

**PENGARUH PENGGUNAAN EKSTRAK KASAR DAUN SIRSAK  
(*Annona muricata*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG  
IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.) YANG DIINFEKSI BAKTERI  
*Pseudomonas fluorescens***

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

Oleh:  
**NUNGKY YUNIARTI  
NIM. 105080513111008**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**PENGARUH PENGGUNAAN EKSTRAK KASAR DAUN SIRSAK  
(*Annona muricata*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG  
IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.) YANG DIINFEKSI BAKTERI  
*Pseudomonas fluorescens***

**SKRIPSI**

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

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

Oleh:

**NUNGKY YUNIARTI  
NIM. 105080513111008**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG  
2014**

**PENGARUH PENGGUNAAN EKSTRAK KASAR DAUN SIRSAK  
(*Annona muricata*) TERHADAP HISTOPATOLOGI INSANG  
IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.) YANG DIINFEKSI BAKTERI  
*Pseudomonas fluorescens***

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

Oleh:

**NUNGKY YUNIARTI  
NIM. 105080513111008**

**DOSEN PENGUJI I**

**Dr. Ir. Maftuch, MSi  
NIP. 19660825 199203 1 001  
TANGGAL:**

**DOSEN PENGUJI II**

**Ir. Ellana Sanoesi, MP  
NIP. 19630924 199803 2 002  
TANGGAL:**

**MENYETUJUI,  
DOSEN PEMBIMBING I**

**Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS  
NIP. 19550213 198403 1 001  
TANGGAL:**

**DOSEN PEMBIMBING II**

**Qurrota A'yunin, S.Pi. MP. MSc  
NIK. 86062808120317  
TANGGAL:**

**MENGETAHUI,  
KETUA JURUSAN MSP**

**Dr. Ir. Arning Wilujeng E, MS  
NIP. 19620805 198603 2 001**

## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

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 jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Malang, Juli 2014

Mahasiswa

NUNGKY YUNIARTI

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi ini dengan baik. Dalam pengerjaan laporan skripsi ini, penulis banyak sekali mendapatkan bantuan baik secara moril maupun materil. Sehingga pada kesempatan kali ini, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ayah, Ibu, Yani di Mojokerto, keluarga besar di Malang untuk dukungannya
2. Ibu Titin selaku *laboran* Lab. Parasit dan Penyakit Ikan serta ibu Iwin selaku *laboran* Lab. Mikrobiologi, FPIK, UB yang senantiasa membimbing dalam pelaksanaan penelitian
3. Bapak Slamet selaku *laboran* Lab. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UB yang senantiasa menyediakan media biakan bakteri, serta Bapak Yit selaku *rekamedik* RSSA yang telah membantu dalam pembuatan preparat histopatologi insang
4. Keluarga besar BP 2010 untuk motivasi dan dukungannya

Tentunya dalam penulisan ini masih banyak kesalahan, oleh karenanya penulis harapan kritik dan saran untuk kesempurnaannya dan semoga penulisan ini bermanfaat.

Juli, 2014  
Penulis

## RINGKASAN

**NUNGKY YUNIARTI.** Pengaruh Penggunaan Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Histopatologi Insang Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Yang Diinfeksi Bakteri *Pseudomonas fluorescens*' (di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. ARIEF PRAJITNO, MS** dan **QURROTA A'YUNIN, S.Pi, MP, M.Sc**)

---

Ikan mas merupakan salah satu ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomis penting, sehingga ikan ini banyak dibudidayakan. Selain dipelihara dalam kolam-kolam tertentu, ikan mas sering dipelihara di sawah bersama-sama dengan tanaman padi (Rudiyanti dan Ekasari, 2009). Menurut Lesmana dan Darmawan (2000), ikan membutuhkan air yang berfungsi sebagai media, baik media internal maupun eksternal. Sebagai media internal, fungsi dari air adalah sebagai bahan baku untuk reaksi di dalam tubuh dan pengangkut bahan makanan keseluruhan tubuh. Sedangkan sebagai media eksternal air berfungsi sebagai habitatnya.

Selain dampak terhadap penurunan kualitas perairan dan daya dukung lingkungannya, penurunan tingkat imunitas ikan juga perlu diperhatikan. Apabila tingkat imunitas menurun maka ikan akan mudah terserang penyakit dan akhirnya mengakibatkan kematian. Kondisi ini akan menjadi kendala dalam meningkatkan produksi serta sektor perikanan budidaya (Saputra *et al.*, 2010). Penggunaan obat-obatan untuk mengurangi gejala atau menyembuhkan penyakit dianggap sangat praktis, efektif dan murah. Tetapi, banyak obat-obatan yang tidak spesifik dan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan (Kordi, 2004). Tanaman obat yang aman digunakan, murah dan mudah didapat salah satunya adalah daun sirsak yang memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan (Dewi dan Hermawati, 2013).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak kasar daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap histopatologi insang ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang digunakan yaitu memberikan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) dengan dosis yang berbeda-beda yaitu perlakuan A (0 ppm), B (50 ppm), C (100 ppm), D (150 ppm), dan kontrol negatif dan diujikan pada ikan mas (*C. carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens* dan dilihat histopatologi insang.

Hasil histopatologi menunjukkan bahwa insang yang terinfeksi bakteri terlihat mengalami kerusakan edema, nekrosis dan fusi. Hasil pengamatan histopatologi insang terlihat bahwa pada hari ke-14, perlakuan D (150 ppm) mengalami pemulihan lebih baik dibandingkan perlakuan A (0 ppm), B (50 ppm), dan C (100 ppm), dengan nilai rerata kerusakannya paling rendah, dan pada perlakuan D (150 ppm) struktur jaringan insangnya mendekati struktur jaringan insang ikan kontrol negatif. Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) yang terbaik yaitu pada perlakuan D (150 ppm) karena dosis ekstrak kasar daun sirsak yang diberikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga mengurangi infeksi yang ditimbulkan dan ikan mas mampu memperbaiki jaringannya.

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan mas (*C. carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens* dan disarankan masih perlu diketahui dosis optimal untuk pemberian ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) berdasarkan analisa data yang dihasilkan berupa grafik yang linear serta dapat pula mengamati kerusakan pada organ dalam lainnya.

## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul 'Pengaruh Penggunaan Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Histopatologi Insang Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Yang Diinfeksi Bakteri *Pseudomonas fluorescens*'. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan meliputi penentuan dosis terhadap histopatologi dan kerusakan jaringan pada insang ikan mas.

Sehubungan dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing I yang sudah memberikan banyak saran dan kritik demi kebaikan penulis.
2. Ibu Qurrota A'yunin, S. Pi, MP, M. Sc, selaku dosen pembimbing II yang juga telah memberikan banyak saran dan kritik demi kebaikan penulis.
3. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi selaku dosen penguji I yang sudah memberikan banyak nasehat dan masukan.
4. Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MS selaku dosen penguji II yang juga telah memberikan masukan kepada penulis.

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

Malang, Juli 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	v
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	viii
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Hipotesis .....	3
1.5 Kegunaan .....	3
1.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ikan Mas ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) .....	4
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	4
2.1.2 Habitat dan Penyebaran .....	5
2.1.3 Kualitas Air .....	6
a. Suhu .....	6
b. <i>Potential of Hydrogen</i> (Ph) .....	6
c. <i>Dissolved Oxygen</i> (DO) .....	7
2.1.4 Penyakit Pada Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> L.) .....	7
2.2 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	8
2.2.2 Habitat dan Penyebaran .....	9
2.2.3 Pertumbuhan .....	10
2.2.4 Infeksi Bakteri <i>P. fluorescens</i> dan Gejalanya .....	11
2.3 Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> ) .....	12
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	12
2.3.2 Habitat dan Penyebaran .....	13
2.3.3 Manfaat Daun Sirsak ( <i>A. muricata</i> ) .....	14
2.3.4 Bioaktif Daun Sirsak ( <i>A. muricata</i> ) .....	14
2.4 Insang .....	15
2.4.1 Edema .....	17
2.4.2 Nekrosis .....	18
2.4.3 Fusi .....	18
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>20</b>
3.1 Meteri Penelitian .....	20



3.1.1 Alat-alat Penelitian .....	20
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian .....	21
3.2 Metode Penelitian .....	22
3.3 Rancangan Penelitian .....	22
3.4 Prosedur Penelitian .....	24
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	24
3.4.2 Sterilisasi Tempat Penelitian .....	25
3.4.3 Perlakuan Menggunakan Ekstrak <i>A. muricata</i> .....	25
3.4.4 Peremajaan Bakteri .....	26
3.4.5 Kultur Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	27
3.4.6 Persiapan Alat .....	27
3.4.7 Persiapan Hewan Uji .....	27
3.4.8 Pelaksanaan Penelitian .....	28
a. Penginfeksi Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	28
b. Perlakuan Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak ..	28
c. Pembuatan Preparat Histopatologi .....	28
3.5 Parameter Uji .....	30
3.5.1 Parameter Utama .....	30
3.5.2 Parameter Penunjang .....	31
3.6 Analisis Data .....	31
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
4.1 Parameter Utama .....	33
4.1.1 Uji Pendahuluan .....	33
a. Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	33
b. Penentuan Pelarut yang Terbaik .....	34
c. Penentuan Dosis Perendaman Ikan Mas Menggunakan Ekstrak kasar Daun Sirsak ( <i>A.</i> <i>muricata</i> ) .....	35
4.1.2 Gambaran Histologi Insang Ikan Mas Sehat .....	35
4.1.3 Gambaran Histopatologi Insang Ikan Yang Diberi Perlakuan .....	37
a. Edema .....	39
b. Nekrosis .....	42
c. Fusi .....	45
4.2 Parameter Penunjang .....	48
4.2.1 Gejala Klinis .....	48
4.2.2 Kualitas Air .....	50
a. Suhu .....	50
b. <i>Potential of Hydrogen</i> (pH) .....	50
c. Oksigen Terlarut (DO) .....	50
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>51</b>
5.1 Kesimpulan .....	51
5.2 Saran .....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>56</b>

## DAFTAR TABEL

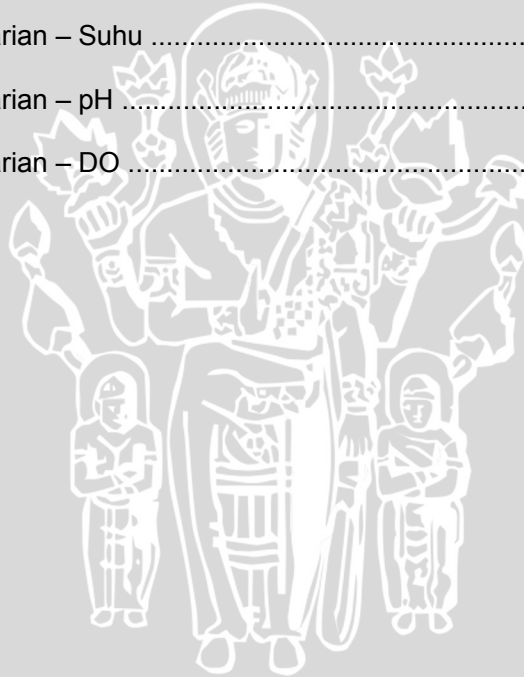
Tabel	Halaman
1. Rancangan Perlakuan .....	23
2. Persentase nilai skoring .....	32
3. Standar Mc Farland .....	34
4. Hasil Uji Daya Hambat Pada Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan Menggunakan Perasan, Akuades dan Etanol 96% .....	34
5. Rerata Skoring Hasil Penelitian Kerusakan Edema Jaringan Insang .....	39
6. Sidik Ragam skoring Edema Insang Ikan Mas .....	40
7. Uji BNT Skoring Edema Histopatologi Insang Ikan Mas .....	40
8. Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis Jaringan Insang .....	42
9. Sidik Ragam Skoring Nekrosis Insang Ikan Mas .....	43
10. Uji BNT Skoring Nekrosis Histopatologi Insang Ikan Mas .....	43
11. Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Fusi Jaringan Insang .....	45
12. Sisik Ragam Skoring Fusi Insang Ikan Mas .....	46
13. Uji BNT Skoring Fusi Histopatologi Insang Ikan Mas .....	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Ikan Mas .....	5
2.	<i>P. fluorescens</i> .....	9
3.	Daun sirsak ( <i>A. muricata</i> ) .....	13
4.	Struktur Kimia <i>Acetogenins</i> pada Daun Sirsak .....	14
5.	Insang Ikan .....	16
6.	Lamella .....	17
7.	Denah penelitian .....	24
8.	Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zigzag) .....	32
9.	Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	33
10.	Histologi Insang Normal dan Terinfeksi .....	36
11.	Struktural Jaringan Histopatologi Insang Ikan Mas yang Telah Diberi Perlakuan .....	38
12.	Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Edema Insang Ikan Mas .....	41
13.	Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Insang Ikan Mas .....	44
14.	Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Fusi Insang Ikan Mas .....	47
15.	Gejala klinis ikan mas pada hari ke-7 .....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian .....	56
2. Cara Perhitungan Analisa Sidik Ragam, Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan Analisa Regresi .....	60
3. Nilai Skoring pada Histopatologi Insang Ikan Mas .....	63
4. Perhitungan Kerusakan Edema .....	64
5. Perhitungan Kerusakan Nekrosis .....	65
6. Perhitungan Kerusakan Fusi .....	66
7. Pengamatan Harian – Suhu .....	67
8. Pengamatan Harian – pH .....	69
9. Pengamatan Harian – DO .....	71



## DAFTAR ISTILAH

- Acetoginin** : Senyawa kimia yang berperan sebagai anti kanker
- Bakteri gram negatif** : Bakteri yang memiliki struktur dinding sel yang lebih tipis yang terdiri dari 10% peptidoglikan, lipopolisakarida dan kandungan lipid tinggi (11-22%)
- Bakteri gram positif** : Bakteri yang memiliki struktur dinding sel yang lebih tebal yang terdiri dari 60-100% peptidoglikan dan lipid rendah (1-4%)
- Bioaktif** : Senyawa kimia yang menghasilkan aktivitas biologis dalam tubuh
- Clearing** : Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk mentransparankan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan
- Dehidrasi** : Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk menarik air dari jaringan organ yang diamati
- Edema** : Akumulasi cairan yang abnormal di dalam rongga-rongga tubuh atau di dalam ruang-ruang interstitial dari jaringan dan organ yang dapat mengakibatkan kebengkakan
- Ekstraksi** : Proses penarikan senyawa kimia dari suatu bahan menggunakan pelarut yang sesuai
- Embedding** : Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk menanam spesimen organ ke dalam parafin yang dicetak menjadi blok-blok parafin dalam wadah khusus berupa *tissue cassette*/block besi
- Fenol** : Zat kristal tak berwarna yang memiliki bau khas. Rumus kimianya adalah  $C_6H_5OH$  dan strukturnya memiliki gugus hidroksil (-OH) yang berikatan dengan cincin fenil
- Fiksasi** : Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk mengawetkan jaringan dari organ yang akan diamati
- Filamen** : Bagian dari insang yang terdapat pembuluh darah yang mengandung kapiler sehingga memungkinkan adanya pertukaran oksigen
- Flavonoid** : Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga
- Fusi** : Peleburan lamella akibat lamella yang semakin menebal

- Hiperplasia** : Peningkatan volume organ atau jaringan yang diikuti dengan peningkatan jumlah sel. Namun, peningkatan volume tidak termasuk neoplasia (kanker).
- Hipertropi** : Peningkatan volume organ atau jaringan tanpa diikuti meningkatnya jumlah sel didalamnya.
- Histopatologi** : Cabang biologi yang mempelajari kondisi dan fungsi jaringan dalam hubungannya dengan penyakit
- Karnivora** : Makhluk hidup pemakan daging-dagingan
- Lamella** : Jaringan berbentuk helaian
- Maserasi** : Proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan
- Metabolit sekunder** : Senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antara spesies yang satu dan lainnya
- Mounting** : Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk merekatkan irisan organ ke dalam preparat
- Nekrosis** : Kerusakan jaringan sel pada insang yang terjadi akibat kematian sel
- P. fluorescens*** : Bakteri gram negatif yang merupakan penyebab penyakit pada ikan air tawar
- Terpenoid** : Senyawa glikosida yang merupakan hasil dari saponin yang dihidrolisis

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan mas merupakan salah satu ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomis penting, sehingga ikan ini banyak dibudidayakan. Selain dipelihara dalam kolam-kolam tertentu, ikan mas sering dipelihara di sawah bersama-sama dengan tanaman padi (Rudiyanti dan Ekasari, 2009). Ikan mas adalah jenis ikan konsumsi air tawar dengan ciri-ciri memiliki badan yang memanjang pipih kesamping dan lunak. Ikan mas sebagai ikan konsumsi merupakan salah satu komoditas sektor perikanan air tawar yang terus berkembang pesat. Ikan mas banyak diminati konsumen karena rasa dagingnya yang enak dan gurih serta memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Permintaan konsumsi ikan mas setiap tahunnya cenderung meningkat terutama di kota-kota besar, seperti Jakarta, Surabaya, Bandung (Amri, 2008).

Menurut Lesmana dan Darmawan (2000), ikan membutuhkan air yang berfungsi sebagai media, baik media internal maupun eksternal. Sebagai media internal, fungsi dari air adalah sebagai bahan baku untuk reaksi di dalam tubuh dan pengangkut bahan makanan keseluruh tubuh. Sedangkan sebagai media eksternal air berfungsi sebagai habitatnya. Oleh karena itu kualitas dan kuantitasnya pun harus dijaga sesuai kebutuhan ikan mengingat pentingnya peran air bagi kehidupan ikan.

Selain dampak terhadap penurunan kualitas perairan dan daya dukung lingkungannya, penurunan tingkat imunitas ikan juga perlu diperhatikan. Apabila tingkat imunitas menurun maka ikan akan mudah terserang penyakit dan akhirnya mengakibatkan kematian. Kondisi ini akan menjadi kendala dalam meningkatkan produksi serta sektor perikanan budidaya (Saputra, Praseno, Sudradjat, Prasetio, 2010).

