

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BINAHONG (*Anredera cordifoli*) TERHADAP PERUBAHAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

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

Oleh:

**HURIYATUL FITRIYAH NOOR
NIM. 105080501111027**



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

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BINAHONG (*Anredera cordifoli*) TERHADAP PERUBAHAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

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

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

Oleh:

**HURIYATUL FITRIYAH NOOR
NIM. 105080501111027**



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BINAHONG (*Anredera cordifoli*) TERHADAP PERUBAHAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh:

HURIYATUL FITRIYAH NOOR
NIM. 105080501111027

DOSEN PENGUJI I

Prof. Ir. MARSOEDI, Ph.D
NIP. 19460320 197303 1 001
Tanggal:

DOSEN PENGUJI II

Ir. HENY SUPRASTYANI, MS
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal:

Menyetujui,
DOSEN PEMBIMBING I

Prof. Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS
NIP. 19611106 198602 2 001
Tanggal:

DOSEN PEMBIMBING II

Dr. Ir. MAFTUCH, M.SI
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal:

Mengetahui,
KETUA JURUSAN MSP

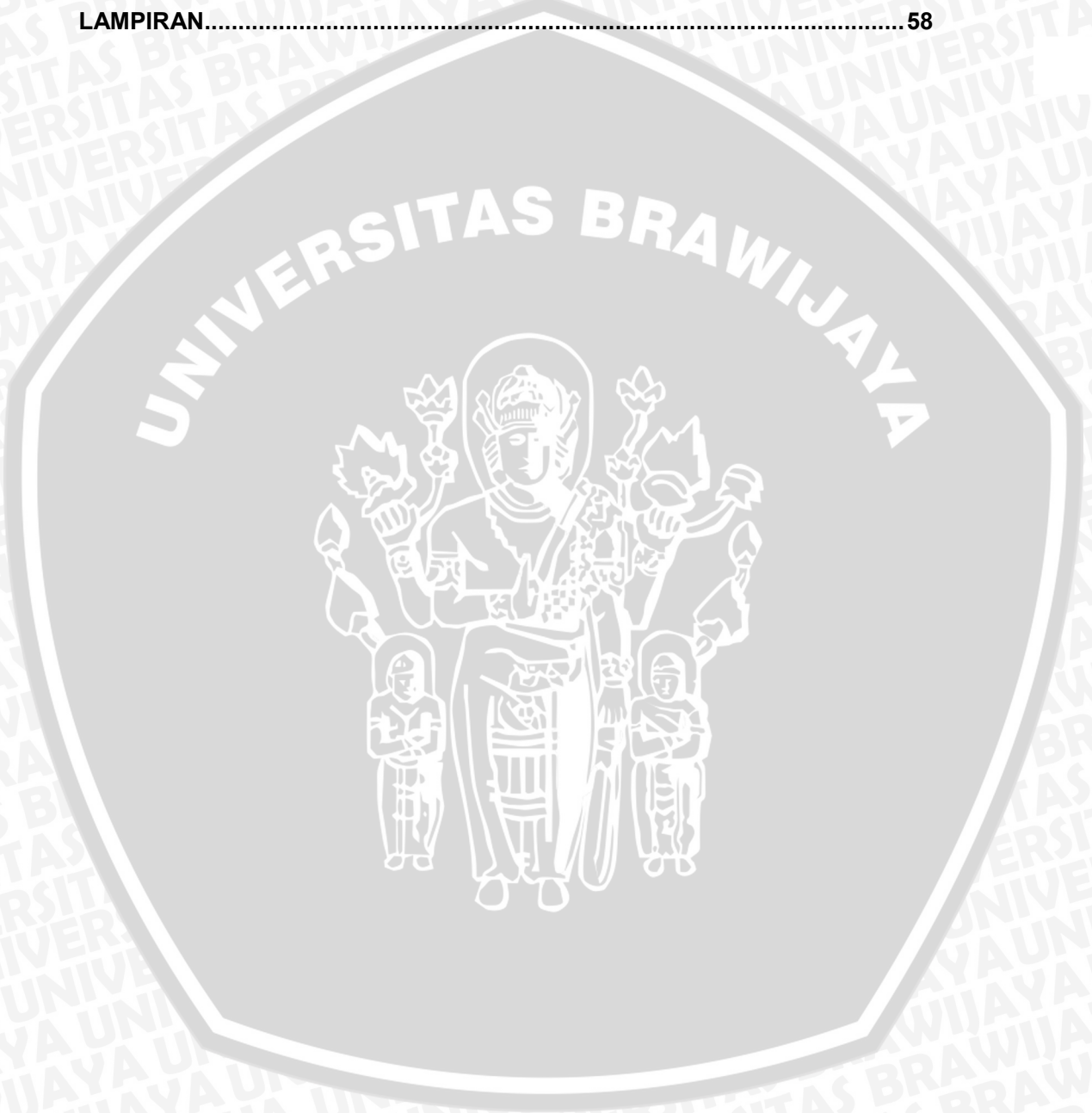
Dr. Ir. ARNING W. EKAWATI, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal:

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN ORISINALITAS	i
UCAPAN TERIMAKASIH	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Waktu dan Tempat	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Koi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Jenis Pakan dan Kebiasaan Makan	8
2.2 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Aeromonas hydrophila</i>	9
2.2.2 Pertumbuhan <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.2.3 Infeksi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.3 Binahong (<i>Anredera cordifolia</i>)	12
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Binahong	12
2.3.2 Habitat dan Penyebaran	13
2.3.3 Manfaat Buah dan Binahong	13
2.3.4 Kandungan Bahan Aktif Binahong	14
2.3.5 Kandungan Ekstrak Fenol Binahong	15

2.3.6 Peranan Larutan Fenol Dalam Imunologi	15
2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan Koi	16
2.5 Imunostimulan	16
2.4.1 Metode Pemberian Imunostimulan	16
2.4.2 Mekanisme Kerja Imunostimulan	18
2.6 Pengertian Histologi Jaringan	18
2.6.1 Pengamatan Histopatologi Jaringan	19
2.4.2 Pembuatan Preparat dalam Histopatologi	20
2.6 Ginjal Ikan	21
3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Materi Penelitian	23
3.1.1 Alat-alat Penelitian	23
3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian	24
3.2 Metode Penelitian	25
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Prosedur Penelitian	27
3.4.1 Persiapan Penelitian	28
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian	30
a. Perlakuan Pemberian Ekstrak Kasar	30
b. Penginfeksian Bakteri <i>A. hydrophila</i>	31
c. Pembuatan Histopatologi Jaringan Ginjal	31
3.5 Parameter Uji	33
3.5.1 Parameter Utama	33
3.6.2 Parameter Penunjang	33
a. Kualitas Air (Suhu, Ph, DO)	33
3.6 Analisa Data	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun Binahong	36
4.2 Gambaran Histopatologi Ginjal Ikan Koi	36
4.2.1 Gambaran Histopatologi Ginjal Ikan Sehat	36
4.2.2 Gambaran Histopatologi Perlakuan Pada Ginjal	38
a. Kerusakan Nekrosis Pada Jaringan Ginjal	39
b. Kerusakan Edema Pada Jaringan Ginjal	43
c. Kerusakan Kongesti Pada Jaringan Ginjal	47
4.3 Pengamatan Gejala Klinis	51

4.4 Pengamatan Kualitas air	52
5. Kesimpulan dan Saran	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	58



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>).....	7
2. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
3. Kurva Pertumbuhan Bakteri	11
4. Binahong (<i>Anredera cordifolia</i>).....	12
5. Alur Perhitungan Skoring	32
6. Histopatologi Jaringan Ginjal Normal dan Terinfeksi.....	37
7. Histopatologi Perlakuan.....	38
8. Grafik Hubungan Nilai Skoring dan Kerusakan Nekrosis.....	42
9. Grafik Hubungan Nilai Skoring dan Kerusakan Edema	46
10. Grafik Hubungan Nilai Skoring dan Kerusakan Kongesti.....	50



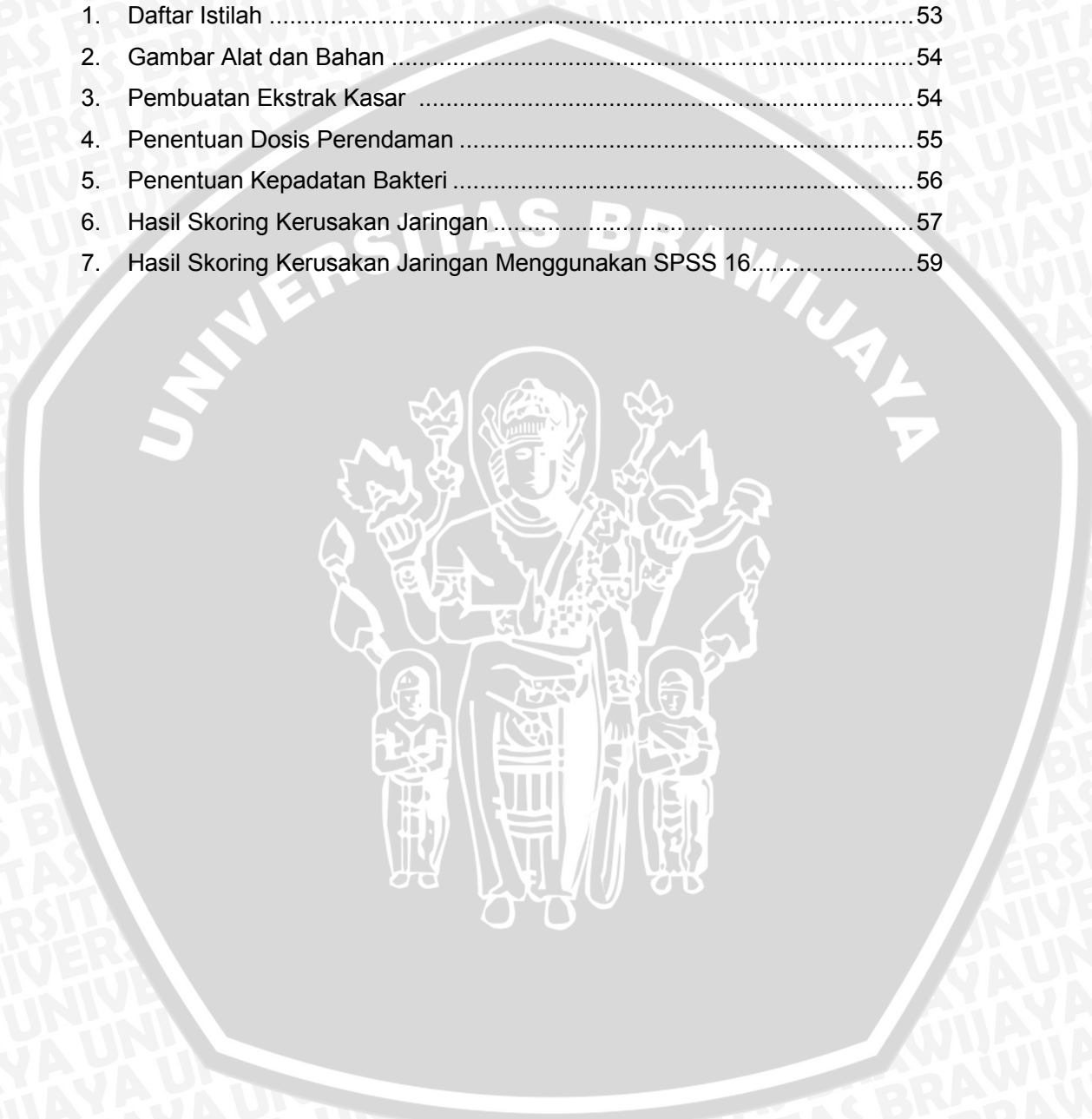
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat Penelitian secara In Vitro	23
2. Alat-alat Penelitian secara In Vivo.....	23
3. Bahan-bahan Penelitian secara In Vitro.....	24
4. Bahan-bahan Penelitian secara In Vivo	24
5. Rerata Skoring Nekrosis	40
6. Sidik Ragam Nekrosis.....	41
7. Uji BNT Nekrosis	41
8. Rerata Skoring Edema.....	43
9. Sidik Ragam Edema	44
10. Uji BNT Edema	45
11. Rerata Skoring Kongesti	47
12. Sidik Ragam Kongesti.....	48
13. Uji BNT Kongesti	49
14. Pengamatan Gejala Klinis.....	51
15. Kualitas Air	52



DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Daftar Istilah	53
2. Gambar Alat dan Bahan	54
3. Pembuatan Ekstrak Kasar	54
4. Penentuan Dosis Perendaman	55
5. Penentuan Kepadatan Bakteri	56
6. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan	57
7. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Menggunakan SPSS 16.....	59



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

Menurut Alex (2012), potensi ekonomis budidaya ikan hias lebih menggiurkan dibandingkan dengan ikan konsumsi. Dengan pola pemeliharaan dan pemberian makanan yang hampir sama dengan ikan konsumsi, budidaya ikan hias mampu menghasilkan pemasukan yang lebih besar karena harga ikan hias lebih mahal. Kunci membudidayakan ikan hias adalah telaten dan senang di dalam memeliharanya.

Menurut Purwaningsih (2007) dalam Musallamah, Sari, Hutami dan Mardia (2011), bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri yang mengakibatkan penyakit dan mampu menyebabkan kegagalan budidaya ikan air tawar, bakteri ini dapat menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian tinggi (80-100%) dalam waktu 1-2 minggu. Bakteri *Aeromonas hydrophilla* biasa menginfeksi pada seluruh tubuh disertai dengan pendarahan pada organ dalam tubuh ikan. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi yang bisa mengakibatkan kematian benih sampai 90% (Prajitno, 2009).

Menurut Samsundari (2006), penyakit yang menyerang tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor, yaitu kondisi dalam air, kondisi inang dan adanya jasad dan patogen (jasad penyakit). Untuk mengatasi permasalahan ini, selain dengan perbaikan kondisi lingkungan budidaya, maka penggunaan antibiotik guna mengobati penyakit infeksi bakteri sangat dianjurkan. Menurut Lukistyowati dan Kurniasih (2001), pemberian bahan kimia ini memang dapat mencegah maupun mengobati penyakit pada ikan bila digunakan dengan dosis yang tepat akan tetapi bila digunakan dengan tidak terkontrol maka dapat menimbulkan beberapa efek negatif. Residu antibiotik dapat mencemari lingkungan dan juga dapat ditemukan di tubuh ikan, sehingga ikan tidak aman untuk dikonsumsi oleh manusia.

Penyakit ikan banyak yang disebabkan oleh bakteri, terutama *Aeromonas hydrophilla*. Jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini adalah Haemorrhagic septicaemia. Gejala yang timbul adalah pendarahan pada berbagai organ dalam dan keracunan pada darah. Ikan yang terserang penyakit ini tampak membengkak disebabkan terkumpulnya cairan di dalam jaringan tubuh. Kemudian ada bisul-bisul yang akan pecah dan akan merusak permukaan kulit sampai di dalam daging (Kabata, 1985).

Pada saat ini penanggulangan penyakit *Aeromonas hydrophilla* dapat menggunakan bahan-bahan kimia atau antibiotik. Namun penggunaan bahan-bahan tersebut belum sesuai dengan harapan. Menurut Afrianto dan Liviawati (1992), bakteri *Aeromonas hydrophilla* itu sudah resisten terhadap beberapa antibiotik antara lain kloramfenikol, kanamisin, streptomisin dan ertitromysin. Selain dampak resistensi, antibiotik juga berpengaruh terhadap lingkungan dimana dapat menyebabkan penurunan kualitas air serta dapat terakumulasi dalam perairan dan tubuh.

