PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR ALGA MERAH (*Gracilaria* sp.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI, GINJAL dan USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :
DHANAR ELOK AGUSTINI
NIM. 0810850035

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR ALGA MERAH (*Gracilaria* sp.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI, GINJAL dan USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.

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 :
DHANAR ELOK AGUSTINI
NIM. 0810850035

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK KASAR ALGA MERAH (*Gracilaria* sp.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI, GINJAL dan USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) PASCA DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas* sp.

Oleh :
DHANAR ELOK AGUSTINI
NIM. 0810850035

Menyetujui,

Dosen Penguji	Dosen Pembimbing I
(Dr. Ir. Mohammad Fadjar, MSc)	**(Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc)**
NIP. 19621014 198701 1 001	**NIP. 19610310 198701 2 001**
Tanggal:	**Tanggal:**

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS)

NIP. 19600425 198503 1 002

Tanggal:

Mengetahui,

Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberi kemudahan dan kelancaran dalam melaksanakan skripsi
2. Ibu Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc dan Bapak Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS selaku dosen pembimbing.
3. Orang tua tercinta yang telah memberi do'a dan dukungan yang kuat.
4. Suami dan anak tersayang yang selalu memberi semangat dan motivasi penulis untuk segera menyelesaikan laporan skripsi.
5. Bajak Tambak '08 yang selalu memberi semangat dan kebersamaan yang tak terlupakan.
6. Rekan-rekan penulis yang telah banyak memberikan bantuan ikut berperan dalam memperlancar penelitian dan penulisan ini.

Malang, 27 Februari 2014

Penulis

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

DHANAR ELOK AGUSTINI. Pengaruh pemberian imunostimulan ekstrak kasar *Gracilaria* sp. terhadap histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) pasca diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. **(di bawah bimbingan Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc dan Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS).**

Sistem budidaya pada ikan air tawar, khususnya pada ikan mas telah mencapai tahap intensifikasi. Hal tersebut memicu peningkatan produksi dari tahun ke tahun. Produksi ikan mas pada tahun 2010 mencapai 374.112 ton. Jumlah ini melampaui target awal sebanyak 267.100 ton. Namun tetap saja dalam pelaksanaan budidayanya masih terdapat banyak kendala. Salah satunya adalah serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* sp. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi yang bisa mengakibatkan kematian benih sampai 90%. Salah satu alternatif pencegahan dari efek penyakit yang menyerang ikan yaitu dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan (sistem imun). Rumput laut *Gracilaria* sp. dapat dijadikan salah satu alternatif immunostimulan alami untuk mengatasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* sp. pada ikan mas.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui cara mendapatkan ekstrak fenol *Gracilaria* sp. serta untuk mengetahui dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. yang dapat memberikan efek penurunan tingkat kerusakan histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2013 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan, ditambah dua kontrol dan masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. pada dosis A(1 gr/l), B(1,5 gr/l) dan C(2 gr/l). K(-) (0 gr/l) dan K(+) sebagai pembanding. Parameter utama pada penelitian ini adalah pengamatan histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas. Sedangkan parameter penunjang adalah pH, suhu dan DO.

Pada pengamatan histopatologi hati, rata-rata pada setiap perlakuan dosis mengalami kerusakan yang sama yaitu kongesti dan nekrosis. Pada pengamatan histopatologi ginjal mengalami kongesti, sel radang pada limfosit dan nekrosis pada tubulus. Pada pengamatan histopatologi terjadi kerusakan berupa nekrosis dan edema. Pada perlakuan K(-), A(1 gr/l) dan C(2 gr/l) mengalami kerusakan dengan persentasi sebesar 25-50% dan dikategorikan pada kerusakan berat. Pada dosis B(1,5 gr/l), penurunan kerusakan sudah mulai dapat dilihat dengan turunnya persentase kerusakan menjadi 6-25% dan dikategorikan pada kerusakan sedang.

Parameter penunjang yaitu pengamatan terhadap kualitas air diantaranya pH, suhu dan DO memberikan kisaran nilai yang sesuai dengan kelangsungan hidup ikan mas. Nilai kisaran kualitas air sebagai media pemeliharaan selama perlakuan, yaitu : pH 7,63 – 7,79, suhu 25 – 36 ^{o}C dan DO 5,64 – 6,39.

Berdasarkan hasil penelitian ini, untuk menurunkan tingkat kerusakan histopatologi hati, ginjal dan usus pada ikan mas (*Cyprinus carpio*), disarankan mengggunakan dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. sebesar 1,5 gr/l.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul Pengaruh Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar *Gracilaria* Sp. Terhadap Histopatologi Hati, Ginjal dan Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Pasca Diinfeksi Bakteri *Aeromonas* sp. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan meliputi pembuatan ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*, pemberian immunostimulan, penginfeksian bakteri, pengamatan histopatologi jaringan hati, ginjal dan usus serta kualitas air selama pemeliharaan.

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

Malang, 27 Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ..... **i**

HALAMAN PENGESAHAN ..... **ii**

UCAPAN TERIMA KASIH ..... **iii**

RINGKASAN ..... **iv**

KATA PENGANTAR ..... **v**

DAFTAR ISI ..... **vi**

DAFTAR GAMBAR ..... **ix**

DAFTAR TABEL ..... **x**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **xi**

1. PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.4 Kegunaan Penelitian 4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian 5

2. TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Sifat Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 7
2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 7
2.2 Sifat Biologi Bakteri *Aeromonas* Sp. 8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Aeromonas* Sp. 8
2.2.2 Habitat dan Penyebaran *Aeromonas* Sp. 9
2.2.3 infeksi tanda Penyerangan *Aeromonas* Sp. 9
2.3 Sifat Biologi Alga Merah (*Gracilaria* Sp.) 11
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Alga Merah (*Gracilaria* Sp.) 11
2.3.2 Habitat dan Penyebaran Alga Merah (*Gracilaria* Sp.) 12
2.3.3 Bahan Aktif Alga Merah (*Gracilaria* Sp.) 13
2.3.4 Kandungan Ekstrak Fenol Pada *Gracilaria* Sp 14
2.3.5 Peranan Ektrak fenol dalam Bidang Imunologi 14
2.4 Imunostimulan 15
2.4.1 Pengertian Imunostimulan 15
2.4.2 Metode Pemberian Imunostimulan 16

2.4.3 Mekanisme kerja Imunostimulan 18
2.5 Pengamatan Histopatologi pada Jaringan 18
2.6 Jaringan Hati sebagai Parameter Uji Histopatologi 20
2.7 Jaringan Ginjal sebagai Parameter Uji Histopatologi 22
2.8 Jaringan Usus sebagai Parameter Uji Histopatologi 23
2.9 Ekstrak Fenol 24
2.9.1 Ekstraksi 24
2.9.2 Senyawa Fenol 26
2.10 Kualitas Air 27

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN 29
3.1 Materi Penelitian 29
3.1.1 Alat-alat Penelitian 29
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian 29
3.2 Metodologi Penelitian 30
3.3 Rancangan Penelitian 31
3.4 Penelitian Pendahuluan 33
3.5 Prosedur Penelitian 37
3.4.1 Persiapan Penelitian 37
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian 37
3.5 Parameter Uji 41
3.5.1 Parameter Utama 41
3.5.2 Parameter Penunjang 41
3.6 Analisis data 42

4. HASIL DAN PEMBAHASAN 45
4.1 pembiakan Bakteri *Aeromonas* Sp. 45
4.2 Gambaran Histopatologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 45
4.3 Gambaran Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 52
4.4 Gambaran Histopatologi Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 58
4.5 Kualitas Air 64

5. KESIMPULAN DAN SARAN 66

DAFTAR PUSTAKA 67

LAMPIRAN 72

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Ikan mas (*Cyprinus carpio*) 6
2. Bakteri *Aeromonas hydrophillla* 9
3. Rumput Laut *Gracilaria veruccosa* 12
4. Denah Penelitian In Vivo 30
5. Penentuan Pelarut Terbaik Untuk Perendaman 31
6. Penentuan Waktu Terbaik Untuk Perendaman 32
7. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria* sp. 34
8. Penentuan Kaktu Perendaman Terbaik Ikan dengan Ekstrak Kasar *Gracilaria* sp. 35
9. Alur Perhitungan Skoring 42
10. Bakteri *Aeromonas hydrophillla* 45
11. Struktur Histopatologi Hati Ikan Kontrol dan Ikan Perlakuan 47
12. Struktur Histopatologi Ginjal Ikan Kontrol dan Ikan Perlakuan 53
13. Struktur Histopatologi Usus Ikan Kontril dan Ikan Perlakuan 59

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Metode imunostimulan pada ikan	17
2.	Kelebihan dan kekurangan metode pemberian imunostimulan	17
3.	Rancangan Perlakuan	32
4.	Hasil Uji Daya Hambat	34
5.	Hasil Panjang Gelombang	35
6.	Rerata Skoring Hati	49
7.	Rerata Skoring Ginjal	55
8.	Rerata Skoring Usus	61
9.	Parameter Kualitas Air	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Alat dan Bahan Penelitian 72
2. Proses Maserasi Rumput Laut (*Gracilaria* Sp.) 77
3. Pembuatan Preparat Histopatologi 78
4. Nilai Skoring Jaringan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 81
5. Hasil Skoring Histopatologi Kerusakan Jaringan dengan Program SPSS 16 85
6. Data Kualitas Air 107
7. Data Pengamatan Gejala Klinis 109

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Potensi ikan mas (*Cyprinus carpio*) sebagai ikan budidaya air tawar cukup besar dan memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan jenis ikan konsumsi air tawar lainnya. Berdasarkan data Kementerian Kelautan Perikanan (2011) menunjukkan bahwa produksi ikan mas pada tahun 2010 mencapai 374.112 ton. Jumlah ini melampaui target awal sebanyak 267.100 ton. Jumlah produksi ini diharapkan semakin meningkat dari tahun ke tahun. Menurut Santoso (1993) ikan mas adalah salah satu jenis ikan budidaya air tawar yang paling banyak dibudidayakan petani baik budidaya pembenihan, pembesaran di kolam pekarangan ataupun air deras. Produksi ikan mas dapat mencapai di atas rata-rata ikan konsumsi lainnya. Sebagai contoh masyarakat daerah Bogor, Sukabumi, Cianjur, Tasikmalaya, Jakarta telah lama mengenal dan melaksanakan pembudidayaannya di kolam sekitar tempat tinggal.

Dalam kegiatan pembesaran, diharapkan ikan dapat tumbuh secara maksimal sehingga mencapai ukuran panen atau ukuran pasar melalui penyediaan lingkungan media hidup ikan yang optimal, pemberian pakan serta pengendalian hama dan penyakit. Selain pertumbuhan individu, dalam pembesaran penting untuk menekan tingkat kematian ikan dalam wadah produksi, supaya produksi biomasa ikan dapat dicapai setinggi mungkin (Effendi, 2004).

Kasus terbesar gagalnya panen pada budidaya intensif ikan mas disebabkan adanya serangan penyakit infeksi. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, parasit, jamur dan virus yang secara normal hidup dan berada di perairan. Penyakit infeksi dapat dipicu melalui penyakit non-infeksi yaitu karena meningkatnya stres, intoksikasi dan menurunnya kualitas lingkungan (Zonneveld

et al., 1991). Salah satu bakteri penyebab utama penyakit infeksi ikan mas adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Aeromonas termasuk bakteri gram negatif, tersebar luas pada perairan perairan air tawar, bersifat opportunistik dan terdapat pada usus ikan sehat. Penyakit ini menimbulkan gejala klinis MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*), peradangan (*Hemorrhagic Septicemia*), Ulcer Disease, atau penyakit merah (*Red-Sore Disease*) (Swann and White, 1989).

Penyakit *A. hydrophila* merupakan penyakit bakterial terpenting pada budidaya ikan air tawar di Indonesia. Serangan infeksinya menyebabkan kematian ikan sampai 80 %, sehingga menimbulkan kerugian yang besar dalam usaha budidaya ikan air tawar (Yin *et al.*, 2010; Kamiso, 2003). Hasil penelitian Balitkanwar tahun 2000 menunjukkan bahwa benih ikan mas sering terserang penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*).

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

Salah satu alternatif penanggulangan penyakit melalui peningkatan kekebalan ikan terhadap penyakit adalah menggunakan imunostimulan. Imunostimulan merupakan zat kimia, stresor, atau aksi untuk meningkatkan respon imun ikan yang berinteraksi secara langsung dengan sel sistem imun (Sakai, 1999). Aplikasi immunostimulan sudah banyak dilakukan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan, perendaman maupun melalui suntikan. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan bahan yang dapat digunakan sebagai stimulus guna meningkatkan kekebalan tubuh dalam upaya

menanggulangi penyakit, baik yang disebabkan oleh virus, bakteri maupun mikroorganisme berbahaya pada ikan maupun udang (Roza dan Johnny, 2004).

Galindo dan Hosokawa (2004), mengatakan ada 10 kelompok immunostimulan yaitu produk bakteri, jamur, ragi/khamir, ikatan partikel terlarut dengan β-glukan, glikan-polisakarida, kitin dan kitosan, peptida, ekstrak tumbuhan dan hewan, bahan sintetis dan sitokinin. *Gracilaria* sp. adalah jenis rumput laut budidaya, jumlahnya melimpah, harganya relatif murah dan mengandung komponen bioaktif yang berperan dalam penanggulangan penyakit ikan sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk imunostimulan. Senyawa utama yang terkandung dalam *Gracilaria* sp. yang termasuk golongan alga merah (Rhodophyta) ini adalah senyawa phenol dari golongan florotannin yang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi (Chkhikvishvili dan Ramazanov, 2000).

Belum banyak penellitian yang dilakukan khsususnya mengenai pemanfaatan senyawa fenol dari jenis *Gracilaria* sp. ini sebagai kandidat imunotimulan pada ikan mas. Maftuch *et al*., (2012) menggunakan ekstrak kasar *Gracilaria* sp. untuk meningkatkan respon imun udang windu dengan hasil THC (Total haemocyte count) sebesar 1,675,000 cells/ml. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai manfaat *Gracilaria* sp. sebagai imunostimulan terhadap benih ikan mas terutama mengenai histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas.

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) yang biasa menyerang pada budidaya ikan air tawar sangat merugikan bagi pembudidaya karena menyebabkan kematian massal organisme budidaya. Pencegahan penyakit biasanya dilakukan menggunakan bahan-bahan

kimia. Namun, obat-obatan ini tidak baik untuk jangka panjang karena dapat menimbulkan resistensi. Selain itu, kandungan antibiotik juga menyebabkan jatuhnya harga ikan di pasar Internasional. Oleh karena itu, dilakukan penelitian tentang penggunaan imunostimulan secara alami tanpa menimbulkan efek.

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

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

1. Bagaimana cara mendapatkan ekstrak kasar dari rumput laut *Gracilaria* sp.?
2. Berapa dosis optimal untuk menjadikan ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp. sebagai bahan imunostimulan pada ikan mas (*Cyprinus* carpio) secara in vivo ditinjau dari histopatologi hati, ginjal dan usus ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Mendapatkan ekstrak kasar dari *Gracilaria* sp.
2. Mengetahui dosis terbaik *Gracilaria* sp. yang dapat menurunkan tingkat kerusakan pada histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas (*cyprinus carpio*).

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peranan pemberian ekstrak kasar dari alga merah *Gracilaria* sp. terhadap peningkatan respon kekebalan tubuh ikan mas untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* sp.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada 1 Februari–30 April 2013 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan di Balai Karantina Ikan Juanda, Surabaya.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

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

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

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Super Kelas	: Pisces
Kelas	: Osteichthyes
Sub Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub Ordo	: Cripinoidea
Famili	: Cyprinidae
Sub Famili	: Cyprinenae
Genus	: *Cyprinus*
Spesies	: *Cyprinus carpio*

Gambar 1. Ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Secara morfologi, ikan mas memiliki ciri-ciri bentuk tubuh agak memanjang dan memipih tegak. Mulut terletak di ujung tengah dan dapat disembulkan. Bagian anterior mulut terdapat dua pasang sungut berukuran pendek. Hampir

seluruh tubuh ikan mas ditutupi sisik dan hanya sebagian kecil tidak ditutupi sisik. Sisik ikan mas berukuran relatif besar dan digolongkan ke dalam tipe sisik sikloid dengan warna yang sangat beragam (Rochdianto 2005).

Ikan mas memiliki banyak ras atau strain. Perbedaan sifat dan ciri dari ras ikan mas disebabkan oleh adanya interaksi antara genotype dan lingkungan kolam, musim dan cara pemeliharaan yang terlihat dari penampilan bentuk fisik, bentuk tubuh dan warnanya. Secara umum ikan mas mempunyai bentuk badan agak memanjang pipih ke samping (*compressed*), mulut berada di ujung tengah (terminal), bersifat elastik, serta memiliki dua pasang kumis dan kadang-kadang memiliki sepasang sungut. Hampir seluruh tubuh ikan mas ditutupi sisik (Mantau dan Sudarty, 2011).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan mas menyukai tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras, seperti di pinggiran sungai atau danau. Ikan mas dapat hidup baik di daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl) dan pada suhu 25-30^{0}C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadar garam) 25-30$^0/_{00}$ (Khairuman, *et al*., 2008).

Menurut Cahyono (2000), ikan mas banyak dijumpai di sungai-sungai, danau-danau dan genangan-genangan air. Ikan mas mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Ikan mas mudah beradaptsi dengan fluktuasi lingkungan yang relatif tinggi, misalnya perubahan suhu sampai 5^{0}C dan penurunan O_2 sampai 2 mg/liter.

2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan mas termasuk pemakan segala. Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan mas senang memakan jasad hewan atau tumbuhan yang hidup di dasar

perairan/kolam, misalnya *chironomidae, olighochaeta, tubificidae, trichoptera, molusca*, dan sebagainya. Selain itu juga protozoa dan zooplankton seperti *copepod* dan *cladocera*. Hewan-hewan kecil tersebut disedot bersama lumpurnya, diambil yang dapat dimanfaatkan dan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Santoso,1993).

