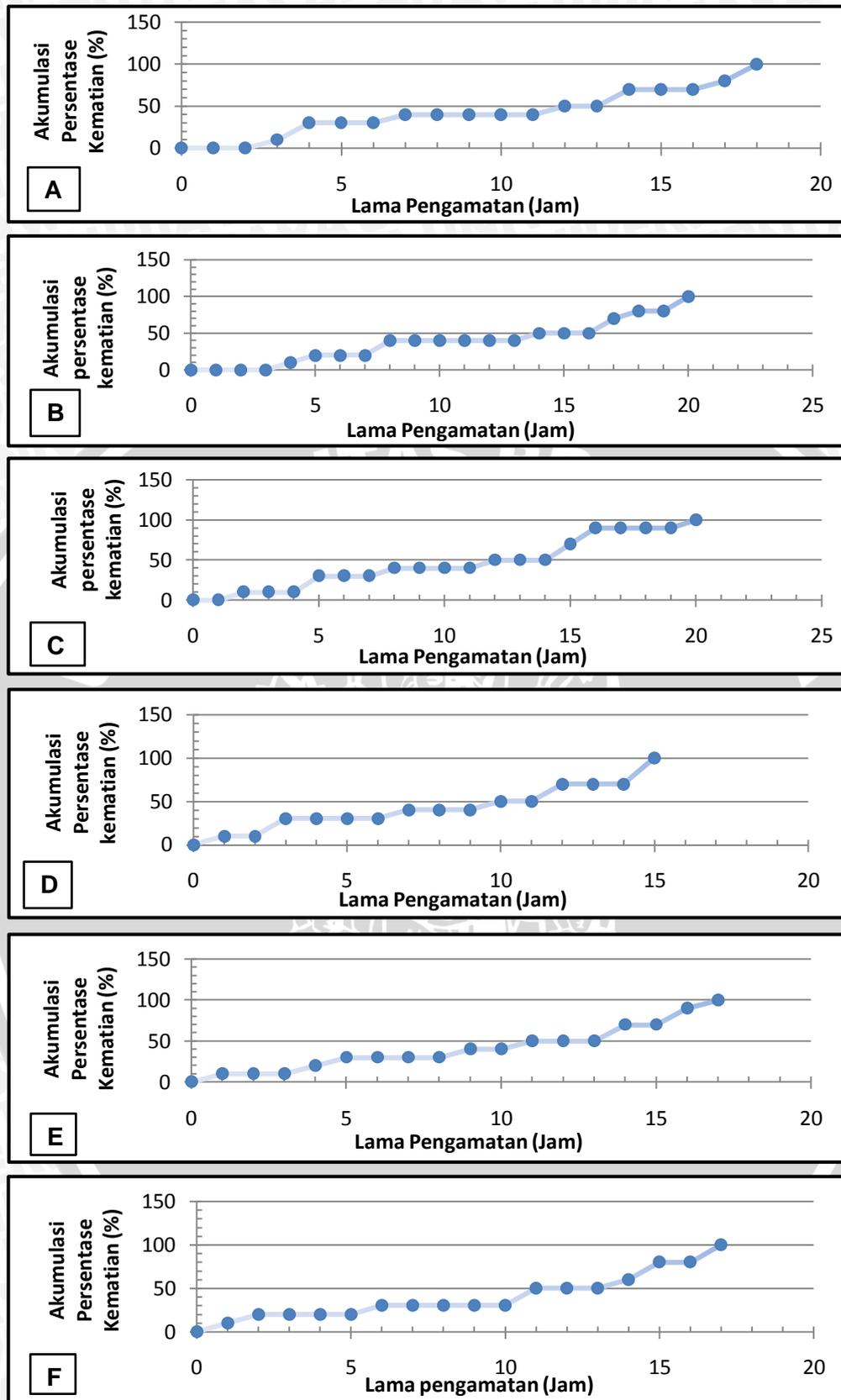
campuran serbuk dan pelarut. Lamanya maserasi harus cukup supaya dapat memasuki semua rongga dari struktur serbuk dan melarutkan semua zat yang mudah larut. Lamanya maserasi bisa memerlukan waktu beberapa jam atau beberapa hari untuk ekstraksi yang optimum.

Kepekatan pelarut juga mempengaruhi hasil maserasi, pada pelarut akuades, konsentrasi fenol lebih kecil apabila dibandingkan dengan pelarut etanol 80% dan 96%. Hal ini dikarenakan akuades mempunyai tingkat kepolaran yang rendah sehingga tidak mampu mengikat bahan aktif secara optimal. Begitu juga pada pelarut etanol 80%, mempunyai konsentrasi lebih rendah dibandingkan dengan pelarut 96%, perbedaan nilai tersebut dipengaruhi juga oleh kepekatan jenis pelarut. Pelarut yang pekat akan menarik zat aktif yang ada didalam bahan sehingga mampu menghasilkan hasil maserasi yang lebih besar. Menurut Suwandi (2012), cairan pelarut pada maserasi akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang terpekat didalam sel akan terdesak keluar. Peristiwa tersebut berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan dalam sel.

Berdasarkan penjelasan diatas, dapat disimpulkan bahwa faktor yang mempengaruhi hasil maserasi adalah jenis pelarut, lama perendaman dan kepekatan jenis pelarut.

4.3 Penentuan Dosis Immunostimulan dan Waktu Perendaman

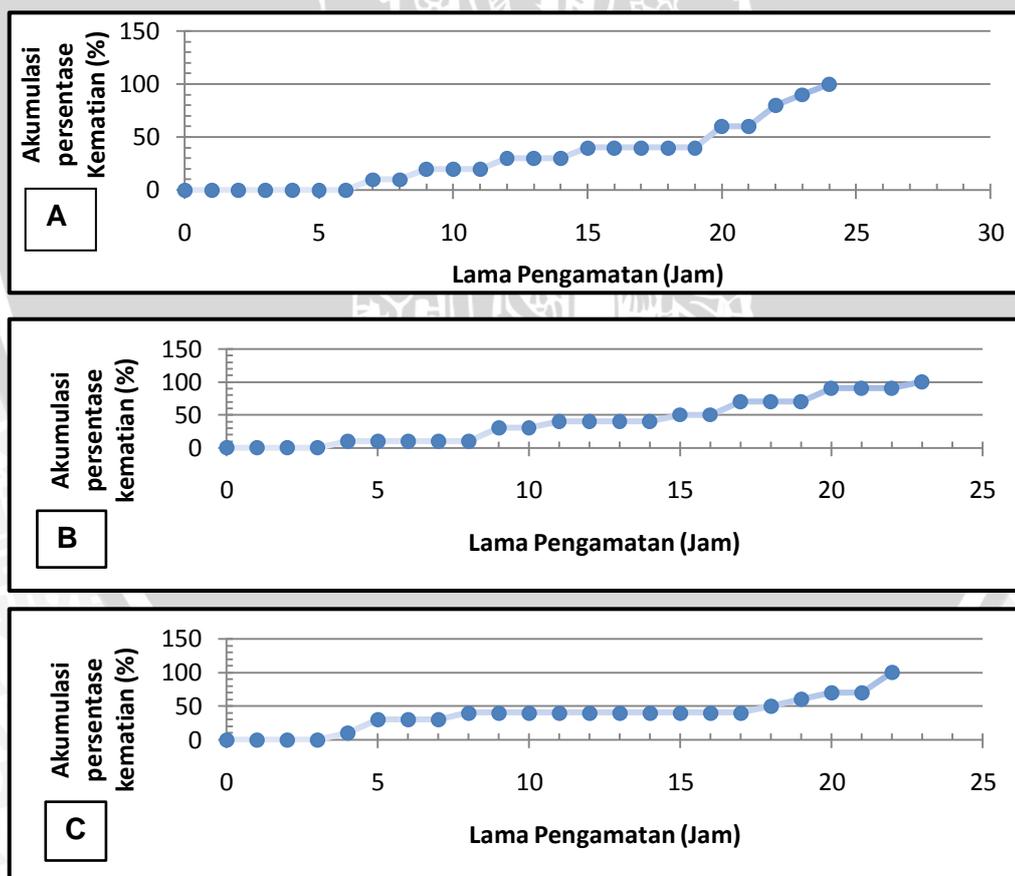
Penentuan dosis ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. pada penelitian ini ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan dengan mencari LC₅₀. Untuk mengetahui LC₅₀, dilakukan uji pendahuluan terhadap dosis ekstrak. Secara detail ditampilkan pada gambar 7.



Gambar 7. Data uji penelitian pendahuluan LC₅₀ terhadap ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dengan dosis A(1 gr/l); B(1,5 gr/l); C(2 gr/l); D(3 gr/l); E(4 gr/l) dan F(5 gr/l).

Pada gambar diatas, LC₅₀ ditentukan oleh kematian ikan pada berbagai dosis dengan melihat kematian sebesar 50% pada ikan. Kematian 50% terjadi pertama kali pada gambar D(3 gr/l) diikuti oleh dosis E(4 gr/l) dan F(5 gr/l) secara bersamaan berturut-turut pada 10 dan 11 jam pengamatan. Pada gambar A(1gr/l) dan C(2 gr/l), kematian 50% terjadi pada 12 jam pengamatan. Sedangkan pada gambar B(1,5 gr/l), kematian 50% pada 14 jam pengamatan.

Data hasil LC₅₀ terhadap lama perendaman pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 8. Perbedaan waktu perendaman yang diujikan sebelum dilakukan uji tantangan terhadap bakteri *Aeromonas* sp. adalah 10, 12 dan 14 jam. Nilai tersebut didapatkan dari hasil LC₅₀ yang dilakukan sebelumnya pada berbagai dosis yang berbeda. Secara detail data kematian ikan pada Lampiran 5.



Gambar 8. Data uji penelitian pendahuluan LC₅₀ terhadap lama perendaman ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dengan lama perendaman A(10 jam); B(12 jam) dan C(14 jam).

Pada gambar diatas dapat dilihat bahwa kematian pertama sebesar 50% terjadi pada 15 jam pengamatan dengan lama perendaman ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. selama 12 jam. Berikutnya perendaman dengan ekstrak selama 10 dan 14 jam mengalami kematian 50% pada 20 dan 18 jam pengamatan. Hasil tersebut mendasari penelitian lanjutan untuk melakukan perendaman dengan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. kurang dari 12 jam sebelum dilakukan perendaman terhadap bakteri *Aeromonas* sp. Waktu perendaman ekstrak yang digunakan adalah 10 jam perendaman.

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan didapatkan hasil semakin tinggi ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dan semakin lama dilakukan perendaman dengan ekstrak dapat menyebabkan meningkatnya kematian sebesar 50% pada ikan. Hal tersebut diduga karena pekatnya ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dapat mengganggu proses pernafasan pada ikan. Menurut Kabata (1985), bahan obat yang larut dalam air dapat diserap dengan baik oleh insang. Oleh karena itu, dosis yang terlalu tinggi akan dapat mengganggu proses pernafasan.

Pada dosis ekstrak kasar fenol yang terlalu tinggi, ikan mas sudah tidak dapat mentolerir pekatnya konsentrasi fenol yang diberikan. Karena dosis yang terlalu tinggi dapat menjadi immunosupresor, hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ridlo dan Pramesti (2009), senyawa aktif akan menunjukkan aktivitasnya jika dapat mencapai di lokasi targetnya yang berarti harus dapat diserap oleh darah untuk selanjutnya dibawa ketempat dimana zat itu akan memberikan efek aktifitasnya atau jumlah senyawa aktif yang lebih kecil dari jumlah minimal yang diperlukan untuk memunculkan efek imunostimulan atau bahkan sebaliknya dosisnya terlalu tinggi sehingga tidak memberikan efek atau berperilaku sebagai inhibitor.