Ikan mas dapat terserang bakteri, salah satunya adalah *Pseudomonas fluorescens* yang diketahui sebagai penyakit yang sangat ganas yang dapat menyerang ikan mas. Gejala yang timbul akibat serangan penyakit ini yaitu terjadi pendarahan dan borok pada kulit, serta sirip ekor terkikis (Mulyadi, 2009).

*Pseudomonas sp.*, bakteri ini termasuk kelompok bakteri *gram negative*, yaitu bersifat motil karena adanya flagel untuk alat gerak dan bersifat *aerobic*. Beberapa spesies bakteri dapat menghasilkan pigmen yang larut dalam air. Bakteri ini berbentuk batang dengan ukuran tubuh sekitar  $0,6 \times 2 \mu\text{m}$ . Bakteri ini dapat terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, ataupun bergerombol membentuk rantai pendek. Gejala pada ikan yang telah terinfeksi oleh bakteri ini adalah terdapat benjolan berwarna merah pada pangkal sirip dada; perutnya membengkak; tubuhnya penuh borok / luka; pendarahan pada organ internal, sekitar mulut, opercula dan daerah ventral; terjadi nekrosis pada jaringan limpa dan ginjal; menurunnya nafsu makan sehingga pertumbuhan ikan melambat; serta ikan terlihat lemah (Anonymous, 2012).

Penggunaan obat-obatan untuk mengurangi gejala atau menyembuhkan penyakit dianggap sangat praktis, efektif dan murah. Tetapi, banyak obat-obatan yang tidak spesifik dan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan (Kordi, 2004). Tanaman obat yang aman digunakan, murah dan mudah didapat salah satunya adalah daun sirsak yang memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan (Dewi dan Hermawati, 2013).

### 1.2 Perumusan Masalah

Penggunaan antibiotik dan obat-obatan untuk ikan dapat mengakibatkan resistensi bakteri terhadap bahan kimia yang digunakan. Oleh karena itu, diperlukan bahan alami yang mampu digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan latar belakang diatas, masalah yang dihadapi yaitu belum



diketuinya pengaruh penggunaan ekstrak kasar daun sirsak terhadap histopatologi insang ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak kasar daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap histopatologi insang ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

### 1.4 Hipotesis

H<sub>0</sub> : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) tidak berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan mas (*C. carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

H<sub>1</sub> : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) berpengaruh terhadap histopatologi insang ikan mas (*C. carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

### 1.5 Kegunaan

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh penggunaan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) terhadap histopatologi insang ikan mas (*C. carpio* L.) yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

### 1.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 17 Maret – 9 Mei 2014 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran (FK), Universitas Brawijaya, Malang, serta Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Khairuman dan Amri (2008), klasifikasi Ikan mas adalah sebagai berikut :

Phyllum	: Chordata
Subphyllum	: Vertebrata
Superclass	: Pisces
Class	: Osteichthyes
Subclass	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Subordo	: Cyprinoidea
Family	: Cyprinidae
Subfamily	: Cyprininae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Species	: <i>Cyprinus carpio</i> L.

Bentuk tubuh ikan mas agak memanjang dan memipih tegak (*compressed*). Mulutnya terletak di ujung tengah (*terminal*) dan dapat disembulkan (*protaktif*). Di bagian anterior mulut terdapat dua pasang sungut. Di ujung dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngial teeth*) yang bersusun dari tiga baris gigi geraham. Sisik berukuran relatif besar dan digolongkan ke dalam sisik tipe lingkaran (*sikloid*). Sirip punggung (*dorsal*) berukuran memanjang dan bagian belakangnya berjari keras. Sementara itu, sirip ketiga dan keempat bergerigi. Letak sirip punggung berseberangan dengan permukaan sirip perut (*ventral*). Tipe sirip dubur (*anal*) mirip dengan sirip punggung, berjari keras dan bagian akhirnya bergerigi. Garis rusuk atau gurat

sisi (*linea lateralis*) tergolong lengkap, berada di pertengahan tubuh melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkal ekor (Khairuman, 2008).

Gambar ikan mas disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Ikan Mas (Dokumentasi penelitian, 2014)

### **2.1.2 Habitat dan Penyebaran**

Ikan mas menyukai lingkungan hidup di perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras, misalnya di pinggiran sungai atau danau. Selain itu akan hidup dengan lebih baik didaerah dengan ketinggian 150 – 600 meter di atas permukaan air laut dengan suhu air sekitar  $25^{\circ}$  –  $30^{\circ}$  C. Ikan mas tergolong ikan omnivora, yaitu pemakan berbagai jenis makanan. Makanannya antara lain tumbuhan air dan binatang renik, sedangkan makanan utamanya adalah tumbuhan yang tumbuh di dasar perairan dan di sekitar tepi perairan tempat hidupnya (Rochdianto, 1995).

Menurut Achjar (1986), menyatakan bahwa ikan mas sangat baik sekali untuk pemeliharaan di kolam dan di sawah. Ikan mas dapat hidup di tempat yang tinggi maupun rendah dengan ketinggian optimal antara 200 - 700 m di atas permukaan air laut (dpl). Ikan mas mengkonsumsi pakan alami berupa hewan-hewan kecil seperti cacing-cacing dan berbagai binatang air dengan ukuran kecil.

Akan tetapi, ikan mas juga mengonsumsi jenis pakan lain seperti dedak dan ampas. Keberadaan benih ikan mas juga tidak sulit untuk didapatkan.

### 2.1.3 Kualitas Air

Menurut Lesmana dan Darmawan (2000), ikan membutuhkan air yang berfungsi sebagai media, baik media internal maupun eksternal. Sebagai media internal, fungsi dari air adalah sebagai bahan baku untuk reaksi di dalam tubuh dan pengangkut bahan makanan keseluruhan tubuh. Sedangkan sebagai media eksternal air berfungsi sebagai habitatnya. Oleh karena itu kualitas dan kuantitasnya pun harus dijaga sesuai kebutuhan ikan mengingat pentingnya peran air bagi kehidupan ikan. Kualitas air yang diukur meliputi suhu, *potential of Hydrogen* (pH), dan oksigen terlarut (DO).

#### a. Suhu

Pertumbuhan ikan juga dipengaruhi oleh suhu air, ketersediaan oksigen dalam air, kepadatan populasi (padat tebar), dan ukuran kolam atau wadah pemeliharaan (Swift, 1993). Kualitas air yang sesuai untuk pertumbuhan larva ikan mas menurut Zonneveld *et al.* (1991) adalah suhu air sekitar 20-30<sup>0</sup> C dan pH 6-9. Hal ini sesuai pendapat Khairuman, *et al.* (2008), bahwa suhu yang dibutuhkan untuk kehidupan ikan mas adalah antara 25-30<sup>0</sup>C. Menurut Wardoyo *dalam* Tamanampo (1994) menyatakan bahwa pertumbuhan larva ikan mas pada suhu 30<sup>0</sup> C akan mengalami penurunan 50% dibandingkan dengan suhu 20<sup>0</sup> C.

#### b. *Potential of Hydrogen* (pH)

Model budidaya ikan mas dapat dipelihara dalam Kantong Jaring Apung (KJA), kolam air deras, kolam tanah, kolam beton dan lain-lain tergantung ketersediaan lokasi. Makanan saat membudidayakan ikan mas juga bervariasi mulai dari pemberian pakan alami sampai dengan pemberian pakan buatan. Yang perlu diperhatikan adalah kualitas air pada media untuk budidaya ikan mas

seperti pH air yang harus berada di kisaran 7 - 8, dengan kandungan oksigen terlarut yang cukup dan bebas dari kandungan zat kimia berbahaya (Effendi, 2004). Sesuai dengan pernyataan Kordi (2009), yaitu pH yang sesuai untuk budidaya perairan adalah pada kisaran 6,5 - 9,0.

### c. *Dissolved Oxygen (DO)*

Usaha pembenihan dan pendederan ikan mas dapat juga menggunakan air hujan, air waduk, air sungai, mata air, air irigasi, air permukaan, air sumur terbuka, dan air sumur pantek. Menurut Cahyono (2001), dari bervariasinya sumber air tersebut, air waduk dianggap yang terbaik dikarenakan endapannya cukup sedikit dan kandungan oksigen yang dibutuhkan serta unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan pakan alami cukup tinggi. menurut Irianto (2005) kandungan oksigen terlarut minimum yang dapat diterima sebagian besar spesies ikan untuk hidup dengan baik adalah 3 ppm dan maksimal 7 ppm (Kordi, 2009).

#### 2.1.4 Penyakit pada Ikan Mas (*C. carpio* L.)

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Khusniati (1994), diperoleh hasil bahwa terdapat 5 spesies bakteri yang dapat bersifat patogen pada ikan mas, baik hasil isolasi dan identifikasi dari air kolam maupun dari ikannya yaitu: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *Streptococcus* sp., dan *Flixibacter columnaris*.

Menurut Cahyono (2001), bahwa bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens* dapat menginfeksi ikan yang masih muda dan ikan yang sudah dewasa. Kerugian yang ditimbulkan oleh bakteri ini sangat besar. Hampir semua bagian tubuh ikan dapat terkena penyakit oleh bakteri ini, karena serangannya yang sangat ganas sehingga dapat menyebabkan kematian.

Salah satu bakteri yang dapat membuat ikan mas sakit adalah *P. fluorescens* yang diketahui sebagai penyakit sangat ganas pada ikan mas. Gejala yang timbul akibat penyakit ini adalah pendarahan dan borok pada kulit, serta sirip ekor terkikis (Mulyadi, 2009).

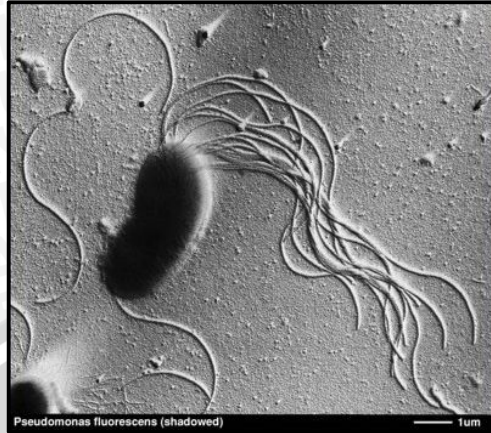
## 2.2 Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi *P. fluorescens* menurut Goto (1992) dalam Ramdan (2010), pengkelasan *P. fluorescens* adalah:

Kingdom	: Prokariota
Divisi	: Gracilutes
Kelas	: Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Penyakit merah tergolong penyakit bakterial, penyebabnya adalah bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens*. Bakteri ini tergolong jenis bakteri gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran sekitar 2-3 mikron meter, dan mempunyai alat berupa flagela yang digunakan untuk bergerak (Cahyono, 2001). Gambar bakteri disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** *P. fluorescens*. Perbesaran 1000x (Google image, 2014).

Karakteristik dari *Pseudomonas* yaitu bersel satu, berbentuk basil, streptobasil, flagel lofotrik yaitu mempunyai lebih dari satu flagel pada salah satu ujungnya, bakteri heterotrof, hidup berkoloni, bersifat oksidatif. Bakteri ini memiliki flagel yg berfungsi sebagai alat pergerakan, kapsul sebagai bahan kental berupa lapisan lendir, berdinding tipis, fili sebagai pintu gerbang masuknya bahan genetik (Qnoze, 2011).

### **2.2.2 Habitat dan Penyebaran**

Bakteri *Pseudomonas* adalah bakteri yang banyak terdapat di lingkungan. Bakteri *P. fluorescens* diketahui terdapat pada beberapa macam makanan antara lain salad, daging, sushi, hamburger, susu pasteurisasi (Franzetti dan Scarpellini, 2007), tanah (Kuarabachew, Assefa dan Hiskias, 2007), air laut (Kim, Kim dan Lee, 2007) maupun air tawar (Irianto, 2005).

Bakteri *Pseudomonas* merupakan salah satu bakteri yang banyak terdapat di perairan. Bakteri *Pseudomonas* sangat kuat dan tahan terhadap kondisi yang sangat dingin, panas hingga kering. Bahkan, terkadang bakteri ini juga tahan terhadap desinfektan. Oleh karena itu, infeksi bakteri *Pseudomonas* berbahaya untuk ikan kecuali ikan dalam kondisi stamina yang kuat dan sehat. Penyakit yang disebabkan oleh *Pseudomonas* dapat terjadi apabila kondisi tubuh

ikan serta pengelolaan air yang kurang baik. Bakteri ini dapat menyebabkan kematian pada ikan. *Pseudomonas* yang menginfeksi ikan dalam jumlah banyak akan mengeluarkan zat racun yang bercampur dalam air yang dapat meracuni ikan (Lesmana, 2003).

### 2.2.3 Pertumbuhan

Menurut Arwiyanto *et.al.* (2007), bahwa semua isolat *P. fluorescens* yang diuji bersifat gram negatif, dapat membentuk enzim katalase, oksidase positif, dan memerlukan oksigen untuk tumbuh (aerob), serta mampu menghidrolisa pati dan arginin, membentuk enzim gelatinase, dapat melakukan denitrifikasi, tidak mengakumulasi *polyhydroxy butirate*. Semua isolat dapat menggunakan glukosa, laktosa, fruktosa, trehalosa, selobiosa, manitol, dan dulcitol sebagai sumber karbon. Semua isolat tumbuh baik pada suhu sekitar 20<sup>0</sup> - 41<sup>0</sup> C dengan pertumbuhan terbaik pada suhu 30<sup>0</sup>C dan pH terbaik untuk pertumbuhan bakteri ini yaitu kisaran 6 - 7.

Pertumbuhan didefinisikan sebagai penambahan jumlah sel atau biomassa yang berurutan dan teratur seiring dengan waktu. Pertumbuhan meliputi jumlah sel, berat kering, kandungan protein, kandungan asam nukleat, dan sebagainya. Bakteri biasanya melakukan pembiakan secara aseksual atau vegetatif. Pembiakan ini berlangsung cepat, jika faktor-faktor luar menguntungkan. Pelaksanaan pembiakan yaitu dengan pembelahan diri atau *divisio*. Jika faktor-faktor luar menguntungkan, maka setelah terjadi pembelahan, sel-sel baru membesar sampai masing-masing menjadi sebesar sel induk.

Bakteri yang diinokulasikan dalam medium yang sesuai dan pada keadaan yang optimum bagi pertumbuhannya, maka terjadi kenaikan jumlah yang sangat tinggi dalam waktu yang relatif pendek. Pada beberapa spesies, populasi (panen sel terbanyak yang dapat diperoleh) tercapai dalam waktu 24 jam, populasinya dapat mencapai 10 sampai 15 milyar sel bakteri per milliliter.



Perbanyakan ini disebabkan oleh pembelahan sel secara aseksual. Fase pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut :

- 1) Fase *lag* adalah fase dimana bakteri beradaptasi dengan lingkungannya dan mulai bertambah sedikit demi sedikit.
- 2) Fase *logaritmik* adalah fase dimana pembiakan bakteri berlangsung paling cepat. Jika ingin mengadakan piaraan yang cepat tumbuh, maka bakteri dalam fase ini baik sekali untuk dijadikan inokulum.
- 3) Fase *stationer* adalah fase dimana jumlah bakteri yang berkembang biak sama dengan jumlah bakteri yang mengalami kematian.
- 4) Fase *autolisis* (kematian) adalah fase dimana jumlah bakteri yang mati semakin banyak, melebihi jumlah bakteri yang berkembang biak.

Fase kematian ditandai dengan cepat berkurangnya koloni dan jumlah bakteri yang mati semakin bertambah. Keadaan ini dapat berlangsung beberapa minggu bergantung pada spesies dan keadaan medium serta faktor-faktor lingkungan. Kalau keadaan ini dibiarkan terus menerus, besar kemungkinan bakteri tidak dapat dihidupkan kembali dalam medium baru. Cara menghitung jumlah bakteri untuk membuat grafik pertumbuhan, yaitu dengan metode penuangan, penghitungan dengan mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer*, dan dengan menggunakan turbidometer (Fauzi, 2009).

#### **2.2.4 Infeksi Bakteri *P. fluorescens* dan Gejalanya**

Bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens* dapat membuat sakit ikan yang masih muda dan ikan yang sudah dewasa. Kerugian yang ditimbulkan oleh serangan bakteri ini sangat besar. Hampir semua bagian tubuh ikan dapat terserang oleh bakteri ini, karena serangannya yang sangat ganas sehingga dapat menyebabkan kematian. Penularannya bisa melalui air, alat-alat budidaya, bagian tubuh ikan yang sudah terinfeksi, melalui perantara hewan lain, dan melalui tumbuhan air. Gejala yang terlihat pada ikan yang telah terinfeksi bakteri

ini adalah ikan berwarna gelap (kusam), nafsu makan berkurang atau bahkan tidak ada nafsu makan, ikan bergerombol di dekat pintu pengeluaran air, terdapat luka pada kulit, sirip dan sisik rusak, pendarahan pada tubuh ikan, perut busung, insang rusak berwarna keputih-putihan hingga kebiru-biruan, ikan melemah, dan timbul luka borok. Faktor-faktor penunjang lainnya adalah kualitas perairan yang buruk, kandungan bahan organik di perairan yang cukup tinggi, dan perubahan musim kering (kemarau) ke musim penghujan (Cahyono, 2001).

### 2.3 Daun Sirsak (*Annona muricata*)

#### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari sirsak menurut Pranitasari (2011), yaitu:

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i>

Tumbuhan ini berbentuk pohon, berwarna coklat tua, batang berkayu (lignosus), silindris, permukaan kasar, percabangan simpodial. Arah tumbuh batang tegak lurus, arah tumbuh cabang ada yang condong ke atas dan ada yang mendatar (Gambar 3 A). Memiliki daun berbentuk jorong (*ovalis* atau *ellipticus*) (Gambar 3 B). Permukaan daun licin (*laevis*) dan mengkilat (*nitidus*), tepi daun rata (*integer*), daging daun tebal dan kaku seperti kulit /

belulang (*coriaceus*). Pangkal daun runcing, daun ujung daun tumpul (*obtusus*) (Pranitasari, 2011).