Ikan mas tergolong jenis omnivore, yakni ikan yang dapat memangsa berbagai jenis makanan, baik yang berasal dari tumbuhan maupun binatang renik. Namun, makanan utamanya adalah tumbuhan dan binatang yang terdapat di dasar dan tepi perairan (Khairuman, *et al*., 2008)

2.2 Sifat Biologi Bakteri *Aeromonas* sp.

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Aeromonas* sp.

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* (Gambar 2) menurut Buchanan dan Gibsons (1974), adalah sebagai berikut :

Filum : Protophyta

Klas : Schizomyecetes

Ordo : Pseudomonodale

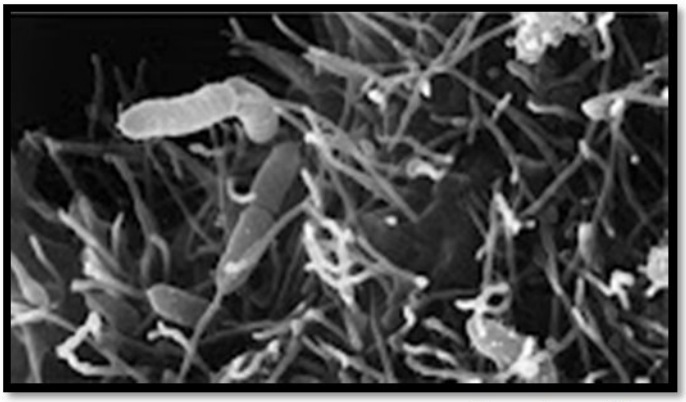
Sub Ordo : Pseumodineae

Family : Vibrionceae

Genus : Aeromonas

Spesies : *Aeromonas hydrophila*

Bakteri ini bersifat gram negative, berbentuk batang lurus dengan ujung sel membulat yang mendekati bentuk spiral, berdiameter 0,3-1,0 µm, dan panjang 1,0-3,5 µm, bergerak (motile dengan flagellum polar), tidak membentuk kapsul dan spora. Koloninya berbentuk bulat. Tepi rata, cembung dan berwarna kuning keputih-putihan (krem) dengan diameter 2-3 µm pada inkubasi selama 48 jam dalam suhu 25^0 C (Sarono, *et al*., 1993).



Gambar 2. Bakteri *Aeromonas hydrophila* (Sumber: Bima, 2009

2.2.2 Habitat dan Penyebaran *Aeromonas* sp.

Genus *A. hydrophila* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar, keberadaan aeromonas di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sediment dasar. Bakteri ini diakui sebagai pathogen dari hewan yang berdarah dingin (Holmes *et al*., 1996).

Bakteri *A. hydrophila* umumnya hidup di air tawar yang mengandung bahan organik tinggi. Hidup pada temperatur optimal 22 - 29°C. Bakteri ini senang hidup di lingkungan perairan bersuhu 15 - 30°C dan pH antara 5,3 - 9 (Ghufran dan Kordi, 2004 *dalam* Ayu *et.al,* 2008).

Bakteri *A. hydrophila* bersifat fakulatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen (Kabata, 1985) dan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair. Bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-30^{0}C, pH 5,5–9. Perkembangbiakannya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1993).

2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan *Aeromonas* sp.

Infeksi bakteri dapat terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau masuk melalui insang, kemudian masuk ke pembuluh darah dan akan menyebar pada organ dalam lainnya. Infeksi bakteri gram negatif

ini bersifat laten (berkepanjangan), jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Organ yang dapat diserang antara lain insang, ginjal, pankreas, limpa bahkan otot tulang. Gejala penyakit ini bervariasi mengingat kondisi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain virulensi dari bakteri, resistensi ikan terhadap infeksi, ada atau tidaknya *septicemia* dan *bacteremia* serta faktor yang diasosiasikan dengan stres pada ikan (Kabata, 1985).

Aeromonas hydrophila telah dihubungkan dengan beberapa penyakit pada ikan, termasuk busuk ekor, busuk sirip dan *haemorrahagic septicaemia*. *haemorrahagic septicaemia* ditandai oleh adanya luka kecil pada permukaan, sering mengarah pada pengelupasan sisik, pendarahan pada insang dan dubur, borok, bisul, mata membengkak, dan pembengkakan perut. Pada bagian dalam, dimungkinkan adanya cairan *ascetic* di dalam rongga peritoneal, kekurangan darah merah dan pembengkakan ginjal, hati dan usus (Miyazaki dan Kage, 1985) *dalam* Rahardjo, 2012).

Menurut Ayu *et.al* (2008), bakteri *A. hydrophila* menyerang hampir semua jenis ikan air tawar dan merupakan organisme oportunis karena penyakit yang disebabkannya mewabah pada ikan-ikan yang mengalami stres atau pada pemeliharan dengan padat tebar tinggi. Serangan bakteri ini bersifat laten (berkepanjangan), sehingga tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Serangan bakteri ini baru terlihat apabila ketahanan tubuh ikan menurun akibat stres yang disebabkan menurunnya kualitas air, kekurangan pakan atau penanganan ikan yang kurang baik. Menurut Snieszko dan Axelrod, 1971 *dalam* Ayu *et.al* (2008), terdapat empat tingkatan serangan *A. hydrophila*, yaitu:

Laten : Tidak memperlihatkan gejala penyakit, namun pada organ dalam terdapat bakteri penyebab penyakit.

Kronis : Gejala tukak, bisul, abses yang perkembangannya berlangsung lama.

Sub Akut : Gejala dropsi, lepuh, abses, perdarahan pada sisik

Akut : Septisemia yang fatal, infeksi cepat dengan sedikit tanda-tanda penyakit yang terlihat.

2.3 Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

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

Klasifikasi *Gracilaria verrucosa* (Gambar 3) menurut Luning (1990) adalah sebagai berikut:

Divisi : Rhodophyta

Class : Rhodophyceae

Ordo : Gracilariales

Family : Gracilariaceae

Genus : Gracilaria

Spesies : *Gracilaria veruccosa*

Gracilaria verrucosa merupakan salah satu spesies alga merah yang banyak tumbuh di perairan Indonesia. Hidup di laut, tidak memiliki akar, batang, daun sejati dan umumnya hidup di dasar perairan. Fungsi akar, batang dan daun yang tidak dimiliki rumput laut tersebut digantikan oleh thallus. Alga merah merupakan kelompok yang jenis-jenisnya memiliki berbagai bentuk dan variasi warna. Salah satu ciri alga merah adalah warnanya akan berubah menjadi ungu atau merah jika mengalami kekeringan akibat terkena sinar matahari langsung (Juneidi, 2004).

Gracilaria verrucosa berbentuk rumpun, dengan tipe percabangan tidak teratur, *dichotomous, alternate, pinnate*, ataupun bentuk-bentuk percabangan yang lain. Thallus pada umumnya berbentuk silindris atau agak memipih,. Ujung-

ujung thallus umumnya meruncing, permukaan thallus halus atau berbintil-bintil. Keadaan permukaan thallus yang berbintil, umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk karposporofit. Panjang thallus sangat bervariasi, sampai mencapai lebih dari 60 cm (Sjafrie, 1990).

Gambar 3. Rumput Laut (*Gracilaria veruccosa*).

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

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

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

Menurut Sjafrie (1990), *Gracilaria verrucosa* hidup di daerah litoral dan sub litoral, sampai kedalaman tertentu, yang masih dapat dicapai oleh penetrasi

cahaya matahari. Beberapa jenis hidup di perairan keruh, dekat muara sungai. Di Indonesia terdapat lebih kurang 15 jenis *Gracilaria* yang menyebar di seluruh kepulauan. Di Bangka, *Gracilaria convervoides* hidup melekat di atas batu karang pada kedalaman 2 - 5 meter. Di Lombok, *Gracilaria gigas* ditemukan di perairan payau. Daerah sebaran *Gracilaria* di Indonesia meliputi: Kepulauan Riau, Bangka, Sumatera Selatan, Jawa, Bali, Lombok, Sumbawa, Flores, Pulau Bawean, Kalimantan, Sulawesi Selatan dan Maluku.

2.3.3 Bahan Aktif Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

Senyawa-senyawa yang diisolasi dari rumput laut diketahui memiliki fungsi sebagai antibakterial (bakterisidal). Senyawa-senyawa tersebut antara lain asam amino, terpenoids, phlorotanin, asam acrilic, senyawa phenol, steroid, hologenated keton dan alkanes, cyclic polysulphida dan asam lemak (Mtolera dan Semesi, 2008).

Gracilaria verrucosa merupakan penghasil agar, setiap jenis *Gracilaria* spp. menghasilkan agar dengan persentase kandungan dan kekuatan gelnya yang berbeda. Agar merupakan koloid hidropilik yang diekstrak dari alga merah. Komponen kimia ini mengandung polisakarida bersulfat, yang formasinya dengan senyawa lainnya dalam agar membentuk sejumlah molekul yang salah satunya berperan dalam *immunomodulatory*. Polisakarida pada alga merah biasanya berisi galaktosa maupun galaktan bersulfat (Naidu, 2000 *dalam* Jasmanindar, 2009).

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

Selain sebagai bahan antibakteri, rumput laut juga dapat digunakan sebagai salah satu bahan imunostimulan. Karagenan, substansi yang banyak terdapat pada alga merah (*Rhodophyta*) termasuk di dalamnya *Gracilaria verrucosa*, memiliki kandungan bahan aktif β-Glucan yang dapat digunakan sebagai imunostimulan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh baik pada ikan maupun udang.

2.3.4 Kandungan Ekstrak Fenol pada G*racilaria* sp.

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

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

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

2.3.5 Peranan Ekstrak Fenol dalam Bidang Imunologi

Katekin merupakan senyawa fenol, aktivitasnya se-bagai antioksidan yang lebih tinggi daripada antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol). Katekin mempunyai efek anti-proliferatif dan bersifat toksik terhadap sel kanker. Kebanyakan senyawa fenol telah diuji secara *in vitro* dan *in vivo* memperlihatkan kemampuan antioksidan, antiinflamasi dan antialergi. Sedangkan senyawa yang

mempunyai bioaktifitas sebagai imunostimulan agen adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoids, alkaloid dan polifenol (Suhirman dan Winarti, 2010).

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

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

2.4 Imunostimulan

2.4.1 Pengertian Imunostimulan

Immunostimulan merupakan senyawa yang dapat merangsang aktivitas pertahanan tubuh. Keistimewaan immunostimulan dibandingkan vaksinasi adalah sifatnya non spesifik, artinya bahan tersebut mampu merangsang peningkatan ketahanan ikan dan udang terhadap berbagai penyakit (Raa, 2000). Imunostimulan meningkatkan respon imun non spesifik, tidak ada komponen sel memori. Jawetz *et al.,* (1982) menjelaskan immunostimulan merupakan senyawa biologis, sintesis atau bahan lainnya yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh non spesifik.

Imunostimulan adalah peningkatan kekebalan spesifik dan non spesifik yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit ikan pada sistem budidaya dari bahan alami yang efektif, aman untuk manusia dan lingkungan (Sukenda, Jamal, Wahyuningrum dan Hasan, 2008). Sel-sel sistem imun

tersebar di seluruh tubuh dan ditemukan di dalam sumsum tulang, timus, darah, kelenjar getah bening, limpa, saluran nafas, saluran cerna, saluran urin dan jaringan. Pertahanan imun terdiri atas sistem imun non-spesifik dan sistem imun spesifik (Baratawijaya, 2004).

Menurut Hanifah (2011), Imunostimulan adalah senyawa tertentu yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik, dan terjadi induksi non spesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral.

2.4.2 Metode Pemberian Imunostimulan

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 imunostmulan 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.
- Oral : memberikan respon imun non spesifik yang baik dan merupakan metode yang lebih efektif.

Kondisi dan metode pemeliharaan yang berbeda telah memberikan cara berbeda dalam penerapan pemberian imunostimulan. Metode dasar pemberian imunostimulan umumnya melalui tiga metode yaitu penyuntikan, perendaman dan oral. Metode pemberian imunostimulan pada ikan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Metode Imunostimulan pada Ikan

Cara	Dosis	Waktu Ekspos
Penyuntikan	Bervariasi	1 atau 2 dosis
Perendaman	2-10 mg/l	10 menit sampai beberapa jam
Oral	0,01-4%	Beberapa hari atau lebih

Sumber : Galindo dan Hosokawa, (2004)

Metode penyuntikan dan perendaman hanya cocok pada kondisi pemeliharaan intensif, membutuhkan penanganan dan tenaga lebih besar, waktu perlakuan lama dan menjadi tidak praktis ketika berat ikan kurang dari 15 gram. Pemberian imunostimulan melalui oral, adalah metode paling ekonomis, cocok diterapkan pada budidaya ektensif, dalam pelaksanaannya tidak menimbulkan stres pada ikan dan memungkinkan pelaksanaan secara masal berkenaan dengan ukuran ikan yang digunakan. Perbedaan ketiga metode ini disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Kelebihan dan kekurangan metode pemberian imunostimulan

Metode	Kelebihan	Kekurangan
Penyuntikan	Cara imunostimulan paling efektif, hemat untuk ikan besar.	Pemeliharaan intensif, butuh tenaga ekstra. Potensi ikan untuk stres tinggi. Berat ikan harus >10-15 g.
Perendaman	Dilakukan pada ikan kecil (<5 g). Metode paling ekonomis pelaksanaan perendaman *non-stressing*.	Cocok untuk budidaya intensif. Keampuhan di bawah metode injeksi. Pengangkatan ikan berpotensi menimbulkan stres.
Oral	Tidak berpotensi menimbulkan stres. Dapat digunakan pada segala ukuran ikan. Butuh sedikit tenaga dan biaya.	Keampuhan rendah. Butuh banyak bahan imunostimulan untuk mencapai tingkat proteksi.

Sumber : Galindo dan Hosokawa (2004)

Seperti halnya dengan vaksin, immunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (oral) dan perendaman. Pemilihan cara aplikasi immunostimulan 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).

2.4.3 Mekanisme Kerja Imunostimulan

Ekstrak kasar dari *Gracilaria verrucosa* telah dibuktikan mempunyai kemampuan untuk mempertinggi aktivasi pada sel-T dan oleh karenanya meningkatkan aktivitas imunostimulan secara potensial. Bagaimanapun juga, ditemukan juga kandungan sitotoksik pada konsentrasi yang lebih tinggi. Hal tersebut bisa terjadi, saat toksik timbul bersamaan dengan penambahan ekstrak yang dapat mengaktivasi kematian sel seperti sel T pada peningkatan pemberian dosis ekstrak. Kita berspekulasi bahwa komponen yang ada pada ekstrak kasar dari tumbuhan dapat memberikan respon yang positif terhadap kerja imunostimulan. Isolasi dan karakterisasi pada komponen tersebut dan mengevaluasinya lebih lanjut lagi diharapkan dapat menghasilkan suatu mekanisme yang lebih detail terhadap aktivasi imun (Kumar *et al*., 2012).

Berbeda dengan vaksin, imunostimulan tidak direspon ikan dengan mensintesis antibodi, melainkan peningkatan aktivitas dan reaktivitas sel pertahanan seluler ataupun humoral. Peningkatan ini didasarkan atas kemampuan imunostimulan menginduksi berlangsungnya transformasi limfoblastik yang ditunjukkan dengan memakai isotop tritium (H3). Aktivitas fagositik ini merupakan manifestasi peningkatan respon seluler dan pada akhirnya akan meningkatkan respon humoral (Alifudin, 2002).

2.5 Pengamatan Histopatologi pada Jaringan

Patologi anatomi adalah ilmu yang mempelajari penyakit dengan memeriksa sampel jaringan yang diperoleh melalui pembedahan atau autopsy dari bagian-bagian tertentu dari tubuh. Patologi anatomi membantu menentukan penyebab dan efek dari penyakit yang menyerang (Anonymous, 2012).

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

Berikut merupakan prosedur pembuatan preparat histologi menurut Barlianto (2008), adalah :

a) Persiapan jaringan

- **Fiksasi**

Dapat dilakukan sebelum atau sesudah penyayatan jaringan dan dilakukan sesuai dengan tujuan pemeriksaan. Tujuan fiksasi antara lain adalah untuk mempertahankan struktur sel seperti semula, mencegah terjadinya proses autolysis oleh enzim dan menegah pertumbuhan bakteri atau jamur. Bahan fiksasi yang dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan adalah larutan Bouin yang terdiri dari asam pikrat jenuh., formaldehyde dan asam cuka glacial. Buffer formalin dapat juga digunakan sebagai bahan fiksasi jaringan.

b) Pemrosesan jaringan

- **Dehidrasi**

Proses ini bertujuan untuk melakukan penarikan air dari dalam jaringan secara perlahan sehingga jaringan tidak menyempit. Bahan yang digunakan untuk menarik air harus mulai dengan prosentase dan konsentrasi yang rendah kemudian dinaikkan secara bertahap sampai prosentasi absolute. Umumnya bahan yang digunakan untuk menarik air pada jaringan adalah alkohol.

- **Penjernihan (*Clearing*)**

Penjernihan merupakan tahap transisi, bahan yang digunakan pada tahap ini mempunyai 2 sifat yaitu, dapat melarutkan atau dilarutkan oleh bahan yang digunakan untuk menarik air dari dalam jaringan, dapat melarutkan dan dilarutkan oleh bahan yang digunakan untuk menanam jaringan (*embedding*).

- ***Embedding* (pencetakan jaringan)**

Suhu antara paraffin dengan jaringan harus mendekati sama, jika terjadi suatu perbedaan yang mencolok antara paraffin dan jaringan yang akan ditanam maka akan nampak seperti terdapat gelembung udara disekitar jaringan.