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

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

1.2 Rumusan Masalah

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

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

Larutan daun binahong, (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diharapkan dapat meningkatkan respon imun pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan kandungan fenol yang tinggi didalamnya.

Dari uraian diatas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Berapa rendemen ekstrak kasar yang dihasilkan dari tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).
2. Berapa dosis ekstrak kasar yang dapat memberikan efek penurunan tingkat gejala klinis dan tingkat kerusakan histopstologi pada ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*)

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Mendapatkan rendemen ekstrak kasar dari *Anredera cordifolia*.
2. Mendapatkan dosis ekstrak kasar *Anredera cordifolia* yang dapat memberikan efek penurunan gejala klinis dan tingkat kerusakan pada histopatologi ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*).

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak kasar binahong (*Anredera cordifolia*) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi gambaran histopatologi jaringan ginjal ikan koi (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

H₁ : Diduga pemberian ekstrak kasar kemangi (*Anredera cordifolia*) dengan dosis yang berbeda dapat mempengaruhi gambaran histopatologi jaringan ginjal ikan koi (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium Mikroskopisi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari sampai Mei 2014.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat Biologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Klasifikasi ikan koi (*Cyprinus carpio*) menurut Alex. (2012), adalah:

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

Ikan koi mempunyai badan yang berbentuk torpedo dengan alat gerak berupa sirip. Sirip-sirip yang melengkapi bentuk morfologi koi adalah sebuah sirip punggung (*dorsal fin*), sebuah sirip anus (*anal fin*), sebuah sirip ekor (*caudal fin*) dan sepasang sirip dada (*pectoral fin*), sepasang sirip perut (*ventral fin*). Sirip-sirip tersebut sangat penting bagi koi untuk berpindah tempat. Morfologi koi tidak jauh berbeda dengan ikan species lainnya, badan koi ditutupi oleh dua lapisan kulit, yaitu kulit luar (epidermis) dan kulit dalam (dermis). Epidermis berguna untuk melindungi kulit dari lingkungan luar atau sebagai proteksi seperti benturan, kotoran, dan hama penyakit. Mengemukakan bahwa lapisan endodermis terdiri dari serat-serat penuh dengan sel. Pangkal sisik dan urat-urat terdapat pada lapisan ini, juga sel warna. Warna tubuh koi merupakan faktor yang paling menentukan daya tarik koi. Warna tubuh koi terdapat pada lapisan dermis mengandung pigmen atau warna seperti kuning, hitam, merah, dan putih (Prasetya, Kismiati dan Subekti, 2013).



Gambar 1. Ikan Koi *Cyprinus carpio* (Google image, 2014)

Pada umur 3 bulan, ikan dihitung dan diamati warnanya untuk melihat segregasi warna dan keberhasilan perlakuan. Sebagai patokan untuk menentukan jenis ikan koi hasil perlakuan adalah sebagai berikut; ikan koi putih: semua badan berwarna putih, ikan koi merah: semua badan berwarna merah, ikan koi hitam: semua bagian punggung ditutupi warna hitam, ikan koi putih - merah: badan berwarna dasar putih atau merah dengan bercak atau tambalan putih atau merah, ikan koi putih - hitam: badan ikan berwarna dasar putih atau hitam dengan bercak atau tambalan putih atau hitam, ikan koi hitam - merah: badan ikan berwarna dasar hitam atau merah dengan bercak atau tambalan hitam atau merah, ikan koi putih -merah-hitam: badan berwarna putih, merah dan hitam (Alimuddin *et al.*, 2002).

2.1.2 Habitat dan Daerah Penyebaran Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Ikan koi adalah ikan air tawar yang habitat aslinya perairan dangkal dengan arus air yang tidak begitu keras di sungai, danau, rawa-rawa, waduk dan genangan air lainnya. Ikan koi lebih suka mencari tempat yang aman (terutama di

tempat yang ditumbuhi rumput). Dari serangkaian penelitian, pertumbuhan panjang badan ikan koi secara maksimal tercapai setelah berumur 2 tahun. Sedangkan pertumbuhan berat badan maksimal tercapai setelah berumur 2 tahun. Sedangkan pertumbuhan berat badan maksimal tercapai pada umur 3 tahun. Ikan koi dapat tumbuh optimal, jika lokasi pemeliharannya berda pada ketinggian antara 150 – 1.000 m, suhu air antara 20-25°C (Kordi, 2010).

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

2.1.3 Jenis Pakan dan Kebiasaan Makan Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Ikan mas koi tergolong pemakan segala (omnivor). Pada ikan mas koi umur muda (ukuran 7 -10) memakan jasad hewan dan tumbuhan yang hidup di dasar perairan, misalnya *chironomidae*, *oligochaeta*, *tubificidae*, *epimidae*, *trichoptera*, *molusca*, dan sebagainya. Selain itu, juga memakan protozoa dan zooplankton seperti copepoda dan cladocera. Jasad - asad tersebut disedot bersama lumpurnya. Komponen makanan dimakan sedangkan lumpurnya dikeluarkan melalui mulut. Ikan - ikan dewasa yang dipelihara di kolam mencari sumber makanan (jasad - jasad renik) di sekeliling pematang kolam. Oleh sebab itu, pematang sering rusak dan longsar karena aktivitas ikan ini. Ikan mas koi juga suka mengaduk - aduk dasar kolam untuk mencari makan. Aktivitas ikan mas koi dalam mengaduk - aduk dasar perairan inilah menyebabkan ikan mas digolongkan ke dalam bottom *feeder* atau “pemakan dasar”. Aktivitas ini pula yang menyebabkan pemeliharaan ikan mas di sawah berhasil dengan baik, karena bnyak terdapat makanan di dasar perairan sawah (Kordi, 2010).

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

2.2 Sifat Biologi *Aeromonas* sp.

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Aeromonas* sp.

Menurut Holt (1979) dalam Prajitno (2007), klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut:

Filum	: Protophyta
Klas	: Schizomyecetes
Ordo	: Pseudomonodale
Sub Ordo	: Pseumodineae
Family	: Vibrionceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>



Gambar 2. Bakteri *Aeromonas hydrophilla* (Google image, 2014)

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

2.2 Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

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

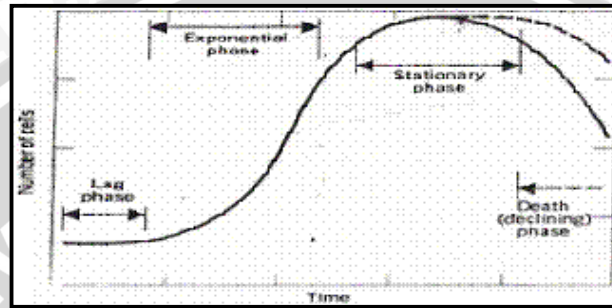
A. hydrophilla termasuk kelompok bakteri gram negatif yang tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38 - 41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0 - 5°C dengan kisaran Ph 5,5 – 9. Perkembangbiakan bakteri *A. hydrophilla* secara pembelahan biner (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.2.2 Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

Bila ikan stress maka daya tahan yang dimiliki oleh ikan akan melemah sehingga mudah terkena infeksi bakteri. Infeksi bakteri lamanya bervariasi, dari beberapa hari sampai beberapa minggu. Jadi dalam periode ini suatu penyakit memberikan informasi tentang penyebabnya. Infeksi oleh bakteri dapat terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, makanan ataupun masuk melalui ginjal, kemudian akan masuk ke pembuluh darah dan menyebar pada septicaemia (kracunan darah karena darah keluar dari pembuluh darah). Penularan penyakit ini melalui kontak langsung dengan ikan yang sakit, melalui alat, penanganan,

bagian sisa tubuh ikan, hewan atau tumbuhan air, serta aliran air bekas ikan yang terserang penyakit (Prajitno, 2007).

Penambahan dan pertumbuhan jumlah sel mikroba pada umumnya dapat digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan merupakan penjabaran dari penambahan jumlah sel dalam waktu tertentu.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan bakteri (Suriawiria, 1989).

Kurva di atas disebut sebagai kurva pertumbuhan bakteri. Ada empat fase pada pertumbuhan bakteri, sebagaimana tampak pada kurva, yaitu (Suriawiria, 1989):

➤ Fase Lag

Fase ini merupakan perubahan bentuk dan pertumbuhan jumlah individu tidak secara nyata terlihat. Fase ini dapat dinamakan sebagai fase adaptasi (penyesuaian) atau fase pengaturan jasad untuk suatu aktivitas di dalam lingkungan yang mungkin baru.

➤ Fase Eksponensial

Fase ini jasad mulai mengadakan perubahan bentuk dan meningkatkan jumlah sel sehingga kurva meningkat dengan tajam. Pe.

➤ Fase Stasioner

Fase yang menunjukkan puncak aktivitas pertumbuhan pada titik yang tidak dapat dilampaui lagi, sehingga pada fase ini gambaran grafik akan mendatar.

➤ Fase Kematian

Fase ini jumlah individu secara tajam akan menurun sehingga grafik tampaknya akan kembali ke titik awal.

2.3 Binahong (*Anredera cordifolia*)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Binahong *Anredera cordifolia*.

Klasifikasi binahong menurut Suhirman dan Winarti (2010), sebagai berikut:

Divisi	:Magnoliophyta
Kels	:Magnoliopsida
Ordo	:Caryophyllales
Famili	:Basellaceae
Genus	:Anredera
Spesies	: <i>Anredera cordifolia</i>



Gambar 4. Binahong *Anredera cordifolia* (Google image, 2014)

Binahong atau *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis merupakan tanaman yang memiliki nama genus *Anredera* dan tergolong Famili *Basellaceae*. Tumbuhan ini sering digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional, diantaranya untuk menyembuhkan luka bakar, luka setelah operasi, rematik,

asam urat, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke, wasir, radang usus (Manoi, (2009) dalam Rahmawati., et al (2010).

2.3.2 Habitat dan Penyebaran Binahong *Anredera cordifolia*

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) termasuk dalam famili Basellaceae merupakan salah satu tanaman obat yang mempunyai potensi besar ke depan untuk diteliti, karena dari tanaman ini masih banyak yang perlu digali sebagai bahan fito farmaka. Tanaman ini sebenarnya berasal dari Cina dan menyebar ke Asia Tenggara. Di negara Eropa maupun Amerika, tanaman ini cukup dikenal, tetapi para ahli di sana belum tertarik untuk meneliti serius dan mendalam, padahal beragam khasiat sebagai obat telah diakui. Di Indonesia tanaman ini dikenal sebagai gendola yang sering digunakan sebagai gapura yang melingkar di atas jalan taman. Namun tanaman ini belum banyak dikenal dalam masyarakat Indonesia (Karouw, Rindengan dan Balitka, 2009).

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) contohnya. Binahong adalah tanaman yang berasal dari Amerika Selatan dan dataran Cina. Di Cina tanaman binahong lebih dikenal dengan nama Deng San Chi. Tumbuhan ini telah dikenal memiliki khasiat penyembuhan yang luar biasa dan telah ribuan tahun lamanya dikonsumsi oleh bangsa Tiongkok . Secara umum, hampir semua bagian dari tumbuhan binahong dapat dimanfaatkan untuk tujuan pengobatan. Misalnya biji binahong dapat dipergunakan untuk penyembuhan diabetes, pembengkakan liver dan radang usus. Sementara daun binahong dapat dimanfaatkan untuk reumatik dan penyembuhan luka (Ferry, 2008).

2.3.3 Manfaat dan Kegunaan Binahong *Anredera cordifolia*

Manfaat tanaman ini sangat besar dalam dunia pengobatan, secara empiris binahong dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Dalam pengobatan, bagian tanaman yang digunakan dapat berasal dari akar, batang,

daun, dan bunga maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Tanaman ini dikenal dengan sebutan *Madeira Vine* dipercaya memiliki kandungan antioksidan tinggi dan antivirus (Karouw *et al.*, 2009).

Menurut Christiawan dan David (2010), Salah satu tanaman tradisional yang sering digunakan sebagai obat adalah *Anredera cordifolia* atau yang oleh masyarakat disebut dengan nama Binahong. Daun Binahong yang dihancurkan dipercaya berkhasiat untuk mencegah infeksi pada luka bakar, sehingga secara tidak langsung dapat mempercepat proses penyembuhan luka bakar.

Menurut Sanarto, Bambang dan Stanley (2010), di Cina tanaman binahong lebih dikenal dengan nama Deng San Chi. Tumbuhan ini telah dikenal memiliki khasiat penyembuhan yang luar biasa dan telah ribuan tahun lamanya dikonsumsi oleh bangsa Tiongkok. Secara umum, hampir semua bagian dari tumbuhan binahong dapat dimanfaatkan untuk tujuan pengobatan. Misalnya biji binahong dapat dipergunakan untuk penyembuhan diabetes, pembengkakan liver dan radang usus. Sementara daun binahong dapat dimanfaatkan untuk reumatik dan penyembuhan luka.

2.3.4 Kandungan Bahan Aktif pada Binahong *Anredera cordifolia*

Kandungan Kimia *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa terdapat kandungan metabolit sekunder jenis flavonoid, alkaloid, polifenol, triterpenoid, saponin. Daun binahong mengandung flavonoid, alkaloid, Saponin, dan glikosida (Murni *et al.*, (2011) dalam Rahmawati, Enny, dan Dewi (2010).

Menurut Umar, Krihariyani dan Diah (2012), zat antimikroba yang terdapat pada daun binahong yaitu flavonoid, polifenol, saponin, alkaloid, terpenoid, minyak atsiri, tanin. Khasiat dari daun binahong adalah melancarkan dan menormalkan peredaran darah dan mengembalikan vitalitas daya tahan

tubuh, ambeien, melancarkan buang air kecil, buang air besar, diabetes, rematik asam urat dan sariawan.

2.3.5 Kandungan Ekstrak Fenol pada Binahong *Anredera cordifolia*

Menurut Karouw *et al.*, (2009), binahong akan memproduksi berbagai senyawa dan senyawa ini disebut dengan metabolit sekunder. Untuk mengungkapkan ada apa dibalik khasiat tanaman binahong maka perlu dilakukan penelitian lebih jauh mengenai kandungan senyawa aktif. Dari hasil penelitian pendahuluan Universitas Gadjah Mada, dinyatakan bahwa pada kultur *in vitro* daun binahong terkandung senyawa aktif flavonoid. Senyawa-senyawa ini dapat berperan sesuai fungsinya masing-masing. Kemampuan binahong untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit ini berkaitan erat dengan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya seperti flavonoid. Flavonoid dapat berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri dan virus.

Flavonoid pada daun binahong berfungsi sebagai antioksidan. Manfaat lainnya adalah untuk melindungi struktur sel tubuh. Flavonoid mengandung senyawa fenol. Fenol merupakan suatu alkohol yang bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat. Fenol memiliki kemampuan untuk mendenaturasikan protein dan merusak membran sel. Fenol berkaitan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak (Umar *et al.*, 2012).