**Gambar 3.** (A) Pohon sirsak dan (B) Daun sirsak (Dokumentasi penelitian, 2014).

### 2.3.2 Habitat dan Penyebaran

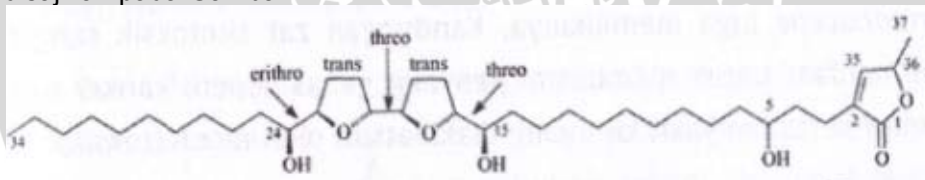
Dewi dan Hermawati (2013), menjelaskan bahwa sirsak termasuk dalam golongan tanaman dengan perawatan yang tidak rumit. Tanaman sirsak cocok tumbuh pada daerah ketinggian 100-1.000 meter di atas permukaan air laut (dpl), bersuhu 220C-280C, curah hujan 1.500-2.000 mm per tahun dengan musim kemarau 4-6 bulan, kelembaban udara 60%-80%, pH tanah dalam rentangan 6-6,5, serta pada kondisi air tanah yang dangkal yaitu kurang dari 150 cm.

Sirsak (*A. muricata* L.) berasal dari wilayah Amerika yang beriklim tropis, terutama Amerika Tengah dan Selatan. Di Indonesia sirsak dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 1000 m diatas permukaan laut. Di setiap daerah, dapat ditemui buah sirsak dengan nama lokal berbeda-beda diantaranya: Sirsak (Indonesia); Nangka Sabrang, Nangka Landa (Jawa); Nangka Walanda Sirsak (Sunda); Nangka buris (Madura); Srikaya jawa (Bali); Deureuyan Belanda (Aceh); Durio Ulondro (Nias); Durian Betawi (Minangkabau); Jambu, Landa (Lampung). Tumbuhan ini banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional di beberapa daerah di Indonesia (Tambunan, 2011).

### 2.3.3 Manfaat Daun Sirsak (*A. muricata*)

Daun sirsak memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan. Hal ini disebabkan adanya kandungan senyawa acetogenin (senyawa anti kanker) yang dapat menghambat dan merusak produksi energi *Adenosina Trifosfat* (ATP) oleh mitokondria. Energi ATP yang diproduksi oleh mitokondria mampu membuat sel-sel kanker berkembang biak dengan cepat. Beberapa manfaat daun sirsak bagi kesehatan, antara lain: mengobati kanker, mengurangi nyeri rematik, mampu menghambat pertumbuhan bakteri, membantu menghambat terjadinya mutasi gen, membantu menghambat perkembangan virus, membantu menghambat pertumbuhan parasit, membantu menghambat pertumbuhan tumor, membantu merelaksasi otot - otot, membantu meredakan nyeri, mampu menekan peradangan, menurunkan kadar gula darah, menurunkan demam, menurunkan darah tinggi (hipertensi dan menyehatkan jantung) (Dewi dan Hermawati, 2013).

Struktur kimia *acetogenin* (Dewi dan Hermawati, 2013) pada daun sirsak disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur Kimia *Acetogenin* pada Daun Sirsak

Penelitian lainnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas sebagai antibakteri, di antaranya terhadap *Klebsiella pneumonia* (gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (gram positif) (Prachi, 2010 dalam Wijaya, 2011).

### 2.3.4 Bioaktif Daun Sirsak (*A. muricata*)

Kandungan dalam daun sirsak diantaranya adalah steroid, glikosida jantung, dan tanin (Prachi, 2010 dalam Wijaya, 2011). Penelitian senyawa kimia dan farmakologi pada *Annonaceae* mengandung alkaloid, asam amino,

karbohidrat, protein, lemak, polifenol (termasuk didalamnya flavonoid), minyak esensial, terpen, dan senyawa aromatic (Vega *et al.*, 2007 dalam Wijaya, 2011). Flavonoid memiliki banyak aktivitas biologi diantaranya antimikroba, antikanker, *antiulcer*, esterogenik (Sujati, Soedarmanto, Hermawan, Danang, 2007).

Kandungan bahan kimia yang terkandung dalam sirsak menurut Mangan (2009) adalah saponin, flavonoid, tanin, kalsium, fosfor, hidrat arang, vitamin (A, B, dan C), fitosterol, Ca-oksalat dan alkaloid murisine. Salah satu kandungan kimia sirsak yang berperan penting untuk obat adalah flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder dan keberadaannya pada daun tanaman dipengaruhi oleh proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa bahan alam dari golongan fenolik (Markham, 1988 dalam Sjahid, 2008). Dalam kebanyakan kasus, flavonoid dapat berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi organisme seperti bakteri atau virus (Subroto dan Saputro, 2006).

#### 2.4 Insang

Sistem pernapasan pada ikan yaitu menggunakan insang. Sebagian besar insang pada ikan dilindungi oleh operkulum yang dapat menyaring air yang masuk melalui mulut sehingga zat-zat yang berbahaya dapat dihindarkan. Ikan mengambil oksigen terlarut dalam air dengan cara menyaring air yang masuk melalui mulut dan mengambil oksigen yang terlarut dalam air menggunakan insang dan juga menggunakan tulang atau struktur aksesoris pernapasan (Pough, Jans, Heiser, 2005). Gambar insang ikan mas disajikan pada Gambar 5.

Insang ikan merupakan organ respirasi utama yang bekerja dengan mekanisme difusi permukaan dari gas-gas respirasi (oksigen dan karbondioksida) antara darah dan air. Oksigen yang terlarut dalam air akan diabsorpsi ke dalam kapiler-kapiler insang dan difiksasi oleh hemoglobin untuk

selanjutnya didistribusikan ke seluruh tubuh. Sedangkan karbondioksida dikeluarkan dari sel dan jaringan untuk dilepaskan ke air di sekitar insang (Brown, 1962; Rastogi, 2007). Oleh sebab itu, apapun perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan perairan akan secara langsung dan tidak langsung berdampak kepada struktur dan fungsi insang (Saputra, Marusin, Santoso, 2013).

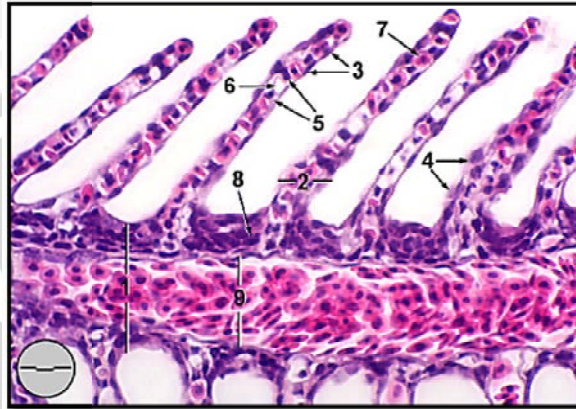
Pada umumnya dalam insang ikan yang bertulang belakang sejati terdapat empat pasang lengkung insang, serta lima sampai tujuh pasang lengkung insang pada *Chondrichthyes*. Pada lengkung insang bagian depan terdapat tapis insang dan di bagian belakang terdapat filamen insang. Selain untuk bernafas, tapis insang juga dapat melindungi filamen insang yang lembut dari kikisan material yang masuk, serta dapat menghalangi material yang dimakan keluar melalui insang (Rahardjo, 2011).



**Gambar 5.** Insang Ikan (Dokumentasi penelitian, 2014).

Insang merupakan komponen penting dalam pertukaran gas. Insang terbentuk dari lengkungan tulang rawan yang mengeras, dengan beberapa filamen insang didalamnya. Setiap filamen insang terdiri atas banyak lamella yang merupakan tempat pertukaran gas. Tugas ini juga ditunjang oleh struktur lamella yang tersusun dari sel-sel tiang sebagai penyangga pada bagian dalam.

Pinggiran lamella yang tidak menempel pada lengkung insang sangat tipis, ditutupi oleh epitelium serta mengandung jaringan pembuluh darah kapiler (Fujaya, 2004). Untuk lebih jelasnya tentang gambar lamella disajikan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Lamella. Dua lamella sekunder brankialis yang berdampingan pada suatu filamen brankialis. (1) lamella primer (filamen brankialis), (2) lamella sekunder brankialis, (3) sel-sel epitel, (4) sel mukus, (5) sel pilaster sel-sel asam, (6) rongga kapiler (lakuna), (7) eritrosit dalam kapiler darah, (8) sel-sel basal. (Yonkos *et al.*, 2000).

Beberapa kerusakan jaringan insang ikan mas yang disebabkan oleh infeksi bakteri, diantaranya yaitu:

#### 2.4.1 Edema

Menurut Saputra *et al.* (2013), lapisan epitel insang yang tipis dan berhubungan langsung dengan lingkungan luar menyebabkan insang berpeluang besar terpapar oleh bahan pencemar yang ada di perairan. Kerusakan sekecil apapun dapat menyebabkan terganggunya fungsi insang sebagai pengatur osmose dan kesulitan bernafas. Pembendungan aliran darah (disebabkan trauma fisik, zat pencemar ataupun gangguan sistem sirkulasi) pada lamela akan menyebabkan edema (pembengkakan sel) di sekitar pembuluh darah yang terlihat dari perluasan jaringan antara pembuluh darah dengan lapisan epitel

lamela primer. Hoole *et al.* (2001), menyatakan bahwa pembendungan dan edema akan mengurangi efisiensi difusi gas dan dapat berakibat fatal seperti kematian. Difusi gas terganggu karena luas permukaan serap pada lamela sekunder insang menyempit.

Selain itu, edema juga disebabkan oleh infiltrasi bakteri ke dalam insang yang mengakibatkan sel bersifat iritatif sehingga sel membengkak. Akibatnya adalah perubahan morfologis yang disebut dengan edema atau pembengkakan sel. Edema yang berlanjut mengakibatkan sel-sel epitel mengalami nekrosis atau kematian sel (Angka, 1990 *dalam* Sukarni, Maftuch, Nursyam, 2012).

#### **2.4.2 Nekrosis**

Nekrosis ialah matinya lebih dari satu sel atau bagian dari jaringan dan organ yang terjadi karena penyakit dengan kerusakan yang tidak dapat diperbaiki (Panigoro *et al.*, 2007).

Nekrosis ditandai dengan bentuk intinya yang mengecil (piknotik), membesar, kabur atau hilang (karyolisis). Nekrosis juga dikenali dari hilangnya sitoplasma sehingga tidak menyerap zat warna HE yang diberikan dalam proses pembuatan preparat histologi (Sukarni *et al.*, 2012).

#### **2.4.3 Fusi**

Proliferasi sel kloride bertujuan untuk mengoptimalkan kapasitas transport  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cl}^-$ , namun proliferasi ini menyebabkan ruang antar lamela sekunder penuh dengan sel-sel baru dan memicu terjadinya perlekatan kedua sisi lamela sekunder, yang disebut fusi lamela (FL) (Robert, (1989); Perry, (1997); dan Lawler (2005)). Fusi lamela terjadi akibat peningkatan patologi hiperplasia secara terus-menerus dan menyebabkan terisinya ruang antar lamela sekunder oleh sel-sel baru yang kemudian memicu terjadinya perlekatan pada kedua sisi lamella. Kejadian ini juga didukung oleh Benli dan Ozkul (2008), bahwa kejadian fusi



lamela merupakan level kerusakan berat karena fusi lamela merupakan tahap lanjutan dari kerusakan hiperplasia.

Pada kerusakan fusi lamela nampak adanya perlekatan antar lamela sekunder insang, sehingga menyebabkan luas permukaan insang untuk melakukan proses respirasi (*respiratory area*) berkurang. Apabila suplai O<sub>2</sub> dan nutrien untuk sel-sel insang berkurang, maka akan menyebabkan berkurangnya ATP. Apabila hal ini terus terjadi, maka dapat mengakibatkan terjadinya kematian ikan (Robert, (1989); Susilowati (2005); dan Kumar (2007)).



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Meteri Penelitian

##### 3.1.1 Alat-alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya yaitu (Lampiran 1).

- 
- Aerator dan Batu Aerasi
  - Akuarium
  - *Autoclave*
  - Bak
  - *Beaker Glass*
  - Blender
  - Botol Film
  - Bunsen
  - Cawan Petri
  - Cetakan Es
  - Corong
  - *Cover Glass*
  - DO Meter
  - Fotomikroskop
  - Gelas Ukur
  - Gunting
  - *Hot Plate*
  - Jarum Ose
  - Labu Erlenmeyer
  - Lemari Pendingin
  - Mikropipet
  - Mikroskop
  - *Mikrotom rotary*
  - *Rotary evaporator*
  - Mistar
  - Nampan
  - *Objek Glass*
  - Oven
  - pH Meter
  - Pinset
  - Pipet tetes
  - Pisau Mikrotom
  - Rak Tabung Reaksi
  - *Scoop Net*
  - *Sectio set*
  - Selang Aerator
  - Termometer
  - *Tissue Floath Bath*
  - *Tissue Proccesor*
  - Wadah *embedding*

- *Waterbaht*
- Spatula
- Tabung Reaksi
- Timbangan digital
- Vortex
- *Embedding Machine*

### 3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Aceton
- Air media
- Akuades
- Alkohol 96%
- Bakteri *P. fluorescens* kepadatan  $10^7$
- Entellan (lem) / *cannada balsem*
- Formalin 10%
- Eosin
- Gelatin
- Hematoksilin
- Ikan mas (*C. carpio* L.)
- Litium karbonat
- Pakan ikan
- Parafin blok
- Parafin cair
- *Xylo*
- Alkohol
- Media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA)
- Natrium Fisiologis (NaFis)
- Akuades
- Aluminium foil
- Aseton 96%
- Benang
- Ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*)
- Etanol 80%
- Etanol 96%
- TSB
- Kertas cakram
- Kapas
- Kertas label
- Kertas koran
- Kertas saring
- Spirtus
- Masker
- *Tissue*
- Sarung tangan

### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, yaitu untuk menyelidiki kemungkinan hubungan dan membandingkan hasilnya dengan kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Nazir, 1988).

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

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Alasan menggunakan rancangan ini karena ikan yang digunakan relative homogen sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanya dari perlakuan. Sesuai dengan pernyataan menurut Nazir (2009), bahwa bila bahan atau lingkungan percobaan dianggap homogen, maka digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Model umum Rancangan Acak Lengkap menurut Murdiyanto (2005) adalah sebagai berikut :

$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Keterangan :

Y = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan dan ulangan

$\mu$  = nilai rerata harapan (*mean*)

$\tau$  = pengaruh faktor perlakuan

$\varepsilon$  = pengaruh galat

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) sebagai obat dengan dosis 0

ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm. Sedangkan untuk kontrol pembanding digunakan 1 kontrol yaitu kontrol negatif / ikan sehat sebagai perlakuan sampel tanpa diinfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 15 sampel. Dalam penelitian ini digunakan ikan mas (*C. carpio* L.) yang berukuran panjang 7-12 cm. Rancangan perlakuan yang digunakan disajikan pada Tabel 1 berikut :

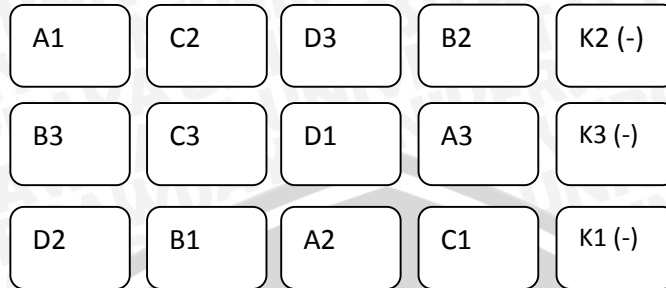
**Tabel 1.** Rancangan Perlakuan

Perlakuan	Dosis (ppm)	Ulangan		
		1	2	3
A	0	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
B	50	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
C	100	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
D	150	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>
K (-)	-	K(-) <sub>1</sub>	K(-) <sub>2</sub>	K(-) <sub>3</sub>

Keterangan:

- A : Perlakuan penginfeksian bakteri *P. fluorescens* dan perendaman dengan dosis 0 ppm ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) pada ulangan ke-n.
- B : Perlakuan penginfeksian bakteri *P. fluorescens* dan perendaman dengan dosis 50 ppm ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) pada ulangan ke-n.
- C : Perlakuan penginfeksian bakteri *P. fluorescens* dan perendaman dengan dosis 100 ppm ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) pada ulangan ke-n.
- D : Perlakuan penginfeksian bakteri *P. fluorescens* dan perendaman dengan dosis 150 ppm ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) pada ulangan ke-n.
- K(-): Sampel sebagai kontrol negatif atau tanpa diinfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) pada ulangan ke-n.

Untuk denah penelitian disajikan pada Gambar 7 dibawah ini.



**Gambar 7.** Denah penelitian

Keterangan:

A-B-C-D : perlakuan

K(-) : kontrol negatif

1,2,3 : ulangan

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan pada penelitian ini dapat dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu:

- Alat dan bahan yang digunakan dicuci bersih dengan sabun cuci, dikeringkan dan dibungkus koran serta diikat menggunakan benang.
- Menuangkan air secukupnya ke dalam *autoclave* hingga pemanas terendam, kemudian alat dan bahan yang telah dibungkus tadi dimasukkan ke dalam *autoclave* lalu ditutup *autoclave* dengan posisi simetris.
- Pemanas dinyalakan sampai suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm, ditunggu sampai 15 - 20 menit dengan cara membuka dan atau menutup klep uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.