- **Penyayatan jaringan**

Alat yang digunakan adalah mikrotom. Kualitas sayatan jaringan ditentukan oleh ketajaman pisau, sudut potong, kualitas pemprosesan jaringan, kualitas pengeblokan, pemindahan jaringan ke water bath dan suhu water bath harus berkisar 45-50 ^{o}C.

- **Pewarnaan jaringan**

Secara fungsional zat warna dikenal ada yang digunakan untuk mewarnai sel (haemotoksilin dan tolodin blue), dan ada yang digunakan untuk mewarnai sitoplasma sel (eosin dan safranin).

2.6 Jaringan Hati sebagai Parameter Uji Histopatologi

Hati merupakan organ penting yang mensekresikan bahan untuk proses pecernaan. Organ ini umumnya merupakan suatu kelenjar yang kompak, berwarna merah kecoklatan tersusun oleh sel-sel hati (*hepatosit*) (Fujaya, 2004).

Hati merupakan organ vital yang berfungsi sebagai detoksifikasi dan mensekresikan bahan kimia yang digunakan untuk proses pencernaan. Hati berperan penting dalam proses metabolisme dan transformasi bahan pencemar dari lingkungan. Dengan demikian hati merupakan organ yang paling banyak

mengakumulasi zat toksik sehingga mudah terkena efek toksik. Sebagian zat toksik yang masuk ke dalam tubuh setelah diserap oleh sel akan dibawa ke hati oleh vena porta hati, sehingga hati berpotensi mengalami kerusakan. Dengan adanya zat toksik maka dapat mempengaruhi struktur histologi hati sehingga dapat mengakibatkan patologis hati seperti pembengkakan sel, rangkaian nekrosis atau bridging necrosis, degenarasi intralobular dan fokal nekrosis, fibrosis, dan cirrhosis. Penelitian mengenai histopatologi hati ini pernah dilakukan oleh Hidayati, *et.al.* (2009) *dalam* Setyowati *et.al.,* (2012) dengan uji skala laboratorium menggunakan ikan bandeng (*Chanos chanos*) yang dipelihara dalam air yang mengandung lumpur Sidoarjo. Hasil menunjukkan ikan bandeng (*Chanos chanos*) mengalami gejala histopatologis berupa pembengkakan sel, kehilangan integritas pembuluh darah kapiler (sinusoid) yang merupakan percabangan dari vena porta dan arteri hepatica dan nekrosis.

Fungsi hati bermacam-macam. Hati penting untuk metabolisme lipid, karena lipid diangkut di dalam darah sebagai lipoprotein, dan lipoprotein ini dibentuk didalam hati. Hati juga menawarkan berbagai bahan toksik dalam edaran darah (Leeson, 1995).

Hati adalah organ terbesar dan secara metabolisme paling kompleks di dalam tubuh. Organ ini terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan. Jenis zat yang belakangan ini biasanya dapat mengalami detoksifikasi, tetapi banyak toksikan dapat dibioaktifkan dan menjadi lebih toksik. Toksikan dapat menyebabkan berbagai jenis efek toksik pada berbagai organel dalam sel hati, mengakibatkan berbagai kerusakan hati (Lu 1995). Hati sangat rentan terhadap pengaruh cukup banyak zat kimia. Kerentanan itu sebagian dapat diterangkan berdasarkan posisinya dalam sirkulasi cairan tubuh (Koeman 1987).

Beberapa kerusakan pada hati menurut Ressang (1984) *dalam* Juhryyah (2008) yaitu :

1. Atrofi umum, terlihat pada gangguan-gangguan gizi hati. Dalam keadaan kaheksia, hati dapat mengecil hingga separuhnya atau sepertiganya. Pengecilan disebabkan oleh karena sel-sel dan lobuli hati beratrofi. Atrofi setempat disebabkan oleh tekanan (atrofi tekanan), yang dapat menyebabkannya adalah tumor, kista, sarang tuberkulosis, sarang aktinomikosis yang besar, abses dan sebagainya.
2. Degenerasi. Degenerasi suram, berbutir-butir, albuminoid atau parenkim, sering terlihat pada proses-proses septik atau toksik dan pada peracunan. Hati membesar, tepinya membundar. Konsistensinya rapuh sedangkan bidang sayatannya berwarna belang atau beraspek seperti telah dimasak.
3. Distrofi toksik hati (*acute toxic hepatic* = *hepatitis dietetica acuta*). Dalam stadium akut hati lekas mengecil. Warnanya berubah menjadi kuning karena perlemakan sel-sel. Bentuk perakut dapat terjadi dalam beberapa jam.
4. Nekrosa hati. Kausa nekrosa hati dapat dibagi dalam kausa toksopatik dan kausa trofopatik. Kerusakan-kerusakan toksopatik disebabkan karena pengaruh langsung agen yang bersifat toksik (zat-zat kimiawi atau toksin kuman-kuman). Kerusakan trofopatik disebabkan oleh kekurangan langsung atau tidak langsung faktor-faktor yang penting untuk kehidupan sel-sel.

2.7 Jaringan Ginjal sebagai Parameter Uji Histopatologi

Ginjal terdiri dari dua bagian yaitu caput renalis anterior yang tersusun atas jaringan hemapoeitik, limfoid dan endokrin serta trunkus renalis posterior yang tersusun atas nefron-nefron dikelilingi jaringan limfoid interstitial. Sisi kiri dan kanan dari trunkus renalis berdifusi dan membentuk lengkungan yang mengisi ruangan di antara kedua gas bladder. Di bagian posterior dari

lengkungan ini trinkus renalis menipis menyesuaikan lengkungan pada gas bladder. Caput renalis terpisah atas bagian kanan dan kiri terletak di bagian anterior dan lengkungan tersebut memasuki daerah cranium (Sustri, 2010).

Menurut Nabib (1987) *dalam* Juhryyah (2008), menyatakan bahwa secara histologi ginjal terdiri atas tiga unsur utama, yaitu (1) Glomerulus, yakni suatu gelung pembuluh darah kapiler yang masuk melalui arteri aferen, (2) Tubuli sebagai parenkim yang bersama glomerulus membentuk nefron, suatu unit fungsional terkecil dari ginjal, dan (3) Interstisium berikut pembuluh-pembuluh darah, limfe dan syaraf.

Ginjal pada ikan teleostei merupakan organ *myelopoeitic*, berperan dalam pembentukan berbagai kelompok sel darah putih seperti monosit/makrofage dan granulosit (netrofil, basofil, eosinofil), selain itu ginjal depan berperan pula sebagai organ utama dalam pembentukan sel limfosit B. Organ timus dalam perkembangannya berperan sebagai organ limfoid yaitu membentuk limfosit T. Organ limpa lebih banyak berperan dalam pembentukan sel trombosit dan sel darah merah (eritrosit). Berdasarkan sifat responnya dalam menghadapi agen patogen penyerang, sistim imun terbagi atas sistim pertahanan alamiah (*innate immunity*) yang bersifat non spesifik dan pertahanan adaptif (*adaptive immunity*) yang bersifat spesifik (Rombout, 2005).

2.8 Jaringan Usus sebagai Parameter Uji Histopatologi

Menurut Fujaya (2004), usus merupakan segmen yang terpanjang dari saluran pencernaan. Pada bagian depan usus terdapat dua saluran yang masuk kedalamnya, yaitu saluran yang berasal dari kantung empedu (ductus choledochus) dan yang berasal dari pangkreas.

Meskipun panjang usus ikan bisa berbeda-beda sesuai dengan makanannya, tetapi kebanyakan usus ikan merupakan suatu tabung sederhana

yang tidak dapat bertambah diameternya untuk membentuk seperti kolon dibagian belakangnya. Usus bisa lurus, melengkung atau bergulung-gulung sesuai dengan bentuk dari rongga perut ikan. Usus mempunyai suatu epitel silindris sederhana yang berlendir menutupi suatu sub-mukosa yang mengandung sel eosinofilik yang dibatasi oleh suatu lapisan muskularis mukosa yang rapat dan lapisan fibroelastik. Rektum pada ikan berdinding lebih tebal dari pada usus dan sangat berlendir serta dapat sangat berkembang (Nabib dan Pasaribu 1989*) dalam* (Susanto, 2008).

Usus merupakan organ yang sering terpapar oleh agen-agen mikroba dan organ penting dalam hubungannya dengan penyakit. Patogen dan parasit dapat masuk ke dalam usus melului oral, khususnya melalui bahan makanan yang tercemar. Apabila terjadi infeksi, maka limfosit akan menginvasi lapisan usus. kemudian, terjadi peradangan dan kondisi tersebut akan meningkat menjadi degenerasi, deskuamasi sel dan sekresi mukus ke dalam lumen. Setelah itu, nekrosis menyebar ke bagian lamina propia dan jaringan otot licin. Pada epitel mukosa yang sensitif dapat terjadi peradangan yang terlokalisir dan timbul ulcerasi. Hal ini dapat terjadi akibat patogen-patogen usus dan benda-benda asing yang dicerna seperti kayu dan batu. Pada kasus-kasus degenerasi usus yang berat, fungsi absorbsi usus terhenti dan ikan mati (Hoole *et al*. 2001).

2.9 Ekstrak dari Alga Merah (*Gracilaria* sp.)

2.9.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu proses pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi (Khopkar, 1990). Ekstraksi

dibedakan menjadi 2 macam yaitu ekstraksi secara dingin dan ekstraksi secara panas (Dinda, 2009 *dalam* Samad, 2010).

a) Ekstraksi secara dingin

- **Metode Maserasi** : cara pengekstrakan sederhana dengan cara merendam sampel dalam suatu solven selama beberapa hari pada suhu kamar adan terlindung dari cahaya. Metode ini digunakan jika sampel mempunyai sifat mudah larut dalam pelarut.
- **Metode soxhletasi** : metode ekstraksi sampel secara berkesinambungan, cairan ekstrak dipanaskan hingga menguap, uap cairan ekstrak akan terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun mengekstrak sampel dalam kondensor dan selanjutnya masuk lagi ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon.
- **Metode perklorasi** : cara ekstraksi dengan mengalirkan sampel dalam bentuk serbuk yang telah dibasahi.

b) Ekstraksi secara panas

- **Metode refluks** : metode ini banyak digunakan jika sampel yang akan diekstrak mempunyai tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung.
- **Metode destilasi uap** : metode yang digunakan untuk mengekstrak sampel yang mengandung minyak yang mudah menguap atau mengandung senyawa kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal.

Metode ekstraksi yang digunakan untuk membuat ekstrak kasar *fenol G. Veruccosa* adalah metode maserasi, karena cara ini merupakan metode yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana, cukup dengan merendam sampel dalam pelarut. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena

pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) (Julyasih *et al*., 2009).

2.9.2 Senyawa Fenol

Menurut Maqsood (2010) *dalam* Samad (2010), senyawa fenolik adalah zat bioaktif secara luas pada tanaman dan merupakan elemen penting yang biasa digunakan oleh manusia untuk menurunkan berat badan. Senyawa fenolik terdiri dari berbagai macam senyawa seperti flavonoid (anthocyanin, flavonol, flavol, dll) dan beberapa kelas non flavonoid (asam fenola, lignins, stilbenes). Senyawa fenolik bervariasi dalam struktur dan jumlah gugus hidroksil, menyebabkan variasi dalam aktivitas antioksidan. Secara umum, senyawa fenolik bertindak sebagai antioksidan melalui mekanisme dari tindakan yang berbeda, seperti pembilasan radikal bebas, menghilangkan spesies oksigen reaktif, penghambatan enzim oksidatif, chelation dari logam transisi melalui interaksi dengan biomembran. Oleh karena itu, senyawa ini telah dianggap sebagai calon potensial yang menjanjikan sebagai pelindung terhadap oksidasi lipid dan biologis penuaan jaringan.

Fenol menyebabkan denaturasi protein pada dinding sel kuman dengan membentuk struktur tersier protein dengan ikatan nonspesifik atau ikatan disulfida. Sekuisterpenoid dalam minyak atsiri dapat merusak membran sel kuman oleh senyawa lipofilik. Sedang tanin menyebabkan denaturasi protein dengan membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen, menginaktifkan adhesin kuman (molekul untuk menempel pada sel inang), menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler. Flavonoid yang bersifat lipofilik membentuk ikatan kompleks dengan protein

ekstraseluler dan dengan dinding sel kuman, merusak membran sel kuman (Chrisnaningsih, 2006).

Katekin merupakan senyawa fenol, aktivitasnya sebagai antioksidan yang lebih tinggi daripada antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol) (Das, 1994 *dalam* Suhirman dan Winarti, 2010). Sedangkan senyawa yang mempunyai bioaktifitas sebagai imunostimulan agent adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoids, alkaloid dan polifenol (Wagner, 1985 *dalam* Suhirman dan Winarti, 2010).

2.9 Kualitas Air

a. Suhu

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

Proses fisiologi yang terjadi dalam tubuh ikan sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungannya. Sebagian besar mekanisme pertahanan tubuh adalah sangat bergantung pada suhu (temperature-dependent), dan berkembang lebih cepat pada suhu lingkungan yang optimal. Suhu rendah diketahui sebagai faktor pembatas dalam proses metabolisme organisme, termasuk proses induksi kekebalan tubuh. Namun demikian, suhu yang terlalu tinggi juga dapat menekan fungsi kekebalan tubuh (immunosupressive) (Anonymous[b],2013).

Menurut Khairuman *et al.* (2008) ikan mas menyukai tempat hidup (habitat) di perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras seperti di pinggiran sungai atau danau. Ikan mas dapat hidup baik di daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl) dan pada suhu 25-30^0 C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadar garam) 25-30 ppt.

Mantau dan Sudarty (2011) menambahkan, suhu air yang baik untuk pemeliharaan dan pertumbuhan ikan mas berkisar 20-30^{0}C.

b. pH

Derajat keasaman (pH) adalah suatu ukuran dari konsentrasi ion hidrogen yang menunjukkan suasana air tersebut bereaksi asam atau basa. Menurut Cahyono (2000), derajat keasaman (pH) air dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan. Derajat keasaman air sangat rendah atau sangat asam dapat menyebabkan kematian ikan dengan gejala gerakannya tidak teratur, tutup insang bergerak sangat aktif, dan berenang sangat cepat di permukaan air. Perairan yang asam juga berpengaruh terhadap nafsu makan ikan. Zonneveld *et al.* (1991), menyatakan bahwa pH yang optimal dalam pembenihan ikan adalah 6,7-8,2.

c. oksigen terlarut

Oksigen terlarut merupakan perubahan mutu air paling penting bagi kehidupan organisme air. Oksigen terlarut dalam air pada konsentrasi tertentu dapat diserap oleh haemosianin dalam pembuluh darah lamella insang akibat perbedaan tekanan parsial. Oksigen yang diserap kemudian dimanfaatkan dalam proses metabolisme baik untuk pembentukan sel baru (pertumbuhan) dan untuk penggantian sel yang hilang (Asmawi, 1986).

Sumber utama oksigen terlarut dalam air adalah difusi dari udara dan hasil fotosintesis biota yang berklorofil yang hidup di dalam perairan. Sumber utama oksigen terlarut dalam air adalah difusi dari udara dan hasil fotosintesis biota yang berklorofil yang hidup di dalam perairan. Menurut Mantau dan Sudarty (2011), kisaran oksigen terlarut untuk ikan mas yang optimal antara 3-6 ppm.

3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian (Lampiran 1) diantaranya adalah sebagai berikut:

- Hot plate
- Timbangan analitik
- Baskom
- Gunting
- Beaker glass
- Gelas ukur
- Corong
- Nampan
- Spektofotometer
- Spatula
- Vortex
- Toples 2L
- Waterbath
- Rotary evaporator
- Akuarium
- Seser
- Aerator
- Selang aerator
- Thermometer
- pH meter
- DO meter
- Sectio set
- Mokroskop
- Botol film
- *Tissue Proccesor*
- Wadah *embedding*
- *Embedding Machine*'LEICA EG 1120
- *Mikrotom rotary*
- Pisau mikrotom
- Pinset
- *Tissue Floath Bath*
- *Objek Glass*
- *Cover Glass*
- *Water bath*
- Oven
- Fotomikroskop
- Cetakan es

3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Baha-bahan yang digunakan untuk penelitian (lampiran 1) diantaranya adalah sebagai berikut:

- Etanol 96%
- Alga merah *Gracilaria* sp.
- Kertas saring
- Akuabides
- Kertas label
- Ikan mas (*Cyprinus carpio)*
- Bakteri *Aerommonas* sp.
- Pakan ikan
- Akuades
- Tissue
- Formalin 10%
- Aceton
- Xylol
- Paraffin cair
- Paraffin blok
- Gelatin
- Alcohol 96%
- Hematoksilin
- Eosin
- Litium karbonat
- *Entellan* (Lem)/*cannada balsam*
- Koran
- Benang
- Aluminium foil

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental, dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya.Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi. Faisal (1989), menambahkan bahwa penelitian eksperimen adalah penelitian yang secara sengaja memanipulasi suatu variabel (memunculkan atau tidak memunculkan suatu variabel) kemudian memeriksa efek atau akibat yang ditimbulkannya.

Histopatologi menggunakan metode deskriptif yaitu menurut Hartoto (2009), penelitian deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasi objek sesuai dengan apa adanya. Penelitian ini juga sering disebut non eksperimen, karena pada penelitian ini penelitian tidak melakukan kontrol dan manipulasi variabel penelitian. Dengan metode deskriptif, penelitian memungkinkan untuk melakukan hubungan antar variabel, menguji hipotesis, mengembangkan generalisasi, dan mengembangkan teori yang memiliki validitas universal. Di samping itu, penelitian deskriptif juga merupakan penelitian, dimana pengumpulan data untuk melihat pertanyaan penelitian atau hipotesis yang berkaitan dengan keadaan dan kejadian sekarang.