2.3.6 Peranan Larutan Fenol dalam Bidang Imunologi

Menurut Samsundari (2006), beberapa group senyawa kimia utama yang bersifat anti mikroba adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, logam berta dan senyawanya, zat warna, dan deterjen, senyawa ammonium khemosterilan. Kandungan fenol dapat menyebabkan protein mengalami denaturasi. Prosesnya

didahului oleh perubahan struktur molekul yang menyebabkan protein tidak dapat melakukan fungsinya sehingga sel bakteri mengalami kematian.

Pada umumnya minyak astiri, tani dan flavonoid berkhasiat anti mikroba dan meningkatkan sistem imun tubuh dengan menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler. Pada penelitian sebelumnya flavonoid yang merupakan senyawa dari polifenol telah menunjukkan efek anti mikroba dan meningkatkan sistem imun (Chrishnaningsih, 2006).

2.4 Sistem Pertahanan Pada Tubuh Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Menurut Alifuddin (2002), respon dan faktor humoral antara lain antibodi, transferin, interferon, protein C-reaktif, respon dan faktor seluler seperti sel makrofag, sel killer (neutrofil reaksi penolakan allograf dan hipersensitivitas. Selain itu, baris mekanik dan kimiawi permukaan seperti kulit, sisik dan mukus pada permukaan tubuh dan ginjal juga merupakan alat pertahanan tubuh ikan yang bersifat non-spesifik. Respon humoral merupakan respon yang bersifat spesifik dilakukan oleh sesuatu substansi yang dikenal sebagai antibodi atau imunoglobulin, sedangkan respon seluler ikan bersifat non-spesifik dilakukan oleh "*cell mediated imunity*". Komunikator dan amplikator dalam fungsi dan mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan dilakukan oleh limfokin, interleukin, interferon dan sitokin.

2.5 Imunostimulan

2.5.1 Metode Pemberian Imunostimulan

Dosis imunostimulan yang digunakan sebesar 100-200 ppm. Imunostimulan ini dapat diberikan secara terus menerus selama 1 minggu kepada larva ikan ketika masih dalam hapa pendederan; kemudian dihentikan pemberiannya, diberikan kembali pada minggu ke 3 selama satu minggu. Karena itu, pada tahap awal, imunostimulan diberikan melalui perendaman, dan pada

pemberian selanjutnya dapat diberikan bersama pakan. Pemilihan cara aplikasi imunostimulan didasarkan atas kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya (Alifuddin, 2002).

Menurut Jasmanidar (2009), imunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan imunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Dugger dan Jory (1999) dalam Jasmanidar (2009), menyatakan bahwa pemberian imunostimulan secara luas dengan maksud untuk mengaktifkan sistem imun non spesifik sel seperti makrofag pada vertebrata dan *hemocyte* pada avertebrata. Pemberian imunostimulan dapat dilakukan dengan :

- Penyuntikan : penyuntikan *beta glucan* dan stimulant imun lainnya dapat memberikan respon non spesifik yang kuat, tetapi biasa tidak praktis dan efektif dalam hal biaya dalam usaha budidaya.
- Perendaman : memberikan respon imun non spesifik yang sedikit, tetapi lebih efektif dalam hal biaya daripada dengan penyuntikan. Namun dapat menimbulkan stress karena meningkatnya penanganan dan kepadatan dalam perendaman. Makrofag dapat diaktifkan pada fase larva ikan.
- Oral : memberikan respon imun non spesifik yang baik dan merupakan metode yang lebih efektif.

Seperti halnya dengan vaksin, imunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (oral) dan perendaman. Pemilihan cara aplikasi imunostimulan ini didasarkan pada kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya. Pemanfaatan dalam kegiatan budidaya ini dapat mengoptimalkan produksi budidaya melalui peningkatan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit infeksi (Anderson, 1990 dalam Jasmanidar, 2009).

2.5.2 Mekanisme Kerja Imunostimulan

Ikan yang diberikan imunostimulan biasanya menunjukkan peningkatan aktivitas sel fagositik. Aktifitas sel fagositik dapat dideteksi dengan fagositosis, *killing* dan *chemotaxis*. Meningkatnya genetik yang terbunuh adalah sangat penting pada makrofag dari ikan yang diberi imunostimulan. *Killing mechanism makrifage* dapat dikategorikan sebagai *oxygen-dependent* atau *oxygen-independent*. *Oksigen-dependent killing mechanism* dimediasikan oleh *reactive oxygen species* (ROS) dapat dideteksi dengan *chemiluminescence* dan uji NBT (Kajita *et al.*, 1990 *dalam* Jasmanidar, 2009). Limfosit juga diaktifkan oleh imunostimulan, aktifitas lisozim juga dipengaruhi oleh pemberian imunostimulan (Jorgensen *et al.*, 1993 *dalam* Jasmanidar, 2009).

Berbeda dengan vaksin, imunostimulan tidak direspon ikan dengan mensintesis antibodi, melainkan peningkatan aktivitas dan reaktivitas sel pertahanan seluler ataupun humoral. Secara *in vitro* peningkatan respon seluler ditunjukkan oleh aktivitas fagositik yang diukur melalui uji nitro blue tetrazolium (NBT) (Anderson dan Siwicki (1993) *dalam* Alifuddin, 2002). Alifuddin (1989) *dalam* Alifuddin (2002) menambahkan peningkatan ini didasarkan atas kemampuan imunostimulan menginduksi berlangsungnya transformasi limfoblastik yang ditunjukkan dengan memakai isotop tritium (H3). Aktivitas fagositik ini merupakan manifestasi peningkatan respon seluler dan pada akhirnya akan meningkatkan respon humoral.

2.6 Pengertian Histologi Jaringan Ginjal

Panigoro, Astuti, Bahnan, Prayudha, Salfira, dan Wakita., (2007), menyatakan bahwa histologi berasal dari kata histo dan logos. Histo berarti jaringan dan logos berarti ilmu sehingga histologi adalah ilmu yang mempelajari sel, organ, dan jaringan tubuh secara mikroskopik. Histology sangat diperlukan

dalam mempelajari struktur jaringan normal suatu organ atau alat tubuh lain baik striktur anatomi maupun fisiologi. Hal ini sangat penting dalam mengenali suatu kondisi patologi yang merupakan akibat suatu penyakit da perubahan-perubahan selular. Ilmu yang mempelajari kelainan patologi (abnormal) suatu jaringan disebut histopatologi.

Menurut Martinez and Marina (2007) *dalam* Setyowati *et al.*, (2012), analisa histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ-organ yang menjadi sasaran utama dari bahan pencemar seperti ginjal, hati, ginjal dan sebagainya. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring lingkungan dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme.

2.6.1 Pengamatan Histopatologi Jaringan

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

Persiapan jaringan melalui tahap fiksasi, pemotongan jaringan, pelabelan specimen, refiksasi, dan dekalsifikasi. Selanjutnya, pengolahan jaringan dilakukan dengan tahap dehidrasi, penjernihan, penyusupan parafin dan pembuatan blok. Jaringan berparafin dalam bentuk blok yang akan dibuat irisan

tipis jaringan dengan mikrotom sehingga menjadi preparat yang dapat diwarnai dengan beberapa jenis pewarna jaringan, seperti pewarnaan hematoksilin eosin, giemsa dan lain-lain (Panigoro *et al.*, 2007).

2.6.2 Pembuatan Preparat dalam Histopatologi

Menurut Susanto (2008), ikan dibedah kemudian diambil sebagian organ usus, otot, insang dan diawetkan dalam larutan fiksatif Bufer Netral Formalin (BNF) 10% selama 1-2 hari. Setelah itu organ ditrimming dan dimasukkan ke dalam kaset plastik untuk dibuat blok lilin. Blok lilin yang terbentuk di potong dengan menggunakan mesin mikrotom dan diletakkan di gelas objek. Setelah itu dilakukan pewarnaan HE (Haematoxillin Eosin). Pertama kali dimasukan ke dalam xylol I, xylol II, alkohol absolut, alkohol 95% dan alkohol 85% masing-masing selama dua menit. Setelah itu secara berurutan dicuci dengan air kran selama satu menit, direndam pada larutan pewarna Haematoxilin selama delapan menit, dicuci dengan air kran selama 30 detik, dimasukkan ke lithium carbonat selama 15-30 detik, kemudian dicuci dengan air kran selama 2 menit dan dimasukkan ke eosin selama 2-3 menit. Setelah itu secara berlawanan seperti perlakuan awal di celupkan ke dalam alkohol 85%, alkohol 95%, alkohol absolut, xylol I dan xylol II masing-masing dua menit. Preparat di keringkan dan ditutup dengan *cover glass* yang diberi perekat

Menurut Harteman (2013), pembuatan preparasi hati, ginjal, insang, otot dan kulit ikan yang sudah difiksasi, dihidrasi selama 12 jam dalam xylene, alkohol absolute, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70%. Sampel yang sudah selesai dihidrasi, direndam dalam parafin panas (60°C) selama 40 menit, selanjutnya dideparafinisasi. Sampel organ tubuh ikan yang sudah berbentuk blok parafin dimikrotom dengan ketebalan setebal 5 µm. Potongan contoh organ tubuh ikan diletakkan di atas permukaan air panas (40°C) selanjutnya ditempel pada

permukaan (objek glass). Sampel yang menempel pada slides dihidrasi menggunakan xylene, alkohol absolute, alkohol 95%, 90%, 80%, 70% dan dibersihkan dengan air. Pada setiap tahapan hidrasi dilakukan selama 3 detik. Selanjutnya jaringan yang menempel pada slides direndam dalam larutan hematoxylin selama 2 jam. Setelah itu, dicuci dengan akuades dan dihidrasi dengan cara dicelupkan 3 kali dalam alkohol 95%, alkohol absolute dan xylene. Selanjutnya sampel yang menempel pada slides ditetaskan entelan 1-2 kali dan ditutup dengan cover glass. Setelah entelan kering, preparasi diamati dengan mikroskop cahaya, difoto, dan dianalisis.

2.7 Ginjal Ikan

Menurut Erlangga (2011), bahan pencemar yang pertama sekali masuk ke dalam tubuh ikan melalui organ pernafasan yaitu insang menyaring bahan pencemar masuk ke dalam tubuh, selanjutnya didistribusikan ke seluruh tubuh melalui aliran darah dan akhirnya terakumulasi di ginjal ikan. Peningkatan kandungan logam Pb dan Cd di ginjal terjadi karena intensitas masuknya logam ke dalam tubuh ikan yang terus menerus, sehingga ginjal mempunyai keterbatasan dalam menganulir bahan pencemar yang terus masuk ke dalam tubuh.

Jun *et al.*, (2010) dalam Aniatih, Idris dan Sabilu (2013), mengemukakan bahwa perubahan patologi pada ginjal ikan *korean cyprinid loach (Misgurnus anguillicaudatus)* yang terinfeksi *A. hydrophila* yaitu degenerasi pada tubulus distal dan pada glomerulus serta jaringan hematopoetik mengalami nekrotik. Beberapa kerusakan ginjal yang sering ditemukan pada ikan yang terserang bakteri *A. hydrophila* yakni:

- a. Nekrosis

Menurut Ersa (2008), nekrosis adalah kematian sel-sel atau jaringan. Karakteristik dari jaringan nekrotik, yaitu memiliki warna yang lebih pucat dari warna normal, hilangnya daya rentang (jaringan menjadi rapuh dan mudah terkoyak), atau memiliki konsistensi yang buruk atau pucat.

b. Edema

Menurut Ersa (2008), edema adalah suatu akumulasi cairan yang abnormal di dalam rongga-rongga tubuh dari jaringan dan organ yang dapat mengakibatkan kebengkakan. Edema ditandai oleh adanya cairan kuning di dalam rongga abdominal atau material encer atau berair. Kondisi-kondisi ini dapat dihubungkan dengan bahan-bahan toksik kimia, virus, bakteri dan penyakit parasitik. Kerusakan mekanis atau penyakit dapat mempengaruhi ikan terhadap infeksi lebih lanjut karena ikan yang otot nya mengalami kerusakan edema akan menyediakan suatu medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri.

c. Kongesti

Lukistyowati dan Kurniasih (2011), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit.

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1 untuk penelitian secara *in vitro* dan Tabel 2 untuk penelitian secara *in vivo*.

Tabel 1. Alat penelitian yang dibutuhkan untuk mendapatkan ekstrak secara *in vitro*.

No	Alat	Fungsi
1.	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan
2.	Hot Plate	Sebagai alat pemanas
3.	Baskom	Sebagai tempat bahan
4.	Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
5.	Beaker Glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
6.	Gelas Ukur	Sebagai alat dalam mengukur bahan larutan
7.	Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
8.	Nampan	Sebagai tempat bahan dalam proses waterbath
9.	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur panjang gelombang bahan
10.	Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
11.	Vortex	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
12.	Toples 2L	Sebagai wadah untuk maserasi
13.	Waterbath	Sebagai alat pemanas
14.	<i>Rotary evaporator</i>	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak fenol

Tabel 2. Alat penelitian yang dibutuhkan untuk uji imunostimulan secara *in vivo*

No	Alat	Fungsi
1.	Akuarium	Sebagai wadah air media
2.	Aerator dan Batu Aerasi	Sebagai alat bantu penghasil oksigen
3.	Selang Aerator	Sebagai alat bantu aerasi
4.	Scoop Net	Sebagai alat untuk memindahkan ikan uji
5.	Termometer	Sebagai alat untuk mengukur suhu
6.	pH Meter	Sebagai alat untuk mengukur pH air media
7.	DO Meter	Sebagai alat untuk mengukur kandungan oksigen terlarut
8.	Mikroskop	Sebagai alat untuk mengamati jaringan otot ikan
9.	Sectio set	Sebagai alat bedah pada jaringan
10.	Botol Film	Sebagai wadah jaringan dan larutan uji histopatologi
11.	<i>Tissue Proccesor</i>	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
12.	Wadah <i>embedding</i>	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan (<i>embedding</i>)
13.	<i>Embedding</i>	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan

	Machine'LEICA EG 1120	(embedding)
15.	Mikrotom rotary	Sebagai alat untuk pemotongan jaringan
16.	Pisau Mikrotom	Sebagai alat untuk pemotongan jaringan
17.	Pinset	Sebagai alat untuk mengambil sampel jaringan
18.	Tissue Floath Bath	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
19.	Objek Glass	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
20.	Cover Glass	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
21.	Water bath	Sebagai alat untuk memanaskan sampel
22.	Oven	Sebagai alat untuk memanaskan sampel
23.	Fotomikroskop	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
24.	Cetakan Es	Sebagai alat untuk meletakkan blok parafin

3.1.2 Bahan

Bahan beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 3 untuk penelitian secara *in vitro* dan Tabel 4 untuk penelitian secara *in vivo*.

Tabel 3. Bahan penelitian yang dibutuhkan untuk mendapatkan ekstrak secara *in vitro*.