Pelczar dan Chan (1988), menambahkan bahwa semakin tinggi dosis antibakteri yang digunakan maka semakin cepat sel bakteri akan terbunuh.

Namun penggunaan dosis yang terlalu tinggi tidaklah efektif. Di samping akan menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibakteri tertentu, juga dapat membunuh ikan dan kurang ekonomis dalam pemakaiannya. Suatu bahan antibakteri pada hakekatnya adalah sebagai racun bagi penyakit dan apabila racun tersebut berlebihan justru akan menimbulkan kematian bagi organisme. Sehingga, berdasarkan data penelitian pendahuluan tersebut, untuk mendapatkan hasil yang optimal dosis yang digunakan adalah kurang dari 3 gr/l.

4.4 Gejala Patologi Klinis Pada Ikan Mas (*C. carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas* sp.

Gejala klinis menjadi parameter pengamatan yang dilakukan untuk mengetahui kondisi fisik dan tingkah laku pada ikan uji yang telah diberi penambahan imunostimulan dan telah diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas* sp. ekstrak kasar fenol yang diberikan sebagai senyawa aktif diharapkan dapat meningkatkan respon imun pada ikan mas untuk menghadapi serangan bakteri, sehingga dapat menurunkan tingkat gejala klinis.

Pengamatan gejala patologi klinis dilakukan pada ikan mas selama 3 hari setelah masa penginfeksi dengan menggunakan bakteri *Aeromonas* sp. Pengamatan yang dilakukan meliputi pergerakan berenang pada ikan, respon terhadap makanan yang diberikan dan kerusakan fisik yang mungkin timbul karena serangan bakteri *Aeromonas* sp. Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992), gejala klinis adalah gejala akibat gangguan patogen yang ditunjukkan oleh adanya kelainan pada tubuh (seperti luka pada kulit, sirip rontok dan adanya pendarahan) dan kelainan perilaku ikan (seperti ikan memisahkan diri dari kelompoknya, terlihat selalu berada pada permukaan air, tubuh tampak lemah dan menunjukkan gerakan yang lambat). Data hasil pengamatan gejala patologi klinis ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Data pengamatan gejala klinis pada ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi *Aeromonas* sp.

H	K(+)/K(n)	K(-) (0 gr/l)	A(1 gr/l)	B(1,5 gr/l)	C(2 gr/l)
1.	Gerakan ikan normal Nafsu makan yang tinggi Tidak ditemukan kerusakan fisik sampai pada hari ke tiga pengamatan	Gerakan ikan agresif Respon makan rendah Pada sirip caudal sisik lepas	Gerakan ikan cenderung didasar Respon makan sedang. Belum ditemukan kerusakan fisik	Gerakan ikan tenang dan menyebarkan respon makan tinggi. Belum ditemukan kerusakan fisik.	Gerakan ikan agresif. Respon makan sedang. Belum ditemukan kerusakan fisik.
2.		Gerakan ikan melambat Respon makan rendah. Pada bagian dorsal, ditemukan kemerahan Rusak pada sirip pada sirip caudal.	Gerakan ikan lemah Respon makan sedang. Pada bagian insang ditemukan bercak darah Terdapat banyak lendir pada tubuh ikan	Gerakan ikan tenang Respon makan sedang. Pada bagian tubuh ikan, ditemukan kemerahan pada bagian dorsal, Produksi lendir berlebih	Gerakan ikan agresif, berenang di bagian dasar. Respon makan sedang. Terdapat pendarahan pada bagian ventral.
3.		Pada beberapa ikan mengalami kematian. Produksi lendir berlebih Ditemukan pendarahan pada insang.	Pada beberapa ikan mengalami pendarahan pada bagian tubuh. Beberapa ikan mengalami kerusakan mata.	Gerakan ikan melambat dan berada dibagian dasar. Pada bagian dorsal mengalami kemerahan.	Gerakan ikan melambat dan berada di permukaan Pada bagian pectoral mengalami pendarahan.

Keterangan :

K(n) = Kontrol normal, K(+) = Dengan penambahan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. tanpa bakteri.

Ikan uji dengan perlakuan dosis ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. sebesar :

K(-) = 0 gr/l; A = 1 gr/l; B = 1,5 gr/l dan C = 2 gr/l.

Tabel tersebut menunjukkan bahwa selama masa adaptasi setelah penginfeksi, ada perbedaan yang diperlihatkan oleh ikan yang telah diberi imunostimulan. Ikan tersebut pada umumnya mempunyai ketahanan fisik yang lebih baik dibandingkan dengan ikan yang tidak diberi imunostimulan. Hal tersebut ditunjukkan dengan kerusakan fisik yang lebih parah (sampai pada kematian) pada ikan kontrol yang tidak diberi imunostimulan. Lukistyowati dan Kurniasih (2011), menyatakan bahwa setelah penginfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*, gejala klinis yang timbul menunjukkan adanya hiperemi (kemerahan) setelah 4 jam setelah infeksi, peradangan (inflamasi) terjadi setelah 9 jam. Hari pertama setelah penginfeksi, di bagian dorsal terjadi nekrosis pergerakan ikan menjadi lamban bahkan diam. Pada hari ke dua dan hari ke tiga pasca infeksi ikan dengan sistem kekebalan yang rendah mengalami kematian baik terjadi pada ikan kontrol. Gejala tersebut merupakan manifestasi klinis *A. hydrophila*.

Aeromonas sp. merupakan bakteri yang bersifat patogen, hal ini terlihat pada saat proses penginfeksi bakteri. Ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. terlihat stres ditandai dengan ikan sering berenang ke permukaan karena kekurangan oksigen dan gerakan ikan menjadi tidak normal. Waktu yang diperlukan dalam proses penginfeksi bakteri *Aeromonas* sp. bervariasi tergantung pada kondisi fisik ikan dan lingkungan yang mempengaruhinya.

Dalam penelitian ini serangan bakteri mulai terjadi pada hari ke 2 dan ke 3 dengan ciri-ciri yaitu warna tubuh ikan menjadi gelap, kulit menjadi licin karena produksi lendir berlebih, perut sedikit menggebu, serta sebagian dari operkulum dan sirip ekor ada yang mengalami kerusakan dan timbul bercak merah, insang berubah menjadi pucat. Kemampuan berenang menurun dan

sering mengumpul pada permukaan dan sekitar aerator. Selain itu, ikan cenderung diam di tepi atau di dasar, namun sering tiba-tiba bergerak cepat dan mendadak. Selain itu, pada sebagian kecil ikan bahkan mengalami kematian. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sholikhah (2009), bahwa pada beberapa kasus kematian ikan akibat infeksi *Aeromonas* sp. tidak ditandai dengan kerusakan pada organ eksternal. Kerusakan dapat terjadi sebagai akibat infeksi lokal pada tempat luka atau penempelan oleh parasit. Ikan yang terinfeksi *Aeromonas* sp. memperlihatkan tanda-tanda berupa tingkah laku ikan tidak normal, berenang lambat, sering berada di permukaan air, dan nafsu makan menurun.

Kerusakan yang sering terjadi pada ikan kontrol dan ikan uji adalah timbulnya bercak kemerahan pada bagian dorsal dan ventral. Mangunwardoyo *et al.* (2010), menyatakan bahwa kemerahan kulit atau hiperemi merupakan tanda klinis yang pertama kali timbul setelah penginfeksi. *Aeromonas* sp. dapat mengenali dan berikatan dengan sel reseptor pada sel-sel tertentu dan mengurai sel inang dengan memproduksi enzim-enzim ekstraseluler seperti hemolisin, protease dan elastase sehingga menyebabkan inflamasi, peradangan dan berkembang menjadi borok. Hiperemi merupakan respon awal terhadap infeksi mikrobial, kemudian diikuti dengan terjadinya peradangan, nekrosis dan terbentuknya tukak.

Berdasarkan penjelasan tersebut, dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp. sebagai imunostimulan dapat meningkatkan respon imun ikan mas dari serangan bakteri *Aeromonas* sp. dengan memperlambat laju pertumbuhan bakteri yang dapat mengakibatkan kematian dan berubahnya kondisi fisik pada ikan. Selain itu penambahan imunostimulan pada dosis yang optimal dapat menurunkan gejala klinis dan menurunkan tingkat kerusakan jaringan pada ikan akibat infeksi bakteri *Aeromonas* sp. Hal tersebut diperjelas oleh pernyataan Lesmanawati (2006), yang mengatakan bahwa

imunostimulan mampu bekerja dengan meningkatkan pertahanan seluler ikan sehingga mengurangi tingkat gejala klinis dari infeksi bakteri.

Selain itu, pemberian imunostimulan secara berulang (lebih dari satu kali) dalam penelitian ini, dapat meningkatkan daya tahan pada ikan. Hal tersebut pertama dikarenakan konsentrasi ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. yang tidak terlalu pekat aman untuk digunakan. Hal ini membuat ikan dapat bertahan terhadap stres yang ditimbulkan oleh perlakuan tersebut. Jarak antara perendaman satu dan dua, memberikan kesempatan pada ikan untuk memulihkan kondisi stres, sehingga meningkatkan daya tahan tubuh ikan. Kemudian yang kedua, adanya perlakuan yang berulang-ulang membuat ikan semakin tahan terhadap benda asing (ekstrak kasar fenol) tersebut, dan akan mengurangi tingkat stres pada ikan.

Lukistyowati dan Kurniasih (2011), menyatakan bahwa pemberian benda asing secara berulang-ulang membuat ikan semakin tahan terhadap benda tersebut dan *stress response* menjadi berkurang.

4.5 Gambaran Histologi dan Histopatologi Otot

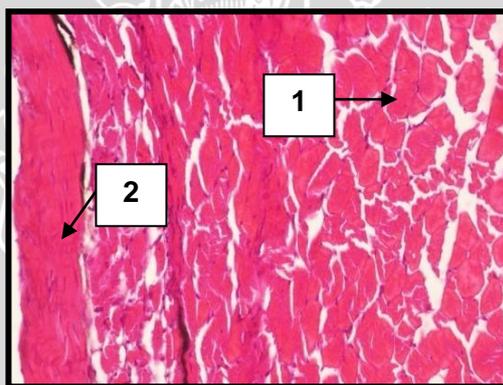
4.5.1 Gambaran Histologi Otot Ikan Normal dan Histopatologi Ikan Kontrol

Otot berperan sangat penting untuk menunjang pergerakan berenang pada ikan melalui koneksi langsung dengan sistem rangka. Struktur otot yang utuh membantu gerakan ikan menjadi seimbang saat ikan membutuhkan gerakan berenang yang lebih halus dan untuk mempertahankan posisi vertikal. Selain itu penampang otot yang baik, akan menjadi penentu kualitas daripada daging ikan itu sendiri. Serat otot bersifat fleksibel, kuat dan dapat melakukan gerakan kontraksi involunter dan mempertahankan bentuk banyak jaringan.