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

3.3 Rancangan Penelitian

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

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

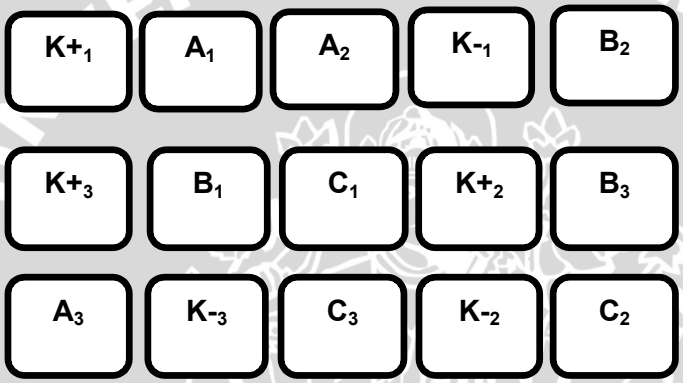
ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar alga merah *Gracilaria* sp. dengan dosis 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l media sebagai immunostimulan. Untuk mempermudah dalam menganalisa diperlukan kontrol-kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol negatif perlakuan sampel dengan penginfeksian bakteri tanpa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. sedangkan kontrol positif yaitu ikan sehat tanpa perlakuan.Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 15 sampel. Rancangan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.berikut :

Tabel 3. Rancangan perlakuan uji imunostimulan secara in vivo

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
K(+)	$K(+)_1$	$K(+)_2$	$K(+)_3$
K(-)	$K(-)_1$	$K(-)_2$	$K(-)_3$
A	A_1	A_2	A_3
B	B_1	B_2	B_3
C	C_1	C_2	C_3

Untuk denah penelitian in vivo disajikan pada (Gambar 4).



Gambar 4. Denah Penelitian In vivo

Keterangan:

$K(+)_n$: Akuarium dengan perlakuan ikan tanpa diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan tanpa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dengan ulangan ke-n.

$K(-)_n$: Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dengan ulangan ke-n.

A_n : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1 gr/l dengan ulangan ke-n.

B_n : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*dengan pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. l 1,5 gr/l dengan ulangan ke-n.

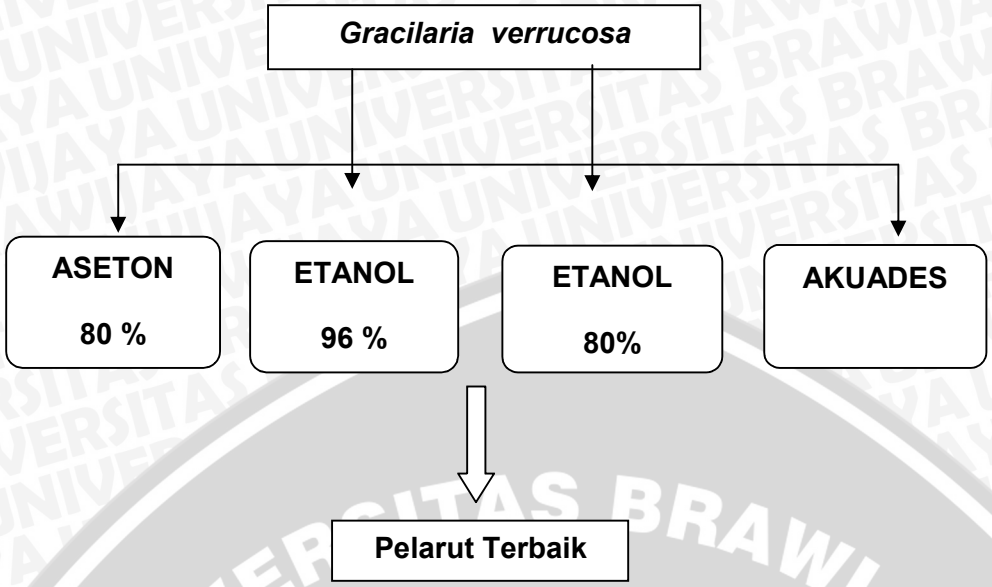
C_n : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*dengan pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 2 gr/l dengan ulangan ke-n.

3.4 Penelitian Pendahuluan

3.4.1 Penentuan pelarut terbaik untuk perendaman

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui pelarut terbaik untuk maserasi, diujicobakan macam-macam pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu aseton 80%, etanol 96%, etanol 80% dan akuades. Setelah diuji cobakan ternyata pelarut aseton 80% telah menguap sebelum dilakukan proses penyaringan, sehingga tidak ada hasil yang diperoleh pada saat perendaman bahan menggunakan pelarut aseton 80%.

Pada proses maserasi dengan menggunakan etanol 96%, 80% dan akuades didapatkan hasil sehingga saat penyaringan diperoleh ekstrak polifenol. Untuk menunjukkan kemampuan pelarut tersebut dalam mengikat polifenol, maka dilakukan uji lanjutan dengan uji daya hambat. Uji daya hambat dilakukan untuk mengetahui diameter daya hambat bakteri yang dihasilkan saat diberi ekstrak fenol. Pengukuran dilakukan selama 24 jam pertama dan 24 jam ke dua, hal tersebut dilakukan untuk mengantisipasi belum tumbuhnya zona hambat pada 24 jam pertama.



Gambar 5. Penentuan Pelarut Terbaik

Berikut hasil uji daya hambat terhadap bakteri *Aeromonas* sp. pada penelitian pendahuluan menggunakan pelarut etanol 96%, etanol 80% dan akuades. Hasil uji daya hambat dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Daya Hambat

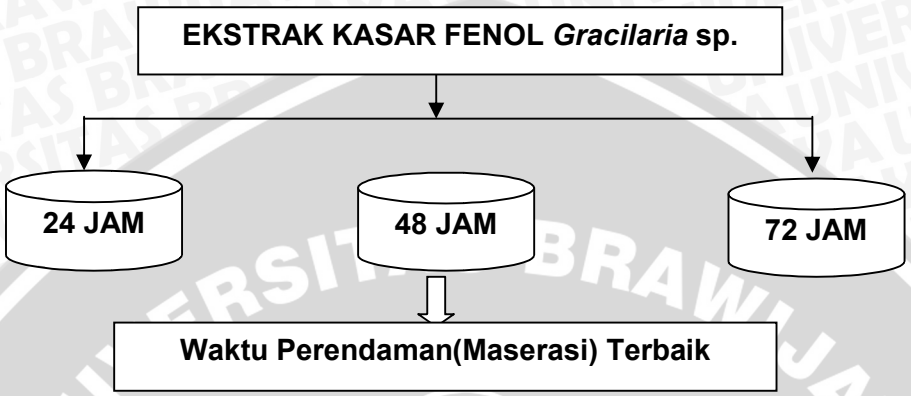
Uji daya hambatdengan *bakteri Aeromonas* sp.	
A_2A	0,9;1,1;0,7
B_2A	**1;1;1**
C_2A	0,7;0,8;0,7

Keterangan :A = Etanol 80%, B = Etanol 96%, C = Akuades
1,2,3= Penanda Ulangan, A = *Aeromonas*sp.

Ekstrak polifenol yang didapatkan dari proses perendaman menggunakan etanol 96%, 98% dan akuades selama 24 jam dilakukan pengukuran panjang gelombang menggunakan spektrofotometer dan mendapatkan hasil panjang gelombang (etanol 80% : 0,007, etanol 96% : 0,015, akuades : 0,000). Sehingga dari hasil uji daya hambat dan pengukuran panjang gelombang dapat disimpulkan bahwa pelarut terbaik yang dapat digunakan untuk perendaman rumput laut *Gracilaria verrucosa* dan dapat mengikat polifenol lebih baik adalah etanol 96%.

3.4.2 Penentuan waktu terbaik perendaman*Gracilaria* sp.

Setelah mengetahui hasil pelarut terbaik untuk perendaman, penelitian pendahuluan dilanjutkan dengan mencari waktu perendaman terbaik, range waktu yang disarankan adalah selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam.



Gambar 6: Penentuan Waktu Terbaik

Pengujian waktu perendaman terbaik ditunjukkan dengan hasil pengukuran panjang gelombang ekstrak polifenol dengan menggunakan spektrofotometer. Berikut hasil panjang gelombang yang didapatkan:

Tabel 5. Hasil panjang gelombang

Jenis Pelarut	Panjang Gelombang 24 Jam	Panjang Gelombang48 Jam
Etanol 80%	0,007	0,009
Etanol 96%	0,015	0,024
Akuades	0,000	0,000

Pada pengukuran panjang gelombang polifenol selama 72 jam tidak mendapatkan hasil, hal tersebut dikarenakan menguapnya polifenol saat dilakukan proses perendaman, sehingga pada saat proses penyaringan tidak mendapatkan hasil untuk dihitung panjang gelombangnya. Sehingga dari hasil pengukuran panjang gelombang tersebut, dapat disimpulkan bahwa pelarut yang menghasilkan panjang gelombang tertinggi adalah perendaman dengan menggunakan pelarut etanol 96% pada 48 jam perendaman karena semakin

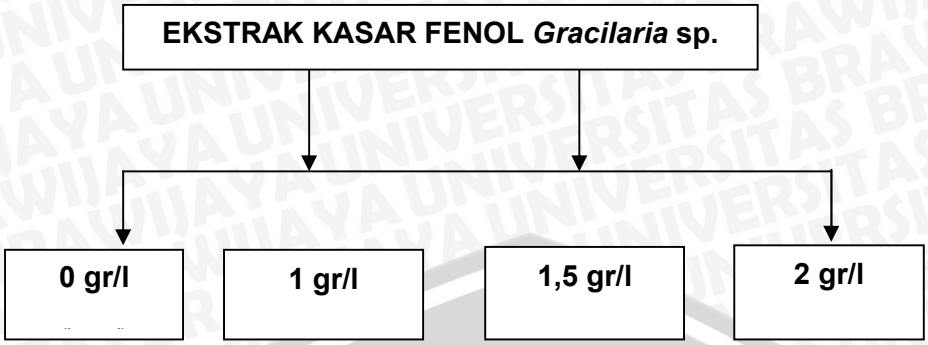
tinggi nilai panjang gelombang, maka diasumsikan ekstrak polifenol yang dihasilkan akan semakin efektif.

3.4.3 Penentuan dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp.

Sebelum melakukan uji in vivo, harus diketahui terlebih dahulu range dosis yang digunakan. Range dosis diambil dari dosis yang terendah sampai dengan dosis yang tertinggi, untuk mengetahui LC 50, harus dilakukan uji pendahuluan terhadap dosis. Dosis yang disarankan adalah 1 gr/l, 1,5 gr/l, 2 gr/l, 3 gr/l, 4 gr/l dan 5 gr/l. Kemudian ikan-ikan uji dimasukkan kedalam media perendaman sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Selanjutnya, dilihat perubahan yang terjadi.

Hasil uji perendaman dengan berbagai range dosis yang berbeda menunjukkan bahwa ikan uji mati pertama kali pada dosis 3 gr/l diikuti dengan ikan uji yang direndam pada media dengan dosis 4 gr/l dan 5 gr/l. Sehingga dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa dosis yang bias ditolerir untuk LC 50 ikan uji yang direndam dengan ekstrak kasar adalah dibawah 3 gr/l.

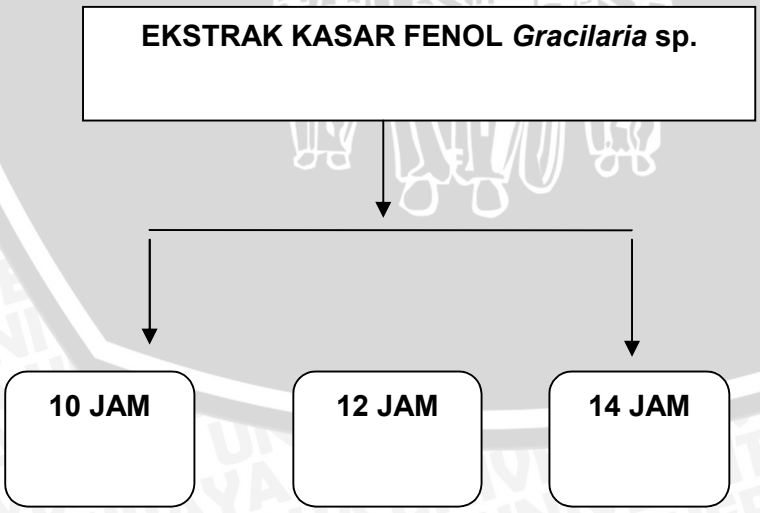
Sehingga untuk uji in vivo digunakan perendaman ekstrak kasar dengan dosis 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa range dosis kurang dari 1 gr/l tidak optimum apabila digunakan untuk imunostimulan sedangkan apabila lebih 2 gr/l fenol akan bersifat *bactericidal* (membunuh bakteri). Pada penelitian lanjutan yang menggunakan uji cakram, didapatkan hasil dosis fenol yang menghasilkan daya hambat lebih tinggi adalah dosis 1,5 gr/l. selanjutnya, dosis ini akan digunakan sebagai acuan penelitian in vivo.



Gambar 7: Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria* sp.

3.4.4 Penentuan waktu perendaman terbaik dengan ekstrak kasar fenol

Pada penelitian lanjutan in vivo, harus diketahui berapa waktu optimal yang dibutuhkan dalam perendaman ikan dengan menggunakan bakteri *Aeromonas* sp. karena itu dilakukan uji pendahuluan dengan range waktu perendaman ikan mas menggunakan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. selama 10 jam, 12 jam dan 14 jam. Setelah dilakukan uji dengan melihat gejala klinis dari perendaman ikan dengan menggunakan fenol didapatkan hasil yaitu waktu perendaman yang optimal adalah 10 jam, karena pada saat 10 jam pertama, ikan uji mati pertama kali.



Gambar 8: Penentuan Waktu Perendaman Terbaik

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 persiapan Penelitian

Persiapan penelitian yang akan dilakukan meliputi ekstraksi senyawa fenolik *Gracilaria* sp. pengukuran kadar senyawa fenolik pada ekstrak kasar *Gracilaria* sp. pembiakan bakteri *Aeromonas* sp., persiapan alat dan persiapan hewan uji.

a. Ekstraksi senyawa fenolik *Gracilaria* sp.

➢ **Pembuatan ekstrak kasar *Gracilaria* sp.**

- Disiapkan bahan *Gracilaria* sp. dalam keadaan kering
- Dibersihkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel
- Dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus
- Ditimbang sebanyak 1000 gram
- Dimasukkan ke dalam plastik dan diberi kertas label
- Disiapkan 5 buah beaker glass
- Dimasukkan bahan ke dalam masing-masing beaker glass sebanyak 200 gram dengan ditambahkan pelarut sebanyak 600 ml (perbandingan 1:3) menggunakan pelarut etanol 96 %.
- Didiamkan selama 48 untuk mendapatkan ekstrak polifenol *Gracilaria* sp.
- Ekstrak polifenol dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk kemudian didapatkan ekstrak fenol berbentuk cair.
- Ekstrak *Gracilaria* sp. cair dipanaskan dengan menggunakan *waterbath* untuk mendapatkan ekstrak kasar dalam bentuk gram.

b. Pengukuran kadar ekstrak kasar *Gracilaria* sp.

- Disiapkan 3 buah tabung reaksi untuk wadah ekstrak kasar Diisi tabung reaksi dengan aquades secukupnya
- Bahan ditimbang dan diletakkan ke dalam cawan petri

- Diambil dan dihomogenkan bahan dengan menggunakan spatula dari cawan petri dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Diberi kertas label sebagai penanda
- Dilakukan vortex untuk menghomogenkan larutan
- Larutan disimpan ke dalam tabung reaksi
- Disiapkan spektofotometer untuk mengukur kandungan senyawa fenol
- Baca absorbansinya dengan panjang gelombang 460 nm menggunakan spektofotometer
- Diperoleh hasil kadar ekstrak fenol *Gracilaria* sp.

c. Pembiakan bakteri *Aeromonas* sp.

Bakteri *Aeromonas* sp. diperoleh dari Labolatorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 1000 ml. Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan mas yaitu dengan kepadatan 10^7 sel/ml (Selvaraj *et al.,* 2009 *dalam* Samad, 2010), sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino (1988), sebagai berikut :

$$N_1 . V_1 = N_2 . V_2$$

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, seser dan lain-lain)
- Pengisian air pada akuarium (ukuran akuarium 30x30x30 cm)

e. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan mas (*C. carpio*) sebanyak 10 ekor untuk masing-masing akuarium. Berikut langkah-langkah dalam persiapan hewan uji :

- Masing-masing akuarium diisi air dengan sebanyak 20 liter
- Sebelum ikan mas dimasukkan dalam akuarium terlebih dahulu dipasang aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut
- Masing-masing akuarium diberi 10 ekor ikan mas

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Perlakuan Pemberian Ekstrak Kasar *Gracilaria* sp.

Ikan mas (*C. carpio*) dengan ukuran 8-10 cm diadaptasikan (aklimatisasi) selama 1 minggu. Media (air) sebelum digunakan telah di treatment terlebih dahulu dengan pemberian 2 ml chlorin dalam masing-masing, selama 1 hari sebagai disenfektan 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. Selanjutnya pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. sebagai immunostimulan dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l. Volume air yang digunakan untuk media perendaman sebanyak 9,9 liter, kemudian dicampurkan dengan ekstrak fenol sesuai dengan dosis yang ditentukan. Ekstrak kasar yang dicampurkan dalam media perendaman pada dosis 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l berturut-turut adalah 9,9 gram, 14,85 gram dan 19,8 gram. Merujuk dari penelitian pendahuluan yang dilakukan, perendaman

dengan ekstrak kasar dilakukan selama 10 jam.Perendaman dilakukan sebanyak 2 kali, perendaman pertama dengan waktu 10 jam, kemudian dilakukan proses adaptasi selama kurang lebih 24 jam, setelah 24 jam dilakukan uji perendaman kedua dengan waktu perendaman selama 10 jam.