No	Alat	Fungsi
1.	Binahong <i>Anredera cordifolia</i>	Sebagai bahan immunostimulan
2.	Kertas Label	Sebagai penanda
3.	Kertas Saring	Sebagai bahan untuk menyaring ekstrak
4.	Tissue	Sebagai bahan pembersih
5.	Masker	Sebagai penutup mulut
6.	Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan
7.	Akuabides	Sebagai pelarut ekstrak

Tabel 4. Bahan penelitian yang dibutuhkan untuk uji imunostimulan secara *in vivo*

No	Alat	Fungsi
1.	Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	Sebagai hewan uji
2.	Bakteri <i>Aeromonas hydrophilla</i>	Sebagai bahan penginfeksi
3.	Air Media	Sebagai media hidup hewan uji
4.	Pakan Ikan	Sebagai nutrisi ikan uji
5.	Akuades	Sebagai bahan sterilisasi awal
6.	Formalin 10%/ Larutan Bouin	Sebagai bahan pengawet jaringan otot
7.	Aceton	Sebagai bahan pengawet jaringan ginjal (proses <i>dehidrasi</i>)
8.	Xylol	Sebagai bahan pengawet jaringan ginjal (proses <i>cleaning</i>)
9.	Parafin cair	Sebagai bahan pengawet jaringan ginjal (proses <i>impregnasi</i>)
10.	Parafin blok	Sebagai bahan pengawet jaringan ginjal

		(proses <i>embedding</i>)
11.	Gelatin	Sebagai bahan campuran saat pemanasan sampel
12.	Alkohol 96%	Sebagai bahan pengawet jaringan ginjal (proses deparafinisasi)
13.	Hematoksilin	Sebagai bahan pewarna pada jaringan ginjal
14.	Eosin	Sebagai bahan pewarna pada jaringan ginjal
15.	Litium Karbonat	Sebagai bahan untuk memekatkan warna pigmen
16.	<i>Entellan</i> (Lem)/ <i>cannada balsem</i>	Sebagai bahan perekat sampel pada <i>cover glass</i>

3.2 Metode Penelitian

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

Metode penelitian dalam menganalisa gejala klinis menggunakan metode deskriptif yaitu menurut Hartoto (2009), penelitian deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasi objek sesuai dengan apa adanya. Penggunaan metode deskriptif, penelitian memungkinkan untuk melakukan hubungan antar variabel, menguji hipotesis, mengembangkan generalisasi, dan mengembangkan teori yang memiliki validitas universal. Selain itu, penelitian deskriptif juga merupakan penelitian yang dilakukan dengan pengumpulan data untuk melihat pertanyaan penelitian atau hipotesis yang berkaitan dengan keadaan dan kejadian sekarang.

3.3 Rancangan Penelitian

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

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

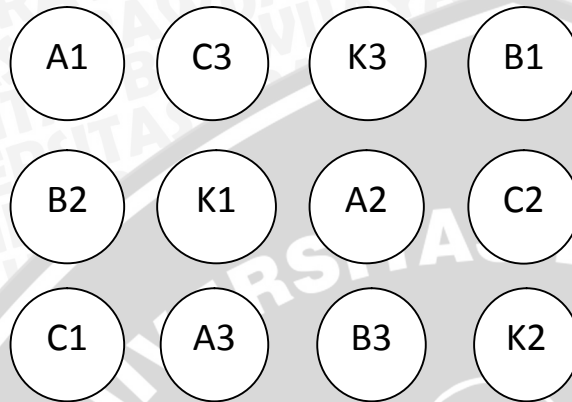
ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini terdiri dari satu faktor penelitian dengan 3 perlakuan dan 1 kontrol dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis larutan binahong terhadap ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Sebagai perlakuan, ikan koi berukuran 8-10 cm yang sudah terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Dosis ekstrak binahong yang digunakan adalah:

- A : Dosis binahong 200 ppm
- B : Dosis binahong 400 ppm
- C : Dosis binahong 600 ppm

Ulangan yang dipergunakan sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian sebagai berikut.



A, B, C = Perlakuan

K = Kontrol

1, 2, 3 = Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Pembuatan ekstrak binahong. *Anredera cordifolia* (Lampiran 2)

Daun binahong (*A.cordifolia*) diperoleh dari tanaman pekarangan rumah di kota Malang, Jawa Timur sebanyak 2 kg. Daun dicuci sampai bersih, lalu ditiriskan. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kering selama 5 hari, setelah kering diblender sampai menjadi bubuk.

Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi dengan cara melarutkan serbuk simplisia sebanyak 50 gram ke dalam 150 ml etanol 96% lalu ditutup dengan alumunium foil dan dibiarkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam, sampel yang direndam tersebut disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Filtrat dievaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun binahong. Kemudian dilanjutkan

pemekatan ekstrak dengan penangas air (*water bath*) dengan suhu 50°C sampai hampir kering untuk menghilangkan kadar air (Dayanti *et al.*, 2012).

b. Uji Pendahuluan

• **Penentuan dosis ekstrak *A.cordifolia* (Lampiran 2.)**

Ekstrak kasar *A.cordifolia* dengan dosis 400, 600, 800, 1000 dan 1200 ppm, masing-masing bahan ekstrak dilarutkan ke dalam 10 liter air. Ikan koi (*Cyprinus carpio*) sebanyak 10 ekor, dimasukkan dalam akuarium dengan dosis yang berbeda. Perendaman dilakukan sampai kematian ikan mencapai 50% dalam range waktu 24 jam. Hasil yang diperoleh adalah kematian ikan sampai 50% terjadi pertama pada dosis 800 ppm sehingga diasumsikan dosis yang digunakan adalah kurang dari 800 ppm. Menurut Novita, Lesje dan Novi (2012), dosis perlakuan yang digunakan dalam uji adalah 200, 400 dan 600 ppm. Perendaman ikan uji dilakukan dengan cara: merendam ikan pada wadah plastik yang berukuran 10 liter yang berisi larutan sesuai dengan dosis.

• **Respon Imun Ikan koi (*Cyprinus carpio*) Terhadap Ekstrak (*A.cordifolia*)**

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan ukuran 8-10 cm diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian dilakukan pemberian ekstrak daun binahong sebagai immunostimulan dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 200, 400 dan 600 ppm. Volume air yang digunakan untuk media perendaman sebanyak 10 liter, kemudian dicampurkan dengan ekstrak kasar (*A.cordifolia*) sesuai dengan dosis yang ditentukan. Perendaman dengan ekstrak kasar *A.cordifolia* dengan dosis yang berbeda 5, 50, dan 500 menit. Sebelum perendaman Ikan koi (*Cyprinus carpio*) di ambil darahnya. Kemudian proses adaptasi 48 jam dan di ambil darahnya lagi untuk mengetahui kenaikan leukosit pada Ikan koi (*Cyprinus carpio*). Uji respon imun ini dilakukan 2 kali pengulangan untuk mendapatkan waktu terbaik uji respon imun. Hasil yang

didapatkan dari uji respon imun ini adalah jumlah leukosit terbaik pada waktu perendaman 50 menit.

- **Penentuan kepadatan bakteri *A.hydrophilla* (Lampiran 4)**

Bakteri *A.hydrophilla* dengan kepadatan yang berbeda 10^6 , 10^7 , 10^8 sel/ml. Masing-masing kepadatan bakteri dilarutkan ke dalam 10 liter air. Ikan koi (*Cyprinus carpio*) sebanyak 10 ekor, dimasukkan dalam akuarium dengan kepadatan bakteri yang berbeda. Perendaman dilakukan sampai kematian ikan mencapai 50% dalam range waktu 24 jam. Hasil yang diperoleh adalah kematian ikan sampai 50% terjadi pertama kali pada kepadatan 10^8 sehingga diasumsikan kepadatan bakteri yang dipakai dalam infeksi kurang dari 10^8 . Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan koi yaitu dengan kepadatan 10^7 sel/ml (Selvaraj *et al.*, 2009 dalam Samad, 2010).

- c. **Pengenceran bakteri *A.hydrophila***

Bakteri *A.hydrophila* diperoleh dari Balai Karantina Juanda dengan kepadatan 10^9 (lampiran 3). Bakteri yang baik dipakai dalam uji adalah di bawah 10^8 sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino (1988), sebagai berikut :

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

Dimana :

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

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

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

d. Persiapan alat

- Pencucian akuarium
- Persiapan alat-alat pendukung (aerasi, termometer, timbangan, seser dan lain-lain)
- Pengisian air pada akuarium (ukuran akuarium 30x30x30 cm)

e. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu Ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan ukuran 8-10 cm sebanyak 10 ekor untuk masing-masing akuarium. Berikut langkah-langkah dalam persiapan hewan uji :

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

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian**a. Perlakuan Pemberian Ekstrak Kasar**

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) diadaptasikan (aklimatisasi) selama 1 minggu. Media (air) sebelum digunakan telah di *treatment* terlebih dahulu dengan pemberian 1 ml chlorin dalam masing-masing akuarium (volume air 10 liter), selama 1 hari sebagai desinfektan dan membersihkan akuarium dari bakteri dan kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian diberikan 2 ml Na-thiosulfat untuk menghilangkan toksik dari efek perlakuan chlorin selama 1 hari. Langkah selanjutnya, akuarium dibersihkan menggunakan air bersih dan didiamkan selama 1 hari, akuarium siap untuk digunakan. Setelah dilakukan *treatment*, masing-masing akuarium diisi air sebanyak 10 liter (2/3 volume akuarium) dan diberi aerasi. Kemudian dilakukan pemberian ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) dengan cara perendaman dengan konsentrasi yang berbeda yaitu

200 ppm, 400 ppm dan 600 ppm selama 50 menit. Setelah direndam selama 50 menit, ikan uji dipindahkan ke akuarium yang berisi air tanpa ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*).

b. Penginfeksian Bakteri *A. hydrophila*

Penginfeksian dilakukan maksimal 24 jam setelah perendaman ekstrak yang kedua. Penginfeksian menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman pada akuarium yang berbeda selama 24 jam dengan kepadatan bakteri 10^7 sel/ml. Dari hasil perhitungan pengenceran bakteri, dapat diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan untuk penginfeksian sebanyak 0,1 liter dan air tawar sebanyak 9,9 liter (lampiran 4). Selanjutnya, 10 ekor ikan koi dimasukkan dalam akuarium berisi bakteri *A. hydrophila* dan direndam selama 24 jam sampai ikan menunjukkan gejala-gejala terkena *A. hydrophila* (warna tubuh pucat, berenang tidak seimbang dan sering ke permukaan). Kemudian setelah diinfeksi, ikan dipindahkan ke akuarium tanpa ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) maupun bakteri *A. Hydrophila* dan diamati gejala klinis selama 7 hari.

c. Pembuatan Histopatologi Ginjal Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

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

- Tahap Fiksasi

Sampel Ginjal ikan yang akan diamati jaringannya diambil. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan buffer yaitu formalin 10% selama 24 jam.

- Tahap Dehidrasi

Tahap dehidrasi dilakukan dengan penarikan air secara bertahap menggunakan alat auto technicon selama 20 jam. Tabung auto technicon

terdiri atas alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 90% selama 2 jam, alkohol 96% selama 2 jam, alkohol absolute 1 selama 2 jam dan alkohol absolute 2 selama 2 jam.

- Tahap Clearing

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

- Tahap Impregnasi

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

- Tahap Embedding (pengeblokan)

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

- Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE

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

- Tahap Mounting

Preparat dilem dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan cover glass jangan sampai terjadi gelembung. Preparat

dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati dibawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh Haematoksilin yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*).

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 :

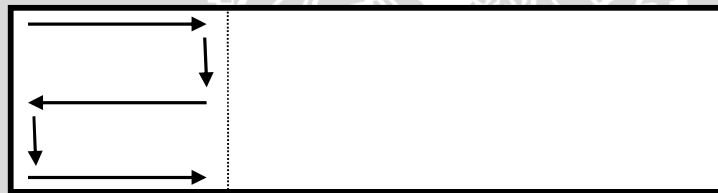
- Suhu yang diukur menggunakan termometer
- pH air yang diukur menggunakan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Lampiran 8). Ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan gejala klinis dan jumlah kerusakan jaringan pada

histopatologi otot secara kuantitatif, digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

Untuk hasil uji histopatologi ginjal pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan ginjal ikan koi yang di berikan imunostimulan dengan larutan daun binahong maka dilakukan analisis statistik pemberian skoring menurut (Gasperz, 1991 *dalam* Santoso dan Nurliani, 2005) dengan metode semi kuantitatif menurut Kakkilaya (2002) yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala kemudian turun ke bawah dan bergeser ke arah ekor kembali (gerak zig zag) dapat dilihat pada Gambar 5.



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

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang sehingga mendapatkan hasil yang maksimal pada tingkat kerusakan jaringan. Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria nekrosis, degenerasi, pyknosis, hialinasi, edema (meningkatnya jumlah cairan antar jaringan) (Panigoro *et al.*, 2007). Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut KIM (2006) *dalam* Raza'l (2008) dengan rumus:

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

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

Pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan setiap hari setelah ikan diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*. Pengukuran diameter klinis dilakukan dengan mengukur luas kelainan klinis dengan menggunakan penggaris, kemudian data yang telah diperoleh diberi skor.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun Binahong *A.cordifolia*

Rendemen merupakan presentasi perbandingan antara ekstrak kasar yang dihasilkan dengan bahan bakunya. Rendemen hasil ekstraksi bergantung pada sifat kelarutan komponen bahan aktifnya. Hasil ekstraksi dengan menggunakan etanol 96%. Nilai rendemen bahan kering *A.cordifolia* adalah sebesar 0,055%. Hasil tersebut diperoleh dari presentase perbandingan berat bahan ekstrak 55 gr dan berat bahan kering sebesar 1000 gr. Hal tersebut bisa terjadi karena senyawa aktif pada masing-masing tanaman mempunyai spesifikasi yang berbeda dalam melarutkan bahan aktifnya.

Menurut Anawariyah (2011), menambahkan bahwa presentase kadar air ini dipengaruhi oleh habitat dan lingkungannya. Kandungan air dalam suatu bahan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran dan daya tahan bahan tersebut. Sehingga dapat disimpulkan, semakin rendah kandungan air pada suatu bahan, maka kualitas bahan tersebut akan semakin baik.

4.2 Gambaran Histopatologi Ginjal Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

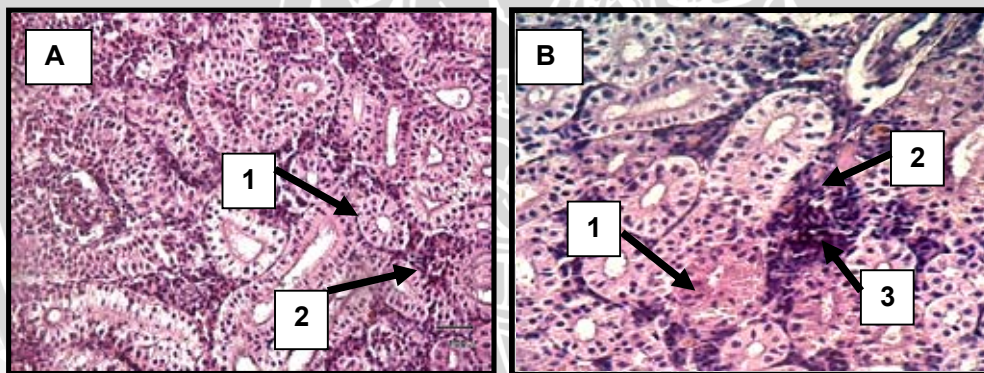
4.2.1 Gambaran Histologi Ginjal Ikan Sehat dan Ikan Yang Terinfeksi Bakteri

Menurut Fujaya (2004), ginjal melakukan dua fungsi utama yaitu mensekresikan sebagian besar produk akhir metabolisme tubuh dan mengatur konsentrasi cairan tubuh. Glomerulus berfungsi menyaring cairan, sedangkan tubulus mengubah cairan yang disaring menjadi urin.