- Kompokor dimatikan dan ditunggu sampai termometer serta manometer menunjukkan angka 0 (nol), setelah itu buka klep uap lalu dilanjutkan membuka penutup *autoclave* dengan cara simetris pula.
- Dilakukan pengambilan alat dan bahan yang telah disterilisasi.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.4.2 Sterilisasi Media Penelitian

Sterilisasi media penelitian perlu dilakukan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dari bakteri lain. Pengaseptisan tangan laboran, meja dan barang disekitar tempat perlakuan diperlukan pula untuk menghindari kontaminasi. Selain itu sebelum melakukan penelitian maka tangan laboran harus memakai sarung tangan dan diperlukan pula masker untuk menutup mulut laboran agar tidak terjadi kontaminasi bakteri lain. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol.

### 3.4.3 Perlakuan Menggunakan Ekstrak *A. muricata*

Daun sirsak diperoleh dengan cara dipisahkan antara daun muda dengan daun tua. Daun sirsak ini didapatkan ditaman kecil didepan SMPN 18 Malang. Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) dalam bentuk serbuk menurut Dewi dan Hermawati (2013), yaitu sebagai berikut. Memilah daun sirsak dengan kematangan yang sedang yaitu tidak terlalu muda atau terlalu tua, lalu dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah itu, daun diangin-anginkan agar kering atau dapat dioven dengan kurun waktu 30 menit dengan suhu 60<sup>0</sup> C. Hasilnya berupa daun kering yang siap untuk diblender dan diayak agar didapatkan serbuk. Serbuk yang dihasilkan dapat disimpan agar sewaktu-waktu dapat digunakan ditempat yang kering. Tahapan pembuatan serbuk daun sirsak adalah sebagai berikut:

- Daun sirsak dipisah antara daun muda dan daun tua
- Dicuci hingga bersih dengan menggunakan air mengalir
- Daun diangin-anginkan sampai kering
- Dioven selama 30 menit dengan suhu 60<sup>o</sup> C.
- Setelah itu daun kering diblender
- Setelah diblender, serbuk kasar diayak agar didapatkan serbuk halus
- Selanjutnya serbuk siap digunakan

Setelah didapatkan serbuk daun sirsak, untuk mendapatkan ekstrak kasar daun sirsak menurut Santoso, Nurdiana, Sutanti (2013), yaitu serbuk daun sirsak ditimbang lalu dilarutkan kedalam rendaman etanol 96%. Kemudian rendaman dibiarkan semalaman sampai mengendap. Saring dengan kertas saring hingga didapatkan ekstrak, dilanjutkan dengan memekatkan ekstrak yang diperoleh kedalam evaporator hingga didapatkan ekstrak murni.

#### 3.4.4 Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri *P. fluorescens* diperoleh dari Balai Besar Air Payau (BBAP) Jepara yang kemudian dikultur pada media padat dan media cair. Media padat yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *P. fluorescens* yaitu *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan ditambahkan gliserol. Media cair yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *P. fluorescens* yaitu *Tryptone Soya Broth* (TSB). Komposisi media PSA yaitu *Pepton from Casein* 10 gram, *Peptone from Meat* 10 gram,  $MgSO_4$  1,5 gram,  $K_2HPO_4$  1,5 gram, *Glyserol*, *Agar*, *Aquadest*. Sedangkan komposisi TSB yaitu *Pancreatic digest of casein* 17.0 g/l, *Papaic digest of soybeanmeal* 3.0 g/l, *Dibasic potassium phosphate* 2.5 g/l, *Sodium chloride* 5.0 g/l, *Glucose* 2.5 g/l (Kartika, 2009). Menurut Lay (1994), peremajaan dilakukan dengan cara sebagai berikut.



- Ditimbang PSA dan dilarutkan dalam aquades steril dengan dosis yang tepat, selanjutnya diletakkan pada *hotplate*
- Setelah mendidih diletakkan pada tabung reaksi dan selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklav
- Setelah disterilisasi, didinginkan dengan cara dimiringkan dan ditunggu hingga dingin
- Bakteri selanjutnya dikultur pada media PSA

#### 3.4.5 Kultur Bakteri *P. Fluorescens*

Menurut Kartika (2009), bakteri *P. fluorescens* dikultur pada media TSB dengan cara:

- Ditimbang TSB dengan dosis tertentu dan disiapkan aquadest steril
- Dihomogenkan dan selanjutnya diletakkan pada *hotplate*
- Setelah mendidih, disterilkan dan diletakkan di autoklav
- Kemudian diambil bakteri *P. fluorescens* 1 ose dan diletakkan pada media TSB.

#### 3.4.6 Persiapan Alat

- Pencucian akuarium dan bak
- Persiapan alat-alat pendukung (aerasi, termometer, timbangan, seser dan lain-lain)
- Pengisian air pada akuarium

#### 3.4.7 Persiapan Hewan Uji

- Masing-masing bak diisi air sebanyak 10 liter
- Sebelum ikan mas dimasukkan dalam akuarium terlebih dahulu dipasang aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut
- Masing-masing akuarium diberi 10 ekor ikan mas

### 3.4.8 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Penginfeksian Bakteri *P. fluorescens*.

Penginfeksian dilakukan sebelum perlakuan pemberian ekstrak kasar daun sirsak. Penginfeksian menggunakan bakteri *P. fluorescens* dengan menggunakan metode perendaman dimana ikan mas direndam dalam akuarium yang sudah berisi bakteri *P. fluorescens* selama 24 jam dengan kepadatan bakteri  $10^7$  sel/ml. Kemudian setelah diinfeksi, ikan dipindahkan pada akuarium yang berisi air biasa, diamati gejala klinis selama 24 jam dan selanjutnya dilakukan pengobatan menggunakan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*).

#### b. Perlakuan Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak

Ikan mas (*C. carpio* L.) dengan ukuran panjang 7-12 cm / ekor yang sudah terinfeksi bakteri *P. fluorescens* kemudian diangkat dan dimasukkan kembali ke dalam akuarium yang sudah ditambahkan ekstrak *A. muricata* dengan dosis selama 4 jam (sesuai hasil penelitian pendahuluan). Pada perlakuan ini digunakan 1 kontrol negatif, yaitu ikan mas sehat tanpa penginfeksian dan tanpa perendaman *A. muricata*. Setelah 4 jam, ikan mas diangkat dari akuarium perendaman dan dipindahkan ke dalam akuarium pemeliharaan yang berbeda-beda yang telah disiapkan dan diaerasi terlebih dahulu. Lama pemeliharaan ikan mas yaitu selama 14 hari.

#### c. Pembuatan Histopatologi Insang Ikan mas

Tahap berikutnya adalah pengamatan histopatologi ikan, yaitu organ dalam berupa insang diambil dan diletakkan ke dalam botol film yang sudah berisi larutan formalin 10%. Kemudian dilakukan pembuatan preparat histopatologi. Pembuatan preparat histopatologi terdiri dari proses *dehidrasi*, *clearing*, *infiltrasi*, *embedding*, *sectioning*, *afixing*, *deparafinasi*, *staining*, *mounting* (penutupan) dan labelling (pemberian label).

- **Proses Dehidrasi**

*Dehidrasi* dilakukan dengan memasukkan organ insang tersebut ke dalam alkohol 70% (5 x masing-masing 30 menit), 80% (4 x masing-masing 30 menit), 90% (3 x masing-masing 30 menit), dan 96% (2 x masing-masing 30 menit), absolut (1 x masing-masing 30 menit).

- **Proses Clearing**

*Clearing* atau dealkoholisasi (pembersihan) dilakukan dengan memasukkan organ insang tersebut ke dalam toluol (parafin) sampai jernih atau transparan selama 30 menit.

- **Proses Infiltrasi**

*Infiltrasi* ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C. Sebelum masuk ke paraffin murni, Jaringan dimasukkan ke dalam toluol paraffin 1:1. Setelah itu berturut-turut dimasukkan ke dalam paraffin murni I, II, dan III masing-masing selama 1 jam.

- **Proses Embedding**

*Embedding*, jaringan dari paraffin III ditanamkan ke dalam kotak karton yang telah berisi paraffin cair. Jaringan diletakkan pada bagian dasar tengah dengan posisi melintang.

- **Proses Sectioning**

*Sectioning* (pemotongan) dilakukan dengan memasang holder di mikrotom, kemudian mengatur ketebalan irisan sebesar 6 mikron pada mikrotom. Lalu mulai mengiris dengan cara memutar pengait mirotome. Pemotongan untuk pengamatan histopatologi insang menurut Takasima *et.al.* (1995), dilakukan sejajar dengan permukaan insang.

- **Proses Afixing**

*Afixing* (penyematan), perekatan dengan menggunakan albumin dan gliserin dengan perbandingan 1:1, disimpan dalam kotak sediaan kira-kira 1 hari.

- **Proses Deparafinasi**

*Deparafinasi*, untuk menghilangkan parafin, sediaan histologis dimasukkan ke dalam xylol I dan II masing-masing 15 menit.

- **Proses Staining**

*Staining* (pewarnaan) dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin hematoksilin. Setelah deparafinasi sediaan histologis dihisap xylitolnya dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, dan aquades. Dimasukkan ke hematoxylin kira-kira 3-7 detik, lalu dicuci dengan air mengalir selama 10 menit, dicuci dengan aquadest lalu dicelupkan ke alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% beberapa celupan. Dimasukkan ke dalam eosin 0,2% selama 1-3 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 96% dan absolut. Lalu dikeringkan dengan kertas saring. Dimasukkan xylol selama 10 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam.

- **Proses Mounting (Penutupan) dan Labelling (Pemberian Label)**

*Mounting* (Penutupan) dan *Labelling* (Pemberian Label) yaitu penutupan preparat dengan menggunakan kaca penutup dan member identitas pada preparat (label), kemudian disimpan dalam kotak sediaan.

### 3.5 Parameter Uji

#### 3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama dari penelitian ini yaitu pengamatan histologi ikan mas (*C. carpio* L.). Pengamatan ini dilakukan guna melihat gambaran antara organ

insang pada ikan kontrol dan ikan uji setelah diinfeksi selang waktu pemeliharaan 14 hari.

### 3.5.2 Parameter Penunjang

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

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

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisis data 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 Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan histopatologi insang, digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik (Lampiran 2).

Untuk mengetahui hasil uji histopatologi insang pada ikan mas (*C. carpio* L.) dapat dilakukan dengan cara menganalisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan pada jaringan otot ikan mas yang telah diberi imunostimulan maka dapat dilakukan analisis statistik dengan cara pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif. Menurut Kakkilaya (2002), bahwa untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan

menghitung persentasenya. Pembacaan scoring 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) disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zigzag) (Siswandari, 2005).

Persentase kerusakan (Tabel 2) 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.

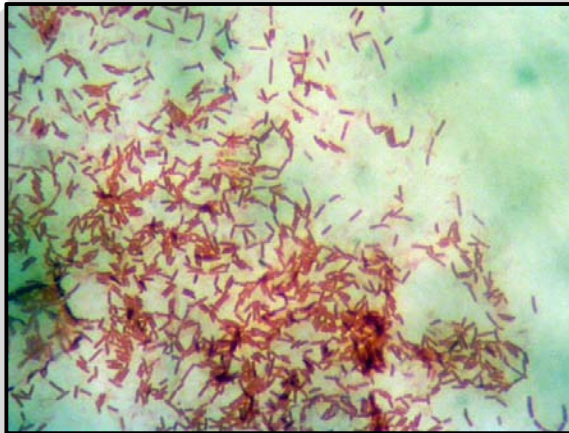
## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Parameter Utama

#### 4.1.1 Uji Pendahuluan

##### a. Bakteri *P. fluorescens*

Ikan mas (*C. carpio* L.) diuji tantang dengan menggunakan bakteri *P. fluorescens* (Gambar 9) dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml. Biakan bakteri *P. fluorescens* yang telah diinkubasi selama 24 jam, misalkan dihasilkan kepadatan bakteri  $10^8$  sel/ml lalu dicocokkan dengan larutan Mc Farland  $10^8$  sel/ml.



**Gambar 9.** Bakteri *P. fluorescens*. Perbesaran 400x. (Dokumentasi penelitian, 2014).

Pengenceran biakan bakteri sebanyak 1 ml dengan kepadatan  $10^8$  sel/ml menjadi  $10^7$  sel/ml dengan rumus pengenceran:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:

$V_1$  = volume bakteri yang dibutuhkan

$N_1$  = kepadatan biakan bakteri awal

$V_2$  = volume air akuarium yang digunakan

$N_2$  = kepadatan bakteri yang diinginkan

Untuk mengetahui kepadatan bakteri dapat dilakukan dengan cara uji Mc Farland yaitu dengan Standar Mc Farland pada Tabel 3 sebagai berikut:

**Tabel 3.** Standar Mc Farland

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl <sub>2</sub> (ml) 1%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml) 1%	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Kepadatan E.Coli(x10 <sup>8</sup> )	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

#### b. Penentuan Pelarut yang Terbaik

Pada uji pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui pelarut terbaik untuk maserasi, diujicoba dengan menggunakan macam-macam pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Pelarut yang digunakan tersebut adalah perasan, akuades dan etanol 96%.

Pada proses maserasi dengan menggunakan perasan, akuades dan etanol 96% didapatkan hasil ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*). Uji daya hambat dilakukan untuk mengetahui diameter daya hambat bakteri pada kertas cakram yang dihasilkan saat diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*). Pengukuran dilakukan selama 2x24 jam, yang bertujuan untuk mengantisipasi belum tumbuhnya zona hambat pada 24 jam pertama. Hasil pengukuran daya hambat oleh kertas cakram dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini.

**Tabel 4.** Hasil Uji Daya Hambat pada Bakteri *P. fluorescens* dengan Menggunakan Perasan, Akuades dan Etanol 96%

Uji Daya Hambat	Perasan	Akuades	Etanol 96%
Diameter Zona Bening Kertas Cakram (cm)	0,6	0,6	0,9

Dari hasil uji daya hambat tersebut, diketahui bahwa etanol 96% adalah pelarut terbaik yang dapat digunakan untuk maserasi daun sirsak (*A. muricata*).

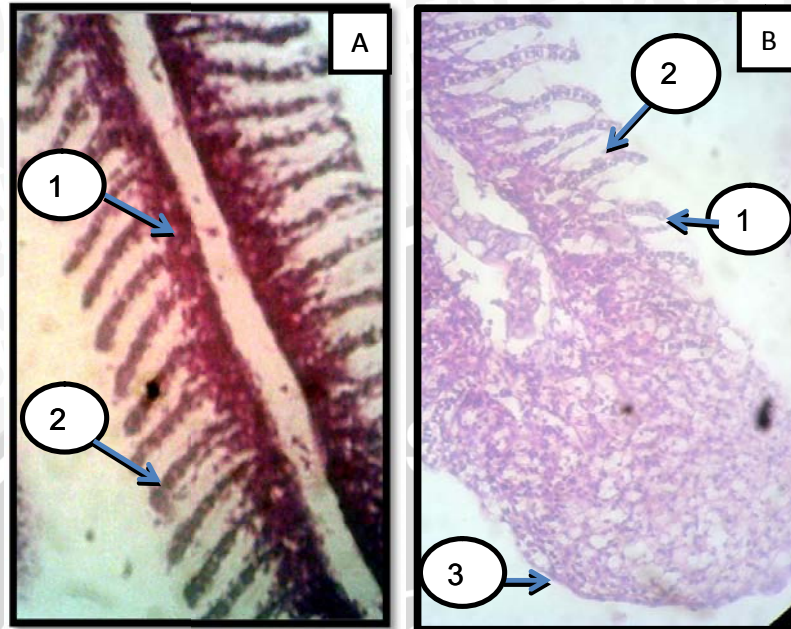


### c. Penentuan Dosis Perendaman Ikan Mas Menggunakan Ekstrak kasar Daun Sirsak (*A. muricata*)

Sebelum melakukan penelitian inti, harus diketahui range dosis yang akan digunakan sebelumnya. Oleh karena itu dilakukan penelitian pendahuluan sehingga didapatkan dari dosis yang terendah hingga dosis yang tertinggi. Dosis yang disarankan adalah 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, dan 150 ppm. Kemudian ikan-ikan uji dimasukkan kedalam media perendaman sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Selanjutnya, dilihat perubahan yang terjadi.

#### 4.1.2 Gambaran Histologi Insang Ikan Mas Sehat

Insang merupakan organ yang sangat vital serta memiliki peran yang sangat penting bagi kehidupan ikan yaitu sebagai alat pernafasan. Komponen insang ikan terdiri dari beberapa filamen atau lamela primer dan lamela sekunder. Di tengah lamela primer terdapat adanya tulang atau plat-plat kartilago yang dapat mendukung struktur lamela. Diantara struktur pendukung juga terdapat lapisan jaringan ikat yang berisi sel-sel eosinofilik dan pembuluh darah. Lamela primer merupakan tempat untuk menyuplai darah dari dan ke lengkungan insang yang didalamnya terdapat limfosit dan granul eosinofilik (EGCs) (Ersa, 2008). Histologi insang ikan normal dan histopatologi insang ikan terinfeksi bakteri dari hasil penelitian disajikan pada Gambar 10.



**Gambar 10.** (A) Histologi Insang Normal, Tanda Panah No A1. Lamella Primer; A2. Lamella Sekunder. (B) Histologi Insang Terinfeksi Bakteri. Tanda Panah No B1. Edema; B2. Nekrosis ; B3. Fusi. Perbesaran 400x dan zoom camera 2x.