Setelah perendaman dilakukan, ikan uji dipindahkan kedalam akuarium bersih sampai 2 - 3 hari.Setelah 2 - 3 hari, penginfeksian baru dapat dilakukan. Perlakuan ikan kontrol dibagi menjadi 2 yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang dilakukan yaitu dengan penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp tanpa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. sedangkan pada kontrol negatif yaitu dilakukan dengan tanpa penginfeksian bakteri dan tanpa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan pemeliharaan ikan uji selama 3 hari.

b. Penginfeksian bakteri *Aeromonas* sp.

Penginfeksian dilakukan setelah 3 hari perendaman ekstrak kasar *Gracilaria* sp. selanjutnya ikan diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. dengan metode perendaman pada akuarium yang berbeda selama 24 jam dengan kepadatan bakteri 10^7 sel/ml.

c. Pengambilan Jaringan Ikan Sampel

Ikan sampel yang akan diamati jaringannya yaitu ikan normal (tidak sakit), ikan yang diinfeksi bakteri dan ikan yang diberi imunostimulan ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dan diinfeksi bakteri. Ikan setelah diinfeksi bakteri selama 24 jam, diambil dari masing-masing akuarium kemudian dibedah.

Caranya yaitu ikan mas dibedah mulai dari anus, dipotong ke arah dorsal kemudian kembali ke arah insang. Setelah itu, diambil organ yang diinginkan yaitu hati, ginjal dan usus lalu dimasukkan dalam wadah yang sudah berisi Nature Buffer Formalin (NBF) 10% untuk fiksasi.

Prosedur pembuatan preparat histopatologi pada ikan (Lampiran 3) menurut Tim Balai Karantina Ikan Juanda (2005), dibagi atas beberapa tahapan sebagaimana berikut:

a. Tissue Preparation (Persiapan Jaringan)

Pada persiapan jaringan,disiapkan dahulu jaringan ikan yang sudah direndam

b. Tissue Fixation (Fiksasi Jaringan)

c. Tissue Processing (Proses Jaringan)

d. Tissue Embedding (Pengeblokan Jaringan)

e. Sectioning (Pemotongan)

f. Staining (Pewarnaan)

g. Pengamatan

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi jaringan hati, ginjal dan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*).

3.6.2 Parameter Penunjang

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

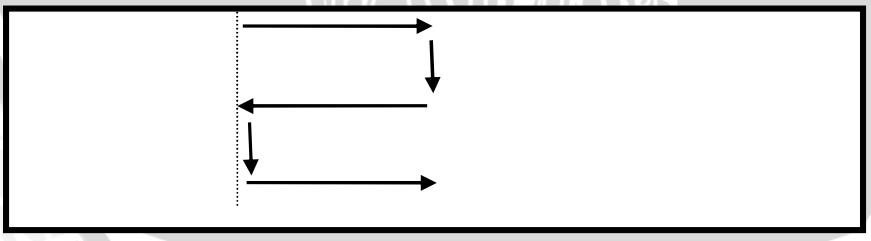
- Suhu yang diukur menggunakan termometer
- pH air yang diukur menggunakan pH meter
- Oksigen terlarut yang diukur menggunakan DO meter

3.7 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).Ini

dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan.Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan jumlah kerusakan jaringan pada histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas, digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

Data yang diperoleh pada penelitian ini merupakan hasil pengamatan mikroskop.Untuk hasil uji histopatologi hati, ginjal dan usus pada ikan mas (*C. carpio*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan hati, ginjal dan usus ikan mas yang telah diberi imunostimulan ekstrak kasar dari alga merah *Gracilaria* sp. maka dilakukan analisis statistik pemberian scoring 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 9. 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 (kerusakan sel), kongesti dan sel radang, kemudian di

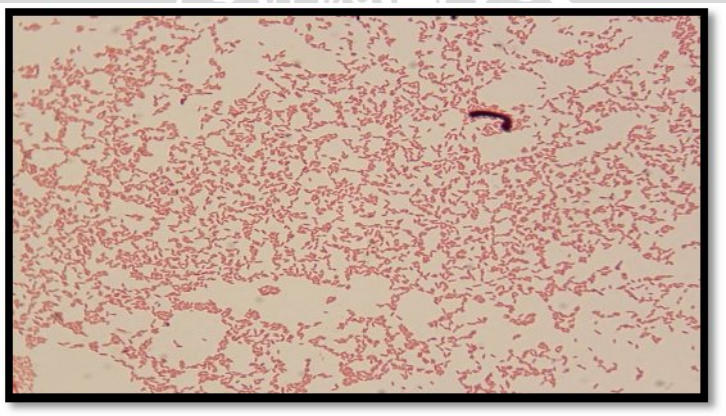
persentase dengan pemberian skor dari angka 1 sampai 4. Angka 1 mempunyai tingkat persentase kerusakan jaringan 0-5%, angka 2 tingkat persentase kerusakan jaringan 6-25%, angka 3 tingkat persentase kerusakan jaringan 26-50% dan angka 4 tingkat persentase kerusakan jaringan >50%.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan Bakteri *Aeromonas* sp.

Pembiakan bakteri *Aeromonas* sp. pada media cair yaitu dengan menyiapkan media TSB (*Tryptone Soya Broth*) dan disterilisasi dengan autoklaf. Setelah dingin dimasukkan bakteri *Aeromonas* sp. dari biakan murni sebanyak 4 ose. Media yang telah mengandung bakteri diinkubasi pada suhu 35ºC selama 18 - 24 jam. Hasil biakan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembiakan bakteri *Aeromonas* sp. pada media agar yaitu dengan menyiapkan cawan petri yang berisi media TSA. Jarum ose dipanaskan diatas Bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan ke biakan murni bakteri *Aeromonas* sp. dan digoreskan pada permukaan media TSA. Cawan petri ditutup rapat dan dipanaskan diatas Bunsen pada bagian tepinya kemudian jarum ose dipanaskan kembali. Media yang sudah terisi bakteri *Aeromonas* sp. diinkubasi pada suhu 35ºC selama 18 - 24 jam. Penampang hasil biakan bakteri *Aeromonas* sp. dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Bakteri *Aeromonas hydrophila.* Perbesaran mikroskop 100X

4.2. Gambaran Histopatologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

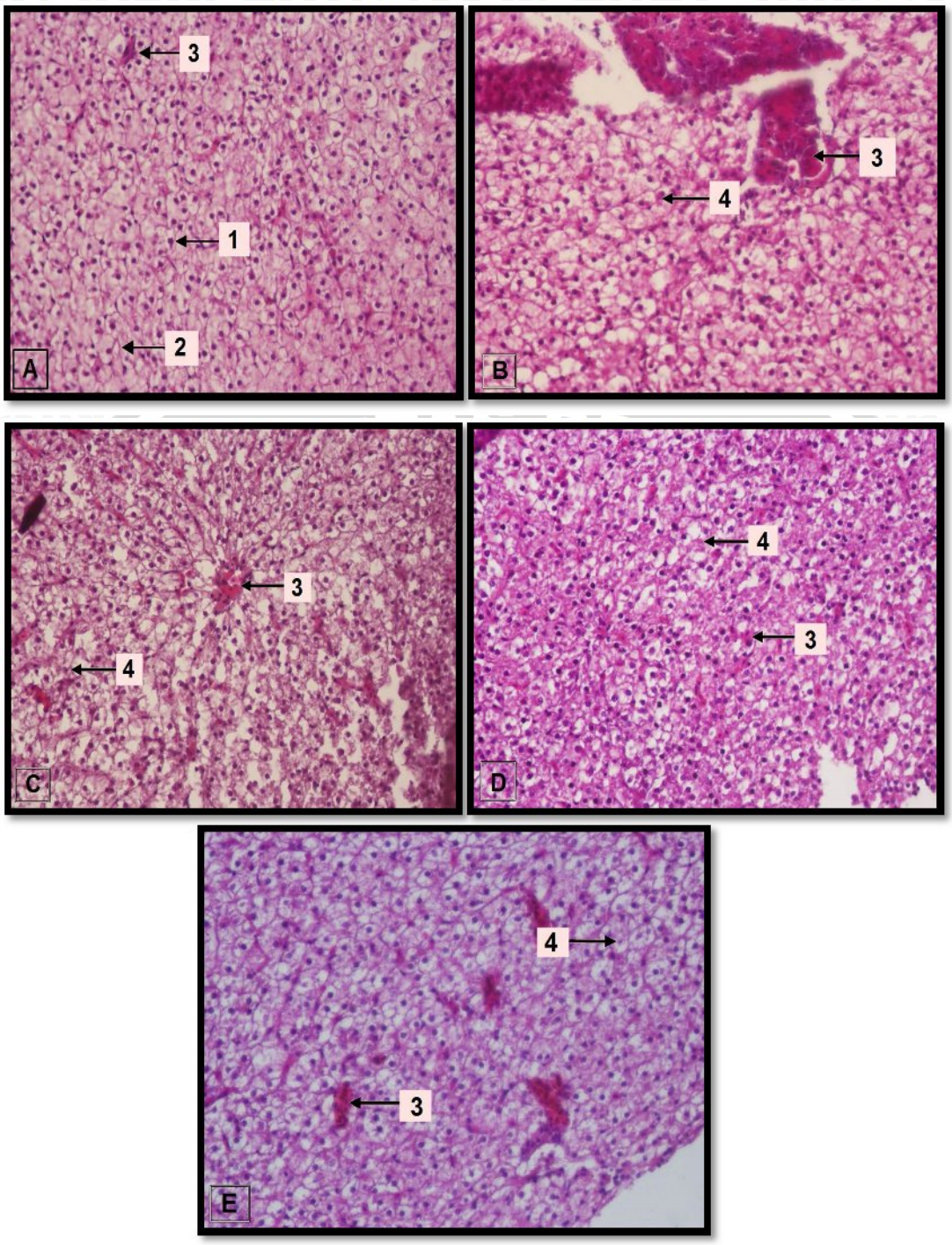
Hati merupakan organ penting yang mensekresikan bahan untuk proses pencernaan. Organ ini pada umunya merupakan suatu kelenjar yang kompak,

berwarna merah kecoklatan tersusun oleh sel-sel hati (*hepatosit*). Menurut Bevelandar dan Rameley, (1988), pada gambaran hati terlihat penampakan sel-sel hepatosit, dimana sel-sel hepatosit memiliki bentuk yang menyerupai plat tipis atau lembaran-lembaran yang terpisah oleh sinusoida-sinusoida yang tersebar secara radial.

Penelitian ini menggunakan imunostimulan ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dengan dosis yang berbeda yaitu 1 gr/l; 1,5 gr/l dan 2 gr/l kemudian diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml dengan tujuan untuk melihat gambaran histopatologi yang terlihat pada perlakuan yang berbeda dibandingkan ikan kontrol. Penampang histopatologi jaringan hati ikan kontrol dan ikan uji dapat dilihat pada Gambar 11.

Hasil histopatologi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar fenol sebagai imunostimulan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan hati ikan mas. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan adanya nilai skoring pada masing-masing dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. yang telah diberikan (nilai skoring dapat dilihat pada Lampiran 4).

Pada perlakuan A, B dan C dengan dosis ekstrak berturut-turut adalah 1 gr/l, 1,5 gr/l dan 2 gr/l serta K(+) dan K(-) rata-rata mengalami kerusakan jaringan yang sama yaitu nekrosis dan kongesti. Namun pada hasil skoring terlihat ada perbedaan hasil pada masing-masing perlakuan. Pada hasil analisa data keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan hati yaitu nekrosis dan kongesti menunjukkan hasil berbeda nyata yang dapat dilihat pada Lampiran 5.



Gambar 11 : Struktur jaringan histopatologi hati ikan mas dengan perlakuan perendaman ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dan diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml (A) Kontrol positif (B) kontrol negatif (C) Dosis 1 gr/l (D) Dosis 1,5 gr/l (E) Dosis 2 gr/l. (1) inti sel (2) Hepatosit (3) Kongesti (4) Nekrosis. Perbesaran mikroskop 400X.

Berdasarkan hasil penelitian, kondisi hati ikan mas kontrol positif yaitu ikan tanpa diberi perlakuan baik perendaman ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp.

maupun diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. (Gambar 11 A) memperlihatakan bentuk jaringan yang normal yakni hepatosit terlihat jelas, inti bulat letaknya sentralis dan sinusoid tampak jelas, sedangkan pada hati kontrol negatif yaitu ikan yang diberi perlakuan infeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml (Gambar 11 B) terlihat terjadi kerusakan sangat berat yaitu terjadi nekrosis dan kongesti. Hal ini dibuktikan dengan nilai skoring pada setiap kriteria kerusakan jaringan yang sangat tinggi dengan rata-rata mendekati 4 (>50%) (untuk nilai skoring lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 4).

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. Nekrosis yang terjadi pada sel-sel hepatosit diperkirakan sebagai akibat infeksi bakteri yang mengeluarkan toksin dan dapat merusak sel-sel hati dengan rusaknya sel hepatosit akan memudahkan bakteri masuk kedalam jaringan hati dan menimbulkan kerusakan yang lebih besar (Setyowati, 2012). Pembengkakan sel hati ditandai dengan adanya vakuola (ruang-ruang kosong) akibat hepatosit membengkak yang menyebakan sinusoid menyempit, sitoplasma tampak keruh.

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

Menurut Kurniasih (1999), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit.

Meskipun tidak terlihat secara langsung bahwa pemberian imunostimulan dapat mempengaruhi pemulihan jaringan, akan tetapi perbedaan prosentase kerusakan jaringan hati dengan penambahan dosis imunostimulan yang berbeda dapat ditunjukkan melalui nilai skoring (Lampiran 4).

Analisa data kerusakan pada histopatologi jaringan hati yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. dan dengan perendaman ekstrak kasar *Gracilaria* sp. adalah sebagai berikut:

Hasil perhitungan rerata skoring dan notasi kerusakan nekrosis dan kongesti jaringan hati dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil perhitungan data skoring lebih lanjut dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 6. Rerata Skoring dan Notasi Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis dan kongesti Jaringan Hati

No	Bentuk Kerusakan Jaringan	Perlakuan Dosis Ekstrak Kasar *Gracilaria* sp.				
		1gr/l	1,5gr/l	2gr/l	K (-)	K (+)
1	*Nekrosis*	$2,5^{b}$	$1,4^{a}$	$2,9^{bc}$	$3,4^{c}$	1,0
2	*Kongesti*	$2,8^{b}$	$1,6^{a}$	$3,0^{b}$	$3,5^{c}$	1,0

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

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

Berdasarkan angka notasi di atas, perlakuan pada kerusakan nekrosis, dan kongesti dengan angka notasi c menunjukkan tingkat kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan K (-) (ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. tanpa diberi

penambahan imunostimulan ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp.). Pada perlakuan terbaik ditunjukkan dengan notasi terkecil yaitu a berada pada perlakuan dosis B (1,5 gr/l). Sehingga dari hasil nilai skoring dan notasi tersebut didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan dosis terbaik yang dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan hati adalah perlakuan B(1,5 gr/l).

Perlakuan K (-) mengalami tingkat kerusakan jaringan yang sangat berat, dengan persentase kerusakan >50%. Hasil rerata pada skoring mendekati nilai 4. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 3,4; 3,5. Hal ini sesuai dengan pendapat Fuentes dan Perez (1998) bahwa *Aeromonas* sp. banyak ditemukan di mata, hati dan ginjal ikan yang terinfeksi. Secara histopatologi, jaringan ikan yang terinfeksi akan mengalami hyperplasia, pendarahan (kongesti) serta peradangan. Derajat kerusakan sel-sel hati tergantung dari perubahan degenerasi yang terjadi pada organ tersebut. Tipe awal degenerasi pada sel hati berupa degenerasi hidrofik, kemudian berlanjut menjadi degenerasi melemak, sebelum akhirnya sel tersebut mengalami kematian atau nekrosis.

Mekanisme bakteri menyerang jaringan menurut (Mangunwardoyo *et al.,* 2010), bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* masuk kedalam tubuh host diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit dengan memanfaatkan pili, flagela dan kait untuk bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Selama proses berlangsung bakteri *Aeromonas hydrophila* memproduksi enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi lapisan kitin sehingga bakteri dapat dengan mudah masuk kedalam host. Selain memanfaatkan kitinase bakteri *Aeromonas hydrophila* juga mengeluarkan enzim lainnya seperti lesitinase dalam upaya masuk kedalam aliran darah.

Perlakuan A pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan yang berat (26-50%), sesuai dengan tingkat skoring dari beberapa kriteria kerusakan jaringan diantaranya terjadi nekrosis dan kongesti dengan masing-masing skoring 2,5; 2,8. Pemberian dosis imunostimulan yang kecil menyebabkan sistem kekebalan tubuh non spesifik tidak dapat bekerja secara maksimal yang menyebabkan kerusakan pada jaringan akibat infeksi bakteri.

Perlakuan B pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1,5 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan sedang dengan persentase kerusakan antara 6-25%. Hal ini dibuktikan dengan adanya nilai skoring pada setiap kriteria jaringan tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 1,4; 1,6. Persentase tersebut apabila dibandingkan dengan perlakuan A lebih kecil, hal tersebut disebabkan karena dosis ekstrak kasar yang diberikan cukup optimal. Menurut Andeson (1992) *dalam* Jasmanidar (2008), pemberian dosis imunostimulan memang tidak dianjurkan untuk terlalu berlebihan hal tersebut tentu akan mempengaruhi sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Pemberian imunostimulan harus memperhatikan dosis optimal yang digunakan, disamping itu juga durasi periode pemberian imunostimulan untuk mencapai proteksi yang optimal juga merupakan hal yang penting dalam pemberian imunostimulan.

Perlakuan C pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 2 gr/l menunjukkan tingkat kerusakan yang berat dengan persentase kerusakan sampai dengan 26-50%. Kerusakan yang ditemukan adalah nekrosis, dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 2,8; 3,0.