Menurut Siregar (1995) dalam Tresnati., *et al* (2007), fungsi ginjal dimulai pada *glomerulus* yaitu pembentuk ultrafilter dari plasma. Ultrafilter akan memasuki kapsul Bowman dan menuju ke lumen pada tubulus. Penyaringan melalui berbagai segmen pada tubulus sehingga terjadi perubahan-perubahan

volume dan komposisi cairan filtrasi sebagai akibat proses reabsorpsi dan sekresi di sepanjang tubulus.

Berdasarkan hasil penelitian, gambaran jaringan ikan koi normal (tanpa diinfeksi bakteri dan tanpa perendaman ekstrak *A.cordifolia* dan ikan koi yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa perendaman ekstrak *A.cordifolia* dapat dilihat pada Gambar 6 . Kondisi ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*) tanpa infeksi memperlihatkan bentuk histologi yang normal. Menurut Asniatih, Idris dan Sabilu (2013), Pemeriksaan histopatologi pada ikan dapat memberikan gambaran perubahan jaringan ikan yang terinfeksi penyakit. Dalam penentuan penyakit pada ikan, diagnosa penyakit merupakan langkah awal yang perlu diterapkan. Pada proses diagnosa penyakit infeksi pada ikan, terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan yaitu, tanda-tanda klinis yang meliputi tingkah laku, ciri-ciri eksternal maupun internal serta perubahan patologi.



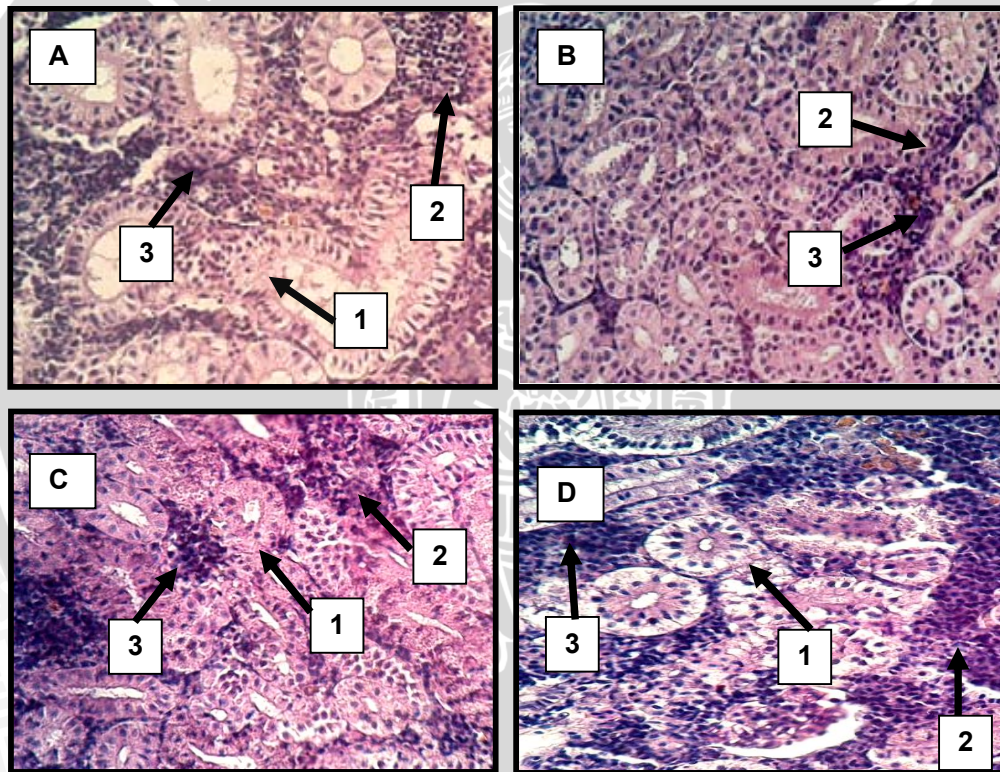
Gambar 6. (A) Histologi ginjal normal. Tanda panah No. 1. Tubulus distal (T); 2. Jaringan hematopoetik (JH). Tanda panah dan (B) Ginjal yang terinfeksi bakteri. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Edma; 3. Kongesti. Mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Pada Gambar dapat dilihat gambar jaringan ginjal ikan sehat menunjukkan tidak adanya kerusakan. Penampang jaringan ginjal pada tubulus distal dan jaringan hematopetik dalam kondisi normal. Sedangkan pada jaringan ginjal ikan yang terinfeksi bakteri banyak terjadi kerusakan. Kerusakan yang terjadi diantaranya yaitu nekrosis, edema dan kongesti.

4.2.2 Gambaran Perubahan Histopatologi pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Pengamatan histopatologi digunakan untuk melihat perubahan patologi pada ikan koi yang telah direndam ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*). Dosis yang berbeda dan diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan penelitian diperoleh hasil gambaran jaringan ginjal pada perlakuan dengan pemberian perendaman ekstrak daun binahong *A.cordifolia* 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 600 ppm (penentuan dosis lampiran 2), dosis-dosis tersebut mengalami kerusakan jaringan yang sama yaitu nekrosis, edema dan kongesti (Gambar 7).



Gambar 7. Histopatologi ginjal, (A). Ikan dengan perendaman ekstrak kasar daun binahong 200 ppm, (B). Ikan dengan perendaman ekstrak kasar daun binahong 400 ppm, (C) Ikan dengan perendaman ekstrak kasar daun binahong 600 ppm, (D) Ikan dengan perendaman ekstrak kasar daun binahong 0 ppm. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Edema; 3. Kongesti. Mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Hasil histopatologi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) sebagai imunostimulan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal ikan koi.

Penambahan ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) dengan konsentrasi yang berbeda sebagai imunostimulan pada ikan koi memiliki pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan jaringan ginjal ikan. Hal ini dapat diketahui dari hasil nilai skoring kerusakan jaringan ginjal. Hasil analisa data keragaman satu arah (*one way anova*) menunjukkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal (nekrosis, edema dan kongesti) memiliki hasil yang berbeda nyata. Hasil analisa data kerusakan pada jaringan ginjal yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan perendaman ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) sebagai berikut:

a. Kerusakan Nekrosis Pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

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

Nekrosis merupakan kerusakan jaringan sel pada ginjal yang terjadi akibat kematian sel yang ditandai dengan nekrosis sel-sel ginjal. Hal ini terjadi akibat kurang atau tidak adanya darah yang mengalir ke jaringan. Apabila sel-sel darah yang membawa oksigen ke dalam jaringan tidak mencukupi maka akan mendorong terjadinya hipoksia (Harper dan Jeffrey, 2008).

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0, 200, 400 dan 600 ppm yang ditentukan dengan uji pendahuluan (Lampiran 3). Adapun hasil perhitungan rerata skoring kerusakan nekrosis pada jaringan ginjal ikan koi disajikan pada Tabel 5. Dapat dilihat dalam tabel bahwa perlakuan 400 ppm merupakan nilai kerusakan nekrosis terendah 1,66. Dan kerusakan nekrosis tertinggi pada dosis 600 ppm dengan nilai 2,66.

Tabel 5. Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,2	2,4	2	6,6	2,2
400 ppm (B)	1,6	1,8	1,6	5	1,66
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,6	7,8	2,66
Kontrol positif (K+)	2,8	3	3	8,8	2,93
Kontrol negatif (K-)	1,4	1,4	1,2	3,6	1,33

Berdasarkan Tabel 5 dapat dilihat bahwa pemberian kasar daun binahong dengan konsentrasi 200 ppm (Perlakuan A) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan sedang. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2,2. Pada pemberian ekstrak kasar daun binahong dengan konsentrasi 400 ppm (Perlakuan B) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang ringan. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 1,6. Pada pemberian ekstrak kasar daun binahong dengan konsentrasi 600 ppm (Perlakuan C) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang hampir berat. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal 2,6. Pada perlakuan K+ yaitu penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) menunjukkan adanya tingkat kerusakan jaringan yang paling berat yaitu sebesar 3. Hal ini menunjukkan adanya infeksi *A. hydrophila* pada ginjal ikan.

Berdasarkan Tabel 5 dilakukan uji sidik ragam (Tabel 6). Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak (*A.cordifolia*) terhadap

kerusakan nekrosis pada jaringan ginjal. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan nekrosis pada jaringan ginjal disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Sidik ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	2.58	0.89	53.533	4.07	7.59
Acak	8	0.13	0.02	**		
Total	11	2.81				

Keterangan **: Sangat Berbeda Nyata

Tabel 5, menunjukkan bahwa nilai hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak *A.cordifolia* berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Mutdjiutami *et al.*, (2005), menyatakan bahwa immunostimulan adalah suatu zat yang termasuk dalam pencegahan, mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Penggunaan immunostimulan pada budidaya ikan merupakan sesuatu yang baru bagi kesehatan ikan dan pencegahan terhadap penyakit.

Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Hasil penghitungan uji BNT skoring kerusakan nekrosis pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji BNT Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Rerata Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B	-	-	-	-	a
A	0.53**	-	-	-	b
C	0.93**	0,40*	-	-	c
K	1.26**	0,73**	0.33*	-	d

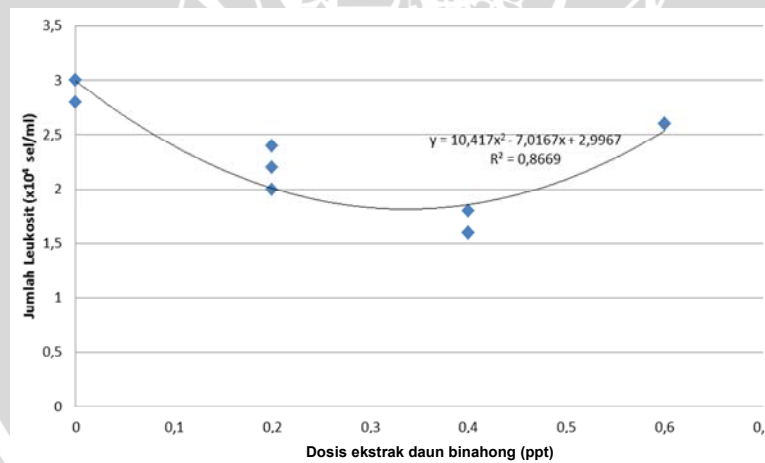
Keterangan : * : berbeda nyata
** : berbeda sangat nyata

Tabel 7 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis berupa notasi a, b, c dan d . Hal ini berarti perlakuan B (400 ppm) dengan notasi a berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (100 ppm)

yang ditunjukkan dengan notasi b, perlakuan C (600 ppm) dengan notasi c berbeda sangat nyata dengan kontrol negatif. Kerusakan ginjal menjadi salah satu indikasi yang dapat menggambarkan kondisi tubuh ikan. Ginjal mempunyai peran utama dalam ekskresi metabolisme, pencernaan dan tempat penyimpanan berbagai unsur. Ginjal berfungsi untuk filtrasi dan mengekskresi bahan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh, termasuk logam berat yang toksik (Erlangga, 2011).

Prince dan Wilson (2006), menyatakan bahwa nekrosis merupakan sel-sel yang mempunyai aktivitas yang sangat rendah dan akhirnya mengalami kematian sel jaringan sehingga menyebabkan hilangnya fungsi pada daerah yang mengalami nekrosis.

Berdasarkan hasil perhitungan Uji BNT yang menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui respon pemberian ekstrak kasar daun binahong terhadap kerusakan nekrosis ginjal ikan koi dilakukan uji polynomial orthogonal yang ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 8.



Gambar 8. Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Ginjal Ikan Koi.

Pada grafik regresi diatas dapat dikatakan bahwa dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap presentase kerusakan ginjal nekrosis, dapat ditunjukkan pula dengan persamaan $y = 7,0167x + 2,997$ yang memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) yakni sebesar 0,8996 dimana nilai tersebut

mendekati 1 yang artinya dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap kerusakan ginjal nekrosis. Hal ini mungkin dikarenakan pemberian ekstrak kasar daun binahong sebagai imunostimulan berpengaruh terhadap ikan koi setelah diberikan mengalami peningkatan tetapi dalam keadaan normal hal tersebut diduga bahwa dalam daun binahong terdapat zat aktif yang berupa flavonoid yang dapat menghambat dan membunuh bakteri. Sesuai dengan pernyataan Wahjuningrum, Ashry, dan Nuryati (2008), flavonoid merupakan perubah respon yang alami, seperti dari hasil beberapa penelitian yang menunjukkan kemampuan flavonoid dalam merubah reaksi tubuh terhadap penyebab alergi, virus, dan penyebab kanker. Zat ini juga memiliki aktivitas anti-alergi, antiradang, antimikroba, dan antikanker.

b. Kerusakan Edema Pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0, 200, 400 dan 600 ppm yang ditentukan dengan uji pendahuluan (Lampiran 3). Adapun hasil perhitungan rerata skoring kerusakan edema pada jaringan ginjal ikan koi disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Rerata Skoring Kerusakan Edema pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,4	2,4	2,4	7,2	2,4
400 ppm (B)	1,8	2	1,8	5,6	1,8
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,8	8	2,6
Kontrol positif (K+)	2,8	3	3	8,8	2,9
Kontrol negatif (K-)	1,8	1,4	1,6	4,8	1,6

Berdasarkan Tabel 8 dapat dilihat bahwa pemberian kasar daun binahong dengan konsentrasi 200 ppm (Perlakuan A) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2,4. Pada pemberian ekstrak kasar daun binahong dengan konsentrasi 400 ppm (Perlakuan B) menunjukkan nilai skoring kerusakan

jaringan yang ringan. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu mendekati 1,8. Pada pemberian ekstrak daun binahong dengan konsentrasi 600 ppm (Perlakuan C) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang hampir berat. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal sebesar 2,6. Pada perlakuan K+ yaitu penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) menunjukkan adanya tingkat kerusakan jaringan yang paling berat yaitu sebesar 2,9. Hal ini menunjukkan adanya infeksi *A. hydrophila* pada jaringan ginjal ikan.

Berdasarkan Tabel 8 dilakukan uji sidik ragam (Tabel 9). Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) terhadap kerusakan edema pada jaringan ginjal. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan edema pada jaringan ginjal disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Edema pada Jaringan Ginjal

Sidik ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	1.87	0.62	62.222	4.07	7.59
Acak	8	0.08	0.01	**		
Total	11	1.95				

Keterangan **: Sangat Berbeda Nyata

Tabel 9 menunjukkan bahwa nilai hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan edema pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Menurut Anderson (1992) dalam Alifuddin (2002), imunostimulan merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan.

Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Hasil penghitungan Uji BNT skoring kerusakan edema

pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 10.