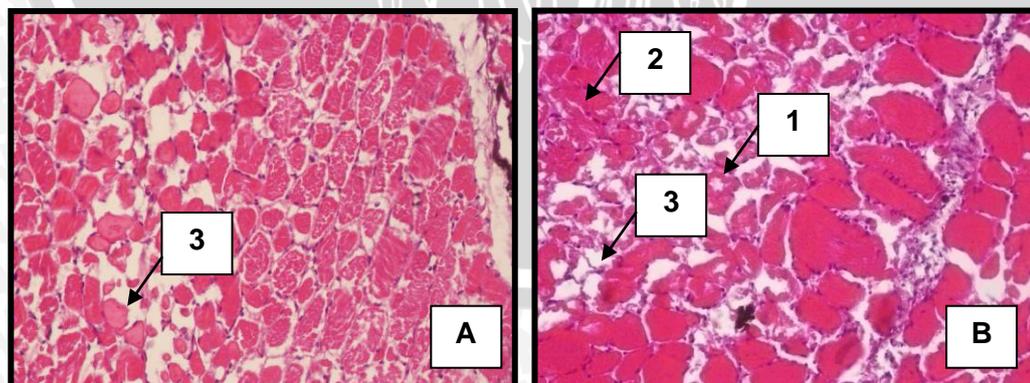
Menurut Panigoro *et al.* (2007), otot teleostei sama seperti pada vertebrata lainnya diklasifikasikan dalam otot lurik, otot jantung dan otot polos. Otot-otot ini

tersusun atas serabut otot. Susanto (2008) menambahkan, otot ikan seperti pada vertebrata tersusun atas bagian-bagian kecil yang disebut dengan serabut otot. Secara morfologi dan fungsi otot dibagi menjadi dua yaitu otot halus dan otot lurik.

Jaringan otot ikan mas pada ikan kontrol positif dan ikan uji, diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. Penampang jaringan otot ikan mas normal (sehat) ditampilkan pada Gambar 9. Pemberian imunostimulan pada ikan mas kontrol positif dengan cara perendaman menggunakan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. mengalami perbaikan struktur jaringan otot. Perbedaan struktur jaringan pada ikan kontrol positif dan negatif tersebut ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 9. Struktur jaringan histologi otot pada ikan mas kontrol positif (ikan sehat). (1) otot lurik, (2) otot halus. Perbesaran mikroskop 400x.



Gambar 10. Struktur jaringan histopatologi otot pada ikan mas (A). jaringan otot ikan kontrol positif, (B). Jaringan otot ikan kontrol negatif. (1). nekrosis (2). degenerasi hialin (3). edema. Perbesaran mikroskop 400x.

Berdasarkan hasil penelitian, kondisi otot ikan mas normal (ikan tanpa perlakuan) memperlihatkan kondisi jaringan yang normal, dengan penampakan struktur jaringan yang rapat tanpa rongga. Kedudukan otot lurik dan otot halus juga terlihat teratur tanpa adanya kerusakan.

Pada penampang jaringan otot diatas, dapat dilihat perbedaan antara jaringan otot ikan kontrol positif (A) dan ikan kontrol negatif (B). Pada gambar A terlihat otot lurik satu dengan yang lain tampak rapat. Hal tersebut menandakan struktur otot yang utuh, meskipun masih terdapat kerusakan berupa edema. Namun, secara keseluruhan penampang otot terlihat teratur.

Sedangkan pada gambar B nampak adanya kerusakan jaringan diantaranya degenerasi hialin yaitu kerusakan yang menyebabkan penampang otot menjadi tidak teratur, nekrosis yang mengakibatkan terkoyaknya otot lurik (ditandai dengan adanya lubang) serta edema yaitu terbentuknya rongga antara otot.

Menurut Ersa (2008), nekrosis adalah kematian sel-sel atau jaringan yang menyertai degenerasi sel pada setiap kehidupan hewan dan merupakan tahap akhir degenerasi yang irreversibel. Karakteristik dari jaringan nekrotik, yaitu memiliki warna yang lebih pucat dari warna normal, hilangnya daya rentang (jaringan menjadi rapuh dan mudah terkoyak), atau memiliki konsistensi yang buruk atau pucat (seperti bubur).

Degenerasi hialin merupakan perubahan yang mengikuti *cloudy swelling*. Kromatik inti berkondensasi dan serabut menghilang. Serabut-serabut otot menjadi homogen dan menyerap pewarna eosin lebih banyak. Serat-serat yang terhialinisasi tampak lebih rapuh dan tidak utuh (Anggie, 2008).

Edema merupakan suatu akumulasi cairan yang abnormal di dalam rongga tubuh atau di dalam ruang interstitial dari jaringan dan organ yang dapat mengakibatkan kebengkakan. Kerusakan mekanis atau penyakit dapat

mempengaruhi ikan terhadap infeksi lebih lanjut, karena edematus menyediakan suatu medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri (Priosoeryanto *et al.*, 2010).

Penambahan imunostimulan berupa ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. secara umum telah memberikan efek imunostimulannya, terlihat dari perbedaan visual pada jaringan otot ikan kontrol positif dan negatif. Ekstrak kasar fenol yang telah diberikan diharapkan akan mampu menurunkan tingkat kerusakan pada jaringan otot ikan mas yang ditunjukkan dengan penampang jaringan otot yang hampir menyerupai jaringan otot normal.

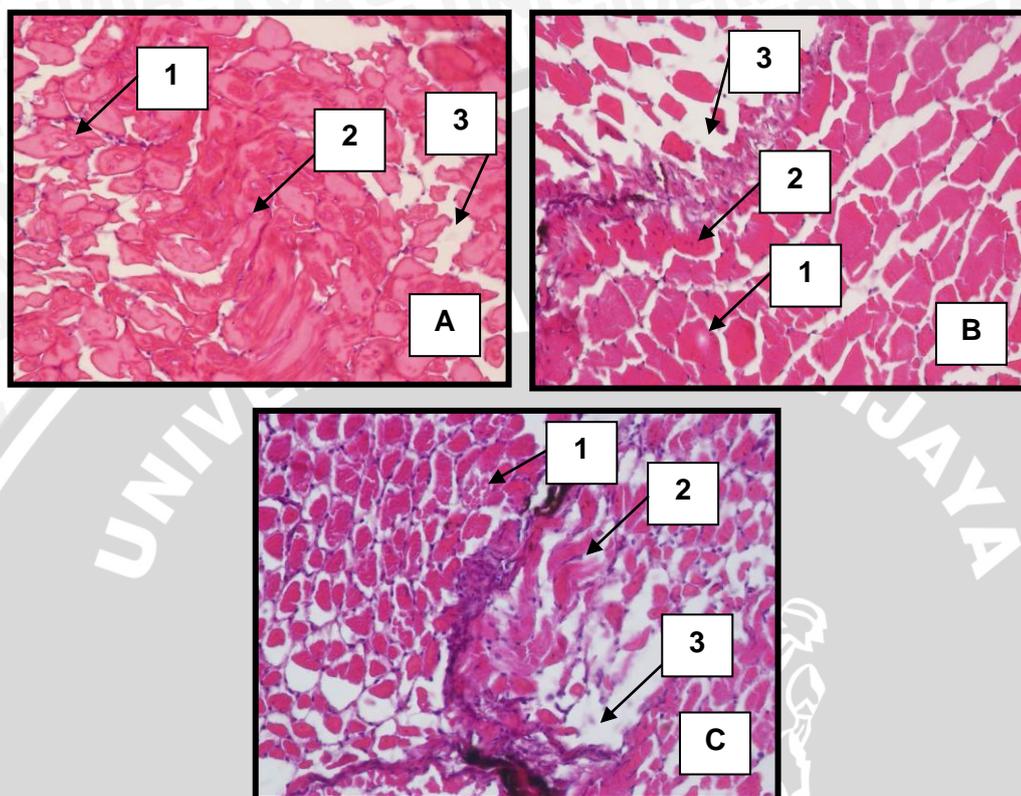
4.5.2 Gambaran Histopatologi Otot Ikan Uji

Pengamatan histopatologi digunakan untuk melihat perubahan patologi pada ikan mas yang telah direndam dengan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. Dosis yang berbeda dan diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas* sp. Untuk mengetahui perbedaan satu sama lain dilakukan perhitungan dengan metode skoring.

Hasil histopatologi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar fenol sebagai imunostimulan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan otot ikan mas. Meskipun tidak dapat terlihat secara visual bahwa pemberian imunostimulan dapat mengurangi tingkat kerusakan jaringan. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan nilai skoring pada masing-masing dosis ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. yang telah diberikan.

Pada dosis ekstrak yang berbeda yaitu 1; 1,5 dan 2 gr/l memperlihatkan tingkatan kerusakan yang sama yaitu nekrosis, degenerasi hialin dan edema. Akan tetapi perbedaan persentase kerusakan jaringan otot dengan penambahan dosis imunostimulan yang berbeda dapat ditunjukkan melalui nilai skoring (Lampiran 6). Dengan bantuan pengukuran nilai skoring, diharapkan dosis terbaik untuk mengurangi tingkat kerusakan dapat diketahui. Penampang

jaringan otot pada ikan mas yang telah diberi imunostimulan berupa ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dan telah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas* sp. ditampilkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Struktur jaringan histopatologi otot pada ikan mas yang telah diberi imunostimulan A (1 gr/l); B(1,5 gr/l); C(2 gr/l). (1). nekrosis, (2). degenerasi hialin, (3). edema. Perbesaran mikroskop 400x.

Data skoring kerusakan pada jaringan menggunakan program SPSS 16 disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Data skoring dan notasi hasil pengamatan kerusakan pada jaringan otot

No	Kerusakan Jaringan	Perlakuan				
		A(1 gr/l)	B(1,5 gr/l)	C(2 gr/l)	K (-) (0gr/l)	K (+/n)
1	Nekrosis	2,7 ^{ab}	1,4 ^a	2,8 ^b	3,6 ^b	1
2	Degenerasi	2,7 ^{ab}	1,7 ^a	2,8 ^b	3,5 ^b	1
3	Edema	2,6 ^a	1,4 ^a	2,9 ^{ab}	3,5 ^b	1

Ket : Nilai 1 kerusakan ringan (0 – 5 %), nilai 2 kerusakan sedang (6 – 25 %), nilai 3 kerusakan berat (26 – 50 %) dan nilai 4 kerusakan sangat berat (> 50 %). a, b, c dan d (notasi tingkat kerusakan jaringan).

Perbedaan hasil nilai skoring terlihat pada masing-masing perlakuan. Pada hasil analisa data keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan otot yaitu nekrosis, degenerasi hialin dan edema menunjukkan hasil berbeda nyata yang dapat dilihat pada Lampiran 7.

Pada tabel tersebut dapat dilihat urutan rerata terbesar ke terkecil pada setiap kerusakan tersebut menandakan kerusakan jaringan yang terberat sampai dengan yang teringan ditinjau dari nilai skoring. Pada semua jenis kerusakan diantaranya nekrosis, degenerasi hialin dan edema, kerusakan jaringan terberat berada pada perlakuan K(-) (0 gr/l), diikuti oleh perlakuan C(2 gr/l), A(1 gr/l) dan B(1,5 gr/l) dengan persentase kerusakan terendah.

Berdasarkan angka notasi diatas, perlakuan pada kerusakan nekrosis, degenerasi hialin dan edema dengan angka notasi b menunjukkan tingkat kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan K(-) (0gr/l). Pada perlakuan terbaik ditunjukkan dengan notasi terkecil yaitu a berada pada perlakuan dosis B (1,5 gr/l). Sehingga dari hasil nilai skoring dan notasi tersebut didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan dosis terbaik yang dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan otot adalah perlakuan B(1,5 gr/l).

Perlakuan K(-) (0 gr/l), mengalami tingkat kerusakan jaringan yang sangat berat, dengan persentase kerusakan >50%. Hasil rerata pada skoring mendekati nilai 4. Kerusakan yang ditemukan antaranya adalah nekrosis, degenerasi hialin dan edema.

Pada perlakuan A(1 gr/l), mengalami tingkat kerusakan jaringan yang berat dengan persentase kerusakan antara 26-50%. Nilai skoring pada setiap kriteria kerusakan jaringan rata-rata mendekati nilai 3. Kerusakan jaringan tersebut diantaranya adalah nekrosis, degenerasi hialin dan edema dengan nilai rerata per perlakuan berturut-turut adalah 2,7; 2,7 dan 2,6. Persentase kerusakan yang tinggi tersebut terjadi akibat pemberian dosis imunostimulan yang kecil sehingga

tidak dapat meningkatkan sistem imun non spesifik secara maksimal, hal tersebut dapat mempengaruhi tingkat pertahanan terhadap serangan bakteri.