Pada perlakuan B 1,5 gr/l dan perlakuan C 2 gr/l kerusakan pada hati hampir sama yaitu nekrosis dan kongesti, tetapi perlakuan C tingkat kerusakannya lebih berat dibanding dengan perlakuan B karena sel mengalami

nekrosis dan kongesti lebih banyak. Hal tersebut dikarenakan dosis imunostimulan yang terlalu berlebihan sehingga tidak memaksimalkan sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Dosis imunostimulan yang tinggi dapat menekan mekanisme pertahanan dan dosis yang rendah bisa tidak efektif atau tidak cukup untuk memberikan respon imun (Jasmanidar, 2009).

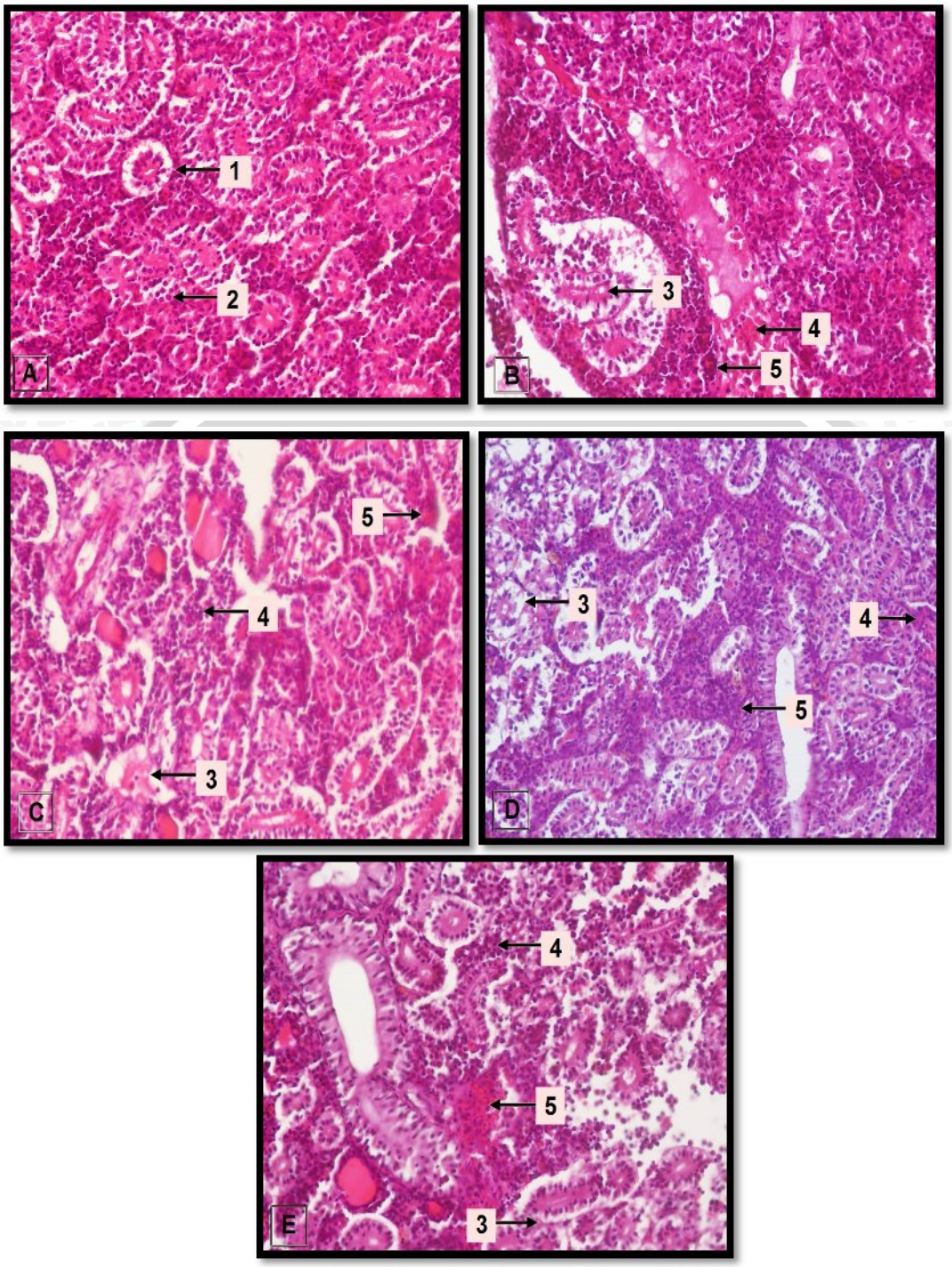
Hasil terbaik yang didapat dari penelitian ini yaitu pada perlakuan B pada dosis 1,5 gr/l dengan rata-rata perlakuan paling rendah sebesar 1,4 dan 1,6. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dengan dosis 1,5 gr/l mampu menurunkan tingkat kerusakan pada jaringan hati bila dibandingkan dengan perlakuan K (-).

4.3 Gambaran Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

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. Dengan demikian nephron dapat membersihkan atau menjernihkan plasma darah dari zat-zat yang tidak dikehendaki ketika melalui ginjal (Fujaya, 2004).

Pemberian imunostimulan diberikan dengan cara melakukan perendaman pada ekstrak kasar *Gracilaria* sp dengan dosis yang berbeda yaitu 1; 1,5 dan 2 gr/l dan diinfeksi bakteri *aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml pada ikan mas, Penampang histpatologi jaringan ginjal ikan kontrol dan ikan uji dapat dilihat pada Gambar 12.

Hasil histopatologi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak fenol sebagai imunostimulan dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal ikan mas. (nilai skoring dapat dilihat pada Lampiran 4).



Gambar 12 : Struktur jaringan histopatologi ginjal ikan mas dengan perlakuan perendaman ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dan diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml (A) Kontrol positif (B) Kontrol negatif (C) Dosis 1 gr/l (D) Dosis 1,5 gr/l (E) Dosis 2 gr/l. (1) Tubulus (2) Inti Sel (3) Nekrosis Tubulus (4) Sel Radang (5) Kongesti. Perbesaran mikroskop 400X.

Pada jaringan ikan kontrol positif (Gambar 12 A) dapat dilihat bahwa struktur ginjal menunjukkan jaringan masih bagus, sangat berbeda bila

dibandingkan dengan jaringan ikan kontrol negatif yaitu ikan yang diberi perlakuan infeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml pada (Gambar 12 B) yang menunjukkan kerusakan sel yang sangat berat, ditandai dengan banyaknya nekrosis pada tubulus, sel radang pada limfosit dan kongesti serta terdapat tubulus yang menyatu. Pernyataan ini sesuai dengan pendapat Fuentes dan Perez (1998) bahwa *Aeromonas* sp. banyak ditemukan di mata, hati dan ginjal ikan yang terinfeksi. Secara histopatologi, jaringan ikan yang terinfeksi akan mengalami hyperplasia, pendarahan (kongesti) serta peradangan. Hal ini dibuktikan dengan nilai skoring pada setiap kriteria kerusakan jaringan yang sangat tinggi dengan rata-rata mendekati 4 (>50%) (untuk nilai skoring lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 4).

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.

Menurut Kurniasih (1999), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit.

Pada perlakuan K(+), K(-), A(1 gr/l), B(1,5 gr/l) dan C(2 gr/l) rata-rata mengalami kerusakan jaringan yang sama yaitu nekrosis pada tubulus, sel radang dan kongesti. Namun pada hasil skoring terlihat ada perbedaan hasil pada masing-masing perlakuan. Pada hasil analisa data keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal menunjukkan hasil berbeda nyata yang dapat dilihat pada Lampiran 5.

Hasil perhitungan rerata skoring dan notasi kerusakan nekrosis tubulus, sel radang pada limfosit dan kongesti jaringan ginjal dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil perhitungan data skoring lebih lanjut dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 7. Rerata Skoring dan Notasi Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis Tubulus, Sel Radang pada Limfosit dan Kongesti Jaringan Ginjal

No	Bentuk Kerusakan Jaringan	Perlakuan dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp.				
		1 gr/l	1,5 gr/l	2 gr/l	K (-)	K(+)
1	*Nekrosis tubulus*	$2,6^{b}$	$1,4^{a}$	$2,8^{bc}$	$3,4^{c}$	1,0
2	*Sel radang (limfosit)*	$2,7^{b}$	$1,7^{a}$	$3,0^{bc}$	$3,4^{c}$	1,0
3	*kongesti*	$2,5^{b}$	$1,4^{a}$	$2,9^{bc}$	$3,6^{c}$	1,0

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

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

Berdasarkan angka notasi di atas, perlakuan pada kerusakan nekrosis tubulus, sel radang pada limfosit dan kongesti dengan angka notasi c menunjukkan tingkat kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan K (-). Pada perlakuan terbaik ditunjukkan dengan notasi terkecil yaitu a berada pada perlakuan dosis B (1,5 gr/l). Sehingga dari hasil nilai skoring dan notasi tersebut didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan dosis terbaik yang dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan ginjal adalah perlakuan B(1,5 gr/l).

Perlakuan K(-) yaitu ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. tanpa di beri perlaukan perendaman pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp., mengalami tingkat kerusakan jaringan yang sangat berat, dengan persentase kerusakan

>50% sehingga menyebabkan ginjal tidak dapat berfungsi dengan baik akibat infeksi bakteri. Hasil rerata pada skoring mendekati nilai 4. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis tubulus, sel radang (limfosit) dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 3,4; 3,4 dan 3,6. Menurut Kurniasih (1999) sel yang mengalami nekrosis secara mikroskopik terlihat bahwa nukleus mengalami lisis (hancur). Jika kariolisis terjadi secara sempurna, maka nukleus tidak terlihat lagi (hilang). Tetapi jika kariolisis tidak sempurna, maka nukleus terlihat sebagai rongga kosong yang hanya dibatasi oleh membrane nukleus yang disebut "*ghost*".

Perlakuan A pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan yang berat (26-50%), sesuai dengan tingkat skoring dari beberapa kriteria kerusakan jaringan diantaranya terjadi nekrosis tubulus, sel radang (limfosit) dan kongesti dengan masing-masing skoring 2,6; 2,7 dan 2,5. Pemberian dosis imunostimulan yang kecil menyebabkan sistem kekebalan tubuh non spesifik tidak dapat bekerja secara maksimal yang menyebabkan kerusakan pada jaringan akibat infeksi bakteri.

Sakai (1999), menyatakan bahwa kemampuan imunostimulan untuk meningkatkan respon imun dan mengembangkan proteksi terhadap infeksi patogen dipengaruhi oleh dosis aplikasi. Pemberian imunostimulan pada konsentrasi dibawah nilai minimal untuk terjadinya respon imun tidak akan memberikan pengaruh.

Perlakuan B pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1,5 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan sedang dengan persentase kerusakan antara 6-25%. Hal ini dibuktikan dengan adanya nilai skoring pada setiap kriteria jaringan tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis tubulus, sel radang (limfosit) dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 1,4; 1,7 dan 1,4. Persentase tersebut apabila

dibandingkan dengan perlakuan A lebih kecil, hal tersebut disebabkan karena dosis ekstrak fenol yang diberikan cukup optimal.

Menurut Andeson (1992) *dalam* Jasmanidar (2008), pemberian dosis imunostimulan memang tidak dianjurkan untuk terlalu berlebihan hal tersebut tentu akan mempengaruhi sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Pemberian imunostimulan harus memperhatikan dosis optimal yang digunakan, disamping itu juga durasi periode pemberian imunostimulan untuk mencapai proteksi yang optimal juga merupakan hal yang penting dalam pemberian imunostimulan.

Perlakuan C pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 2 gr/l menunjukkan tingkat kerusakan yang berat dengan persentase kerusakan sampai dengan 26-50%. Kerusakan yang ditemukan adalah nekrosis tubulus, sel radang (limfosit) dan kongesti dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 2,8; 3,0 dan 2,9. Menurut Sakai (1999), dua hal yang perlu dipertimbangkan dalam aplikasi imunostimulan dalam budidaya adalah dosis dan lama waktu pemberian. Pemberian imunostimulan dalam jumlah yang tepat dapat meningkatkan imunitas dan pertumbuhan ikan yang dipelihara, sebaliknya dosis berlebihan akan menekan pertumbuhan dan bersifat imunosupresor bagi hewan yang dipelihara.

Pada perlakuan B 1,5 gr/l dan perlakuan C 2 gr/l kerusakan pada ginjal hampir sama yaitu nekrosis tubulus, sel radang (limfosit) dan kongesti, tetapi perlakuan C tingkat kerusakannya lebih berat dibanding dengan perlakuan B. Hal tersebut dikarenakan dosis imunostimulan yang terlalu berlebihan sehingga tidak memaksimalkan sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Dosis imunostimulan yang tinggi dapat menekan mekanisme pertahanan dan dosis yang rendah bisa tidak efektif atau tidak cukup untuk memberikan respon imun (Jasmanidar, 2009).

Ridlo dan Pramesti (2009), menambahkan senyawa aktif akan menunjukkan aktivitasnya jika dapat mencapai di lokasi targetnya yang berarti

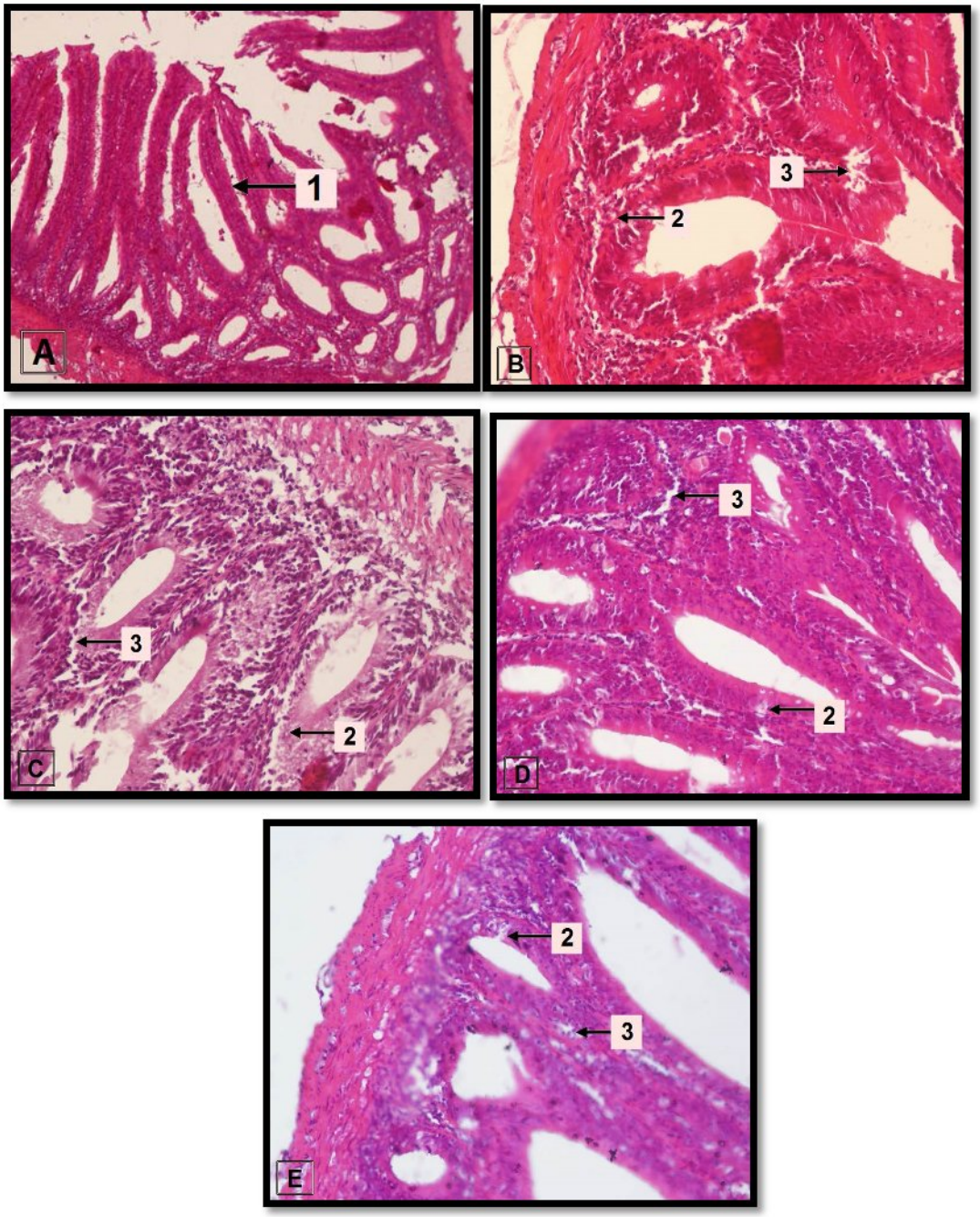
harus dapat diserap oleh darah untuk selanjutnya dibawa ketempat dimana zat itu akan memberikan efek aktifitasnya atau jumlah senyawa aktif yang lebih kecil dari jumlah minimal yang diperlukan untuk memunculkan efek imunostimulan atau bahkan sebaliknya dosisnya terlalu tinggi sehingga tidak memberikan efek atau berperilaku sebagai inhibitor.

Dari penelitian ini kesimpulan yang didapat yaitu hasil terbaik untuk pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. adalah perlakuan B pada dosis 1,5 gr/l dengan rata-rata perlakuan paling rendah sebesar 1,4; 1,7 dan 1,4. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar fenol *Gracilaria* sp. dengan dosis 1,5 gr/l mampu memperbaiki kerusakan pada struktur jaringan ginjal.

4.4 Gambaran Histopatologi Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Struktur histologi saluran pencernaan ikan secara umum sama dengan struktur histologi vertebrata. Lapisan saluran pencernaan ikan terdiri dari mukosa, sub mukosa, muskularis, dan serosa. Lapisan mukosa terdiri dari epitel, lamina basalis, lamina propria, dan mukosa muskularis. Lapisan sub mukosa terdiri dari stratum kompaktum dan stratum granulosum. Lapisan muskularis merupakan lapisan otot yang terdiri dari otot sirkuler dan otot memanjang (Hibiya 1995) *dalam* Susanto (2008).