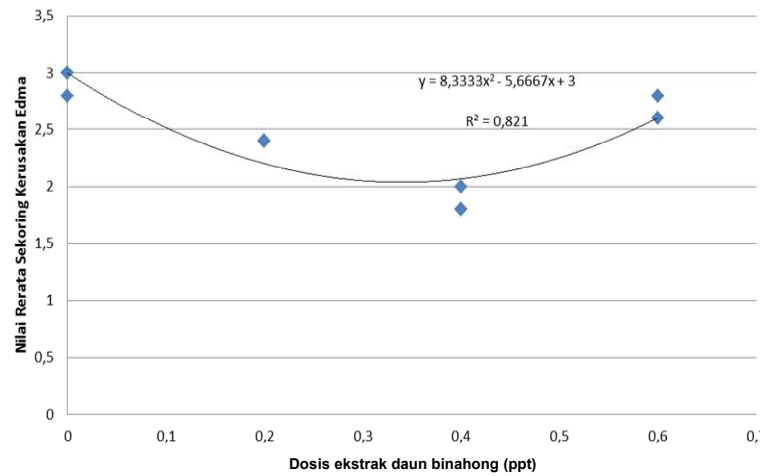
Tabel 10. Uji BNT Skoring Kerusakan Edema Pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B	-	-	-	-	a
A	0.53**	-	-	-	b
C	0,80**	0,27*	-	-	c
K	1.07**	0,53**	0.26*	-	d

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

Tabel 10 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami sel radang berupa notasi a, b, c dan d. Hal ini berarti perlakuan B (400 ppm) dengan notasi a berbeda nyata dengan perlakuan A (200 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi b (600 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi c serta berbeda nyata dengan perlakuan K+ (tanpa pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*), yang ditunjukkan dengan notasi d. Kerusakan edema pada jaringan ginjal yang paling parah berada pada perlakuan K+, diikuti dengan 600 ppm dan 200 ppm serta rerata kerusakan terendah dengan kerusakan teringan pada dosis 400 ppm. Pemberian immunostimulan pada ikan sebaiknya tidak terlalu tinggi dan juga tidak terlalu rendah. Menurut Jawetz *et al.*, (1996) dalam Sukmaningtyas (2012) bahwa dosis immunostimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Berdasarkan hasil perhitungan Uji BNT yang menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui respon pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) terhadap kerusakan edema ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*) nekrosis dilakukan uji polynomial orthogonal yang ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 9.



Gambar 9. Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Edema Ginjal Ikan Koi.

Pada grafik regresi diatas dapat dikatakan bahwa dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap presentase kerusakan ginjal edema, dapat ditunjukkan pula dengan persamaan $y = 5,6667x + 3$ yang memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) yakni sebesar 0,821 dimana nilai tersebut mendekati 1 yang artinya dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap kerusakan ginjal edema. Seperti yang diungkapkan oleh Jonathansarwono (2014), bahwa keselerasan model regresi dapat diterangkan dengan menggunakan nilai R^2 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 akan mempunyai arti kesesuaian yang sempurna. Maksudnya 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. Hal ini mungkin dikarenakan pemberian ekstrak kasar daun binahong sebagai imunostimulan berpengaruh terhadap ikan koi setelah diberikan mengalami peningkatan tetapi dalam keadaan normal hal tersebut diduga bahwa dalam daun binahong terdapat zat aktif yang berupa flavonoid yang dapat menghambat dan membunuh bakteri.

c. Kerusakan Kongesti Pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Kongesti ditandai dengan kapiler darah melebar yang berwarna lebih merah dan berukuran lebih lebar dibandingkan dengan kapiler normal. Menurut Lukostyowati dan Kurniasih (2011), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0, 200, 400 dan 600 ppm yang ditentukan dengan uji pendahuluan (Lampiran 3). Adapun hasil perhitungan rerata skoring kerusakan kongesti pada jaringan ginjal ikan koi disajikan pada Tabel 11.

Pada Tabel 11 dapat dilihat kerusakan kongesti terendah pada dosis 400 ppm dengan nilai 1,86 dan nilai kerusakan kongesti tertinggi pada dosis 600 ppm dengan nilai 2,73.

Tabel 11. Rerata Skoring Kerusakan jaringan Kongesti pada Ginjal Ikan Koi

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,6	2,4	2,4	7,4	2,46
400 ppm (B)	1,8	1,8	2	5,6	1,86
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,8	8	2,73
Kontrol positif (K+)	3,2	3	3	9,2	3,06
Kontrol negatif (K-)	1,6	1,6	1,8	5	1,6

Berdasarkan Tabel 11 dapat dilihat bahwa pemberian ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) dengan konsentrasi 200 ppm (Perlakuan A) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2,4. Pada pemberian ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) dengan konsentrasi 400 ppm (Perlakuan B) menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang ringan. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 1,8. Pada pemberian ekstrak daun binahong (*A.cordifolia*) dengan konsentrasi 600 ppm (Perlakuan C) menunjukkan

nilai skoring kerusakan jaringan yang berat. Hal ini diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal sebesar 3. Pada perlakuan K+ yaitu penginfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian daun binahong (*A.cordifolia*) menunjukkan adanya tingkat kerusakan jaringan yang paling berat yaitu sebesar 3,0. Hal ini menunjukkan adanya infeksi *A. hydrophila* pada jaringan ginjal ikan koi.

Berdasarkan Tabel 11 dilakukan uji sidik ragam (Tabel 12). Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *A.cordifolia* terhadap kerusakan kongesti pada jaringan ginjal. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan kongesti pada jaringan ginjal disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Ginjal

Sidik ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	2,25	0.75	56.250	4.07	7.59
Acak	8	0.11	0.01	**		
Total	11	2.36				

Keterangan **: Sangat Berbeda Nyata

Tabel 12 menunjukkan bahwa nilai hasil F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak *A.cordifolia* berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan kongesti pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Menurut Chariningsih (2002), pada penelitian sebelumnya flavonoid yang merupakan senyawa dari polifenoltelah menunjukkan efek anti mikrobia dan meningkatkan sistem imun.

Menurut Jawetz *et al.*, (1996) dalam Sukmaningtyas (2012) bahwa dosis immunostimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Sehingga untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Hasil penghitungan uji BNT skoring kerusakan kongesti

pada jaringan ginjal ikan koi yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 13.

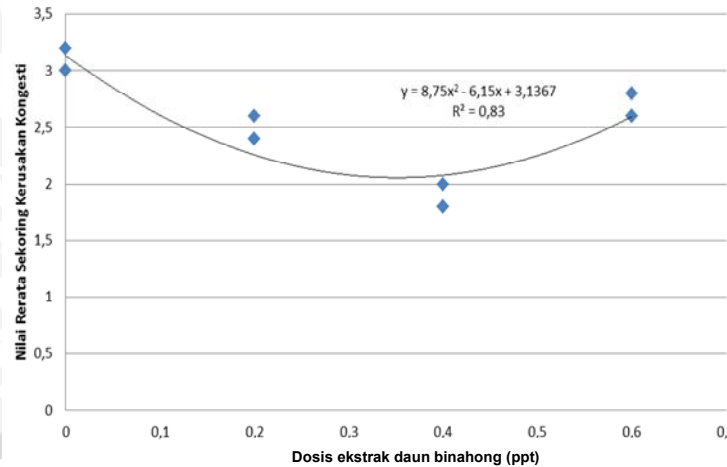
Tabel 13. Uji BNT Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Ginjal Ikan Koi

Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B	-	-	-	-	a
A	0,6**	-	-	-	b
C	0,8**	0,2 ^{ns}	-	-	b
K	1,2**	0,6**	0,4**	-	c

Keterangan : ns : non significant (tidak berbeda)
 * : berbeda nyata
 ** : berbeda sangat nyata

Tabel 13 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami kongesti berupa notasi a, b, b, dan c. Hal ini berarti perlakuan B (400 ppm) dengan notasi a berbeda nyata dengan perlakuan A (200 ppm) yang ditunjukkan dengan notasi b (600 ppm) dan perlakuan C (600ppm) dengan notasi b tidak berbeda nyata dengan perlakuan B (200 ppm), tetapi berbeda nyata dengan perlakuan K+ (tanpa pemberian ekstrak *A.cordifolia*), yang ditunjukkan dengan notasi c. Kerusakan kongesti pada jaringan ginjal yang paling parah berada pada perlakuan K+, diikuti dengan 600 ppm dan 200 ppm serta rerata kerusakan terendah dengan kerusakan teringan pada dosis 400 ppm. Pemberian immunostimulan pada ikan sebaiknya tidak terlalu tinggi dan juga tidak terlalu rendah. Menurut Jawetz *et al.*, (1996) dalam Sukmaningtyas (2012) bahwa dosis immunostimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Berdasarkan hasil perhitungan Uji BNT yang menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui respon pemberian ekstrak kasar daun binahong (*A.cordifolia*) terhadap kerusakan kongesti ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*) dilakukan uji polynomial orthogonal yang ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 10.



Gambar 10. Hubungan Antara Dosis dengan Nilai Skoring Kerusakan Kongesti Ginjal Ikan Koi

Pada grafik regresi diatas dapat dikatakan bahwa dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap presentase kerusakan ginjal kongesti, dapat ditunjukkan pula dengan persamaan $y = -6,15x + 3,1367$ yang memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) yakni sebesar 0,83 dimana nilai tersebut mendekati 1 yang artinya dosis ekstrak kasar daun binahong berpengaruh terhadap kerusakan ginjal kongesti. Hal ini mungkin dikarenakan pemberian ekstrak kasar daun binahong sebagai imunostimulan berpengaruh terhadap ikan koi setelah diberikan mengalami peningkatan tetapi dalam keadaan normal hal tersebut diduga bahwa dalam daun binahong terdapat zat aktif yang berupa flavonoid yang dapat menghambat dan membunuh bakteri. Sesuai dengan pernyataan Wahjuningrum, D, N. Ashry, dan S. Nuryati (2008), flavonoid merupakan perubah respon yang alami, seperti dari hasil beberapa penelitian yang menunjukkan kemampuan flavonoid dalam merubah reaksi tubuh terhadap penyebab alergi, virus, dan penyebab kanker. Zat ini juga memiliki aktivitas anti-alergi, anti radang, antimikroba, dan antikanker.

4.3 Pengamatan Gejala Klinis Ikan

Pengukuran gejala klinis dilakukan selama masa penginfeksi dan 3 hari setelah ikan uji diinfeksi bakteri *A. Hydrophila*. Ditampilkan pada Tabel 14 berikut:

Tabel 14. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Koi Uji Setelah Penginfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hari	Perlakuan	Gejala Klinis
1	K	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak agresif ○ Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh ikan ○ Air media pemeliharaan terlihat sedikit keruh
	A	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak agak agresif ○ Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh ikan ○ Air media pemeliharaan terlihat sedikit keruh
	B	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak cenderung tenang ○ Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh ikan ○ Media pemeliharaan tidak keruh
	C	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan cenderung bergerak menuju permukaan ○ Ada sedikit kerusakan pada kulit ○ Air media pemeliharaan terlihat agak keruh
2	K	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan diam di permukaan dan bergerak lambat ○ Warna ikan tidak cerah ○ Media pemeliharaan terlihat keruh
	A	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak lamba ○ Tubuh ikan terlihat berwarna agak pucat ○ Media pemeliharaan tidak terlalu keruh.
	B	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak normal dan tenang ○ Tubuh ikan terlihat berwarna pekat (normal) ○ Media pemeliharaan tidak keruh
	C	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak lambat, berdiam diri. ○ Media pemeliharaan keruh. ○ Tubuh ikan terlihat berwarna pucat
3	K	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan sedikit agresif ○ Tubuh ikan berwarna pucat ○ Kepala ikan terlihat sedikit memerah ○ Media air berwarna keruh
	A	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak lambat, cenderung diam di dasar ○ Tubuh ikan terluka ○ Media air keruh
	B	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ikan bergerak sedikit lambat dan cenderung berada didasar. ○ Tubuh ikan berwarna agak pucat ○ Media pemeliharaan sedikit keruh
	C	<ul style="list-style-type: none"> ○ Gerakan ikan melambat dan bergerak pasif ○ Tubuh ikan berwarna pucat ○ Media pemeliharaan keruh

Keterangan :

- K = Ikan Uji dengan Pemberian Ekstrak *A.cordifolia* dengan Konsentrasi 0 ppm
 A = Ikan Uji dengan Pemberian Ekstrak *A.cordifolia* dengan Konsentrasi 200 ppm
 B = Ikan Uji dengan Pemberian Ekstrak *A.cordifolia* dengan Konsentrasi 400 ppm
 C = Ikan Uji dengan Pemberian Ekstrak *A.cordifolia* dengan Konsentrasi 600 ppm

4.4 Pengamatan Kualitas Air

Kualitas air selama masa pemeliharaan berlangsung merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan karena kualitas air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

No.	Parameter Kualitas Air	Kisaran Parameter Kualitas Air pada Perlakuan	Partosuwiryo dan Warseno (2011)
1.	Suhu	25-26°C	25-30°C
2.	pH	7,63-7,69	6,7-8,2
3.	Oksigen Terlarut	5,72-6,29 ppm	>5 ppm

Berdasarkan Tabel 15 diperoleh hasil bahwa air sebagai media pemeliharaan dan media hidup ikan uji selama perlakuan masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologis ikan uji. Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), keberhasilan dalam budidaya ikan salah satunya yaitu dipengaruhi oleh kualitas air.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

- Rendemen ekstrak kasar *A.cordifolia* sebesar 0,0555%
- Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun binahong *A.cordifolia* dengan konsentrasi yang berbeda dapat memberikan efek penurunan gejala klinis dan tingkat kerusakan histopatologi jaringan ginjal ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan dosis optimal sebesar 400 ppm

5.1 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar daun binahong *A.cordifolia* pada hematologi ikan koi (*Cyprinus carpio*)

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan Liviawati. E.1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisus. Yogyakarta. 89 hlm.
- Alex, S. 2012. Budidaya Ikan Koi, Ikan Eksotis Yang Menguntungkan. Pusataka Baru Press. 204
- Alifuddin, M. 2002. Imunostimulan Pada Hewan Akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **1(2):**87-92.
- Alimuddin., K. Sumantadianata, Y. Hadiroseyani dan D. Irawan. 2002. Fenotipe Keturunan Pertama Ikan Koi Hasil Ginonenesis. *Akuakultur*. **1(2):**65-68.
- Anawariyah, S. 2011. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan *Cymodocea Rotundata*. Skripsi.79 hlm
- Aslianti, T., Afifah dan Musthofa. S.Z. 2010. Dosis efektif probiotik dalam pemeliharaan Larva bandeng, chanos chanos secara terkontrol. Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indonesia 2010. Sekolah Tinggi Ilmu Perikanan, Jakarta 2-3 Desember 2010.
- Asniatih, Muhammad Idris, dan Kadir Sabilu. 2013. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesi*. **3(12)** Sep 2013 ISSN : 2303-3959
- Cahyono, B. 2000. Budidaya Ikan Air Tawar Ikan Gurami, Ikan Nila, Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta. 113 hlm.
- Capuccino dan Sherman, 1988. Microbiology, A laboratory Manual. Benjamin/Cumming Science Publishing. Menlo Park. California : 477
- Chrisnaningsih, N.W. 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Syzygium polyanthum Terhadap Produksi ROI Makrofage Pada Mencit BALB/c yang Diinokulasi Salmonella typhimurium*. Artikel Karya Tulis Ilmiah. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Christiawan, Arman dan P David. 2010. Aktivits Antimikroba Daun Binahong Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* Yang Sering Menjadi Penyulit Pada Penyembuhan Luka Bakar. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Erlangga. 2007. Penyakit Ginjal dan Hipertensi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Hlm 73.
- Erlangga. 2011. *Analisis Histologi Ginjal Ikan Baung (Hemibagrus nemurus) Yang Terindikasi Pencemaran Di Perairan Sungai Kampar Provinsi Riau. Berkala Perikanan Terbaru* **39** (1):0126-4265
- Ersa, E. Maulana. 2008. Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot Pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 66 hlm.