Pada Gambar 10 (A), kondisi ikan mas normal memperlihatkan bentuk histologi insang normal, dengan penampakan lamella sekunder jelas dan teratur, permukaan lamella dilapisi oleh sel epitelium. Pembuluh darah kapiler dipisahkan oleh sel pilar. Diantara interlamella terdapat sel-sel basal yang berada pada bagian basal. Pada bagian tengah lamella primer terdapat pembuluh kapiler yang bercabang ke lamella sekunder, di dalam kapiler darah banyak terdapat sel eritrosit (Setyowati *et al.*, 2010). Lamella tersusun dari sel-sel epidermis tipis dan sel-sel pendukung yang berbentuk batang biasa disebut sel tiang (*pillar sel*) yang mendukung aliran darah ke insang (Irianto, 2005).

Hal ini berbanding terbalik dengan Gambar 10 (B), yakni insang yang terinfeksi bakteri terlihat mengalami kerusakan. Hal ini terlihat dari jaringan insang yang mengalami edema, nekrosis dan fusi sehingga mempersulit proses pernapasan yang akhirnya dapat menyebabkan kematian pada ikan.

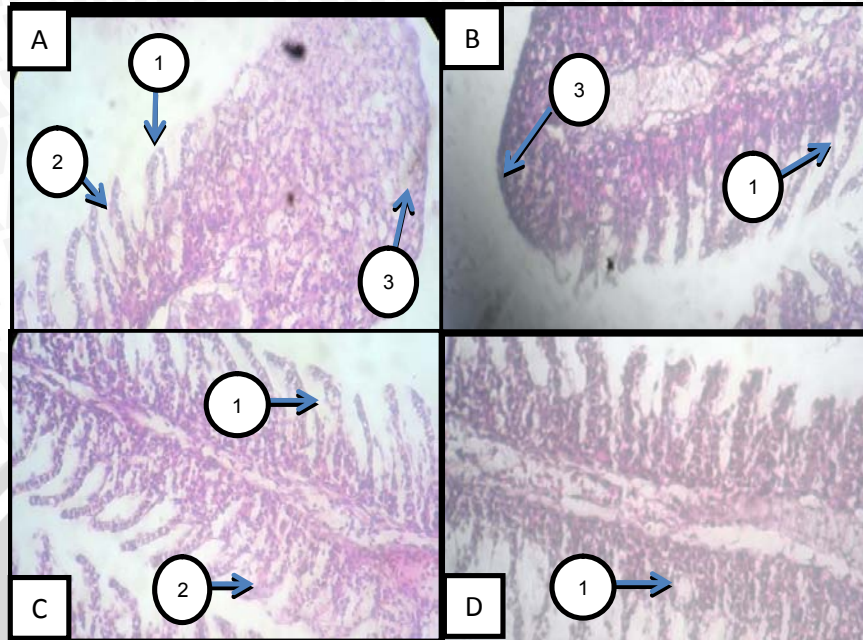
Edema (nomor 1) yang terdapat pada gambar diatas disebabkan oleh infiltrasi bakteri ke dalam insang yang mengakibatkan sel bersifat iritatif sehingga sel membengkak. Akibatnya adalah perubahan morfologis yang disebut dengan edema atau pembengkakan sel. Edema yang berlanjut mengakibatkan sel-sel epitel mengalami nekrosis atau kematian sel (Angka, 1990).

Nekrosis (nomor 2) ditandai dengan bentuk intinya yang mengecil (piknotik), membesar, kabur atau hilang (karyolisis). Nekrosis juga dikenali dari hilangnya sitoplasma sehingga tidak menyerap zat warna HE yang diberikan dalam proses pembuatan preparat histologi (Sukarni *et al.*, 2012).

Fusi (nomor 3) terlihat adanya pembengkakan pada sel-sel insang (edema). Terjadinya fusi lamella sekunder mengakibatkan fungsi lamella sekunder terganggu dalam hal proses pengambilan oksigen. Oleh karena itu, lamela sekunder menyatu sehingga struktur lamela sekunder secara keseluruhan nampak seperti “daun” (Sukarni *et al.*, 2012).

#### **4.1.3 Gambaran Histopatologi Insang Ikan Yang Diberi Perlakuan**

Berdasarkan hasil penelitian, pada ikan yang terinfeksi bakteri *P. fluorescens* dan dilakukan perendaman dengan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*), menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap perbedaan tingkat pemulihan yang terjadi pada jaringan insang. Untuk lebih jelasnya morfologi jaringan insang ikan disajikan pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Struktural Jaringan Histopatologi Insang Ikan Mas yang Telah Diberi Perlakuan (A). Dosis 0 ppm, (B). Dosis 50 ppm, (C). Dosis 100 ppm dan (D). Dosis 150 ppm. (1). Edema, (2). Nekrosis dan (3). Fusi. Perbesaran mikroskop 400x.

Berdasarkan Gambar 10 perlakuan A, B, C dan D dengan dosis ekstrak berturut-turut adalah 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 150 ppm, rata-rata mengalami kerusakan jaringan yang berbeda, yakni pada Gambar 11 (A) terdapat kerusakan edema, nekrosis dan fusi; pada Gambar 11 (B) terdapat kerusakan edema dan fusi; pada Gambar 11 (C) terdapat kerusakan edema dan nekrosis; sedangkan pada Gambar 11 (D) terdapat kerusakan edema. Persentase kerusakan jaringan insang dengan penambahan dosis ekstrak kasar daun sirsak yang berbeda dapat ditunjukkan melalui nilai skoring pada tabel (Lampiran 3).

Analisis data kerusakan pada histopatologi jaringan insang yang terinfeksi bakteri *P. fluorescens* dan dengan perendaman ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) adalah sebagai berikut :

### a. Edema

Perlakuan yang dilakukan selama penelitian pada ikan mas yang diinfeksi oleh bakteri *P. fluorescens* dengan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) memberikan hasil rata-rata yang berbeda pada histopatologi insang ikan mas yang disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5** . Rerata Skoring Hasil Penelitian Kerusakan Edema Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD ( $\pm$ )
	1	2	3			
A	3.2	3.0	3.4	9.6	3.20	0.20
B	2.6	2.8	2.6	8.0	2.67	0.12
C	2.0	1.8	1.8	5.6	1.87	0.12
D	1.2	1.4	1.2	3.8	1.27	0.12
K (-)	1.2	1.0	1.0	3.2	1.07	0.12
Total	10.2	10	10	30.2	10.07	0.68

Berdasarkan Tabel 5 di atas, dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan edema pada jaringan insang ikan mas yang terendah diperoleh pada perlakuan D (150 ppm), hal tersebut diduga karena dosis ekstrak kasar daun sirsak yang diberikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga mengurangi infeksi yang ditimbulkan dan ikan mas mampu memperbaiki jaringannya. Pelczar dan Reid (1979) dalam Poeloengan *et al.*, (2006), menambahkan bahwa mekanisme penghambatan mikroba oleh fenol meliputi: (1) merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis atau menghambat proses pembentukan dinding sel pada sel yang sedang tumbuh; (2) mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel; (3) mendenaturasi protein sel; (4) merusak sistem metabolisme di dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler. Aktivitas senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun sirsak terbukti mampu menghambat dan menyembuhkan infeksi bakteri *P.fluorescens* pada ikan mas. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak

kasar daun sirsak (*A. muricata*) terhadap kerusakan edema pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Sidik Ragam skoring Edema Insang Ikan Mas

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	6.57	2.19	109.500**	4.07	7.59
Acak	8	0.16	0.02			
Total	11	6.73				

Keterangan \*\*: Berbeda Sangat Nyata

Pada Tabel 6 menunjukkan bahwa hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan edema pada histopatologi insang ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*. Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji BNT (Beda Nyata terkecil) yang disajikan pada Tabel 7.

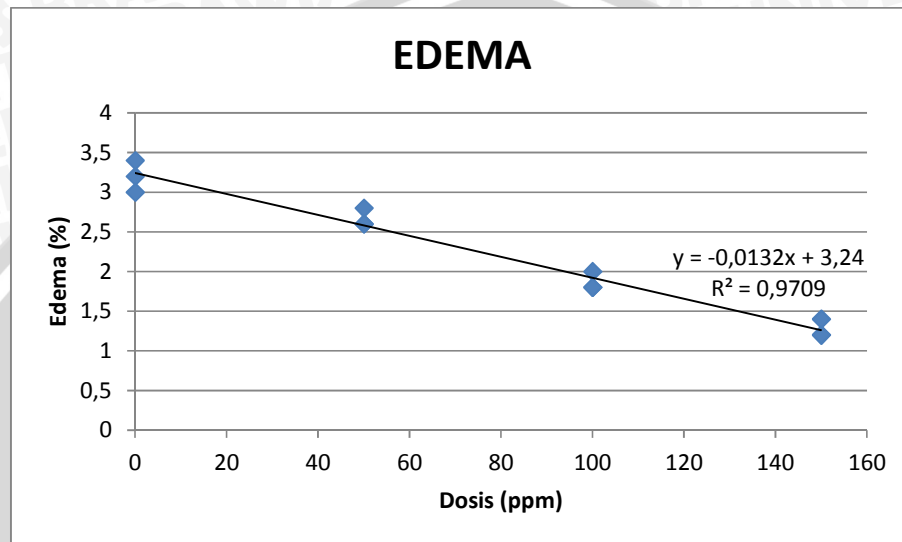
**Tabel 7.** Uji BNT Skoring Edema Histopatologi Insang Ikan Mas

Rerata Perlakuan	D=1.27	C=1.87	B=2.67	A=3.20	Notasi
<b>D=1.27</b>	-	-	-	-	a
<b>C=1.87</b>	0.60**	-	-	-	b
<b>B=2.67</b>	1.40**	0.80**	-	-	c
<b>A=3.20</b>	1.93**	1.30**	0.53**	-	d

Keterangan : \* = berbeda nyata ; \*\* = berbeda sangat nyata

Pada Tabel 7, terlihat bentuk kerusakan jaringan yang mengalami edema ditandai dengan notasi a, b, c dan d. Perubahan jaringan pada insang ikan mas, dipengaruhi oleh penambahan dosis ekstrak kasar daun sirsak. Dosis yang berbeda juga akan mempengaruhi tingkat pemulihan jaringan yang berbeda ditunjukkan oleh nilai skoring. Sesuai dengan pernyataan Mangan (2009), bahwa salah satu kandungan kimia sirsak yang berperan penting untuk obat adalah flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder dan keberadaannya pada daun tanaman dipengaruhi oleh proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid. Dalam

kebanyakan kasus, flavonoid dapat berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan cara mengganggu fungsi organisme seperti bakteri atau virus (Subroto dan Saputro, 2006). Untuk mengetahui uji respon maka dilakukan uji polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 12.



**Gambar 12.** Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Edema Insang Ikan Mas.

Pada grafik diatas dapat diketahui bahwa hubungan antara dosis ekstrak kasar daun sirsak dengan kerusakan edema pada insang berbanding terbalik, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak kasar daun sirsak maka nilai kerusakan insang edema semakin rendah, dan didapatkan persamaan  $y = -0,0132x + 3,24$  yang memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) yakni 0,9709 menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar sirsak yang diberikan berpengaruh terhadap presentase kerusakan insang edema karena nilainya mendekati 1. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Jonathansarwono (2014), bahwa keselerasan model regresi dapat diterangkan dengan menggunakan nilai  $R^2$ , yaitu semakin besar nilai tersebut maka model semakin baik. Jika nilai mendekati 1 maka model regresi semakin baik. Nilai  $R^2$  mempunyai karakteristik diantaranya: 1) selalu positif, 2) nilai  $R^2$  maksimal sebesar 1. Jika nilai  $R^2$  sebesar 1 berarti kesesuaian yang

sempurna. Artinya seluruh variasi dalam variabel Y dapat diterangkan oleh model regresi. Sebaliknya jika  $r^2$  sama dengan 0, maka tidak ada hubungan linier antara X dan Y.

#### b. Nekrosis

Perlakuan yang diberikan selama penelitian pada ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens* dengan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) memberikan hasil rata-rata yang berbeda terhadap histopatologi insang ikan mas yang disajikan pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD ( $\pm$ )
	1	2	3			
A	2.8	2.8	3.0	8.6	2.87	0.12
B	2.2	2.8	2.6	7.6	2.53	0.31
C	2.2	2.0	1.8	6.0	2.00	0.20
D	1.4	1.6	1.6	4.6	1.53	0.12
K (-)	1.0	1.2	1.0	3.2	1.07	0.12
Total	9.6	10.4	10	30	10	0.87

Berdasarkan Tabel 8, dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan nekrosis pada jaringan insang ikan mas yang terendah diperoleh pada perlakuan D (150 ppm), hal tersebut diduga karena dosis ekstrak kasar daun sirsak yang diberikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga mengurangi infeksi yang ditimbulkan dan ikan mas mampu memperbaiki jaringannya. Daun sirsak mengandung suatu senyawa yang disebut sebagai senyawa *acetogenins*. Fenol merupakan salah satu gugus *acetogenin* yang bersifat antibakteri. Mekanisme senyawa fenol dalam menyerang bakteri adalah dengan menghancurkan dinding sel dan presipitasi (pengendapan) protein sel dari bakteri sehingga terjadi koagulasi dan kegagalan fungsi dari mikroorganismenya tersebut (Hermawan dan Laksono, 2013). Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun



sirsak (*A. muricata*) terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Sidik Ragam Skoring Nekrosis Insang Ikan Mas

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	3.11	1.04	25.889**	4.07	7.59
Acak	8	0.32	0.04			
Total	11	3.43				

Keterangan \*\*: Berbeda Sangat Nyata

Pada Tabel 9, menunjukkan bahwa hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan nekrosis pada histopatologi insang ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*. Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang disajikan pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Uji BNT Skoring Nekrosis Histopatologi Insang Ikan Mas

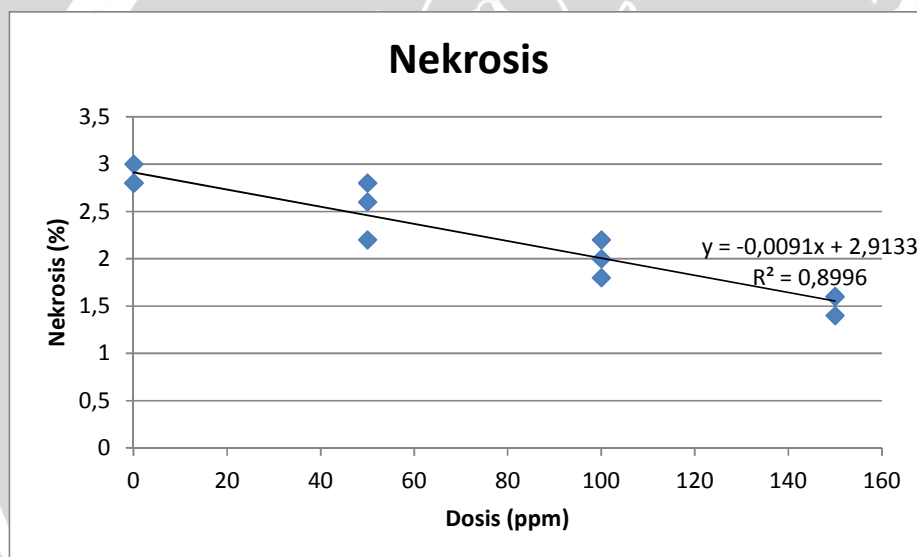
Rerata Perlakuan	D= 1.53	C= 2.00	B= 2.53	A= 2.87	Notasi
D= 1.53	-	-	-	-	A
C= 2.00	0.47*	-	-	-	B
B= 2.53	1.00**	0.53*	-	-	bc
A= 2.87	1.33**	0.87**	0.33**	-	cd

Keterangan : \* = berbeda nyata ; \*\* = berbeda sangat nyata

Pada Tabel 10, terlihat bentuk kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis yang ditandai dengan notasi a, b, bc, dan cd. Hal ini berarti perlakuan D berbeda sangat nyata dengan perlakuan C, B, dan A. Tetapi, pada Perlakuan C berbeda nyata dengan perlakuan B dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan A. Namun, pada perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan A.

Perubahan jaringan pada insang ikan mas, dipengaruhi oleh penambahan dosis ekstrak kasar daun sirsak. Dosis yang berbeda juga akan mempengaruhi tingkat pemulihan jaringan yang berbeda ditunjukkan oleh nilai skoring. Sesuai pendapat Flavonoid dan polifenol merupakan senyawa fenol, turunan fenol

bekerja sebagai antiseptik dan disinfektan dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri. Pada konsentrasi rendah terbentuk kompleks protein-fenol dengan ikatan lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol kedalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sel dan sel membran mengalami lisis. Turunan fenol juga dapat mengubah permeabilitas membran sel, dapat menimbulkan kebocoran konstituen sel yang essential sehingga bakteri mengalami kematian (Harborne, 1987 dalam Sari *et al.*, 2010). Untuk mengetahui uji respon maka dilakukan uji polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Insang Ikan Mas.

Pada grafik diatas dapat diketahui bahwa hubungan antara dosis ekstrak kasar daun sirsak dengan kerusakan nekrosis pada insang berbanding terbalik, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak kasar daun sirsak maka nilai kerusakan insang nekrosis semakin rendah, dan didapatkan persamaan  $y = -0,0091x + 2,91$  yang memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) yakni 0,8996 menunjukkan bahwa dosis

ekstrak kasar sirsak yang diberikan berpengaruh terhadap presentase kerusakan insang nekrosis karena nilainya mendekati 1. Dari penelitian Vijayameena *et al.* (2013), diketahui bahwa daun sirsak memiliki kandungan fenol yang lebih tinggi dari bijinya. Kandungan fenol daun sirsak sebesar 134,28 mg% dan daun sirsak memiliki daya hambat bakteri paling maksimum dibandingkan bagian yang lain. Tumbuhan sirsak juga memiliki kandungan bioaktif lainnya seperti alkaloid, flavonoid, karbohidrat, glikosida, protein, saponin, tannin, terpenoid dan *anthraquinone*.