Sakai (1999), menyatakan bahwa kemampuan imunostimulan untuk meningkatkan respon imun dan mengembangkan proteksi terhadap infeksi patogen dipengaruhi oleh dosis aplikasi. Pemberian imunostimulan pada konsentrasi dibawah nilai minimal untuk terjadinya respon imun tidak akan memberikan pengaruh. Agung (2007), menambahkan bahwa dosis imunostimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Perlakuan B(1,5 gr/l), menunjukkan tingkat kerusakan jaringan yang sedang dengan persentase kerusakan antara 6-25%. Persentase tersebut berdasarkan nilai skoring pada setiap kriteria kerusakan yang mendekati nilai 2. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis, degenerasi hialin dan edema dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 1,4; 1,7 dan 1,4. Persentase tersebut apabila dibandingkan dengan perlakuan A lebih kecil, hal tersebut disebabkan karena dosis ekstrak kasar fenol yang diberikan cukup optimal.

Pemberian imunostimulan memang tidak dianjurkan untuk terlalu berlebihan hal tersebut tentu akan mempengaruhi sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Pemberian imunostimulan harus memperhatikan dosis optimal yang digunakan, disamping itu juga durasi periode pemberian imunostimulan untuk mencapai proteksi yang optimal juga merupakan hal yang penting dalam pemberian imunostimulan (Jasmanidar, 2009).

Pemberian imunostimulan dilakukan dengan cara perendaman sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 jam. Hal tersebut dilakukan untuk mengaktifkan sistem respon imun pada ikan mas terhadap serangan bakteri. Metode tersebut setidaknya dapat mempengaruhi bagaimana imunostimulan bekerja. Menurut

Sakai (1999), dua hal yang perlu dipertimbangkan dalam aplikasi imunostimulan dalam budidaya adalah dosis dan lama waktu pemberian. Pemberian imunostimulan dalam jumlah yang tepat dapat meningkatkan imunitas dan pertumbuhan ikan yang dipelihara, sebaliknya dosis berlebihan akan menekan pertumbuhan dan bersifat immunosupresor bagi hewan yang dipelihara. Manoppo (2011), menambahkan bahwa lama waktu pemberian sangat penting untuk menghasilkan respon imunitas optimal sebab pemberian imunostimulan yang berkepanjangan dapat menekan resistensi ikan terhadap penyakit dan pertumbuhan.

Pada perlakuan C (2 gr/l), menunjukkan tingkat kerusakan yang berat dengan persentase kerusakan sampai dengan 26-50%. Persentase tersebut didapat dari hasil nilai skoring per kerusakan mendekati nilai 3. Kerusakan yang ditemukan adalah nekrosis, degenerasi hialin dan edema dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 2,8; 2,8 dan 2,9.

Persentase nilai skoring tersebut apabila dibandingkan dengan perlakuan B (1,5 gr/l) cukup meningkat, hal tersebut dikarenakan dosis imunostimulan yang terlalu berlebihan sehingga tidak memaksimalkan sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Dosis imunostimulan yang tinggi dapat menekan mekanisme pertahanan dan dosis yang rendah bisa tidak efektif atau tidak cukup untuk memberikan respon imun (Jasmanidar, 2009). Menurut Cheng *et al.* (2004), bahwa pemberian imunostimulan secara berkelanjutan diperlukan untuk lebih memberikan kemampuan imun. Selain itu senyawa fenol yang diberikan sebagai imunostimulan harus disesuaikan dengan kebutuhan ikan sehingga didapatkan dosis yang optimal, karena dosis yang terlalu rendah maupun terlalu tinggi akan mempengaruhi interaksi senyawa fenol dengan bakteri.

Menurut Wibawati (2012), turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah

terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan membran sel mengalami lisis.

Pemulihan jaringan pada otot tersebut, dipengaruhi oleh penambahan ekstrak kasar fenol yang telah diberikan. Dosis yang berbeda juga akan mempengaruhi tingkat pemulihan jaringan yang berbeda ditunjukkan oleh nilai skoring. Berdasarkan penjelasan dan hasil skoring diatas dapat disimpulkan bahwa dosis terbaik yang mampu menurunkan tingkat kerusakan pada jaringan otot ikan mas adalah 1,5 gr/l.

4.6 Pengamatan Kualitas Air

Pada saat masa pemeliharaan berlangsung, kualitas air merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan. Kualitas air yang buruk akan mempengaruhi kondisi ikan menjadi stress, akibatnya bakteri dengan mudah menginfeksi ikan. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Berikut hasil pengukuran kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 7 dan secara rinci pada Lampiran 8.

Tabel 7. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

No.	Parameter Kualitas Air	Kisaran Parameter Kualitas Air pada Perlakuan	Sidik <i>et al.</i> , (2010) (pada kepadatan 10 ekor)
1.	Suhu (C)	25-26 ^o C	26,4-28,0
2.	pH	7,63-7,79	7,28-8,21
3.	Oksigen Terlarut (mg/l)	5,64-6,39 ppm	7,10-8,10

Sitawati (2002), menyatakan dalam penelitiannya bahwa ikan mengalami stres saat terjadi perubahan kualitas air, yang penyebabnya adalah DO yang rendah (1-2 mg/l), elevasi CO₂ dan elevasi amonia. Dengan kondisi ini ikan akan

mudah terjangkit penyakit setelah mengalami stres yang kompleks, karena kualitas air dan prosedur penanganan ikan yang buruk.

Pada tabel diatas nilai suhu berkisar antara 25-26 °C, nilai suhu tersebut apabila dibandingkan dengan pustaka yang ada telah memenuhi syarat. Suhu mempengaruhi aktivitas ikan, seperti pernafasan, pertumbuhan dan reproduksi. Suhu air sangat berkaitan erat dengan konsentrasi oksigen terlarut dan laju konsumsi oksigen hewan akuatik air (Praseno *et al.*, 2010).

Menurut Sucipto (2005), toksisitas suatu senyawa kimia dipengaruhi oleh derajat keasaman suatu media. Titik batas kematian organisme air terhadap pH adalah 4 dan 11. Nilai pH pada saat penelitian telah memenuhi syarat hidup pada pemeliharaan ikan mas.

Nilai DO pada penelitian tersebut memang cukup rendah dibandingkan dengan kisaran nilai DO yang disarankan pada kepadatan ikan dalam akuarium yang sama yaitu 10 ekor. Namun hal tersebut tidak menjadi kendala, sebab pada saat pengukuran DO tidak terjadi fluktuasi DO berlebih. Menurut Praseno *et al.* (2010), kandungan oksigen terlarut (DO) minimum adalah 2 mg/l, dalam keadaan normal tidak tercemar oleh senyawa beracun (toksik). Kandungan oksigen terlarut minimum ini sudah cukup mendukung kehidupan organisme. Sehingga dari penjelasan diatas, dapat disimpulkan bahwa nilai kualitas air selama pemeliharaan masih dalam taraf normal dan telah memenuhi syarat hidup pada ikan mas yang dipelihara.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka kesimpulan yang didapatkan adalah sebagai berikut :

- Rendemen ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. sebesar 0,9% dan Kadar air rumput laut *Gracilaria* sp. kering sebesar 10%.
- Dosis ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. yang mampu menurunkan tingkat gejala klinis dan tingkat histopatologi otot pada ikan mas (*C. carpio*) adalah dosis 1,5 gr/l. Kerusakan otot yang ditemukan diantaranya adalah nekrosis, degenerasi hialin dan edema.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang sistem *recovery* imunostimulan untuk mengetahui berapa lama efektifitas imunostimulan dalam tubuh ikan. Selain itu, hendaknya penggunaan imunostimulan dilakukan secara berulang dengan jarak waktu tertentu agar dapat menurunkan tingkat stres pada ikan sehingga dapat meningkatkan efektifitas penyerapan imunostimulan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aberoum, A and Jooyandeh, H. 2010. A Review On Occurrence And Characterization Of The *Aeromonas* Species From Marine Fishes. *World Journal of Fish and Marine Science*. **2**(6):519-523.
- Agung, M. 2007. Penelusuran Efektifitas Beberapa Bahan Sebagai Kandidat Antibakteri Dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis Pada Udang Windu. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Padjadjaran. Jatinangor. 36 hal.
- Alamsjah, M. Amin., W. Tjahjaningsih dan A. W. Pratiwi. 2009. Pengaruh Kombinasi Pupuk NPK dan TSP Terhadap Pertumbuhan, Kadar Air Dan Klorofil α *Gracilaria Verrucosa*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **1**(1):1-14.
- Alifuddin, M. 2002. Imunostimulan Pada Hewan Akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **1**(2):87-92.
- Anggie, R. 2008. Studi Histopatologi Insang, Usus dan Otot Ikan Gurami (*Osporonemus gouramy*) Akibat Infestasi Parasit Protozoa Di Desa Carangpulang Dramaga Bogor. Skripsi. 83 hal.
- Anwariyah, S. 2011. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan *Cymodocea Rotundata*. Skripsi. 79 hal.
- Afrianto, E dan Liviawaty, E. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta. Hal. 20.
- Aslianti, T., Afifah dan S. Z. Musthofa. 2010. Dosis Efektif Probiotik Dalam Pemeliharaan Larva Bandeng, *Chanos Chanos* Secara Terkontrol. Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indonesia 2010. Sekolah Tinggi Ilmu Perikanan, Jakarta 2-3 Desember 2010: Hal 1-10.
- Astawan M., Muchtadi dan Tutik. 2001. Pemanfaatan Rumput Laut Pada Berbagai Makanan Jajanan Untuk Mencegah Timbulnya Defisiensi Iodium Dan Penyakit Degeneratif. *Jurnal Pangan*. **1**(2):35-40.
- Aydin, Seyit and Ciltas, Abdulkadir. 2004. *Systemic infections of Aeromonas hydrophila in Rainbow trout (onchorhynchus mykiss walbaum) : Gross Pathology, Bacteriology, Clinical Pathology, Histopathology And Chemoterapy*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **3**(12):810-819.
- Bansemir A., M. Blume., S. Schroder and U. Lindequist. 2006. Screening Of Cultivated Seaweeds For Antibacterial Activity Against Fish Pathogenic Bacteria. *Journal of Aquaculture*. **252**(1):79-84.
- Bird, C., E. Rice., C. A. Murphy., Q. Y.Liu dan M. A. Ragan. 1990. Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA genes from the red algae *Gracilaria tikvahiae* McLachlan, *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilariopsis* sp. *Nucleic Acids Reserch*. **18**(1):1-2.