- Ferry, A. 2008. Uji Aktivitas Antiradikal Isolat Fraksi Non Polar Ekstrak Metanol Kulit Batang Meranti Kuning (*Shorea accuminatissima*) Dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Surakarta.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan- Dasar Pengembangan Teknik Perikanan. PT Rineka Cipta. Jakarta Pandang. 36 hlm.
- Harteman, E. 2013. Pemantauan Logam Berat pada Histologi Ikan Badukang (*Arius Caelatus Valenciennes1840*) Muara Sungai Kahayan dan Katingan, Kalimantan Tengah. *Jurnal Ilmu Hewani Tropika*. **2** (1): 21-26.
- Hartoto, 2009. Penelitian deskriptif. <http://www.penalaran-unm.org.pdf>. Diakses 20 Januari 2014.
- Harper, C. and J.C. Wolf. 2009. Morphologic Effect Of The Stress Response In Fish. *ILAR Journal*. **50** (4):387-396.
- Holmes, P., L.M. Niccolls. And Sartory, D.P., 1996. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In the Genus *Aeromonas*, pp.127-150.
- Jasmanidar, Y. 2009. *Penggunaan Ekstrak Gracilaria verrucosa untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname Litopenaeus vannamei*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 97 hlm.
- Jonathansarwono. 2014. Model Regresi. <http://jonathansarwono.wordpress.com>
- Kabata, Z., 1985. Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic. Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelpia.318 hlm.
- Kakkilaya, B.S. 2002. Peripheral smear examination for malaria parasite. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site.
- Karouw , S., Rindengan dan Balitka. Binahong *Anredera cordifolia* Sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* **16** (1): 0853 – 8204.
- KKP. 2012. Outlook Perikanan 2012 : Industrialisasi Perikanan Budidaya. Arsib Berita Perikanan.umm.ac.id. Universitas Muhammadiyah Malang. 2 hlm.
- Kordi, M. dan H. Ghufron. 2010. 14 Ikan Air Tawar Ekonomis. Liliy Publisher. Yogyakarta. 322 hlm.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio L*) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **16** (1): 14-160.
- Musallamah, E.K. Sari, T. Hutami dan N.Mardia, 2011. Isolasi dan Kultur Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan yang terserang Penyakit Serta Cara Pewarnaan Bakteri *Aeromonas Hydrophylla*. Institut Teknologi Sepuluh November.
- Mutdjiutami, E., Ciptoroso, Z. Zainun, Sumarjo dan Rahmat. 2005. Pemanfaatan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas. *Jurnal Budidaya Air Tawar*. **4**(1): 1-9.

- Panigoro, N, I. Astuti, M. Bahnan, Prayudha, Salfira, dan K. Wakita. 2007. Teknik Dasar Histologi dan Atlas Dasar-Dasar Histopatologi Ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi dan Japan International Coperation Agency. 56 hlm
- Partosuwiryo S dan W. Yus. 2011. Kiat Sukses Budi Daya Ikan Mas. Citra Aji Parama. Yogyakarta. 59 hlm.
- Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan - Udang Bakteri. UM Press. Malang. 113 hlm
- Prajitno, A. 2009. Penyakit Ikan - Udang. UM Press. Malang. 115 hlm.
- Prasetya, N., S Sri dan Kismiyati. 2013. Prevalensi Ektoparasit Yang Menyerang Benih Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Di Bursa Ikan Hias Surabaya. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* **5** (1).
- Prince, S.A. dan Wilson, L.M. 2006. Patofisiologi. Edisi VI. Vol **1**. EGC.
- Rahmawati, L., F Enny dan K. Dewi. 2010. Itas Antioksidan Senyawa Flovonid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).
- Raza'l, T. S. 2008. *Analisis histopatologi organ ginjal dan usus ikan kerapu lumpur (Epinephelus coloides) yang diberi khamir laut (Marine yeast) sebagai immunostimulan*. Tesis.
- Ridlo. A., dan R. Pramesti. 2009. Aplikasi ekstrak rumput laut sebagai agen imunostimulan sistem pertahanan non spesifik pada udang (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmu Kelautan*. **14** (3):133-137.
- Samad, M.S.F. 2010. *Pengaruh senyawa fenolik ubur-ubur (Aurelia sp.) terhadap hematologi dan aktivitas fagositosis ikan mas (Cyprinus carpio) yang diinfeksi bakteri Aeromonas hydrophila*. Tesis. 109 hlm.
- Samsundari, S. 2006. Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal GAMMA*. **2** (1):71:83.
- Sanarto., P Bambang dan A.T. Stanley. 2010. Uji Ekstrak Daun Binahong *Anredera cordifolia* Sebagai Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* Secara In Vitro. Universitas Brawijaya, Malang.
- Santoso, H.B dan A. Nurliani. 2005. Efek doksisisiklin selama masa organogenesis pada struktur histology organ hati dan ginjal fetus mencit. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. *Bioscientiae*. **3** (1): 15-27.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Setyanto, A. Eko. 2005. Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen dalam Kajian Komunikasi. *Jurnal Ilmu Komunikasi*. **3**(1):37-48.
- Setyowati, A., H. Dewi., Awik dan Nurlita. 2012. *Studi Histopatologi Hati Ikan Belanak (Mugil cephalus) Di Muara Sungai Aloo Sidoarjo*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.

- Sholikhah, E.H. 2009. Efektivitas Campuran Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) dalam Pakan untuk Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias sp*). Skripsi.
- Suhirman, S dan Winarti, C. 2010. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunodulator. *Jurnal Lingkungan*. 1 (1):1-13.
- Sukmaningtyas. 2012. Pengaruh Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. 92 hlm.
- Suriawiria, U. 1989. Pengantar Mikrobiologi Umum. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Susanto. D. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot, dan Usus Ikan Mas (*C. carpio*) di Desa Cibanteng. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi. 49 hlm.
- Tresnati, Joeharnani., M.I.Djavad dan A.S. Bulqish. 2007. Kerusakan Ginjal Ikan Pari Kembang (*Dasyatis kuhlii*) Yang Diakibatkan Oleh Logam Berat Timbel (Pb). *Jurnal Sains dan Teknologi* 7 (3):153-160.
- Umar, A., K. Dwi dan T.K. Diak. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong *Anredera cordifolia* Terhadap Kesembuhan Luka Infeksi *Staphylococcus aureus* Pada Mencit. *Analisis Kesehatan Sains* 1 (2): 2302-3635.
- Wahjuningrum D., N. Ashry dan S. Nuryati. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Daun Ketapang *Terminalia cattapa* untuk Pencegahan Pengobatan Ikan Patin *Pangasinodon hydrophila* yang Terinfeksi *A. hydrophila*. *Akuakultur Indonesia*. 7 (1):79-94.
- Wu, C.C., C.H. Liu., Y. P. Chang , S.L. Hasieh, 2010. Effect of hot water extract of *toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, P: 258-263

LAMPIRAN 1

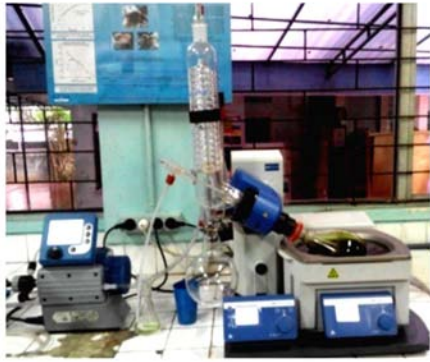
DAFTAR ISTILAH

<i>A. hydrophila</i>	: Bakteri gram negatif yang merupakan penyebab penyakit pada ikan air tawar
Antioksidan	: Senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau dua lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut bisa terendam
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
Bioaktif	: Senyawa kimia yang menghasilkan aktivitas biologis dalam tubuh
Clearing	: Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan untuk mensterilkan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan
Dehidrasi	: Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan 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 pembengkakan
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
Eritrosit	: Sel darah merah yang membawa oksigen ke dalam sel-sel tubuh dan karbon dioksida keluar dari tubuh
Fenol	: Zat kristal takberwarna yang memiliki bau khas. Rumus kimianya adalah C_6H_5OH dan strukturnya memiliki gugus hidroksil (-OH) yang berikatan dengan cincin fenil

Fikasasi	: Tahapan dalam pembuatan preparat histologi yang bertujuan mengawetkan jaringan dari organ yang akan diamati
Flavonoid	: Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga
<i>Haemorigic septicemia</i>	: Penyakit pada ikan yang dapat menyebabkan kematian
Histologi	: Studi mikroskopis sel dan jaringan
Histopatologi	: Studi tentang sel-sel yang berkaitan dengan penyakit
Imunostimulasi	: Cara untuk mengobati fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut
Imunostimulan	: Senyawa yang dapat meningkatkan respon imun
Kongesti	: Kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit
Maserasi	: Proses pengekekstrakan 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
Nekrosis	: Kerusakan jaringan sel pada inang yang terjadi akibat kematian sel
Respon humoral	: Respon kekebalan yang dihasilkan dari aktivitas unsur-unsur dalam darah dan jaringan limfoid, seperti antibodi
Respon Imun	: Respon yang ditimbulkan oleh sel-sel dan molekul yang menyusun sistem imun setelah berhadapan dengan substansi asing
Respon seluler	: Respon imun yang muncul untuk mengeliminasi antigen dan terutama dilakukan oleh limfosit T yang teraktivasi sel

Lampiran 2. Alat dan Bahan Penelitian

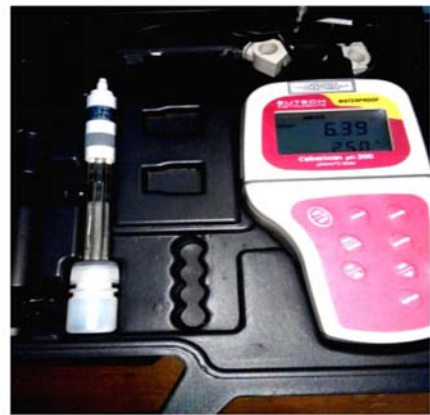
a) Alat yang digunakan dalam penelitian



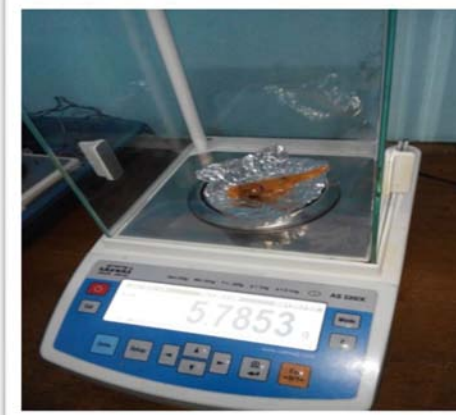
Rotary Evaporator



Mikrotom



pH Meter

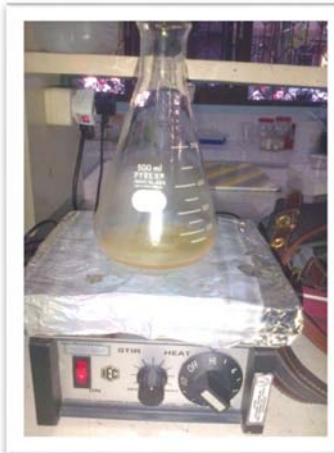


Timbangan Analitik





Autoclave



Hot Plate



Thermometer



Base Mold



Nampan dan Pipet Tetes



Mikroskop



Lampiran 2a (Lanjutan)



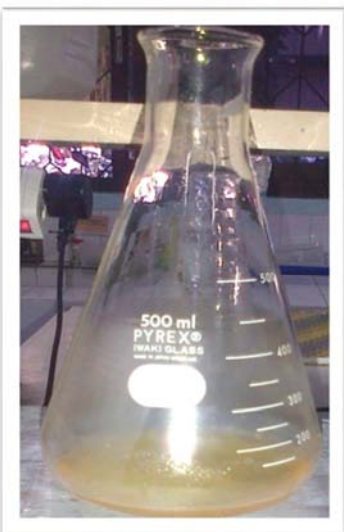
Refrigator



Laminary Flow



Rak



Erlenmayer



Cawan Petri



Akuarium

2b) Bahan yang digunakan dalam penelitian



Ikan koi



Binahong serbuk



TSA



Aquades



Aluminium Foil



TSB



Alkohol 70



Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Fenol *Anredera cordifoli*

Daun Binahong *A.cordifoli*

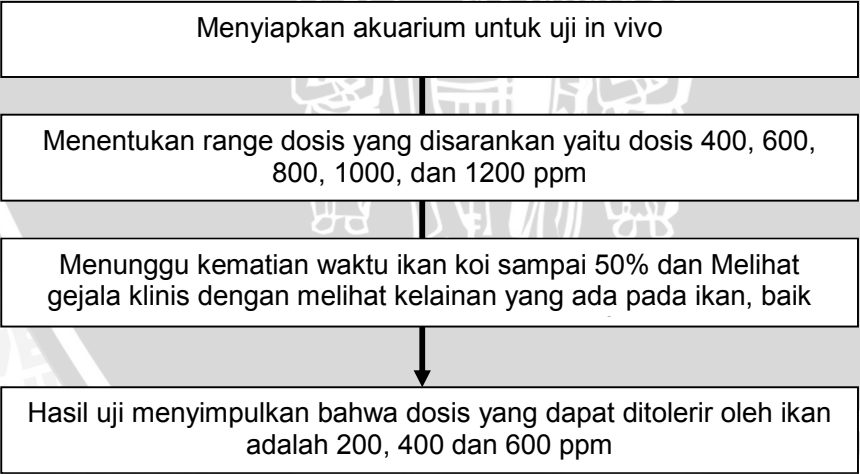
- Dijemur hingga kering
- Dibersihkan dari pengotornya
- Dipotong sampai ukuran kecil
- Dimaserasi (direndam) dengan menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 selama 24 jam
- Disaring dengan menggunakan kertas saring

Ekstrak Kasar

- Dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*
- Didapatkan ekstrak (ml)
- Dikeringkan dengan menggunakan *water bath* dengan suhu 50°C sampai hampir kering
- Diperoleh ekstrak kasar (gr)

Hasil

Lampiran 4. Penentuan Dosis Perendaman Ikan dengan Ekstrak Fenol untuk Penelitian In Vivo



Lampiran 5. Penentuan Kepadatan Bakteri

Pada penelitian lanjutan in vivo, sangat penting diketahui berapa kepadatan bakteri yang dapat ditolerir ikan koi (*Cyprinus capio*). Bakteri *A. Hydrophila* diadaptasikan dari balai karantina juanda dengan kepadatan 10^9 diukur dalam standart McFarlan. Untuk uji dilakukan pengenceran, dengan perhitungan rumus pengenceran sebagai berikut:

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

Dimana :

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

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

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

- Untuk mendapatkan kepadatan bakteri *A. hydrophylla* 10^8

$$V_1 \cdot 10^9 = 10.000 \text{ ml} \cdot 10^8$$

$$V_1 = \frac{10.000 \text{ ml} \cdot 10^8}{10^9} = 10 \cdot 10^{11}$$

$V_1 = 1000 \text{ ml}$ (diambil dari bakteri kepadatan 10^9 sel/ml ditambahkan 9.000 ml air sehingga volume total 10.000 ml)

- Untuk mendapatkan kepadatan bakteri *A. hydrophylla* 10^7

$$V_1 \cdot 10^9 = 10.000 \text{ ml} \cdot 10^7$$

$$V_1 = \frac{10.000 \text{ ml} \cdot 10^7}{10^9} = 10 \cdot 10^{10}$$

$V_1 = 100 \text{ ml}$ (diambil dari bakteri kepadatan 10^9 sel/ml ditambahkan 9.900 ml air sehingga volume total 10.000 ml)