### c. Fusi

Perlakuan yang diberikan selama penelitian pada ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens* dengan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) memberikan hasil rata-rata yang berbeda terhadap histopatologi insang ikan mas yang disajikan pada Tabel 11 sebagai berikut.

**Tabel 11.** Rerata Skoring Hasil Pengamatan Kerusakan Fusi Jaringan Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD ( $\pm$ )
	1	2	3			
A	3.0	3.2	4.0	10.2	3.40	0.53
B	2.6	3.2	2.8	8.6	2.87	0.31
C	2.2	2.4	2.2	6.8	2.27	0.12
D	1.0	1.2	2.0	4.2	1.40	0.53
K (-)	1,6	1.0	1.0	3.6	1.20	0.35
Total	10.4	11	12	33.4	11.14	1.84

Berdasarkan Tabel 11, dapat ditunjukkan bahwa rerata kerusakan fusi pada jaringan insang ikan mas yang terendah diperoleh pada perlakuan D (150 ppm), hal tersebut diduga karena dosis ekstrak kasar sirsak (*A. muricata*) yang diberikan dapat mengobati ikan mas yang telah diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

Menurut Ganiswarna (1995) dalam Permatasri *et al.* (2013), *flavonoid* menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara *flavonoid* dengan DNA bakteri, *tanin*

diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, *saponin* termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain, *alkaloid* memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1991). Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) terhadap kerusakan fusi pada jaringan insang dilakukan uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 12 berikut ini.

**Tabel 12.** Sisik Ragam Skoring Fusi Insang Ikan Mas

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
<b>Perlakuan</b>	3	6.62	2.21	13.247**	4.07	7.59
<b>Acak</b>	8	1.33	0.17			
<b>Total</b>	11	4.75				

Keterangan \*\*: Berbeda Sangat Nyata

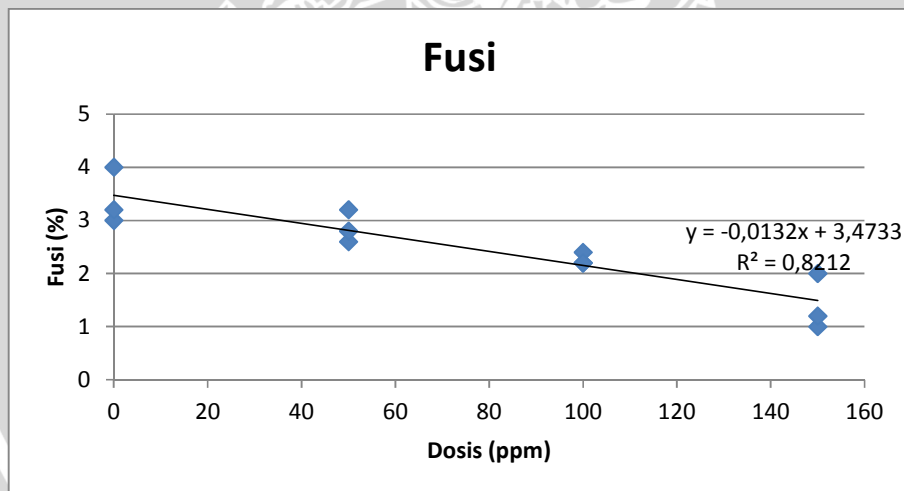
Pada Tabel 12, menunjukkan bahwa hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan fusi pada histopatologi insang ikan mas yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*. Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji BNT (Beda Nyata terkecil) yang disajikan pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Uji BNT Skoring Fusi Histopatologi Insang Ikan Mas

Rerata Perlakuan	D= 1.40	C= 2.27	B= 2.87	A= 3.40	Notasi
<b>D= 1.40</b>	-	-	-	-	A
<b>C= 2.27</b>	0.87**	-	-	-	Ab
<b>B= 2.87</b>	1.47**	0.60 <sup>ns</sup>	-	-	Bc
<b>A= 3.40</b>	2.00**	1.13**	0.53 <sup>ns</sup>	-	Cd

Keterangan : \* = berbeda nyata ; \*\* = berbeda sangat nyata ; <sup>ns</sup> = tidak berbeda nyata

Pada Tabel 13, dapat terlihat bentuk kerusakan jaringan yang mengalami fusi didapatkan notasi a, ab, bc, dan cd. Hal ini berarti perlakuan D berbeda nyata dengan perlakuan C dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan B, dan A. Tetapi, pada Perlakuan C berbeda nyata dengan perlakuan B dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan A. Namun, pada perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan A. Hal tersebut diduga bahwa dosis yang berbeda dapat menyebabkan perbedaan persentase kerusakan fusi jaringan pada insang ikan mas. Sesuai dengan pernyataan Harmita dan Radji (2008) bahwa dosis dan jumlah kelompok dosis harus cukup, sehingga dapat diperoleh dosis toksik dan dosis tidak berefek. Untuk mengetahui uji respon maka dilakukan uji polynomial orthogonal yang disajikan pada Gambar 14.



**Gambar 14.** Grafik Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Fusi Insang Ikan Mas.

Pada grafik diatas dapat diketahui bahwa hubungan antara dosis ekstrak kasar daun sirsak dengan kerusakan fusi pada insang berbanding terbalik, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak kasar daun sirsak maka nilai kerusakan insang edema semakin rendah, dan didapatkan persamaan  $y = -0,0132x + 3,47$  yang

memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) yakni 0,8212 menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar sirsak yang diberikan berpengaruh terhadap presentase kerusakan insang edema karena nilainya mendekati 1. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan dari Junaidichicago (2014) bahwa *R Square* ( $R^2$ ) sering disebut dengan koefisien determinasi, yakni mengukur kebaikan dari persamaan regresi; yaitu memberikan proporsi atau persentase variasi total dalam variabel terikat yang dijelaskan oleh variabel bebas. Nilai  $R^2$  terletak diantara 0 – 1, dan kecocokan model dikatakan lebih baik jika  $R^2$  semakin mendekati 1.

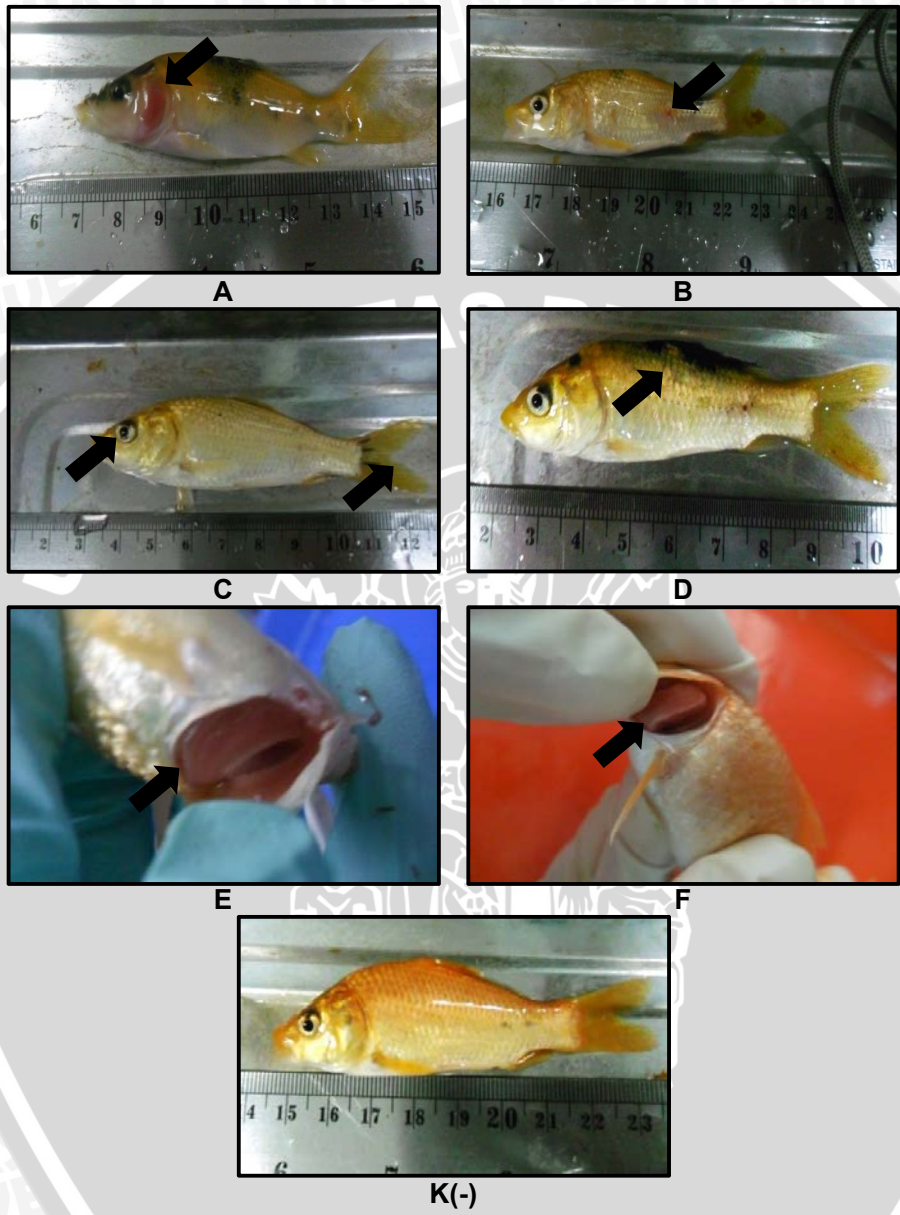
## 4.2 Parameter Penunjang

### 4.2.1 Gejala Klinis

Prajitno (2005), menyatakan bahwa penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stres, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit.

Pengamatan gejala klinis dilakukan pada hari ke-7 (Gambar 15). Ikan kontrol negatif menunjukkan tidak adanya gejala klinis ikan sakit. Berbeda dengan ikan uji yang telah diinfeksi bakteri *P. fluorescens* yang menunjukkan berbagai gejala klinis ikan sakit yaitu: (A) operkulum tampak merah hingga pendarahan pada insang, (B) muncul bercak merah dan luka di sekitar ekor, (C) ekor geripis dan mata membesar, (D) rusak dan hilangnya sisik. Sedangkan

pada Gambar (E) nampak insang sehat yang berwarna lebih merah / segar daripada Gambar (F) yang memperlihatkan insang pucat atau lebih putih.



**Gambar 15.** Gejala klinis ikan mas pada hari ke-7. (A) Pemberian dosis 0 ppm ; (B) Pemberian dosis 50 ppm ; (C) Pemberian dosis 100 ppm ; (D) Pemberian dosis 150 ppm ; (E) Insang sehat ; (F) Insang terinfeksi ; (K(-)) Kontrol negatif

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata*) dengan dosis 150 ppm menunjukkan hasil paling terbaik dalam penyembuhan. Daun sirsak mengandung suatu senyawa yang disebut sebagai senyawa *acetogenins*. Fenol merupakan salah satu gugus *acetogenin* yang bersifat antibakteri. Mekanisme senyawa fenol dalam menyerang bakteri adalah dengan menghancurkan dinding sel dan presipitasi (pengendapan) protein sel dari bakteri sehingga terjadi koagulasi dan kegagalan fungsi dari mikroorganisme tersebut (Hermawan dan Laksono, 2013).

#### 4.2.2 Kualitas Air

##### a. Suhu

Berdasarkan hasil pengukuran suhu selama pemeliharaan (lampiran 7) berkisar antara 25<sup>o</sup> - 27,6<sup>o</sup> C. Nilai tersebut masih dalam kisaran normal. Hal ini sesuai pendapat Khairuman, *et al.* (2008), bahwa suhu yang dibutuhkan untuk kehidupan ikan mas adalah antara 25-30<sup>o</sup>C.

##### b. *Potential of Hydrogen* (pH)

Hasil pengukuran derajat keasaman (*Potential of Hydrogen* / pH) selama pemeliharaan (lampiran 8) berkisar antara 6,64-8,01. Nilai tersebut masih termasuk dalam kisaran normal, sesuai dengan pernyataan Kordi (2009), yaitu pH yang sesuai untuk budidaya perairan adalah pada kisaran 6,5-9,0.

##### c. Oksigen Terlarut (DO)

Hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) selama pemeliharaan (lampiran 9) berkisar antara 4,05 – 6,80 mg/l. Nilai tersebut masih dalam kisaran normal, karena menurut Irianto (2005) kandungan oksigen terlarut minimum yang dapat diterima sebagian besar spesies ikan untuk hidup dengan baik adalah 3 ppm dan maksimal 7 ppm (Kordi, 2009).



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa pengobatan dengan ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) memberikan pengaruh terhadap gambaran histopatologi insang ikan mas (*C. carpio* L.). Dari hasil penelitian menggunakan perlakuan dosis yang terbaik dalam pengobatan ikan mas dilihat dari perbaikan jaringan insang yakni pada dosis D (150 ppm), karena pada dosis 150 ppm dapat mempercepat pemulihan jaringan insang ikan mas, dan nilai scoring kerusakan paling kecil, serta struktur jaringannya mendekati pada jaringan insang yang normal.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimal ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) untuk pengobatan ikan mas yang diinfeksi *P. fluorescens* serta dapat pula menggunakan tanaman obat lainnya yang dapat digunakan untuk pengobatan ikan yang diinfeksi *P. fluorescens*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achjar, M. 1986. Perikanan Darat. CV. Sinar Baru. Bandung. 107 hlm.
- Angka S.L. 1990. *The Pathology of The Walking Catfish Clarias batracus (L), Infected Intraperitoneally With Aeromonas hydrophila*. *Asian Fisheries Science*. 343-351 hlm.
- Anonymous, 2012. Bakteri Penyebab Penyakit Pada Ikan. <http://imi-jogja.blogspot.com/2012/11/bakteri-penyebab-penyakit-pada-ikan.html>. Diakses pada 13 Februari 2014.
- Arwiyanto, T., Y.M.S. Maryudani, N. Azizah. 2007. Sifat-Sifat Fenotipik *Pseudomonas fluoresen*, Agensi Pengendalian Hayati Penyakit Lincat pada Tembakau Temanggung. *Biodiversitas Volume 8 Nomor 2* ISSN:1412-033X. 147-151 hlm.
- Benli, A.C.K dan A. Ozkul. 2008. *Sublethal Ammonia Exposure of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Effect on Gill, Liver and Kidney*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. *Chemosphere* 72 (2008). 1355-1358 hlm.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan di Perairan Umum. Kanisius. Yogyakarta. 68hlm.
- Dewi, H. A. C., dan R. Hermawati. 2013. Khasiat Ajaib! Daun Sirsak. Padi. Malang. 140 hlm.
- Ersa, E. M. 2008. Gambaran Histopatologi Insang, Usus Dan Otot Pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. 66 hlm.
- Fauzi, Syarif. 2009. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri. <http://syariffauzi.wordpress.com/tag/faktor-faktor-yang-mempengaruhi-pertumbuhan-bakteri/>. Diakses pada 13 Februari 2014.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknik Perikanan. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hlm.
- Google image. 2014. Gambar *Pseudomonas fluorescens*. [www.googleimages.com](http://www.googleimages.com). Diakses pada 12 Februari 2014.
- Hermawan, G. P. dan H. Laksono. 2013. Ekstraksi Daun Sirsak (*A. muricata* L.) Menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2(2):111-115 hlm.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hlm.

- Jonathansarwono. 2014. Model Regresi. <http://jonathansarwono.wordpress.com>. Diunduh pada tanggal 14 Mei 2014.
- Junaidichocago. 2014. Memahami Output Regresi dari Excel. <http://junaidichaniago.wordpress.com>. Diunduh pada tanggal 13 Mei 2014.
- Kakkilaya, B.S. 2002. *Peripheral smear examination for malaria parasite*. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site. 34(8): 602-608 hlm.
- Kartika, Ardiana. 2009. Teknik Eksplorasi dan Pengembangan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*. 18 hlm.
- Khairuman., D. Sudenda dan B. Gunadi. 2008. Budi Daya Ikan Mas Secara Intensif. Agromedia Pustaka. Jakarta. 100 hlm.
- Khusniati, Sri. 1994. Identifikasi Kandungan Bakteri Patogen Dalam Air Kolam Dan Frekuensi Infeksi Yang Terjadi Pada Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). Univ. Airlangga. 27 hlm.
- Kordi, M. G. H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Rineka Cipta dan Penerbit Bina Adiaksara. Jakarta. 190 hlm.
- . 2009. Budidaya Perairan Buku Kedua. PT Citra Aditya Bakti. Bandung. 964 hlm.
- Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto, R. N. Mitchell. 2007. *Robbins Basic Pathology. Eight Edition*. Saunders Elsevier, Inc.: Philadelphia. 15 hlm.
- Lawler, Adrian. 2005. *Hyperplasia in Fishes*. [http://www.aquarticles.com/articles/management/Lawler\\_Hyperplasia.html](http://www.aquarticles.com/articles/management/Lawler_Hyperplasia.html). Diakses pada 12 Februari 2014.
- Lay, B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hlm.
- Lesmana, D.S. dan I. Darmawan. 2000. Budidaya Ikan Hias Air Tawar Populer. Penebar Swadaya. Jakarta. 80 hlm.
- Mangan, Y. 2009. Solusi Sehat Mencegah Dan Mengatasi Kanker. Agromedia Pustaka. Jakarta. 76 hlm.
- Mulyadi, R. 2009. Waspada Hama Dan Penyakit Pada Ikan Mas. <http://petaniberdasicom.blogspot.com/2009/11/waspada-hama-dan-penyakit-pada-ikan.html>. Diakses pada 3 Maret 2014.
- Nazir, M., 2009. Metode Penelitian. Cetakan ketujuh, Penerbit Ghalia Indonesia. 54, 63, 122, 221 hlm.
- 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 Cooperation Agency. 77 hlm.