Berdasarkan hasil penelitian, gambaran jaringan usus ikan mas kontrol positif (tanpa diinfeksi bakteri dan tanpa perendaman larutan ekstrak kasar *Gracilaria* sp.), ikan mas kontrol negatif (ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. tanpa perendaman larutan ekstrak kasar *Gracilaria* sp.), perlakuan A (1 gr/l), B (1,5 gr/l), dan C (2 gr/l) dapat dilihat pada Gambar 13 dengan perbesaran mikroskop 400 kali.



Gambar 13 : Struktur jaringan histopatologi usus ikan mas dengan perlakuan perendaman ekstrak fenol *Gracilaria* sp. dan diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml (A) Kontrol positif (B) Kontrol negatif (C) Dosis 1 gr/l (D) Dosis 1,5 gr/l (E) Dosis 2 gr/l. (1) Sel Epitel (2) Nekrosis (3) Edema. Perbesaran mikroskop 400X.

Pada jaringan usus ikan kontrol positif (Gambar 13 A) terlihat struktur jaringan usus masih bagus, sangat berbeda dengan (Gambar 13 B) jaringan usus ikan kontrol negatif yaitu ikan yang diberi perlakuan infeksi bakteri *Aeromonas* sp. kepadatan 10^7 sel/ml, jaringan mengalami kerusakan yang

sangat parah. Kerusakan yang ditemukan akibat terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. yaitu nekrosis dan edema. Hal ini dibuktikan dengan nilai skoring pada setiap kriteria kerusakan jaringan yang sangat tinggi dengan rata-rata mendekati 4 (>50%) (untuk nilai skoring lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 4).

Menururt Priosoeryanto *et al*. (2010), edema merupakan suatu akumulasi cairan yang abnormal di dalam rongga tubuh atau di dalam ruang interstitial dari jaringan dan organ yang dapat mengakibatkan kebengkakan. Kerusakan mekanis atau penyakit dapat mempengaruhi ikan terhadap infeksi lebih lanjut, karena edematus menyediakan suatu medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri. Edema menyebabkan epitel usus terangkat dan pada kondisi parah dapat berlanjut menjadi dequamasi dan ruptur epitel. Edema yang ditemukan menandakan adanya masalah pada sistem sirkulasi darah. Adanya eritrosit yang menyebar menandakan terjadi hemoragi sedangkan limfosit menandakan ada peradangan karena gangguan parasit, bakteri atau virus (Susanto ,2008).

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

Pada perlakuan K(+), K(-), A(1 gr/l), B(1,5 gr/l) dan C(2 gr/l) rata-rata mengalami kerusakan jaringan yang sama yaitu nekrosis dan edema. Namun pada hasil skoring terlihat ada perbedaan hasil pada masing-masing perlakuan. Pada hasil analisa data keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan usus menunjukkan hasil berbeda nyata yang dapat dilihat pada Lampiran 5.

Hasil perhitungan rerata skoring dan notasi kerusakan nekrosis dan edema jaringan usus dapat dilihat pada Tabel 8. Hasil perhitungan data skoring lebih lanjut dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 8. Rerata Skoring dan Notasi Hasil Pengamatan Kerusakan Nekrosis dan Edema Jaringan Usus.

No	Bentuk Kerusakan Jaringan	Perlakuan Dosis Ekstrak Kasar *Gracilaria* sp.				
		1gr/l	1,5gr/l	2gr/l	K (-)	K (+)
1	*Nekrosis*	$2,7^{b}$	$1,3^{a}$	$2,9^{bc}$	$3,6^{c}$	1,0
2	*Edema*	$2,7^{b}$	$1,4^{a}$	$2,9^{b}$	$3,4^{c}$	1,0

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

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

Berdasarkan angka notasi di atas, perlakuan pada kerusakan nekrosis dan edema dengan angka notasi c menunjukkan tingkat kerusakan paling parah yaitu pada perlakuan K (-) (ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. tanpa diberi penambahan imunostimulan ekstrak kasar *Gracilaria* sp.). Pada perlakuan terbaik ditunjukkan dengan notasi terkecil yaitu a berada pada perlakuan dosis B (1,5 gr/l). Sehingga dari hasil nilai skoring dan notasi tersebut didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan dosis terbaik yang dapat menurunkan tingkat kerusakan jaringan usus adalah perlakuan B (1,5 gr/l).

Perlakuan K (-) yaitu ikan yang diinfeksi bakteri *Aeromonas* sp. tanpa di beri perlakukan perendaman ekstrak kasar *Gracilaria* sp., mengalami tingkat kerusakan jaringan yang sangat berat, dengan persentase kerusakan >50%. Hasil rerata pada skoring mendekati nilai 4. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis dan edema dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 3,6 dan 3,4.

Guyton dan Hall (1996) *dalam* Pazra (2008) menyatakan bahwa penyebab dari edema adalah meningkatnya tekanan hidrostatik intra vaskula sehingga menimbulkan perembesan cairan plasma darah keluar dan masuk ke dalam ruang interstisium. Kondisi peningkatan tekanan hidrostatik sering ditemukan pada pembuluh vena dan edema sebagai resiko paska kongesti.

Racun yang terkandung dalam bakteri *Aeromonas* sp. yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada ikan yaitu eksotoksin dan endotoksin. Eksotoksin merupakan protein bakteri yang diproduksi dan dikeluarkan ke lingkungan selama pertumbuhan bakteri patogen. Ada beberapa cara eksotoksin untuk dapat menimbulkan penyakit. Pertama eksotoksin dikeluarkan ke makanan, akibatnya ikan terserang penyakit asal makanan. Kedua, eksotoksin dikeluarkan ke permukaan mukosa menyerang sel inang atau dapat terbawa ke sistem peredaran darah untuk menyerang jaringan yang rentan. Ketiga, bakteri patogen membentuk abses (luka) dan mengeluarkan eksotoksin untuk merusak jaringan sehingga mempermudah pertumbuhan bakteri. Sedangkan endotoksin merupakan lipid A sebagai bagian dari lipoposakarida membran luar bakteri Gram negatif. Ketika bakteri patogen terbenam dalam permukaan sel inang, akan menyebabkan pelepasan senyawa protein seperti komplemen dan sitokin berlebih yang dapat ikut merusak sel atau jaringan inang di sekitarnya. Endotoksin dapat menyebabkan radang, demam dan rejatan (*shock*) pada

hewan inang. Endotoksin dilepaskan hanya bila sel dari bakteri tersebut hancur karena lisis. Karena itu, umunya endotoksin hanya memegang peranan membantu dalam menyebarkan penyakit.

Perlakuan A pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan yang berat (26-50%), sesuai dengan tingkat skoring dari beberapa kriteria kerusakan jaringan diantaranya terjadi nekrosis dan edema dengan rata-rata skoring 2,7. Pemberian dosis imunostimulan yang kecil menyebabkan sistem kekebalan tubuh non spesifik tidak dapat bekerja secara maksimal yang menyebabkan kerusakan pada jaringan akibat infeksi bakteri. Menurut Jawetz, *et al* (1996) bahwa dosis immonustimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil selain itu juga dapat berubah menjadi toksin.

Perlakuan B pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* sp. 1,5 gr/l mengalami tingkat kerusakan jaringan sedang dengan persentase kerusakan antara 6-25%. Hal ini dibuktikan dengan adanya nilai skoring pada setiap kriteria jaringan tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan yaitu nekrosis dan edema dengan nilai rerata per kerusakan berturut-turut adalah 1,3 dan 1,4. Persentase tersebut apabila dibandingkan dengan perlakuan A lebih kecil, hal tersebut disebabkan karena dosis ekstrak fenol yang diberikan cukup optimal. Menurut Andeson (1992) *dalam* Jasmanidar (2008), pemberian dosis imunostimulan memang tidak dianjurkan untuk terlalu berlebihan hal tersebut tentu akan mempengaruhi sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Pemberian imunostimulan harus memperhatikan dosis optimal yang digunakan, disamping itu juga durasi periode pemberian imunostimulan untuk mencapai proteksi yang optimal juga merupakan hal yang penting dalam pemberian imunostimulan.

Perlakuan C pada dosis ekstrak kasar *Gracilaria* Sp. 2 gr/l menunjukkan tingkat kerusakan yang berat dengan persentase kerusakan sampai dengan 26-

50%. Kerusakan yang ditemukan adalah nekrosis dan edema dengan nilai rerata per kerusakan adalah 2,9. Pada perlakuan B 1,5 gr/l dan perlakuan C 2 gr/l kerusakan pada usus hampir sama yaitu nekrosis dan edema, tetapi perlakuan C tingkat kerusakannya lebih berat dibanding dengan perlakuan B karena sel mengalami kerusakan lebih banyak. Hal tersebut dikarenakan dosis imunostimulan yang terlalu berlebihan sehingga tidak memaksimalkan sistem pertahanan non spesifik pada ikan. Dosis imunostimulan yang tinggi dapat menekan mekanisme pertahanan dan dosis yang rendah bisa tidak efektif atau tidak cukup untuk memberikan respon imun (Jasmanidar, 2009).

Ridlo dan Pramesti (2009), menambahkan senyawa aktif akan menunjukkan aktivitasnya jika dapat mencapai di lokasi targetnya yang berarti harus dapat diserap oleh darah untuk selanjutnya dibawa ketempat dimana zat itu akan memberikan efek aktifitasnya atau jumlah senyawa aktif yang lebih kecil dari jumlah minimal yang diperlukan untuk memunculkan efek imunostimulan atau bahkan sebaliknya dosisnya terlalu tinggi sehingga tidak memberikan efek atau berperilaku sebagai inhibitor.

Dari penelitian ini kesimpulan yang didapat yaitu hasil terbaik untuk pemberian ekstrak kasar *Gracilaria* sp. adalah perlakuan B pada dosis 1,5 gr/l dengan rata-rata perlakuan paling rendah sebesar 1,3 dan 1,4. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Gracilaria* sp. dengan dosis 1,5 gr/l mampu memperbaiki kerusakan pada struktur jaringan usus.

4.5 Pengamatan Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Ikan Mas

Dalam suatu kegiatan budidaya perairan, kualitas air merupakan salah satu faktor yang memegang peranan penting karena organisme hidup dalam perairan tersebut. Kualitas air yang diuji meliputi faktor fisika dan kimia, diantaranya adalah suhu, kandungan oksigen terlarut dan pH (Subarijanti, 2000).

Kualitas air selama masa pemeliharaan berlangsung merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan karena kualitas air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Apabila kualitas air tidak sesuai dengan lingkungan hidup ikan mas maupun bakteri *Aeromonas* SP. maka kemungkinan yang mempengaruhi kelangsungan hidup ikan mas adalah kualitas air yang tidak sesuai sehingga keefektifan bahan imunostimulan sukar diketahui. Selama penelitian dilakukan pengukuran kualitas air media uji, yaitu : suhu, pH, dan oksigen terlarut (DO). Berikut hasil pengukuran kualitas air selama pemeliharaan disajikan pada Tabel 9 dan secara rinci pada Lampiran 6.

Tabel 9. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Perlakuan

No.	Parameter Kualitas Air	Kisaran Parameter Kualitas Air pada Perlakuan	Partosuwiryo dan Warseno (2011)
1.	Suhu (C)	25,4-26,6^{0}C	25-30^{0}C
2.	pH	7,63-7,79	6,7-8,2
3.	Oksigen Terlarut (mg/l)	5,64-6,39 ppm	>5 ppm

Berdasarkan hasil parameter kualitas air di atas (Tabel 9) menunjukkan bahwa air sebagai media pemeliharaan ikan mas masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologisnya. Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), keberhasilan dalam budidaya ikan mas salah satunya yaitu dipengaruhi oleh kualitas air. Pada lokasi harus terdapat sumber air yang memenuhi syarat, baik kualitas maupun kuantitas (debit) air sepanjang tahun.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

- Pemberian imunostimulan ekstrak kasar alga merah *Gracilaria* sp. dengan dosis yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sp.
- Kerusakan jaringan yang terjadi pada hati diantaranya adalah nekrosis dan kongesti. Pada jaringan ginjal terdapat kerusakan berupa kongesti, sel radang pada limfosit dan nekrosis tubulus. Pada jaringan usus terjadi kerusakan berupa nekdrosis dan edema. Persentase kerusakan jaringan terparah pada ikan mas yaitu pada perlakuan K(-) (tanpa penambahan ekstrak kasar *Gracilaria* sp., diikuti oleh perlakuan A (1 gr/l) dan C (2 gr/l). Persentase kerusakan jaringan terendah pada dosis B (1,5 gr/l).
- Pada penelitian ini didapatkan dosis terbaik ekstrak kasar alga merah *Gracilaria* sp. yang dapat menurunkan prosentase kerusakan adalah dosis 1,5 gr/l.
- Parameter penunjang yang diamati adalah kualitas air saat penelitian dengan nilai suhu berkisar antara 25-26 ^{0}C, nilai pH berkisar antara 7,63-7,79 dan nilai oksigen terlarut berkisar antara 5,64-6,39 ppm

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, uji lanjutan tentang recovery sistem imunostimulan perlu dilakukan untuk mengetahui berapa lama efektifitas imunostimulan dalam tubuh ikan.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2012. Pengertian Patologi Anatomi. http://www.jaringankomputer.org-pengertian-patologi-dan-pembagian-patologi. Diakses pada tanggal 18 Februari 2013.

Alifuddin, M. 2002. Imunostimulan Pada Hewan Akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia.* 1(2):87-92.

Anwariyah, Siti. 2011. Kandungan fenol, komponen fitokimia dan aktivitas antioksidan *Cymodocea rotundata*. Skripsi. IPB. Bogor. 79 hal.

Asmawi. S.1986 . Parameter Kualitas Air Tambak. PT.Gramedia. Jakarta. 65 hal.

Ayu, W, Siti N.A, Zaenal A, dan Suhendi. 2008. Pemanfaatan kombmasi ekstrak daun ketapang *terminalia Catfapa* l. Dan bawang putih *allium safivum* sebagai antibiotic Alami untuk pencegahan dan pengobatan serangan *Aeromonas hydrophila* pada ikan patin *pangasionodon hypopthalmus.* http://www. repository.ipb.ac.idbitstreamhandlepemanfaatankombinasiekstrakdaunketapang_abstract.pdf.

Barlianto, D. 2008. Aplikasi Imunostimulan Khamir Laut Pada Ikan Patin (*Pangasius sp.)* Yang Diinfeksi Bakteri *aeromonas hydrophila* Dengan Pengamatan Histopatologi. Program pasca sarjana, Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang. Tesis. (Tidak dipublikasikan).

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbon (ed), 1974. Determinative Bacteriology. Eighty edition. Averly Press. Inc. USA. P. 126.

Cahyono, B., 2000. Budidaya Ikan Air Tawar. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal 28, 39, 99.

Capuccino and Sherman, 1988. Microbiology, A laboratory Manual. Benjamin/ Cumming Science Publishing. Menlo Park. California : 477

Chkhikvishvili, I. D and Z. M. Ramazanov. 2000. Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 36 No. 3 (2000) : 289-291.

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.

Effendi. 2004. Pengantar Akuakultur. Penebar Swadaya. Jakarta. 160 hal.

Ersa, E. Maulana. 2008. Gambaran histopatologi insang, usus dan otot pada ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) di daerah ciampea bogor. Skripsi. 66 hal.

Fuentes, R. J. M. and H. J. A. Perez. 1998. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the rainbow trout (*Oncorhynchus* mykiss). *Veterinaria Mexico*. 29 (1): 117-119.

Fujaya, Y., 2004. Fisiologi ikan. Dasar pengembangan Teknologi Perikanan. Rineka Cipta. Jakarta. Hal 36.

Galindo-Villegas, J., & H. Hosokawa, 2004. Immunostimulants : Toward Temporary Prevention of Diseases in Marine Fish. Kochi University, Faculty of Agriculture. Laboratory of Fish Nutrition B200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502 JAPAN. 279 - 469 Page.

Hartoto. 2009. Penelitian Deskriptif. http://www.penalaran-unm.org /index.php/artikel-nalar/penelitian/163-penelitian-deskriptif.pdf. Diakses 9 Februari 2013.

Hasan, I. 2002. Pokok-pokok Materi Metodologi Penelitian dan Aplikasinya. Gahlmia Indonesia. Jakarta. hal 58.

Hoole *et al*. 2001. Disease of Carp and Other Cyprinid Fishes. Fishing New Books. Blackwell Sciences Ltd., Oxford.

Holmes, P., Niccolls, L. M. And Sartory, D.P., 1996. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In the Genus Aeromonas, edited by B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. New York: Wiley. pp.127-150.

Ismail, T.A. 2007. Pengaruh pengobatan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* menggunakan ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Skripsi. 68 hal.

Jasmanidar, Yudiana. 2009. *Penggunaan Ekstrak Gracilaria verrucosa untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname Litopenaeus vannamei.* Tesis. Institus Pertanian Bogor. 97 hal.

Jawetz, E., Melnick And Adelberg., 1982. Review Of Medical Microbiology. Diterjemahkan: Gerard Bonang K. C. V. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 846 hal.

Juhryyah, sri. 2008. Gambaran Histopatologi Organ hati dan Ginjal Tikus pada Intoksikasi Akut Insektisida (metofluthrin, D-Phenothrin, D-allethrin) dengan Dosis Bertingkat. Skripsi. 75 hal.

Julyasih, K. Sri., I.G.P. Wirawan., W.S Harijani dan W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial Di Bali. Disampaikan pada Seminar Nasional, Surabaya, 2 Desember 2009.

Juneidi, A.W. 2004. *Rumput Laut, Jenis dan Morfologinya*. PK.BRL.A.01.M. Direktorat Pendidikan Menengah dan Kejuruan, Ditjen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.

Kakkilaya, B.S. 2002. Peripheral smear examination for malaria parasite. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site.