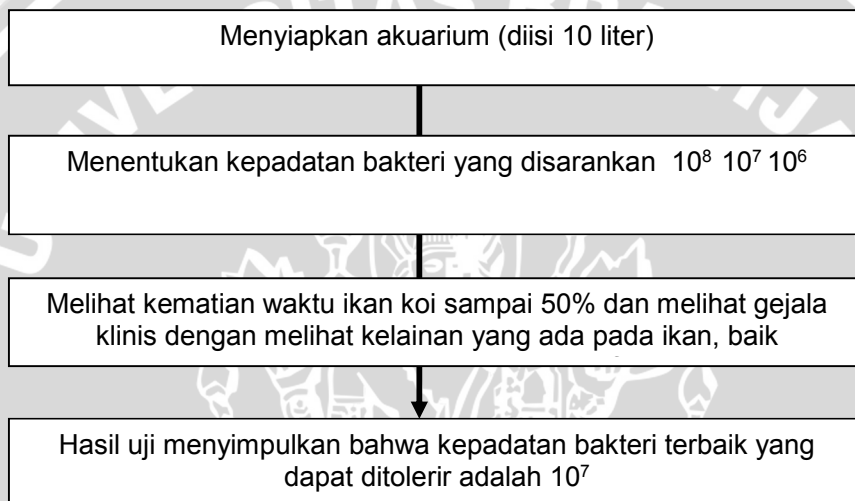
- Untuk mendapatkan kepadatan bakteri *A. hydrophylla* 10^6

$$V_1 \cdot 10^9 = 10.000 \text{ ml} \cdot 10^6$$

$$V_1 = \frac{10.000 \text{ ml} \cdot 10^6}{10^9} = 10 \cdot 10^9$$

$V_1 = 10$ ml (diambil dari bakteri kepadatan 10^9 sel/ml ditambahkan 9.990 ml air sehingga volume total 10.000 ml)

Penentuan Kepadatan Bakteri Terbaik akan di tampilkan skema berikut:



Lampiran 6. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Ginjal Ikan Koi

Kelainan patologi	Sampel	Ulangan	Area lapang pandang					Rerata LP	Rerata sampel
			1	2	3	4	5		
nekrosis	A	1	2	2	3	2	2	2.2	2,2
		2	4	1	2	2	3	2.4	
		3	3	1	2	2	2	2	
	B	1	2	1	2	1	2	1.6	1,6667
		2	2	2	1	2	2	1.8	
		3	1	1	2	2	2	1.6	
	C	1	4	3	2	2	2	2.6	2,6666
		2	2	3	3	3	3	2.8	
		3	3	3	2	3	2	2.6	
	K+	1	3	3	2	3	3	2.8	2,9333
		2	3	3	4	3	2	3	
		3	4	3	3	3	2	3	
	K-	1	2	1	1	1	2	1.4	1,3333
		2	1	2	1	1	2	1.4	
		3	2	1	1	1	1	1.2	
Edema	A	1	2	2	3	3	2	2.4	2,4
		2	3	3	2	2	2	2.4	
		3	2	2	3	3	2	2.4	
	B	1	3	2	1	1	2	1.8	1,8666
		2	2	2	2	2	2	2	
		3	1	2	2	2	2	1.8	
	C	1	2	2	3	3	3	2.6	2,6666
		2	2	3	2	3	3	2.6	
		3	3	2	3	3	2	2.8	
	K+	1	3	2	4	2	3	2.8	2,9333
		2	3	3	2	3	4	3	
		3	2	3	3	4	3	3	
	K-	1	2	1	2	2	2	1.8	1,6
		2	1	1	2	2	1	1.4	
		3	2	2	1	1	2	1.6	
kongesti	A	1	3	2	3	3	2	2.6	2,4666
		2	3	3	2	1	3	2.4	
		3	1	2	3	3	3	2.4	
	B	1	1	2	2	2	2	1.8	1,8666
		2	2	2	2	2	1	1.8	
		3	2	2	2	2	2	2	
	C	1	2	2	3	3	3	2.6	2,7333
		2	3	2	3	4	2	2.8	
		3	3	3	2	3	2	2.8	

K+	1	3	4	3	3	3	3.2	3,0666
	2	2	3	4	3	3	3	
	3	3	3	4	2	3	3	
K-	1	2	1	1	2	2	1.6	1,6666
	2	1	2	1	2	2	1.6	
	3	1	2	2	2	2	1.8	

Keterangan:

Nilai 1 = Ringan (Kerusakan 0-5%)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6-25%)

Nilai 3 = Berat (Kerusakan 26-50%)

Nilai 4 = Sangat Berat (Kerusakan >50%)



Lampiran 7. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Ginjal Menggunakan

SPSS 16

Nekrosis

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,2	2,4	2	6,6	2,2
400 ppm (B)	1,6	1,8	1,6	5	1,66
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,6	7,8	2,66
Kontrol positif (K+)	2,8	3	3	8,8	2,93
Kontrol negatif (K-)	1,4	1,4	1,2	3,6	1,33

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Nekrosis
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	2.3667
	Std. Deviation	.51757
Most Extreme Differences	Absolute	.174
	Positive	.113
	Negative	-.174
Kolmogorov-Smirnov Z		.603
Asymp. Sig. (2-tailed)		.861

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 1,001, $\alpha>0,05$, Sehingga data diatas normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	db (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	2.787	3	0.929	46.444	0.000
Acak	0.160	8	0.020		
Total	2.947	11			

Post Hoc Tes

Beberapa perbandingan

Perlakuan (I)	Perlakuan (J)	Rata-Rata Perbedaan (I-J)	Standar Error	Signifikansi	Nilai Kepercayaan 95%	
					Terendah	Tertinggi
0	200	.73333*	.11547	.001	.3636	1.1031
	400	1.26667*	.11547	.000	.8969	1.6364
	600	.26667	.11547	.175	-.1031	.6364
200	0	-.73333*	.11547	.001	-1.1031	-.3636
	400	.53333*	.11547	.007	.1636	.9031
	600	-.46667*	.11547	.016	-.8364	-.0969
400	0	-1.26667*	.11547	.000	-1.6364	-.8969
	200	-.53333*	.11547	.007	-.9031	-.1636
	600	-1.00000*	.11547	.000	-1.3698	-.6302
600	0	-.26667	.11547	.175	-.6364	.1031
	200	.46667*	.11547	.016	.0969	.8364
	400	1.00000*	.11547	.000	.6302	1.3698

Berdasarkan objek yang diamati:

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

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

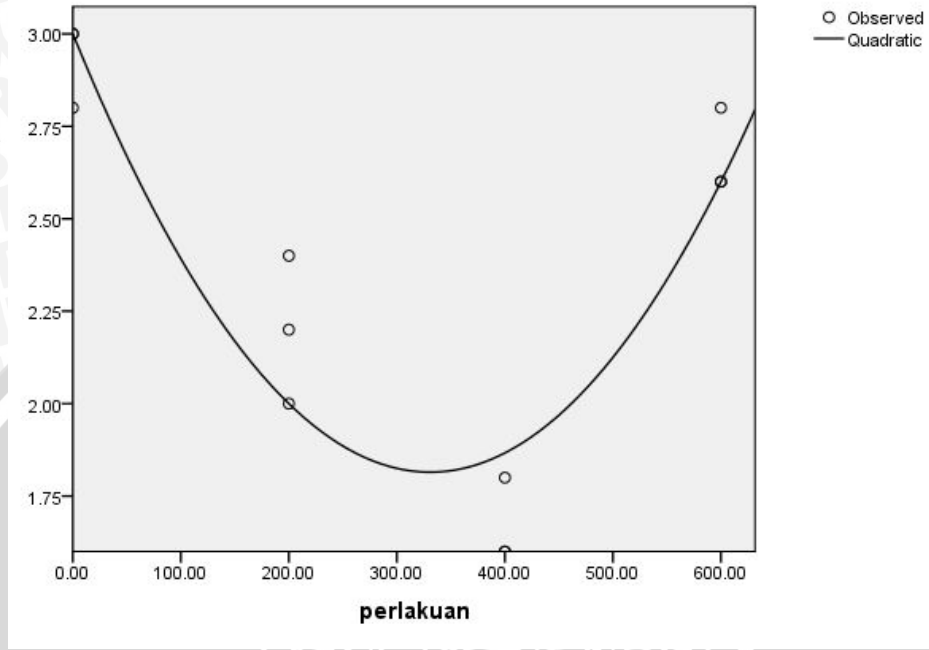
Rerata Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B=1.66	-	-	-	-	a
A=2,20	0.53**	-	-	-	b
C=2.66	0,93**	0,40*	-	-	c
K=2,93	1.26**	0,73**	0.33*	-	d

Keterangan : * : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Equation	Model Summary					Parameter Estimates		
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2
Quadratic	.855	26.578	2	9	.000	3.000	-.007	1.083E-5
The independent variable is perlakuan.								

nekrosis



LAMPIRAN 6. Lanjutan

EDEMA

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,4	2,4	2,4	7,2	2,4
400 ppm (B)	1,8	2	1,8	5,6	1,8
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,8	8	2,6
Kontrol positif (K+)	2,8	3	3	8,8	2,9
Kontrol negatif (K-)	1,8	1,4	1,6	4,8	1,6

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	db (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	1.876	3	0.622	62.222	0.000
Acak	0.080	8	0.047		
Total	1.947	11			

Post Hoc Tes

Beberapa perbandingan

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	200	.53333*	.08165	.001	.2719	.7948
	400	1.06667*	.08165	.000	.8052	1.3281
	600	.26667*	.08165	.046	.0052	.5281
200	0	-.53333*	.08165	.001	-.7948	-.2719
	400	.53333*	.08165	.001	.2719	.7948
	600	-.26667*	.08165	.046	-.5281	-.0052
400	0	-1.06667*	.08165	.000	-1.3281	-.8052
	200	-.53333*	.08165	.001	-.7948	-.2719
	600	-.80000*	.08165	.000	-1.0615	-.5385
600	0	-.26667*	.08165	.046	-.5281	-.0052
	200	.26667*	.08165	.046	.0052	.5281
	400	.80000*	.08165	.000	.5385	1.0615

Berdasarkan objek yang diamati:

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

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

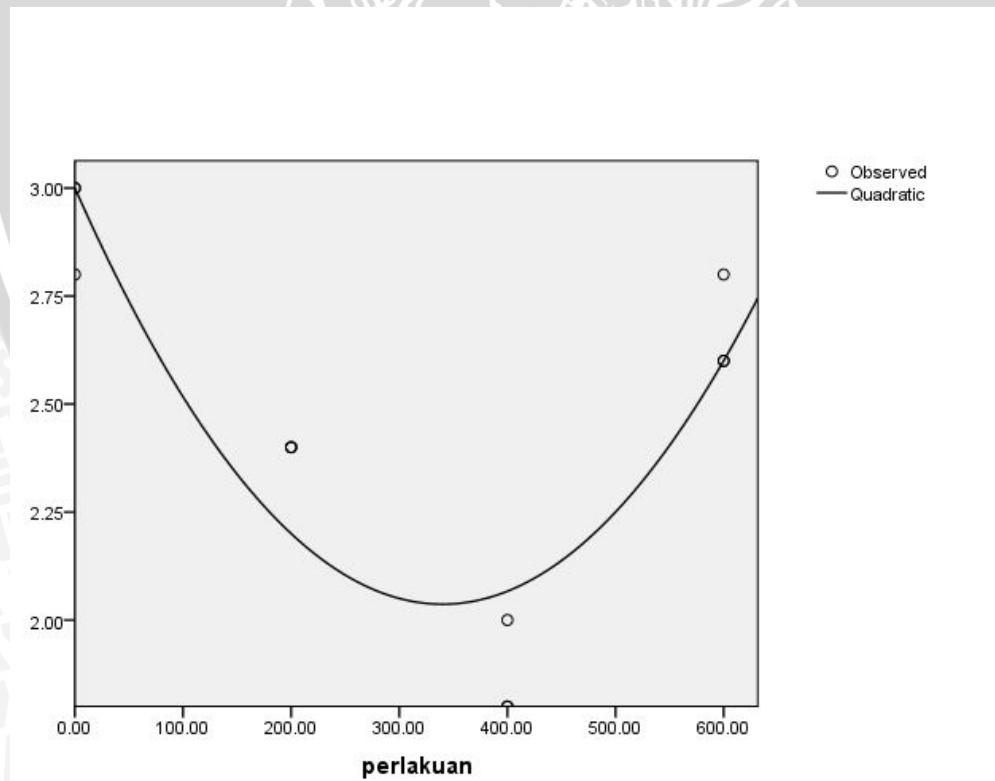
Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B=1.8	-	-	-	-	a
A=2,4	0.53**	-	-	-	b
C=2.6	0,80**	0,27*	-	-	c
K=2,9	1.07**	0,53**	0.26*	-	d

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

Equation	Model Summary					Parameter Estimates		
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2
Quadratic	.822	20.769	2	9	.000	3.000	-.006	8.333E-6



LAMPIRAN 6. Lanjutan

KONGESTI

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
200 ppm (A)	2,6	2,4	2,4	7,4	2,46
400 ppm (B)	1,8	1,8	2	5,6	1,86
600 ppm (C)	2,6	2,6	2,8	8	2,73
Kontrol positif (K+)	3,2	3	3	9,2	3,06
Kontrol negatif (K-)	1,6	1,6	1,8	5	1,6

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	JK (Jumlah Kuadrat)	db (Derajat Bebas)	KT (Kuadrat Tengah)	F hitung	Sig.
Perlakuan	2.320	3	0.773	58.000	0.000
Acak	0.107	8	0.013		
Total	2.427	11			

Keterangan: * berbeda sangat nyata (sig<0,01)

Post Hoc Tes

Beberapa perbandingan

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	200	.60000*	.09428	.001	.2981	.9019
	400	1.20000*	.09428	.000	.8981	1.5019
	600	.33333*	.09428	.031	.0314	.6353
200	0	-.60000*	.09428	.001	-.9019	-.2981
	400	.60000*	.09428	.001	.2981	.9019
	600	-.26667	.09428	.085	-.5686	.0353
400	0	-1.20000*	.09428	.000	-1.5019	-.8981
	200	-.60000*	.09428	.001	-.9019	-.2981
	600	-.86667*	.09428	.000	-1.1686	-.5647
600	0	-.33333*	.09428	.031	-.6353	-.0314
	200	.26667	.09428	.085	-.0353	.5686

	400	.86667*	.09428	.000	.5647	1.1686
--	-----	---------	--------	------	-------	--------

Berdasarkan objek yang diamati:

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

* = tidak berbeda nyata

Keterangan:

Jika Sig > 0,05 : tidak berbeda nyata

Sig < 0,05 : berbeda nyata

Sig < 0,01 : sangat berbeda nyata

Rerata Perlakuan	B	A	C	K	Notasi
B=1.86	-	-	-	-	a
A=2,46	0,6**	-	-	-	b
C=2.73	0,8**	0,2 ^{ns}	-	-	b
K=3,06	1.2**	0,6**	0,4**	-	c

Keterangan : ns : non significant (tidak berbeda)

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Equation	Model Summary					Parameter Estimates		
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1	b2
Quadratic	.823	20.935	2	9	.000	3.140	-.006	9.167E-6