- Permatasari, G. A. A. A., I N. K. Besung, H. Mahatmi. 2013. Daya Hambat Perasan Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*. Icssn : 2301-7848. *Indonesia Medicus Veterinus* 2013 2(2) : 162 - 169 hlm.
- Perry, Steve, F. 1997. *The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. Annual Review of Physiology*. Vol 59: 325-347 hlm.
- Poeloengan, M., Chairul, I. Komala, S. Salmah dan M. N. Susan. 2006. Aktivitas Antimikroba dan Fitokimia dari Beberapa Tanaman Obat. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. [http://bbalitvet.litbang.deptan.go.id/eng/attachments/247\\_46.pdf](http://bbalitvet.litbang.deptan.go.id/eng/attachments/247_46.pdf). Diakses pada tanggal 5 Maret 2014.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Universitas Brawijaya. Malang. 104 hlm.
- Pranitasari, Novi. 2011. Sirsak (*Annona muricata L.*). <http://novi-biologi.blogspot.com/2011/08/sirsak-annona-muricata-l.html>. Diakses pada 13 Februari 2014.
- Qnoze, F. E. D. 2011. *Pseudomonas sp.* <http://fadliqnoze.blogspot.com/2011/10/blog-post.html>. Diakses pada 12 Februari 2014.
- Raza'l, T. S. 2008. Analisis Histopatologi Organ Insang Dan Usus Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus coloides*) yang diberi Khamir Laut (*Marine Yeast*) Sebagai Immunostimulan. Tesis. 95 hlm.
- Rudiyanti, S. dan A. D. Ekasari. 2009. Pertumbuhan Dan Survival Rate Ikan Mas (*Cyprinus Carpio Linn*) Pada Berbagai Konsentrasi Pestisida Regent 0,3 G. *Jurnal Saintek Perikanan* Vol. 5, No. 1, 2009. 39 – 47 hlm.
- Santoso S., Nurdiana, R. N. Sutanti. 2013. Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Isolat 450-Sv Secara *In Vitro*. 11 hlm.
- Saputra, A., O. Praseno, A. Sudradjat, dan A. B. Prasetio. 2010. Pertumbuhan Beberapa Strain Ikan Mas Yang Dipelihara Pada Tambak Bersalinitas Rendah. *Prosiding Forum inovasi teknologi akuakultur 2010*. 79-80 hlm.
- Saputra, H. M., N. Marusin, dan P. Santoso. 2013. Struktur Histologis Insang dan Kadar Hemoglobin Ikan Asang (*Osteochilus hasseltii C.V*) di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA.)* 2(2) – Juni 2013 (ISSN : 2303-2162 - DRAFT):. 138-144 hlm.
- Sari, Y. D., S. N. Djannah, L. H. Nurani. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Secara *In Vitro* Terhadap *Staphylococcus aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia coli* Atcc 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. *Kes Mas* Vol. 4 No. 3, September 2010 : 144 – 239 hlm.

- 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 hlm.
- Siswandari, W. 2005. Nilai Diagnosis Pemeriksaan Imunositokimia Limfosit Sediaan Apus Darah Tepi Dibandingkan Analisis Kromosom Pada Penderita Dengan Dugaan Sindroma Fragile x. Tesis. Universitas Diponegoro Semarang. 74 hlm.
- Subroto, A. dan Saputro, H. 2006. Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut. Penebar Swadaya. Jakarta. 85 hlm.
- Sujati K, Soedarmanto, Hermawan S, dan Danang K. 2007. Tumbuhan Berguna Indonesia. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta, 15-29 hlm.
- Sukarni, Maftuch, H. Nursyam. 2012. Kajian Penggunaan *Ciprofloxacin* Terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J. Exp. Life Sci*. Vol. 2 No.1. ISSN 2087-2852. 12 hlm.
- Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 hlm.
- Susilowati. 2005. Pengaruh Akut Pemberian Kadmium Terhadap Struktur Mikroanatomi Insang Ikan Bandeng. Skripsi. Univ. Negeri Semarang. 77 hlm.
- Tambunan, S. 2011. Ensiklopedi Tanaman Obat Tradisional. Materia Medika, Jakarta. 47-68 hlm.
- Wijaya, M. 2011. Ekstraksi *Annonaceous acetogenin* Dari Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Sebagai Senyawa Bioaktif Antikanker. Skripsi Fakultas Teknik Program Studi Teknologi Bioproses Universitas Indonesia. 89hlm.
- Vijayameena, C., G. Subhashini, M. Logayani dan B. Ramesh. 2013. *Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in Annona muricata*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2(1): 1-8 hlm.

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian  
a. Alat



Inkubator



Vortex



Hot plate



Timbangan Digital



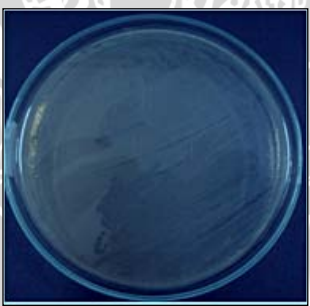
Spektrofotometer



Mikropipet



Tabung reaksi beserta raknya



Petridisk



Lemari Es



LAF



Bak



Akuarium



Oven



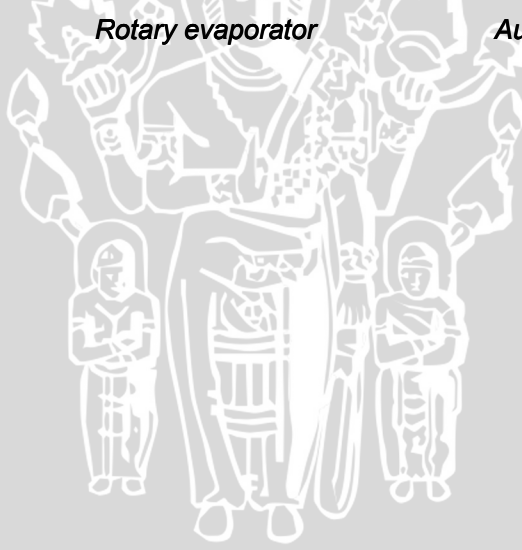
Blender



Rotary evaporator



Autoclave



Lampiran 1. (Lanjutan)

b. Bahan



TSB (Tryptone Soya Broth)



PSA (Pseudomonas selective agar)



Gliserol



Alkohol



Isolat Bakteri



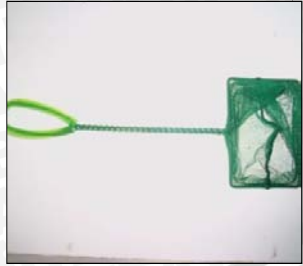
Tissue



Aquadest



Lampiran 1. (Lanjutan: Alat Pembuatan Preparat Histopatologi)



Scoop Net



Nampan



Section set



Mikrotom



Wax dispenser



Tissue prosesor



Mikroskop



Ember kecil

## Lampiran 2. Cara Perhitungan Analisa Sidik Ragam, Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan Analisa Regresi

### Tabel Analisa Data

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	TA	RA
B	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	TB	RB
C	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	TC	RC
D	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	TD	RD
Total				G	

Perhitungan :

#### 1. Jumlah Kuadrat (JK) :

- Faktor Koreksi (FK) =  $G^2/n$
- JK Total =  $(A_1^2 + A_2^2 + \dots + D_3^2) - FK = P$
- JK Perlakuan =  $\frac{(\sum A)^2 + \dots + (\sum D)^2}{3} - FK = Q$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan = P – Q = R

#### 2. Hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel sidik ragam

### Tabel Analisa Keragaman/Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F Hitung	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	3	Q	$Q/3 = a$	a/b	$F \alpha (3,9)$	$F \alpha (3,9)$
Acak	9	R	$Q/9 = b$			
Total	12	P				

Keterangan :

- Jika F hitung < F tabel 5 % berarti hasilnya tidak berbeda nyata
- Jika F tabel 5 % < F hitung < F tabel 1 % berarti hasilnya berbeda nyata. Pada F hitung diberi tanda satu bintang (\*).

- Jika F hitung > F tabel 1 % berarti hasilnya berbeda sangat nyata. Pada F hitung diberi tanda dua bintang (\*\*).

Apabila hasil perlakuan berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perlakuan mana yang terbaik, yaitu sebagai berikut :

1. Menghitung nilai BNT :

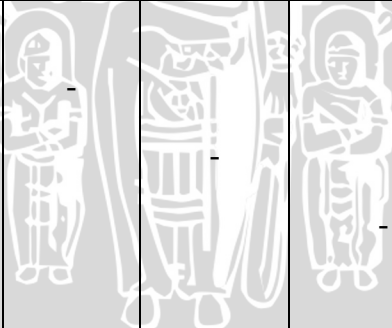
$$SED = \frac{\sqrt{2KT \text{ acak}}}{3}$$

$$BNT \ 5 \% = t \text{ tabel } 5 \% \text{ (db Acak)} \times SED$$

$$BNT \ 1 \% = t \text{ tabel } 1 \% \text{ (db Acak)} \times SED$$

2. Menghitung selisih rata-rata perlakuan

**Tabel BNT Perlakuan**

Rata-rata Perlakuan	Terkecil Terbesar	→			Notasi
Terkecil	-				
↓					
Terbesar					

**Ketentuan :**

Selisih < BNT 5 % = ns (tidak berbeda nyata).

BNT 5 % < selisih < BNT 1 % = \* (berbeda nyata).

Selisih > BNT 1% = \*\* (berbeda sangat nyata).



Untuk menentukan hubungan fungsional antara respon (tanggapan) dengan perlakuan yang terlibat dalam kisaran taraf faktor penelitian dilakukan pengujian menurut metode ortogonal polinomial yaitu :

$$Y = \alpha + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \dots + \beta_n X^n$$

Keterangan :

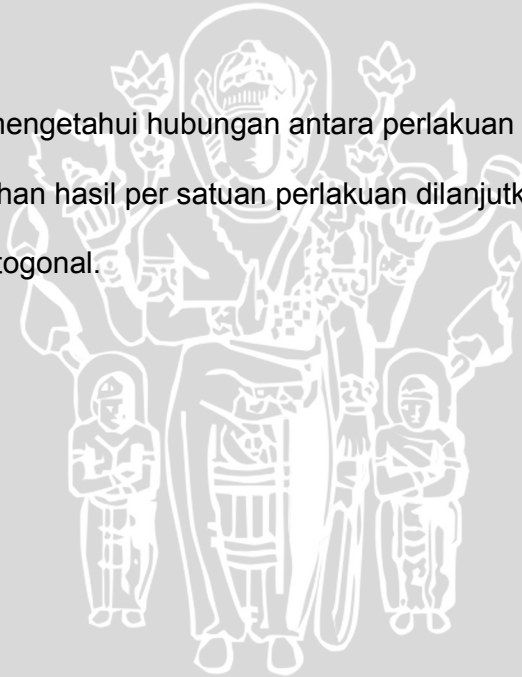
$\alpha$  = intersepsi

$\beta_1 = (l=1,2,3,\dots,n)$  Koefisien regresi parsial yang berasosiasi dengan derajat polinomial ke-1

Y = respon

X = perlakuan

Selanjutnya untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil atau berapa perubahan hasil per satuan perlakuan dilanjutkan dengan tabel polinomial ortogonal.



Lampiran 3. Nilai Skoring pada Histopatologi Insang Ikan Mas

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang (LP)					Rerata LP	Rerata Sampel
			1	2	3	4	5		
<b>E D E M A</b>	A	1	3	4	3	3	3	3,2	3,2
		2	2	3	3	4	3	3	
		3	4	3	3	4	3	3,4	
	B	1	2	2	3	3	3	2,6	2,67
		2	2	3	3	3	3	2,8	
		3	3	2	3	2	3	2,6	
	C	1	2	2	2	2	2	2	1,87
		2	2	2	1	2	2	1,8	
		3	1	2	2	1	3	1,8	
	D	1	1	1	1	2	1	1,2	1,27
		2	2	1	2	1	1	1,4	
		3	1	1	1	1	2	1,2	
	K (-)	1	1	1	1	2	2	1,2	1,13
		2	1	1	1	1	1	1	
		3	1	1	1	1	1	1	
<b>N E K R O S I S</b>	A	1	3	2	3	3	3	2,8	2,87
		2	3	4	3	2	2	2,8	
		3	3	3	3	3	3	3	
	B	1	3	2	2	2	2	2,2	2,53
		2	3	3	3	3	2	2,8	
		3	2	2	3	2	3	2,6	
	C	1	2	3	2	2	2	2,2	2
		2	3	1	2	2	2	2	
		3	2	2	1	1	3	1,8	
	D	1	1	1	3	2	2	1,4	1,53
		2	1	2	1	2	2	1,6	
		3	2	1	1	1	2	1,6	
	K (-)	1	1	1	1	1	1	1	1,07
		2	1	2	1	1	1	1,2	
		3	1	1	1	1	1	1	
<b>F U S I</b>	A	1	3	2	3	4	3	3	3,4
		2	2	4	3	3	4	3,2	
		3	4	4	4	4	4	4	
	B	1	3	2	2	3	3	2,6	2,87
		2	2	2	4	4	4	3,2	
		3	2	3	3	3	3	2,8	
	C	1	2	1	2	3	2	2,2	2,27
		2	3	2	1	3	3	2,4	
		3	2	1	3	3	2	2,2	
	D	1	1	1	1	1	1	1	1,4
		2	2	1	1	1	1	1,2	
		3	1	1	3	3	2	2	
	K (-)	1	1	1	2	2	2	1,6	1,2
		2	1	1	1	1	1	1	
		3	1	1	1	1	1	1	

**Lampiran 4. Perhitungan Kerusakan Edema**

**a. Rataan Kerusakan Edema**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	3.2	3.0	3.4	9.6	3.20
B	2.6	2.8	2.6	8.0	2.67
C	2.0	1.8	1.8	5.6	1.87
D	1.2	1.4	1.2	3.8	1.27
Total	9.0	9.0	9.0	27	9
FK		27.00	729.00		60.75
JK Total			67.48		6.73
JK Perlakuan		201.96	67.32		6.57
JK Acak					0.16

**b. Analisis Sidik Ragam**

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3.00	6.57	2.19	109.5	4.07	7.59
Acak	8.00	0.16	0.02	**		
Total	11.00	8447.4	1			

$SED = \sqrt{2 \text{ KT acak/r}} = 0.12$   
 $BNT 5\% = t \text{ tabel } 5\% * SED = 0.27$   
 $BNT 1\% = t \text{ tabel } 1\% * SED = 0.39$

**c. Uji BNT**

Rerata Perlakuan	1.27	1.87	2.67	3.20	notasi
1.27	-	-	-	-	a
1.87	0.60	-	-	-	b
2.67	1.40	0.80	-	-	c
3.20	1.93	1.33	0.53	-	d

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

**Lampiran 5. Perhitungan Kerusakan Nekrosis**

**a. Rataan Kerusakan Nekrosis**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	2.8	2.8	3.0	8.6	2.87
B	2.2	2.8	2.6	7.6	2.53
C	2.2	2.0	1.8	6.0	2.00
D	1.4	1.6	1.6	4.6	1.53
Total	8.6	9.2	9	26.8	8.93
FK		26.80		718.24	59.85
JK Total				63.28	3.43
JK Perlakuan		188.88		62.96	3.11
JK Acak					0.32

**b. Analisis Sidik Ragam**

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3.00	3.11	1.04	25.889	4.07	7.59
Acak	8.00	0.32	0.04	**		
Total	11.00	3.43				

$SED = \sqrt{2 \text{ KT acak}/r} = 0.16$   
 $BNT 5\% = t \text{ tabel } 5\% * SED = 0.38$   
 $BNT 1\% = t \text{ tabel } 1\% * SED = 0.55$

**c. Uji BNT**

Rerata Perlakuan	1.53	2.00	2.53	2.87	notasi
1.53	-	-	-	-	a
2.00	0.47	-	-	-	b
2.53	1.00	0.53	-	-	bc
2.87	1.33	0.87	0.33	-	cd

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

## Lampiran 6. Perhitungan Kerusakan Fusi

### a. Rataan Kerusakan Fusi

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	3.0	3.2	4.0	10.2	3.40
B	2.6	3.2	2.8	8.6	2.87
C	2.2	2.4	2.2	6.8	2.27
D	1.0	1.2	2.0	4.2	1.40
Total	8.8	10	11	29.8	9.93
FK		29.80		888.04	74.00
JK Total				81.96	7.96
JK Perlakuan		241.88		80.63	6.62
JK Acak					1.33

### b. Analisis Sidik Ragam

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3.00	6.62	2.21	13.247	4.07	7.59
Acak	8.00	1.33	0.17	**		
Total	11.00	7.96				

$$SED = \sqrt{2 \text{ KT acak}/r} = 0.33$$

$$BNT 5\% = t \text{ tabel } 5\% * SED = 0.77$$

$$BNT 1\% = t \text{ tabel } 1\% * SED = 1.12$$

### c. Uji BNT

Rerata Perlakuan	1.40	2.27	2.87	3.40	notasi
1.40	-	-	-	-	a
2.27	0.87	-	-	-	ab
2.87	1.47	0.60	-	-	bc
3.40	2.00	1.13	0.53	-	cd