- Cahyono, B. 2000. Budidaya Ikan Air Tawar Ikan Gurami, Ikan Nila, Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta. 113 hal.
- Cappuccino and Sherman, 1988. Microbiology, A laboratory Manual. Benjamin/Cumming Science Publishing. Menlo Park. California. p. 477
- Castro,R., I. Zarrab and J. Lams. 2004. *Water Soluble Seaweed Extract Modulate The Pantoea Agglomerans Lipopolisaccharidae (LPS)*. *Journal of Fish Shellfish Immunol.* **10**(10):505-14.
- Cheng W., CH. Liu, ST. Yeh, and JC. Chen. 2004. The Immune Stimulatory Effect Of Sodium Alginate On The White Shrimp *Litopenaeus vannamei* And Its Resistance Against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology.* **17**(1):41-51.
- Chrisnaningsih, N.W. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Syzygium polyanthum* Terhadap Produksi Makrofage Pada Mencit Yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Skripsi. 80 hal.
- Cipriano, C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. Fish Disease Leaflet 68. 25 hal.
- Ersa, E. M. 2008. Gambaran Histopatologi Insang, Usus Dan Otot Pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. 66 hal.
- Harborne J. B. 1984. Phytochemical Methods: A Giude to Modern Techniques of Plant Analysis. London. p. 49, 196-197.
- Herupradoto., B. Aksono dan Y. G. Atik. 2010. Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser Pada Ikan Mas. *Jurnal Veteriner.* **11**(3):158-162.
- Hukmah, S. 2007. Aktivitas Antioksidan Katekin dari Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Hasil Ekstraksi Dengan Variasi Pelarut Dan Suhu. Skripsi. 80 hlm.
- Indrani, D. 2012. *Komposit Hidroksiapatit Kalsinasi Suhu Rendah Dengan Alginat Sargassum Duplicatum Atau Sargassum Crassifolium Sebagai Material Scaffold Untuk Pertumbuhan Sel Punca mesenkimal*. Disertasi. 169 hlm.
- Janda, M and Abott, S. 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. *Clinical Microbiology Reviews.* p. 35-73.
- Jasmanidar, Y. 2009. *Penggunaan Ekstrak Gracilaria verrucosa untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname (Litopenaeus vannamei)*. Tesis. 97 hal.
- Julyasih, K. Sri., I.G.P. Wirawan., W.S Harijani dan W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial Di Bali. Disampaikan pada Seminar Nasional, Surabaya, 2 Desember 2009.

- Kabata, Z., 1985. Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic. Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelpia. p. 318.
- Kakkilaya, B.S. 2002. Peripheral smear examination for malaria parasite. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site.
- Khairuman, D. Setiawan dan Bambang. 2008. Budidaya Ikan Mas Secara Intensif. Agromedia Pustaka. Jakarta. 100 hal.
- KKP. 2012. Outlook Perikanan 2012 : Industrialisasi Perikanan Budidaya. Arsip Berita Perikanan.umm.ac.id. Universitas Muhammadiyah Malang. 2 hal.
- Komarawidjaja, W. dan D.A Kurniawan. 2008. Tingkat Filtrasi Rumput Laut (*Gracilaria* Sp.) Terhadap Kandungan Ortofosfat (P_2O_5). *Jurnal Teknik Lingkungan*. **9**(2): 180-183.
- Kumar, A.A., V.S. Meena., S. Chattopadhyay., K.C. Paningrahi. 2012. Novel immunodulatory effect of gracilaria verrucosa and potamogetin pectinatus extracts on in vitro activation of t cells. *Journal International of Life Science and Pharma Research*. **2**(3):233-239.
- Kresno SB. 2001. Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 90 hal.
- LAKIP, KKP. 2012. Laporan Akuntabilitas Kinerja. Kementerian Kelautan dan Perikanan Tahun 2011. 98 hal.
- Lesmanawati, W. 2006. Potensi Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Sebagai Antibakteri Dan Immunostimulan Pada Ikan Patin *Pangasianodon hypophthalmus* yang diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. 54 hal.
- Lestario, L.N.,S. Stefanll dan K.H. Timotius. 2008. Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Fenolik Total Dari Ganggang Merah (*Glacilaria verrucosa* L.). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **19** (2): 132-133.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan di infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **16**(1):144-160.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji patogenitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui postulat koch. *Jurnal Ristek Akuakultur*. **5**(2): 245-255.
- Manoppo, H. 2011. Peran Nukleotida Sebagai Immunostimulan Terhadap Respon Immunonspesifik dan Resistensi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Skripsi. 137 hal.
- Mantau, Z. dan Sudarty. 2011. Buku Terlengkap Pembenihan Ikan Mas yang Efektif dan Efisien. Pustaka Mina. Jakarta. 63 hal.

- Maswan, N. A. 2009. Pengujian Efektifitas Dosis Vaksin DNA dan Korelasinya Terhadap Parameter Hematologi Secara Kuantitatif. Skripsi. 70 hal.
- Maulida, R. 2007. Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Caulerpa lentillifera*. Skripsi. 85 hal.
- Melki., W. Ayu dan Kurniati. 2011. Uji antibakteri ekstrak *Gracilaria* sp. (Rumput Laut) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Teknik Lingkungan*. 6 hal.
- Milasari, Heny. 2004. Pemanfaatan Ekstrak *Gracillaria verrucosa* Sebagai Agent Antibakteri *Vibrio Alginoliticus* Dan *Vibrio Anguillarum*. Skripsi. 80 hal.
- Miyazaki, T., T. Kageyama., M. Miura., T. Yoshida. 2001. Histopathology Of Viremia-Associated In Combination With *Aeromonas hydrophila* Incolor Carp *Cyprinus carpio* In Japan. *Journal Of Diseases Of Aquatic Organism*. **44**(1):109-120.
- Mudjiutami, E., Ciptoroso, Z. Zainun, Sumarjo dan Rahmat. 2005. Pemanfaatan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas. *Jurnal Budidaya Air Tawar*. **4**(1): 1-9.
- Panigoro, N., I. Astuti., M. Bahnan., P. D. C. Salfira dan K. Wakita. 2007. Teknik Dasar Histologi dan Atlas Dasar-Dasar Histopatologi Ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi dan Japan International Coperation Agency.
- Partosuwiryo, S dan W, Yus. 2011. Kiat Sukses Budidaya Ikan Mas. Citra Aji Parama. Yogyakarta. 60 hal.
- Parwata, O. A., W. S. Rita dan R. Yoga. 2009. Isolasi dan Uji Antiradikal Bebas Minyak Atsiri Pada Daun Sirih (*Piper Betle* Linn) Secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*. **3**(1):7-13.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hal.
- Prajitno, A. 2006. *Pengendalian Penyakit Vibrio harveyii dengan Ekstrak Rumput Laut (Halimeda opuntia) Pada Udang Windu (Penaeus monodon Fab.)* PL-13. Disertasi.
- Praseno, A., H. Krettiawan., S. Asih., A. Sudradjat. 2010. Uji ketahanan beberapa strain ikan mas yang dipelihara di akuarium. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010. 7 hal.
- Priosoeryanto., I.M. Ersa., R. Tiuria dan S.U. Handayani. 2010. Gambaran Histopatologi Insang, Usus, dan Otot Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang Berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Journal of Veterinary Science & Medicine*. **2**(1):1-8.
- Rasyid, A., R. Rahmat., T. Murniasih. 1999. Karakterisasi polisakarida agar dari *Gracilaria* sp. dan *Gelidium* sp. Prosiding Pra Kipnas VII Komunikasi Ikatan

Fikologi Indonesia (IFI), Serpong Gedung DRN. Puspiptek, 8 September 1999: 57-62.

Raza'i, T. S. 2008. *Analisis Histopatologi Organ Insang Dan Usus Ikan Kerapu Lumpur (Epinephelus coloides) yang diberi Khamir Laut (Marine Yeast) Sebagai Immunostimulan*. Tesis. 95 hal.

Reskika, A. 2011. *Evaluasi Potensi Rumput Laut Coklat (Phaeophyceae) dan Rumput Laut Hijau (Chlorophyceae) Asal Perairan Takalar Sebagai Antibakteri Vibrio Spp.* Skripsi. 62 hal.

Ridlo. A., R. Pramesti. 2009. *Aplikasi Ekstrak Rumput Laut Sebagai Agen Immunostimulan Sistem Pertahanan Non Spesifik Pada Udang (Litopenaeus vannamei)*. *Jurnal Ilmu Kelautan*. **14** (3):133-137.

Sakai, M. 1999. *Current research status of fish immunostimulants*. *Aquaculture* : **172**:63-92.

Samad, M.S.F. 2010. *Pengaruh Senyawa Fenolik Ubur-Ubur (Aurelia Sp.) Terhadap Hematologi Dan Aktivitas Fagositosis Ikan Mas (Cyprinus carpio) Yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. Tesis. 109 hal.

Samsundari, Sri. 2006. *Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri Aeromonas hydrophila yang menyerang ikan mas (Cyprinus carpio)*. *Jurnal GAMMA*. **2**(1):71:83.

Santoso, B. 1993. *Ikan Mas*. Kanisius. Yogyakarta. 83 hal.

Saputra, A., O. Praseno., A. Sudradjat dan A. B. Prasetio. 2010. *Pertumbuhan Beberapa Strain Ikan Mas Yang Dipelihara Pada Tambak Bersalinitas Rendah. Disampaikan pada Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010*. 8 hal.

Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi*. Kanisius. Yogyakarta. 276 hal.

Setyanto, A. Eko. 2005. *Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen Dalam Kajian Komunikasi*. *Jurnal Ilmu Komunikasi*. **3**(1):37-48.

Setyowati, A., D. H. Awik dan Nurlita. 2012. *Studi Histopatologi Hati Ikan Belanak (Mugil cephalus) Di Muara Sungai Aloo Sidoarjo*. *Jurnal Ristek Akuakultur*. **2**(1):22-29.

Selim, S. A. 2012. *Antimicrobial, Antiplasmid And Cytotoxicity Potentials Of Marine Algae Halimeda opuntia And Sarconema filiforme Collected From Red Sea Coast*. World Academy Of Science. *Engineering and Technology Journal*. **2**(1):1154-1159.

Sholikhah, E.H. 2009. *Efektivitas Campuran Meniran (Phyllanthus niruri) dan Bawang Putih (Allium sativum) dalam Pakan untuk Pengendalian Infeksi*

- Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Lele Dumbo (*Clarias* sp). Skripsi. 74 hal.
- Sidik, A.S., Sarwono dan Agustina. 2010. Pengaruh padat penebaran terhadap laju nitrifikasi dalam budidaya ikan sistem resirkulasi tertutup. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 1(2):47-51.
- Simanjatak, P. 1995. Ulas Balik Senyawa Bioaktif Dari Alga. *Jurnal Hayati*. 2(2):49-54.
- Sinulingga, M dan S. Darmanti. 2010. Kemampuan Mengikat Air Oleh Tanah Pasir yang Diperlakukan Dengan Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 2(1):32-38.
- Siswandari, W. 2005. *Nilai Diagnosis Pemeriksaan Imunositokimia Limfosit Sediaan Apus Darah Tepi Dibandingkan Analisis Kromosom Pada Penderita Dengan Dugaan Sindroma Fragile X*. Tesis. 74 hal.
- Sitawati, R. I. 2002. Interaksi Antara Deterjen, Tingkat Stres Dan Uji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.). Skripsi. 53 hal.
- Sjafrie, N. D. M. 1990. Beberapa Catatan Mengenai Rumput Laut *Gracilaria*. *Jurnal OSEANA*. XV(4):147:155.
- Snieszko dan H. R. Axelrod. 1971. *Disease of Fishes*. TFH Publication Ltd., Hongkong. p. 100.
- Sucipto, A. 2005. *Broodstock Manajemen Ikan Mas dan Nila*. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Sukabumi. hal 1-13.
- Suhermanto, A., S. Andayani., Maftuch. 2011. Pemberian Total Fenol Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) untuk Meningkatkan Leukosit dan Diferensial Leukosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Kelautan*. 4(2):49-56.
- Suhrman, S dan W, Christina. 2010. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunodulator. *Jurnal Lingkungan*. 1(1):1-13.
- Surachmad, W. 1998. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar*. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 hal.
- Susanto, H. 1990. *Budidaya Ikan di Pekarangan*. Penebar Swadaya. Jakarta. 152 hal.
- Susanto, D. 2008. *Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot Dan Usus Ikan Mas (Cyprinus carpio) Di Desa Cibanteng*. Skripsi. 49 hal.
- Sutisna, D. H. dan Ratno S. 1995. *Pembenihan Ikan Air Tawar*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 52 hal.

- Suwandi, T. 2012. *Pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga Hibiscus sabdariffa L. (Rosela) terhadap Streptococcus sanguinis Penginduksi Gingivitis Menuju Obat Herbal Terstandart*. Disertasi. 257 hal.
- Swann, Ladon dan White, M. Randy. 2000. Diagnosis And Treatment Of 'Aeromonas hydrophila' Infection Of Fish. Aquaculture Extension. *Journal of Diseases*. 1(1):1-2.
- Taukhid, Sunarto A, Koesharyani I, Supriyadi H, Gaedenia L. 2004. Strategi Pengendalian Penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas dan Koi. Makalah seminar pengendalian penyakit koi herpes virus (KHV) pada budidaya ikan air tawar. Bogor. 10 hal.
- Utomo, Y. E. 2001. Uji Lapang Vaksin Aeromonas hydrophila Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Melalui Pakan Pelet Bervaksin. Skripsi. 56 hal.
- Wardiyanto., Sukoso dan U. Yanuhar. 2008. Analisa daya hambat ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L) terhadap infeksi selular Aeromonas hydrophila pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L). *Jurnal Penelitian Perikanan*. 2(1):107-114.
- Wibawati, Prima Ayu. 2012. Pengaruh ekstrak daun sirih merah (*Piperbetle* Var. *Rubrum*) Terhadap Waktu Kesembuhan Luka Insisi yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* pada tikus putih. Skripsi. 72 hal.
- Williams, P. E. 2008. *Evaluation Of A Common Carp (Cyprinus carpio L.) Exlusion And Trapping Device For Use In Aquatic Plant Founder Colony Establishment*. Thesis. 58 hlm.
- Wiyanto, D. B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* Terhadap Bakteri Aeromonas hydrophila dan Vibrio harveyii. *Jurnal Kelautan*. 3(1):1-17.
- Wu, C.C., Liu C.H., Chang Y. P., Hsieh S.L., 2010. Effect Of Hot Water Extract Of *Toona Sinensis* On Immune Response And Resistance To *Aeromonas hydrophila* In *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, p. 258-263.
- Zaheer, Z., A. P. Paithankar dan S. Khan. 2011. Optimization of extraction process and phytochemical investigations of *spathodea campanulata* flowers. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(20):2226-2231.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



Rotary Evaporator



Alat pengolah jaringan otomatis



Parafin Blok



Mikrotom Putar



Waterbath

Lampiran 2. Pembuatan serta Perhitungan Dosis Ekstrak Fenol *Gracilaria* sp.

Pembuatan ekstrak *Gracilaria* sp. didapatkan dari 24,24 gr ekstrak fenol . Setelah itu ditimbang sesuai dosis yang dibutuhkan yaitu 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l. Volume air untuk perendaman dengan ekstrak fenol *Gracilaria* sp. sebanyak 5 liter.

Perhitungan dosis obat menggunakan rumus pengenceran:

- Ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dengan dosis 1 gr/l. Maka ekstrak fenol *Gracilaria* sp. yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan (5 liter air) sebesar :

$$1 \text{ gr/l} = 1 \times 5 \text{ liter} = 5 \text{ gr/5 liter}$$

- Ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dengan dosis 1,5 gr/l. Maka ekstrak fenol *Gracilaria* sp. yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan (5 liter air) sebesar :

$$1,5 \text{ gr/l} = 1,5 \times 5 \text{ liter} = 7,5 \text{ gr/5 liter}$$

- Ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dengan dosis 2 gr/l. Maka ekstrak fenol *Gracilaria* sp. yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan (5 liter air) sebesar :

$$2 \text{ gr/l} = 2 \times 5 \text{ liter} = 10 \text{ gr/5 liter.}$$

Sehingga total ekstrak fenol *Gracilaria* sp. yang dibutuhkan adalah 22,5 gr.

Lampiran 3. Pembuatan preparat histopatologi jaringan otot

1. Tahap Fiksasi

Sampel daging ikan yang akan diamati jaringan ototnya diiris dengan ukuran 2 x 2 cm Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan buffer yaitu formalin 10% selama 24 jam.

2. Tahap Dehidrasi

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

3. Tahap Clearing

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

4. Tahap Impregnasi

Tahap impregnasi bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (embedding). Dilakukan dengan mencelupkan bahan ke parafin cair dengan suhu 56-60°C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali kedalam parafin cair dengan suhu 56-60°C selama 2 jam.

5. Tahap Embedding (pengeblokan)

Tahapan ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan kedalam waterbath (temperature 40°C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass (untuk persiapan pewarnaan HE) sebelumnya obyek glass harus diolesi

perekat polylisin. Berikutnya, keringkan pada oven dengan suhu 50-60°C kurang lebih selama 30 menit.

6. Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE

Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut :

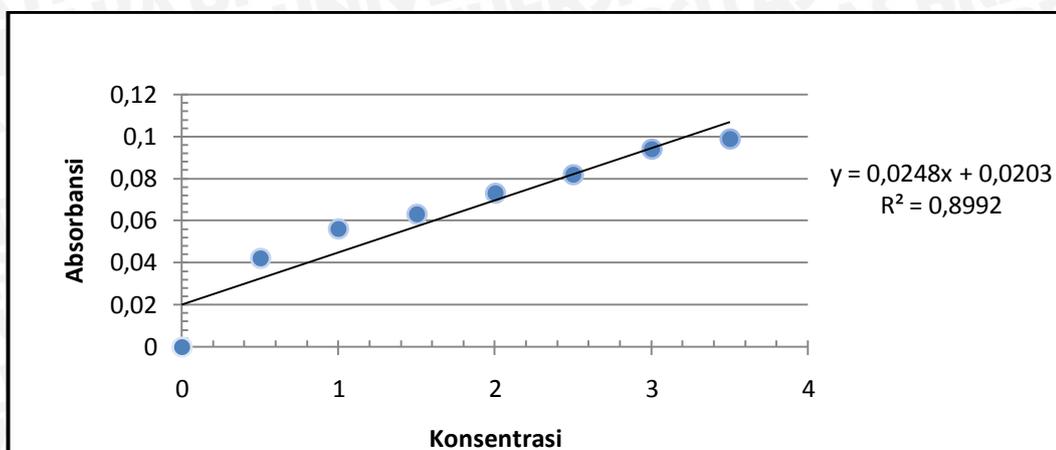
- Deparafinisasi : Dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan berturut-turut kedalam xylol 1 selama 5 menit, xylol 2 selama 5 menit dan xylol 3 selama 5 menit.
- Hidrasi : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan berturut-turut kedalam alkohol absolute selama 4 menit, alkohol 96% selama 3 menit, alkohol 90% selama 3 menit, alkohol 80% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, terakhir dimasukkan kedalam air mengalir selama 10 menit.
- Cat utama : dilakukan dengan menambahkan pewarna hematoksilin selama 5 menit dan eosin 1% selama 3-5 menit.
- Dehidrasi : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan kedalam alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 80% selama 2 menit, alkohol 90% selama 3 menit, alkohol 96% selama 4 menit dan alkohol absolute selama 5 menit.
- Clearing : dilakukan dengan memasukkan hasil sayatan jaringan kedalam xylol 1 selama 5 menit, xylol 2 selama 5 menit dan xylol 3 selama 5 menit.

7. Tahap Mounting

Preparat dilem dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan cover glass jangan sampai terjadi gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati dibawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh Haematoksilin yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

Lampiran 4. Penentuan Konsentrasi Fenol dengan Kurva Standart

Dari persamaan kurva standar diperoleh persamaan :



Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi dengan memasukkan nilai absorbansi sebagai berikut :

Lama Perendaman (jam)	Jenis Pelarut	Nilai Absorbansi	Persamaan	Konsentrasi (ppm)
24	Akuades	0,039	y=0,0248x+0,0203	0,75
	Etanol 80%	0,071		2,04
	Etanol 96%	0,099		3,17
48	Akuades	0,078		2,33
	Etanol 80%	0,142		4,91
	Etanol 96%	0,198		7,16

Contoh Perhitungan :

Absorbansi 0,198

$$Y = 0,0248x + 0,0203$$

$$0,039 = 0,0248x + 0,0203$$

$$0,039 - 0,0203 = 0,0248x$$

$$0,0187 = 0,0248x$$

$$X = 0,0187 / 0,0248$$

$$= 0,754$$

Lampiran 5. Data hasil PP LC50 terhadap dosis dan lama perendaman

Jam Ke	Dosis (gr/l)											
	1	%	1,5	%	2	%	3	%	4	%	5	%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	1	10	1	10	1	10
2	0	0	0	0	1	10	1	10	1	10	2	20
3	1	10	0	0	1	10	3	30	1	10	2	20
4	3	30	1	10	1	10	3	30	2	20	2	20
5	3	30	2	20	3	30	3	30	3	30	2	20
6	3	30	2	20	3	30	3	30	3	30	3	30
7	4	40	2	20	3	30	4	40	3	30	3	30
8	4	40	4	40	4	40	4	40	3	30	3	30
9	4	40	4	40	4	40	4	40	4	40	3	30
10	4	40	4	40	4	40	5	50	4	40	3	30
11	4	40	4	40	4	40	5	50	5	50	5	50
12	5	50	4	40	5	50	7	70	5	50	5	50
13	5	50	4	40	5	50	7	70	5	50	5	50
14	7	70	5	50	5	50	7	70	7	70	6	60
15	7	70	5	50	7	70	10	100	7	70	8	80
16	7	70	5	50	9	90			9	90	8	80
17	8	80	7	70	9	90			10	100	10	100
18	10	100	8	80	9	90						
19			8	80	9	90						
20			10	100	10	100						

Jam ke	Lama Perendaman (Jam)					
	10	%	12	%	14	%
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	10	1	10
5	0	0	1	10	3	30
6	0	0	1	10	3	30
7	1	10	1	10	3	30
8	1	10	1	10	4	40
9	2	20	3	30	4	40
10	2	20	3	30	4	40
11	2	20	4	40	4	40
12	3	30	4	40	4	40
13	3	30	4	40	4	40
14	3	30	4	40	4	40
15	4	40	5	50	4	40
16	4	40	5	50	4	40
17	4	40	7	70	4	40
18	4	40	7	70	5	50
19	4	40	7	70	6	60
20	6	60	9	90	7	70
21	6	60	9	90	7	70
22	8	80	9	90	10	100
23	9	90	10	100		
24	10	100				

Lampiran 6. Nilai Skoring Pada Histopatologi Otot Ikan Mas

SKORING TEST HISTOPATOLOGI OTOT

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Nekrosis	A	1	4	3	3	1	3	2,8	2,7
		2	2	3	2	1	3	2,2	
		3	3	4	3	2	3	3	
	B	1	1	2	1	1	1	1,2	1,4
		2	2	1	3	1	2	1,8	
		3	1	2	1	1	1	1,2	
	C	1	2	3	3	1	3	2,4	2,8
		2	3	4	4	4	4	3,8	
		3	1	3	2	4	1	2,2	
	K(-)	1	3	4	3	3	4	3,4	3,6
		2	4	4	4	3	4	3,8	
		3	3	4	3	4	4	3,6	
	K(+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
		2	1	1	1	1	1	1	
		3	1	1	1	1	1	1	
Degenerasi	A	1	2	4	3	4	3	3,2	2,7
		3	3	1	2	3	4	2,6	
		3	3	2	2	2	3	2,4	
	B	1	2	1	3	3	1	2	1,7
		2	1	2	1	2	1	1,4	
		3	2	1	2	1	3	1,8	
	C	1	3	3	4	4	3	3,4	2,8
		2	4	2	3	2	4	3	
		3	2	2	2	3	1	2	
	K (-)	1	4	4	3	4	3	3,6	3,5
		2	4	4	4	3	4	3,8	
		3	3	4	3	4	2	3,2	
	K (+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
		2	1	1	1	1	1	1	
		3	1	1	1	1	1	1	
Edema	A	1	3	2	3	1	2	2,2	2,6
		2	2	2	4	3	2	2,6	
		3	4	3	4	1	3	3	
	B	1	1	2	2	1	1	1,4	1,4
		2	2	2	1	2	1	1,6	
		3	2	1	1	1	1	1,2	
	C	1	4	3	4	2	2	3	2,9