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



Lampiran 7. Pengamatan Harian – Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															Keterangan
		A			B			C			D			Kontrol Negatif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Sebelum Penginfeksian (Senin, 24-3-14)	Pagi	25.5	25.8	25.9	25.7	26.1	26.1	25.9	26.1	26.1	26.0	26.1	26.1	25.8	25.7	26.1	
	Sore	27.1	26.4	26.5	27.1	26.8	27.1	26.4	26.8	27.0	26.5	26.8	26.7	25.7	26.1	26.1	
(Selasa, 25-3-14)	Pagi	25.9	25.9	25.9	25.9	26.1	25.9	25.9	26.1	26.0	25.9	26.1	26.1	25.7	25.8	25.6	
	Sore	26.3	26.2	26.3	26.4	26.5	27.0	26.5	26.7	26.7	26.7	25.5	26.8	26.2	26.2	26.3	
24 jam pasca penginfeksian (H0/Rabu,26-3-14)	Pagi	25.5	25.9	26.1	25.7	25.9	26.1	26.0	26.1	26.1	25.8	25.7	26.1	25.5	25.5	26.1	
	Sore	26.3	26.8	26.3	26.4	26.4	26.5	26.5	26.5	26.5	26.3	26.5	26.5	25.1	26.2	26.2	
H1/Kamis, 27 Maret 2014	Pagi	25.3	25.3	25.0	25.3	25.3	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.3	25.3	25.3	
	Sore	26.3	26.2	26.3	26.4	26.5	27.0	26.5	26.7	26.7	26.7	25.5	26.8	26.2	26.2	26.3	
H2/Jumat, 28 Maret 2014	Pagi	25.6	25.6	25.6	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	
	Sore	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.4	26.4	26.4	26.3	26.3	26.3	26.2	26.2	26.2	
H3/Sabtu, 29 Maret 2014	Pagi	25.4	25.4	25.5	25.7	26.1	26.1	25.6	25.6	25.5	26.1	25.7	26.1	25.5	25.5	25.6	
	Sore	26.1	26.2	26.3	26.5	26.5	26.5	26.6	26.6	26.6	26.7	26.7	26.8	26.8	26.8	26.8	
H4/Minggu, 30 Maret 2014	Pagi	25.5	25.5	25.6	26.0	26.0	26.0	25.8	25.8	25.8	25.8	25.9	25.9	25.9	25.9	25.9	
	Sore	25.8	25.9	25.9	25.8	26.0	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.0	26.0	26.0	
H5/Senin, 31 Maret 2014	Pagi	25.2	25.3	25.5	27.5	27.5	27.5	26.2	26.3	26.4	26.6	26.6	26.7	26.7	26.8	26.8	
	Sore	27.2	27.5	27.2	25.6	25.6	25.6	27.5	27.5	27.2	27.6	27.5	27.5	27.6	27.5	27.6	
H6/Selasa, 1 April 2014	Pagi	25.6	25.6	25.4	26.3	26.3	26.3	25.6	25.6	25.6	25.6	26.6	25.6	25.6	25.6	25.6	
	Sore	26.2	26.2	26.3	25.8	25.8	25.8	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	
H7/Rabu, 2 April 2014	Pagi	25.7	25.7	25.7	25.8	25.8	25.8	25.8	25.9	26.0	26.0	26.1	26.2	26.2	26.2	26.2	
	Sore	24.7	24.5	24.9	24.7	24.7	24.8	24.7	24.8	24.9	24.7	24.7	24.7	24.8	24.8	24.7	

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															KETERANGAN
		A			B			C			D			Kontrol Positif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
H8/Kamis, 3 April 2014	Pagi	25.5	25.8	25.9	25.7	26.1	26.1	25.9	26.1	26.1	26.0	26.1	26.1	25.8	25.7	26.1	
	Sore	27.1	26.4	26.5	27.1	26.8	27.1	26.4	26.8	27.0	26.5	26.8	26.7	25.7	26.1	26.1	
H9/Jumat, 4 April 2014	Pagi	25.9	25.9	25.9	25.9	26.1	25.9	25.9	26.1	26.0	25.9	26.1	26.1	25.7	25.8	25.6	
	Sore	26.3	26.2	26.3	26.4	26.5	27.0	26.5	26.7	26.7	26.7	25.5	26.8	26.2	26.2	26.3	
H10/Sabtu, 5 April 2014	Pagi	25.5	25.9	26.1	25.7	25.9	26.1	26.0	26.1	26.1	25.8	25.7	26.1	25.5	25.5	26.1	
	Sore	26.3	26.8	26.3	26.4	26.4	26.5	26.5	26.5	26.5	26.3	26.5	26.5	25.1	26.2	26.2	
H11/Minggu, 6 April 2014	Pagi	25.4	25.4	25.5	25.7	26.1	26.1	25.6	25.6	25.5	26.1	25.7	26.1	25.5	25.5	25.6	
	Sore	26.1	26.2	26.3	26.5	26.5	26.5	26.6	26.6	26.6	26.7	26.7	26.8	26.8	26.8	26.8	
H12/Senin, 7 April 2014	Pagi	25.5	25.5	25.6	26.0	26.0	26.0	25.8	25.8	25.8	25.8	25.9	25.9	25.9	25.9	25.9	
	Sore	25.8	25.9	25.9	25.8	26.0	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.0	26.0	26.0	
H13/Selasa, 8 April 2014	Pagi	25.2	25.3	25.5	27.5	27.5	27.5	26.2	26.3	26.4	26.6	26.6	26.7	26.7	26.8	26.8	
	Sore	27.2	27.5	27.2	25.6	25.6	25.6	27.5	27.5	27.2	27.6	27.5	27.5	27.6	27.5	27.6	
H14/Rabu, 9 April 2014	Pagi	25.6	25.6	25.4	26.3	26.3	26.3	25.6	25.6	25.6	25.6	26.6	25.6	25.6	25.6	25.6	
	Sore	26.2	26.2	26.3	25.8	25.8	25.8	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	

Lampiran 8. Pengamatan Harian – pH

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															Keterangan
		A			B			C			D			Kontrol Negatif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Sebelum Penginfeksi (Senin, 24-3-14)	Pagi	7.54	7.38	7.33	7.41	7.35	7.30	7.41	7.36	7.33	7.29	7.36	7.36	7.41	7.50	7.36	
	Sore	7.08	7.14	7.13	7.23	7.24	7.14	7.24	7.20	7.24	7.18	7.11	7.23	7.13	7.14	7.20	
(Selasa, 25-3-14)	Pagi	7.11	7.08	7.17	7.06	7.16	7.13	7.22	7.17	7.11	7.14	7.06	7.22	7.08	7.17	7.11	
	Sore	7.14	7.13	7.24	7.24	7.20	7.18	7.11	7.10	7.14	7.23	7.24	7.11	7.17	7.2	7.24	
24 jam pasca penginfeksi (H0/Rabu, 26-3-14)	Pagi	7.38	7.41	7.35	7.30	7.41	7.36	7.33	7.30	7.36	7.41	7.50	7.41	7.50	7.36	7.41	
	Sore	7.00	7.04	6.92	7.05	7.06	7.02	7.02	7.14	7.11	7.11	7.11	7.08	7.03	6.96	7.00	
H1/Kamis, 27 Maret 2014	Pagi	6.92	7.07	6.94	6.92	7.02	7.03	7.01	7.09	7.09	7.02	6.84	6.90	7.24	7.30	7.22	
	Sore	6.74	7.05	7.01	6.93	6.95	6.79	6.98	6.75	6.93	7.05	7.07	7.00	7.10	6.97	6.87	
H2/Jumat, 28 Maret 2014	Pagi	7.00	7.04	7.01	6.97	6.95	7.00	6.93	7.09	7.02	6.99	6.90	7.02	7.07	7.13	7.06	
	Sore	6.87	6.81	6.78	6.84	6.81	6.86	6.77	6.97	6.87	6.92	6.76	6.84	6.86	6.89	6.79	
H3/Sabtu, 29 Maret 2014	Pagi	6.88	7.07	7.09	6.87	6.89	6.96	6.70	6.87	6.71	7.01	7.03	6.54	6.88	7.03	6.96	
	Sore	7.11	6.92	6.90	6.93	6.87	6.74	6.64	6.98	6.90	6.95	6.98	6.90	6.82	6.91	6.74	
H4/Minggu, 30 Maret 2014	Pagi	7.67	7.78	7.72	7.66	7.69	7.63	7.57	7.69	7.62	7.62	7.58	7.59	7.67	7.71	7.66	
	Sore	7.18	7.49	7.30	7.33	7.43	7.48	7.18	7.47	7.45	7.38	7.36	7.14	7.31	7.53	7.10	
H5/Senin, 31 Maret 2014	Pagi	7.51	7.67	7.64	7.63	7.50	7.69	7.60	7.66	7.57	7.70	7.54	7.45	7.64	7.63	7.57	
	Sore	7.72	7.82	7.73	7.74	7.74	7.88	7.62	7.78	7.71	7.80	7.73	7.62	7.58	7.36	7.46	
H6/Selasa, 1 April 2014	Pagi	7.82	7.88	7.79	7.77	7.82	7.96	7.66	7.91	7.84	7.72	7.88	7.81	7.74	7.82	7.63	
	Sore	7.81	7.87	7.71	7.61	7.74	7.86	7.56	7.80	7.73	7.77	7.83	7.71	7.72	7.79	7.64	
H7/Rabu, 2 April 2014	Pagi	7.74	7.71	7.66	7.57	7.73	7.76	7.53	7.62	7.59	7.68	7.70	7.67	7.66	7.72	7.64	
	Sore	7.81	7.95	7.91	7.89	7.99	8.01	7.93	7.77	7.79	7.93	7.90	7.93	7.86	7.92	7.86	

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															Keterangan
		A			B			C			D			Kontrol Positif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
H8/Kamis, 3 April 2014	Pagi	7.54	7.38	7.33	7.41	7.35	7.30	7.41	7.36	7.33	7.29	7.36	7.36	7.41	7.50	7.36	
	Sore	7.08	7.14	7.13	7.23	7.24	7.14	7.24	7.20	7.24	7.18	7.11	7.23	7.13	7.14	7.20	
H9/Jumat, 4 April 2014	Pagi	7.11	7.08	7.17	7.06	7.16	7.13	7.22	7.17	7.11	7.14	7.06	7.22	7.08	7.17	7.11	
	Sore	7.14	7.13	7.24	7.24	7.20	7.18	7.11	7.10	7.14	7.23	7.24	7.11	7.17	7.2	7.24	
H10/Sabtu, 5 April 2014	Pagi	7.38	7.41	7.35	7.30	7.41	7.36	7.33	7.30	7.36	7.41	7.50	7.41	7.50	7.36	7.41	
	Sore	7.00	7.04	6.92	7.05	7.06	7.02	7.02	7.14	7.11	7.11	7.11	7.08	7.03	6.96	7.00	
H11/Minggu, 6 April 2014	Pagi	6.88	7.07	7.09	6.87	6.89	6.96	6.70	6.87	6.71	7.01	7.03	6.54	6.88	7.03	6.96	
	Sore	7.11	6.92	6.90	6.93	6.87	6.74	6.64	6.98	6.90	6.95	6.98	6.90	6.82	6.91	6.74	
H12/Senin, 7 April 2014	Pagi	7.67	7.78	7.72	7.66	7.69	7.63	7.57	7.69	7.62	7.62	7.58	7.59	7.67	7.71	7.66	
	Sore	7.18	7.49	7.30	7.33	7.43	7.48	7.18	7.47	7.45	7.38	7.36	7.14	7.31	7.53	7.10	
H13/Selasa, 8 April 2014	Pagi	7.51	7.67	7.64	7.63	7.50	7.69	7.60	7.66	7.57	7.70	7.54	7.45	7.64	7.63	7.57	
	Sore	7.72	7.82	7.73	7.74	7.74	7.88	7.62	7.78	7.71	7.80	7.73	7.62	7.58	7.36	7.46	
H14/Rabu, 9 April 2014	Pagi	7.82	7.88	7.79	7.77	7.82	7.96	7.66	7.91	7.84	7.72	7.88	7.81	7.74	7.82	7.63	
	Sore	7.81	7.87	7.71	7.61	7.74	7.86	7.56	7.80	7.73	7.77	7.83	7.71	7.72	7.79	7.64	

Lampiran 9. Pengamatan Harian – DO (ppm)

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															Keterangan
		A			B			C			D			Kontrol Negatif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Sebelum Penginfeksian (Senin, 24-3-14)	Pagi	6.57	6.23	5.87	6.22	6.37	6.42	6.20	5.99	6.08	6.17	5.93	6.10	6.20	6.30	5.99	
	Sore	5.97	6.55	6.09	6.37	6.00	6.14	6.59	6.29	6.34	6.56	6.26	6.35	6.40	6.60	5.88	
(Selasa, 25-3-14)	Pagi	6.41	6.40	6.53	6.17	6.26	6.45	6.50	6.20	6.04	6.37	6.19	6.53	6.3	5.8	6.1	
	Sore	5.86	6.43	6.07	6.56	6.78	6.77	6.5	6.10	6.67	6.3	6.67	6.14	6.14	6.0	6.22	
24 jam pasca penginfeksian (H0/Rabu,26-3-14)	Pagi	5.91	6.03	6.37	6.23	6.42	6.27	5.97	6.27	6.53	6.27	5.98	6.17	6.13	6.23	6.01	
	Sore	5.87	5.66	6.38	6.12	6.03	6.13	6.05	6.17	6.11	6.00	6,52	6.50	6.66	6.63	6.45	
H1/Kamis, 27 Maret 2014	Pagi	6.11	6.41	5.99	6.05	6.29	5.90	6.03	5.89	5.85	6.08	6.00	5.99	6.38	6.64	6.15	
	Sore	5.35	5.41	6.16	5.48	5.79	5.08	6.26	5.24	6.21	6.18	6.21	5.88	5.44	5.68	5.86	
H2/Jumat, 28 Maret 2014	Pagi	6.12	5.94	6.62	5.83	5.88	5.77	5.53	5.91	5.88	6.02	5.44	5.84	5.66	5.85	6.06	
	Sore	5.86	5.38	5.12	5.21	5.10	5.30	4.69	5.34	6.30	5.46	4.66	5.27	4.94	5.75	4.97	
H3/Sabtu, 29 Maret 2014	Pagi	6.29	6.31	6.45	6.40	6.55	6.23	6.53	6.19	6.55	5.82	6.55	6.40	6.54	6.51	6.41	
	Sore	6.67	6.06	5.89	5.63	5.89	5.85	6.13	5.97	6.12	6.14	5.53	6.21	6.07	6.14	6.04	
H4/Minggu, 30 Maret 2014	Pagi	5.48	5.86	5.67	5.74	5.74	5.56	5.23	5.74	6.63	5.58	5.37	6.80	5.74	6.51	5.50	
	Sore	4.76	5.58	4.95	4.86	5.00	5.17	4.05	5.33	5.31	5.00	4.89	3.99	4.55	5.61	4.10	
H5/Senin, 31 Maret 2014	Pagi	6.52	6.45	6.45	6.33	6.23	6.37	6.42	6.38	6.40	6.35	6.26	6.38	6.35	6.26	6.31	
	Sore	6.07	6.11	5.94	6.00	5.90	6.12	6.01	6.04	6.10	6.05	6.04	6.04	5.98	6.01	6.04	
H6/Selasa, 1 April 2014	Pagi	5.79	5.89	6.06	6.27	6.02	5.93	5.88	5.99	6.18	5.58	6.58	6.17	6.09	6.05	6.00	
	Sore	5.84	5.99	5.62	6.02	5.88	5.92	5.41	5.86	5.77	5.83	5.91	5.71	5.47	5.70	5.50	
H7/Rabu, 2 April 2014	Pagi	5.51	5.96	6.08	5.97	5.97	6.02	5.97	6.06	6.12	5,85	6.07	5.77	6.31	6.32	6.33	
	Sore	6.43	6.29	6.31	6.14	6.03	6.19	6.26	6.18	6.32	6.31	6.19	5.96	5.97	6.08	6.19	

Waktu/Tanggal	Waktu	PERLAKUAN															KETERANGAN
		A			B			C			D			Kontrol Positif			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
H8/Kamis, 3 April 2014	Pagi	6.57	6.23	5.87	6.22	6.37	6.42	6.20	5.99	6.08	6.17	5.93	6.10	6.20	6.30	5.99	
	Sore	5.97	6.55	6.09	6.37	6.00	6.14	6.59	6.29	6.34	6.56	6.26	6.35	6.40	6.60	5.88	
H9/Jumat, 4 April 2014	Pagi	6.41	6.40	6.53	6.17	6.26	6.45	6.50	6.20	6.04	6.37	6.19	6.53	6.3	5.8	6.1	
	Sore	5.86	6.43	6.07	6.56	6.78	6.77	6.5	6.10	6.67	6.3	6.67	6.14	6.14	6.0	6.22	
H10/Sabtu, 5 April 2014	Pagi	5.91	6.03	6.37	6.23	6.42	6.27	5.97	6.27	6.53	6.27	5.98	6.17	6.13	6.23	6.01	
	Sore	5.87	5.66	6.38	6.12	6.03	6.13	6.05	6.17	6.11	6.00	6,52	6.50	6.66	6.63	6.45	
H11/Minggu, 6 April 2014	Pagi	6.29	6.31	6.45	6.40	6.55	6.23	6.53	6.19	6.55	5.82	6.55	6.40	6.54	6.51	6.41	
	Sore	6.67	6.06	5.89	5.63	5.89	5.85	6.13	5.97	6.12	6.14	5.53	6.21	6.07	6.14	6.04	
H12/Senin, 7 April 2014	Pagi	5.48	5.86	5.67	5.74	5.74	5.56	5.23	5.74	6.63	5.58	5.37	6.80	5.74	6.51	5.50	
	Sore	4.76	5.58	4.95	4.86	5.00	5.17	4.05	5.33	5.31	5.00	4.89	3.99	4.55	5.61	4.10	
H13/Selasa, 8 April 2014	Pagi	6.52	6.45	6.45	6.33	6.23	6.37	6.42	6.38	6.40	6.35	6.26	6.38	6.35	6.26	6.31	
	Sore	6.07	6.11	5.94	6.00	5.90	6.12	6.01	6.04	6.10	6.05	6.04	6.04	5.98	6.01	6.04	
H14/Rabu, 9 April	Pagi	5.79	5.89	6.06	6.27	6.02	5.93	5.88	5.99	6.18	5.58	6.58	6.17	6.09	6.05	6.00	
	Sore	5.84	5.99	5.62	6.02	5.88	5.92	5.41	5.86	5.77	5.83	5.91	5.71	5.47	5.70	5.50	