K (-)	2	2	3	3	4	4	3,2	3,5
	3	2	3	1	2	4	2,4	
	1	4	3	4	3	4	3,6	
	2	4	4	4	3	4	3,8	
	3	3	3	4	2	4	3,2	
K (+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
	2	1	1	1	1	1	1	
	3	1	1	1	1	1	1	

Keterangan :

Nilai 1 = Ringan (Kerusakan 0-5%)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6-25%)

Nilai 3 = Berat (Kerusakan 26-50%)

Nilai 4 = Sangat Berat (Kerusakan >50%)



Lampiran 7. Hasil Skoring Histopatologi Kerusakan Jaringan Otot Nekrosis, Degenerasi Hialin dan Edema menggunakan Program SPSS 16

NEKROSIS

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Nekrosis	A	1	4	3	3	1	3	2,8	2,7
		2	2	3	2	1	3	2,2	
		3	3	4	3	2	3	3	
	B	1	1	2	1	1	1	1,2	1,4
		2	2	1	3	1	2	1,8	
		3	1	2	1	1	1	1,2	
	C	1	2	3	3	1	3	2,4	2,8
		2	3	4	4	4	4	3,8	
		3	1	3	2	4	1	2,2	
K(-)	1	3	4	3	3	4	3,4	3,6	
	2	4	4	4	3	4	3,8		
	3	3	4	3	4	4	3,6		

Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Smirnov ($p > 0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
	N	Nekrosis
	12	
Normal Parameters ^a	Mean	2,6167
	Std. Deviation	0,93598
Most Extreme Differences	Absolute	0,132
	Positive	0,103
	Negative	-0,132
	Kolmogorov-Smirnov Z	0,457
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,985

Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0.457, $\alpha > 0,05$ sehingga data tersebut normal.

Uji antar perlakuan dan efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	7,45	2,483333	9,085	0,016*
Acak	8	2,186667	0,273333		
Total	11	2.666,67			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0.05)

Perlakuan

Variabel terikat : Nekrosis

Perlakuan	Rata-rata	Standar Error	Nilai Kepercayaan 95%	
			Terendah	Tertinggi
0 gr/l	3,600	0,302	2,904	4,296
1 gr/l	2,667	0,302	1,971	3,363
1,5 gr/l	1,400	0,302	0,704	2,096
2 gr/l	2,800	0,302	2,104	3,496

Post Hoc Test

Beberapa Perbandingan

Dosis (I)	Dosis (J)	Rata-rata Perbedaan (I - J)	Standar Error	Signifikansi	Nilai Kepercayaan 95%	
					Terendah	Tertinggi
0	1	0,933	0,4269	0,207	-0,434	2,300
	1,5	2,200'	0,4269	0,004	0,833	3,567
	2	0,800	0,4269	0,310	-0,567	2,167
1	0	-0,933	0,4269	0,207	-2,300	0,434
	1,5	1,267	0,4269	0,070	-0,100	2,634
	2	-0,133	0,4269	0,989	-1,500	1,234
1,5	0	-2,200'	0,4269	0,004	-3,567	-0,833
	1	-1,267	0,4269	0,070	-2,634	0,100
	2	-1,400'	0,4269	0,045	-2,767	-0,033
2	0	-0,800	0,4269	0,310	-2,167	0,567
	1	0,133	0,4269	0,989	-1,234	1,500
	1,5	1,400'	0,4269	0,045	0,033	2,767

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

Keterangan:

- Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata
- Sig < 0,05 : berbeda nyata
- Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Dosis	N			Notasi
		1	2	
1.5 gr/l	3	1,400	-	a
1 gr/l	3	2,667	2,667	ab
2 gr/l	3	-	2,800	b
0 gr/l	3	-	3,600	b
Sig.		0,070	0,207	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000



Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial		Variabel Terikat	
		Nekrosis	
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,820
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,820
	Standar error		0,302
	Signifikansi		0,026 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-1,516
	Tertinggi	-0,124	
Kuadrat	Perkiraan Perbandingan		1,167
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,167
	Standar error		0,302
	Signifikansi		0,05*
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,471
	Tertinggi	1,863	
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,671
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,671
	Standar error		0,302
	Signifikansi		0,057 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,025
	Tertinggi	1,367	

Ringkasan Model

R	R ²	Penyesuaian R ²	Perkiraan Standar Error
0,716	0,512	0,404	0,723

Koefisien

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien	t	Sig
	B	Standar Error	Beta		
Dosis	-2,514	0,951	-2,075	-2,645	0,027
Dosis **2	0,970	0,471	1,616	2,060	0,069
(Perbandingan)	3,687	0,415		8,878	0,000

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan persamaan :

$$Y = 3,687 - 2,514x + 0,970x^2$$

$$Y' = -2,514 + (2) \cdot 0,970 x$$

$$Y' = -2,514 + 1,94x$$

$$2,514 = 1,94x$$

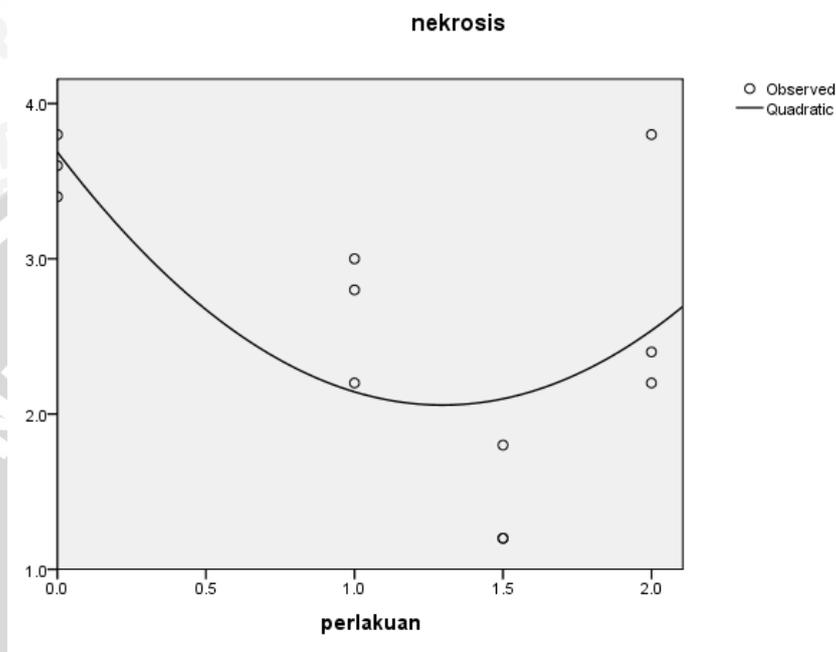
$$X = 1,29$$

$$Y = 3,687 - 2,514(1,29) + 0,970(1,29)^2$$

$$Y = 3,687 - 3,243 + 1,614$$

$$Y = 2,058$$

Grafik Nekrosis Sebagai Berikut :



DEGENERASI HALIN

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Degenerasi	A	1	2	4	3	4	3	3,2	2,7
		3	3	1	2	3	4	2,6	
		3	3	2	2	2	3	2,4	
	B	1	2	1	3	3	1	2	1,7
		2	1	2	1	2	1	1,4	
		3	2	1	2	1	3	1,8	
	C	1	3	3	4	4	3	3,4	2,8
		2	4	2	3	2	4	3	
		3	2	2	2	3	1	2	
K (-)	1	4	4	3	4	3	3,6	3,5	
	2	4	4	4	3	4	3,8		
	3	3	4	3	4	2	3,2		

Hasil Uji Normalitas Kolmogrof-Smirnov ($p > 0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Degenerasi
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	2,700
	Std. Deviation	0,7793
Most Extreme Differences	Absolute	0,156
	Positive	0,149
	Negative	-0,156
	Kolmogorov-Smirnov Z	0,541
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,932

Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,541, $\alpha < 0,05$. Sehingga data diatas normal

Uji antar perlakuan dan efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Signifikansi
Perlakuan	3	4,92	1,64	7,455	0,011*
Acak	8	1,76	0,22		
Total	11	6,68			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0.05)

Perlakuan

Variabel terikat : Degenerasi

Perlakuan	Rata-rata	Standar Error	Nilai Kepercayaan 95%	
			Terendah	Tertinggi
0 gr/l	3,533	0,271	2,909	4,158
1 gr/l	2,733	0,271	2,109	3,358
1,5 gr/l	1,733	0,271	1,109	2,358
2 gr/l	2,800	0,271	2,176	3,424

Post Hoc Test

Beberapa Perbandingan

Dosis (I)	Dosis (J)	Rata-rata Perbedaan (I - J)	Standar Error	Signifikansi	Nilai Kepercayaan 95%	
					Terendah	Tertinggi
0	1	0,800	0,3830	0,235	0,426	2,026
	1,5	1,800'	0,3830	0,007	0,574	3,026
	2	0,733	0,3830	0,294	-0,493	1,960
1	0	-0,800'	0,3830	0,235	-2,026	0,426
	1,5	1,000	0,3830	0,115	-0,226	2,226
	2	-0,067	0,3830	0,998	-1,293	1,160
1,5	0	-1,800'	0,3830	0,007	-3,026	-0,574
	1	-1,000	0,3830	0,115	-2,226	0,226
	2	-1,067	0,3830	0,090	-2,293	0,160
2	0	-0,733	0,3830	0,294	-1,960	0,493
	1	0,067	0,3830	0,998	-1,160	1,293
	1,5	1,067	0,3830	0,090	-0,160	2,293

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata
 Sig < 0,05 : berbeda nyata
 Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Dosis	N			Notasi
		1	2	
1.5 gr/l	3	1,733	-	a
1 gr/l	3	2,733	2,733	ab
2 gr/l	3	2,800	2,800	ab
0 gr/l	3	-	3,533	b
Sig.		0,090	0,235	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial		Variabel Terikat	
		Degenerasi	
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,716
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,716
	Standar error		0,271
	Signifikansi		0,030 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah Tertinggi	-1,340 -0,091
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		-0,933
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,933
	Standar error		0,271
	Signifikansi		0,009*
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah Tertinggi	0,309 1,558
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,507
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,507
	Standar error		0,271
	Signifikansi		0,098 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah Tertinggi	-0,118 1,131

Ringkasan Model

R	R ²	Penyesuaian R ²	Perkiraan Standar Error
0,716	0,513	0,405	0,601

Koefisien

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien	t	Sig
	B	Standar Error	Beta		
Dosis	-2,041	0,791	-2,023	-2,580	0,030
Dosis **2	0,770	0,392	1,541	1,965	0,081
(Perbandingan)	3,601	0,346		10,420	0,000

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan persamaan :

$$Y = 3,601 - 2,041x + 0,770x^2$$

$$Y' = -2,041 + (2) \cdot 0,770 x$$

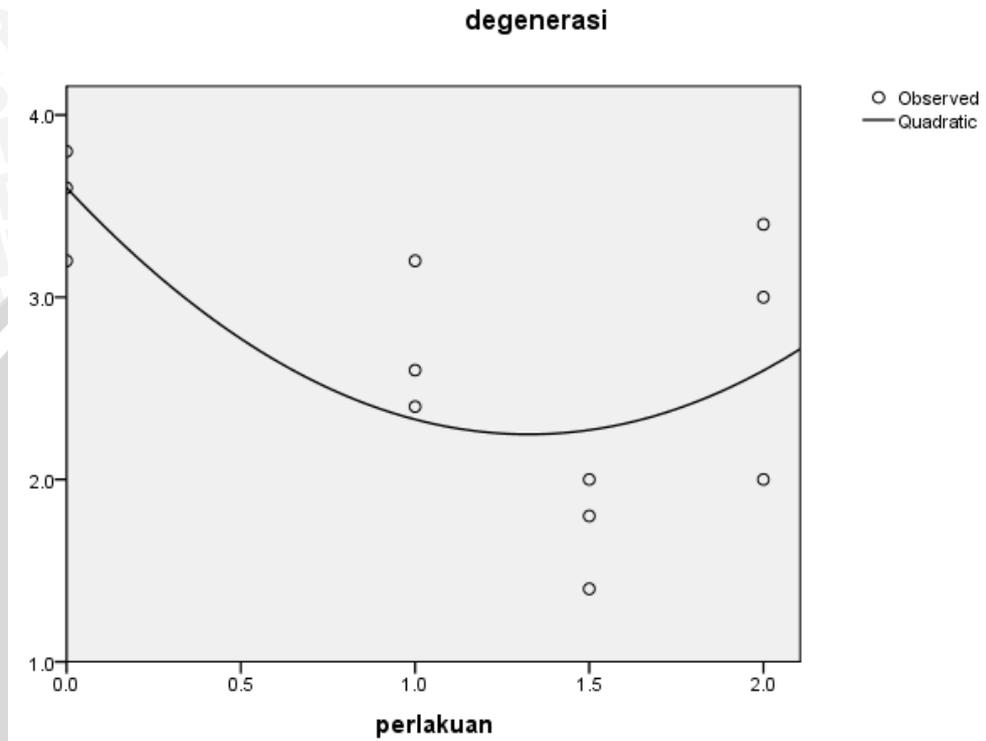
$$Y' = -2,041 + 1,54x$$

$$2,041 = 1,54x$$

$$X = 1,32$$

$$Y = 3,601 - 2,041(1,32) + 0,770(1,32)^2$$
$$Y = 3,687 - 2,694 + 1,341$$
$$Y = 2,248$$

Dengan Grafik Sebagai Berikut :



EDEMA

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
			LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
			Edema	A	1	3	2		
		2	2	2	4	3	2	2,6	
		3	4	3	4	1	3	3	
	B	1	1	2	2	1	1	1,4	1,4
		2	2	2	1	2	1	1,6	
		3	2	1	1	1	1	1,2	
	C	1	4	3	4	2	2	3	2,9
		2	2	3	3	4	4	3,2	
		3	2	3	1	2	4	2,4	
	K (-)	1	4	3	4	3	4	3,6	3,5
		2	4	4	4	3	4	3,8	
		3	3	3	4	2	4	3,2	

Hasil Uji Normalitas Kolmogrof-Smirnov ($p > 0,05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Edema
	N	12
Normal Parameters ^a	Mean	2,817
	Std. Deviation	0,5622
	Most Extreme Differences	
	Absolute	0,187
	Positive	0,187
	Negative	-0,136
	Kolmogorov-Smirnov Z	0,649
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,793

Test distribution is Normal.

Nilai Z = 0,649, $\alpha > 0,05$ sehingga data tersebut normal.

Uji antar perlakuan dan efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Signifikansi
Perlakuan	3	2,60	0,87	7,869	0,009*
Acak	8	0,88	0,11		
Total	11	6,68			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0.05)

Perlakuan

Variabel terikat : Edema

Perlakuan	Rata-rata	Standar Error	Nilai Kepercayaan 95%	
			Terendah	Tertinggi
0 gr/l	3,533	0,191	3,092	3,975
1 gr/l	2,600	0,191	2,158	3,042
1,5 gr/l	2,267	0,191	1,825	2,708
2 gr/l	2,867	0,191	2,425	3,308

Post Hoc Test

Beberapa Perbandingan

Dosis (I)	Dosis (J)	Rata-rata Perbedaan (I - J)	Standar Error	Signifikansi	Nilai Kepercayaan 95%	
					Terendah	Tertinggi
0	1	0,933'	0,2708	0,036	0,066	1,801
	1,5	1,267'	0,2708	0,007	0,399	2,134
	2	0,667	0,2708	0,142	-0,201	1,534
1	0	-0,933'	0,2708	0,036	-1,801	-0,66
	1,5	0,333	0,2708	0,626	-0,534	1,201
	2	-0,267'	0,2708	0,762	-1,134	0,601
1,5	0	-1,267'	0,2708	0,007	-2,134	-0,399
	1	-0,333	0,2708	0,626	-1,201	0,534
	2	-0,600	0,2708	0,199	-1,467	0,267
2	0	-0,677	0,2708	0,142	-1,534	0,201
	1	0,267	0,2708	0,762	-0,601	1,134
	1,5	0,600	0,2708	0,199	-0,267	1,467

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000

*Perbedaan rata-rata adalah signifikan pada tingkat 0,05

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata
 Sig < 0,05 : berbeda nyata
 Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Dosis	N			Notasi
		1	2	
1.5 gr/l	3	2,267	-	a
1 gr/l	3	2,600	-	a
2 gr/l	3	2,867	2,867	ab
0 gr/l	3	-	3,533	b
Sig.		0,199	0,142	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Berdasarkan objek yang diamati:

Istilah kesalahan Mean Square (Error) = 100,000

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial		Variabel Terikat	
		Edema	
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,552
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,552
	Standar error		0,191
	Signifikansi		0,026 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,963
	Tertinggi	-0,080	
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		-0,767
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,767
	Standar error		0,191
	Signifikansi		0,004*
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,325
	Tertinggi	1,208	
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,075
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,075
	Standar error		0,191
	Signifikansi		0,707 ^{ns}
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,367
	Tertinggi	0,516	

Ringkasan Model

R	R ²	Penyesuaian R ²	Perkiraan Standar Error
0,835	0,697	0,629	0,342

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien	t	Sig
	B	Standar Error	Beta		
Dosis	-1,810	0,450	-2,486	-4,018	0,003
Dosis **2	0,715	0,223	1,984	3,207	0,011
(Perbandingan)	3,556	0,197		18,073	0,000

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk kuadratik dengan persamaan :

$$Y = 3,556 - 1,810x + 0,715x^2$$

$$Y' = -1,810 + (2) \cdot 0,715x$$

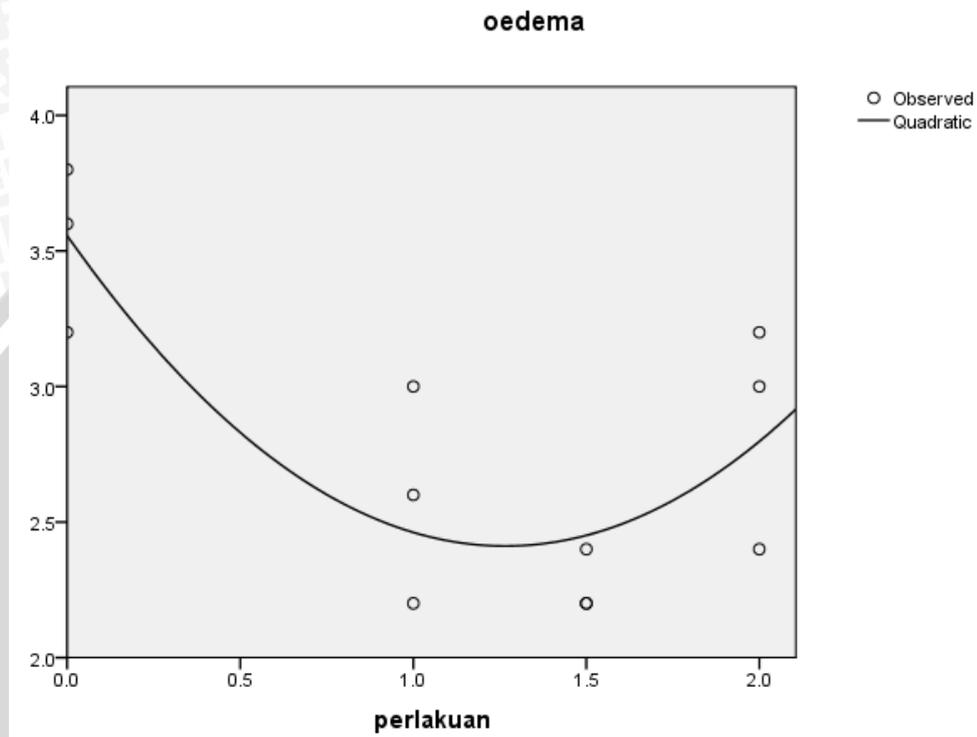
$$Y' = -1,810 + 1,43x$$

$$1,810 = 1,43x$$

$$X = 1,26$$

$$Y = 3,556 - 1,810(1,26) + 0,715(1,26)^2$$
$$Y = 3,556 - 2,280 + 1,135$$
$$Y = 2,411$$

Dengan Grafik Sebagai Berikut :



Lampiran 8. Data Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu (°C) pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

DATA DO (ppm)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sore	6.03	6.55	5.67	6.23	6.12	6.35	6.23	6.21	5.37	6.32	6.75	5.43	5.37 - 6.75
2	Pagi	5.32	5.02	5.43	5.6	5.37	5.75	5.43	5.23	5.46	5.34	5.54	5.21	5.02 - 5.75
	Sore	5.73	6.53	6.24	6.45	5.67	5.59	6.2	6.02	6.06	6.32	6.12	5.96	5.59 - 6.45
3	Pagi	5.02	5	5.12	6.4	5.3	5.7	5.42	5.01	5.38	5.21	5.1	5.2	5 - 6.4
	Sore	6.02	6.21	6.12	6.22	6.23	6.11	6.32	5.92	5.78	6.03	6.13	6.13	5.78 - 6.32

DATA pH

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sore	7.78	7.75	7.73	7.78	7.29	7.39	7.84	7.67	7.69	7.29	7.69	7.38	7.29 - 7.84
2	Pagi	7.28	7.75	7.78	8.21	8.24	7.38	7.84	7.63	7.74	7.46	7.55	7.65	7.28 - 8.24
	Sore	8.03	8.05	8.31	8.35	8.31	7.89	7.83	7.37	8.05	7.29	7.84	7.65	7.29 - 8.35
3	Pagi	7.57	7.65	7.34	7.46	7.28	7.59	7.27	7.37	7.38	7.48	7.53	7.41	7.27 - 7.65
	Sore	7.89	7.95	8.01	8.05	8.14	7.59	7.38	8.06	7.87	8.03	8.05	8.13	7.38 - 8.13

DATA SUHU (°C)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sore	25.6	26.2	26.1	26	26.4	26.5	26.6	26.4	26.3	26.1	26.5	26.6	26 – 26.6
2	Pagi	26.6	26.1	26	26.1	26.3	26.5	26.6	26.4	26.2	26.3	26.2	25.9	25.9 – 26.6
	Sore	26.1	26.4	25.9	25.7	25.5	25.6	25.7	25.8	25.7	26	25.7	25.6	25.5 – 26.1
3	Pagi	26.4	26.5	26.6	26.5	26.4	26.5	26.3	26.4	26.3	26.4	26	26.1	26 – 26.6
	Sore	25.5	26.1	25.6	25.7	25.8	25.5	25.6	25.8	25.7	25.8	25.7	25.6	25.5 – 26.1