Khairuman, Sudenda, D., dan Gunadi, B. 2008. Budi daya ikan mas secara intensif. Agromedia Pustaka. Hal 8-9, 72, 80.

KKP. 2011. Rencana Strategis Kementerian Kelautan dan Perikanan 2010-2014. Dakses pada tanggal 25 maret 2013.

Komarawidjaja, W. dan D.A Kurniawan. Tingkat Filtrasi Rumput Laut (*Glacilaria* sp.) Terhadap Kandungan Ortofosfat (P_2O_5). *Jurnal Teknik Lingkungan.* 9 (2): 180-183.

Kumar, A.A., V.S. Meena., S. Chattopadhyay., K.C. Paningrahi. 2012. *Novel immunodulatory effect of gracilaria verrucosa and potamogetin pectinatus extracts on in vitro activation of t cells. Journal International of Life Science and Pharma Research*. 2(3):233-239.

Kurniasih. 1999. Deskripsi Histopatologi dari Beberapa Penyakit Ikan. Departemen Pertanian. Jakarta. 55 hal.

Leeson, C. Roland, Thomas S. Leeson dan Anthony A. Paparo. 1995. Textbook of Histology. Terjemahan oleh dr. S. Koesparti Siswojo, dan dr. Jan Tambajong. Buku Ajar Histologi. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 622 hal.

Luning, K. 1990. Seaweed ; Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. John Willey & Sons, Inc. New York. 527 p.

Maftuch, M.H. Toban, Y. Risjani, 2012. Administration of marine algae (*Gracilaria verrucosa*) immunostimulant enhances some innate immune parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) against *Vibrio harveyi* infection. Journal of Applied Sciences research. 58JASR. p 1052-1058.

Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari., E. Riani. 2010. Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui Postulat Koch. J. Ris. Akuakultur Vol. 5 Tahun 2010: 245-255

Mantau Z dan Sudarty. 2011. Buku Terlengkap Pembenihan Ikan Mas yang Efektif dan Efisien. Pustaka Mina. Jakarta. 63 hal.

Mariyono dan A. Sundana. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian*. 7 (1): 33-36.

Muslim, Hotly M. P dan H. Widjajanti. 2009. Penggunaan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) untuk mengobati benih ikan patin siam (*Pangasius hypophthlmmus*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 8 (1): 91-100.

Partosuwiryo S., dan Yus W., 2011. Kiat Sukses Budidaya Ikan Mas. Citra Aji Parama. Yogyakarta. 60 hal.

Pazra, DB. Gambaran histopatologi insang, otot dan usus Pada ikan lele (*clarias* spp.) Asal dari Daerah bogor. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 64 hal.

Prince, S.A. dan Wilson, L.M. 2006. Patofisiologi. Edisi VI. Volume 1. EGC. Philadelphia.

Priosoeryanto., I.M. Ersa., R. Tiuria dan S.U. Handayani. 2010. Gambaran histopatologi insang, usus, dan otot ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Journal of Veterinary Science & Medicine*. **2**(1):1-8.

Raa, jan, 2000. The Use of Immune-stimulants in Fish and Shellfish Feeds. Memorias del V. Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 19 – 22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico.

Rahardjo, A. 2012. Mengantisipasi Serangan Bakteri Aeromonas Pada Ikan Patin Dan Manusia. http://benihikan.net/penyakit/mengantisipasi-serangan-bakteri-aeromonas-pada-ikan-patin-dan-manusia/.

Ridlo. A., 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.

Rochdianto A. 2005. Analisis Finansial Usaha Pembenihan Ikan Karper (Cyprinus carpio linn) di Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan, Bali. http://id.wikipedia.org/wiki/ikankarper.

Roza, D dan Johnny, F., 2004. Peningkatan Kekebalan Larva Ikan Kerapu Bebek *Cromileptes altivelis* Dengan Menggunakan Immunostimulan Terhadap Infeksi VNN. Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Purwokerto.

Sakai, M., 1999. Current Research Status of Fis Immunostimulants Aquaculture 172 ; 63-92.

Samad, M.S.F. 2010. Pengaruh senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) terhadap hematologi dan aktivitas fagositosis ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. 109 hal.

Santoso, B. 1993. Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta. 83 hal.

Santoso, H.B dan A. Nurliani. 2005. Efek doksisiklin selama masa organogenesis pada struktur histology organ hati dan ginjal fetus mencit. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat. *Bioscientiae*. 3 (1): 15-27 hal.

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

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

Selim, S. A. 2012. Antimicrobial, antiplasmid and cytotoxicity potentials of marine algae halimeda opuntia and sarconema filiforme collected from red sea coast. world academy of science. *Engineering and Technology Journal*. **2**(1):1154-1159.

Setyowati, A., Dewi H., Awik dan Nurlita. 2012. Studi Histopatologi Hati Ikan Belanak (*Mugil cephalus)* Di Muara Sungai Aloo Sidoarjo. http://digilib.its.ac.idpublicITS-Undergraduate-13520-Paper.pdf (2). Diakses tanggal 08 Maret 2013.

Siswandari, W. 2005. Nilai diagnosis pemeriksaan imunositokimia limfosit sediaan apus darah tepi dibandingkan analisis kromosom pada penderita dengan dugaan sindroma fragile *x.* Tesis. 74 hal.

Sjafrie, N.D.M. 1990. Beberapa Catatan Mengenai Rumput Laut *Glacilaria*. *Jurnal Oseana* 15 (4): 147-155.

Suhirman, Sintha dan Winarti, Christina. 2010. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunodulator. *Jurnal Lingkungan*. 1(1):1-13.

Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 hal.

Susanto, Dwi. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot dan Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) di Desa Cibanteng. Skripsi Institut Pertanian Bogor. 49 hal.

Sustri, Losita. 2010. Histologi Tulang, Haiti, Ginjal, Insang, Gonad, Otot, dan Evitel Ikan. Universitas Riau.

Sutisna, D. H. dan Ratno S. 1995. Pembenihan Ikan Air Tawar. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.52 hal.

Swann LaDon dan White M. Randy, 1989. Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* Infection of Fish. Page 461-462.

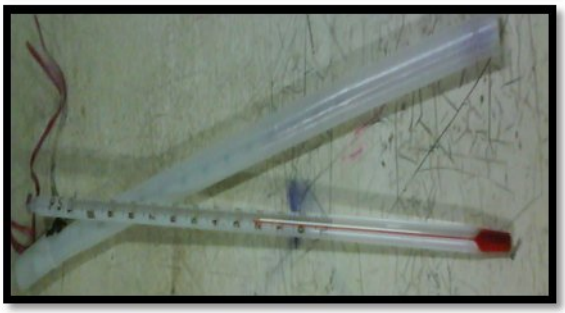
Wiyanto, D. B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* Terhadap Bakteri Aeromonas hydrophila dan Vibrio harveyii. *Jurnal Kelautan*. **3**(1):1-17.

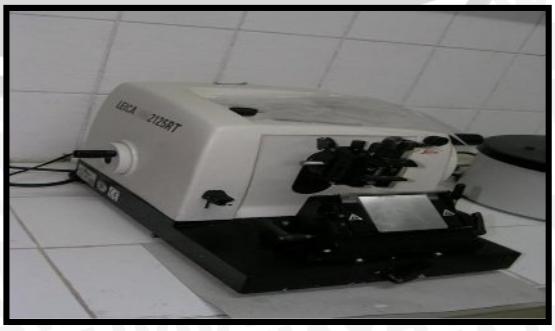
Yin, G., Ardo L., Thompson, K. D., Adams A., Jeney Z., Jeney G., 2010. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carps, *Cyprinus carpio* and protection againts *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 140 – 145.

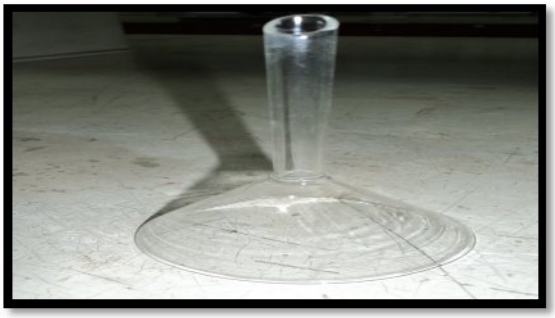
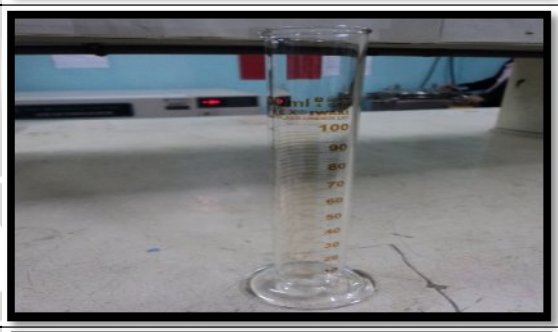
Zonneveld, N., Huisman, E.A., dan Boon, J.H., 1991. Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan. Alih bahasa, Penerbit PT. Gramedia Jakarta. Hal 159-160.

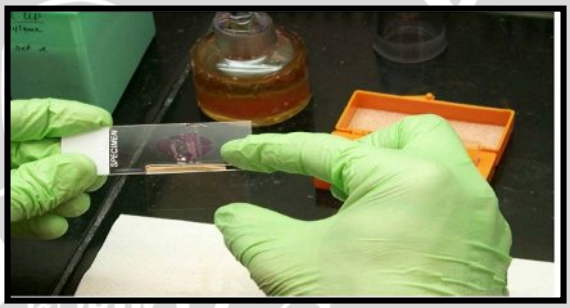
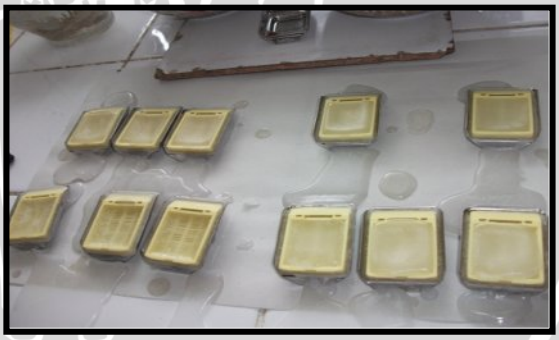
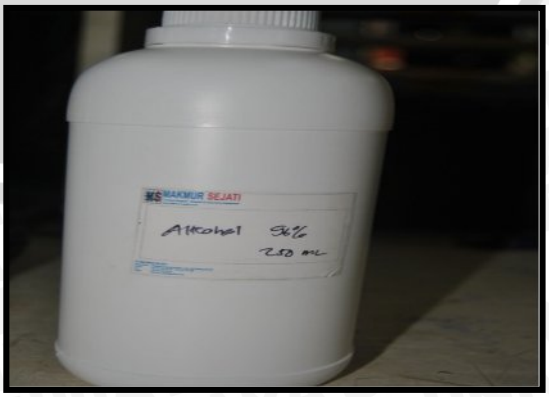
LAMPIRAN

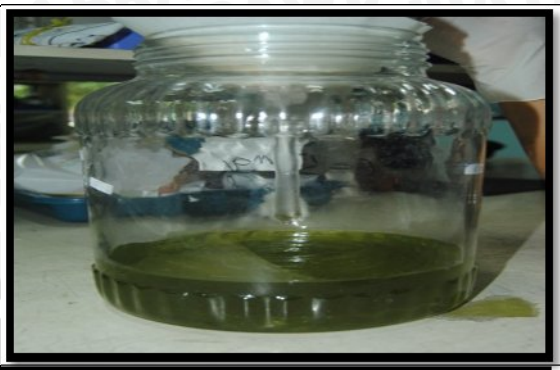
Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

Akuarium ukuran 30x30x30 cm^3	
Aerator, Selang dan Batu	
DO Meter	
Thermometer	
Timbangan Analitik	

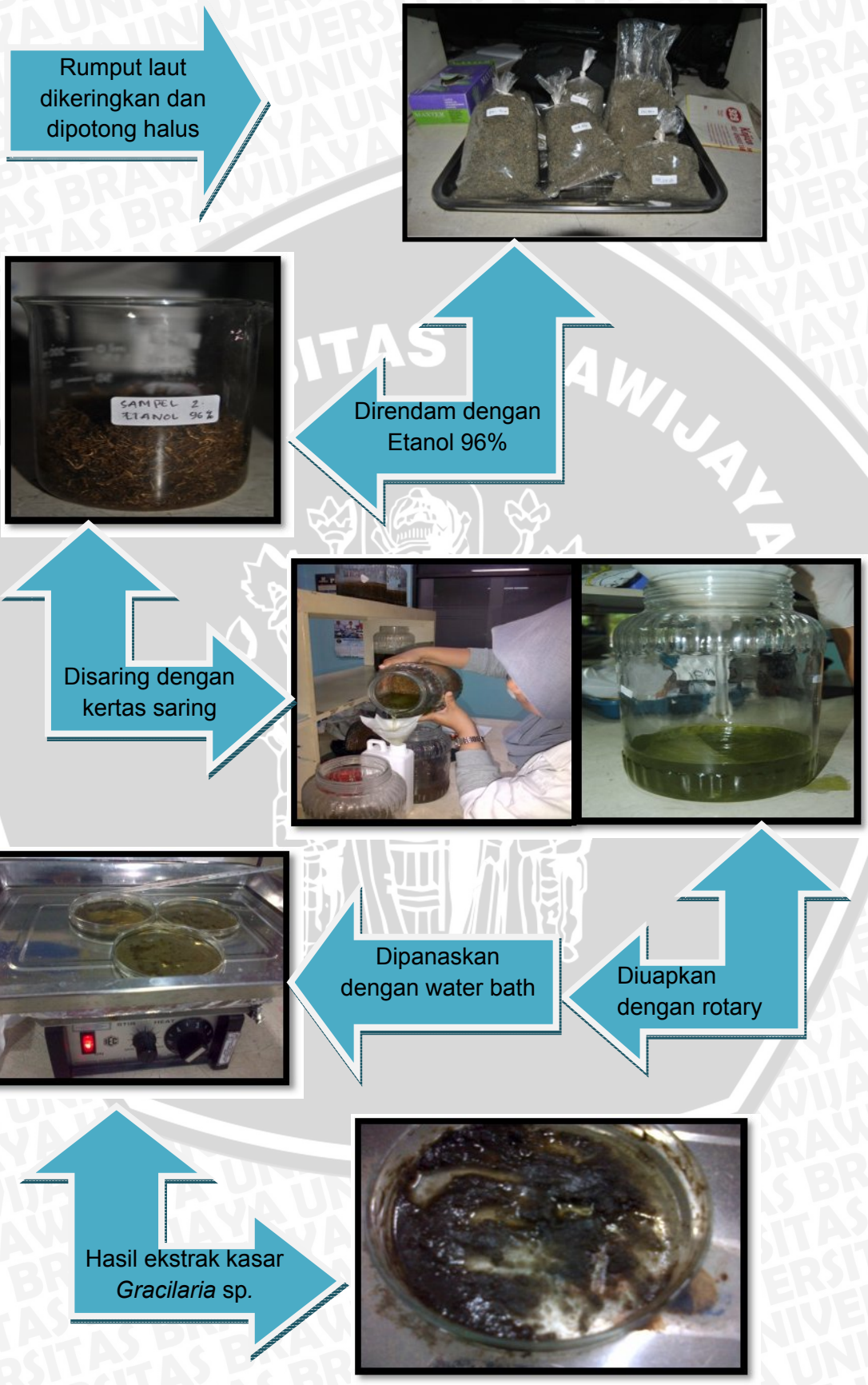
Section Set	
Beaker glass	
Rotary Evaporator	
Wadah Embedding	
Mikrotom Rotary	

Embedding Machine	
Corong	
Gelas Ukur	
Toples 2 liter	
Mikroskop	

Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)	
Rumput Laut *Gracilaria veruccosa* Kering	
Hematoksilin Eosin	
Paraffin Blok	
Etanol 96%	

Ekstrak *Gracilaria verrucosa*	
Xylol	
Larutan Bouin	
Pellet	

Lampiran 2. Proses Maserasi Rumput Laut *Gracilaria veruccosa*



repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 3 : Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi menurut Tim Balai Karantina Ikan Juanda (2005), melalui tahap-tahap di bawah ini:

- **Tahap Fiksasi**

Jaringan hati, ginjal dan usus diiris dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm^2. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam ekstrak kasar fiksatif yaitu formalin 10% selama 24 jam.

- **Tahap Dehidrasi**

Jaringan direndam dalam alkohol 70% selama 24 jam. Jaringan selanjutnya direndam dalam alkohol 80%, 95%, 100% xylol + alkohol (3:1), xylol + alkohol (1:1), xylol selama 30 menit.

- **Tahap Parafinasi**.

Jaringan direndam dengan menggunakan paraffin xylol, paraffin 1, paraffin II, paraffin III bersuhu 56-60°C selama 30 menit. Selanjutnya terhadap jaringan tersebut dilakukan embedding atau pengeblokan dengan cara memasukkan jaringan dalam cetakan berisi paraffin cair. Jaringan didinginkan hingga mengeras pada suhu kamar minimal 24 jam.

- **Tahap Deparafinasi**

Blok paraffin yang berisi jaringan dipotong dengan menggunakan mikroton dengan ketebalan 5 mikron. Jaringan yang terpotong diletakan di air hangat untuk mencegah hasil pemotongan melengkung selanjutnya diletakkan diatas gelas objek dan dikeringkan sampai jaringan menempel sempurna pada permukaan gelas objek. Preparat potongan jaringan dicelupkan secara berturut-turut pada ekstrak kasar xylol, alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing selama 3-5 menit, kemudian preparat potongan jaringan dicelupkan dalam akuades selama 5 menit.

- **Tahap Pewarnaan**

Preparat potongan jaringan dicelupkan dalam ekstrak kasar pewarna haemotoksilin selama 5-10 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat potongan jaringan kemudian dicelupkan ke dalam eosin selama 5-10 menit lalu dibilas dengan air mengalir

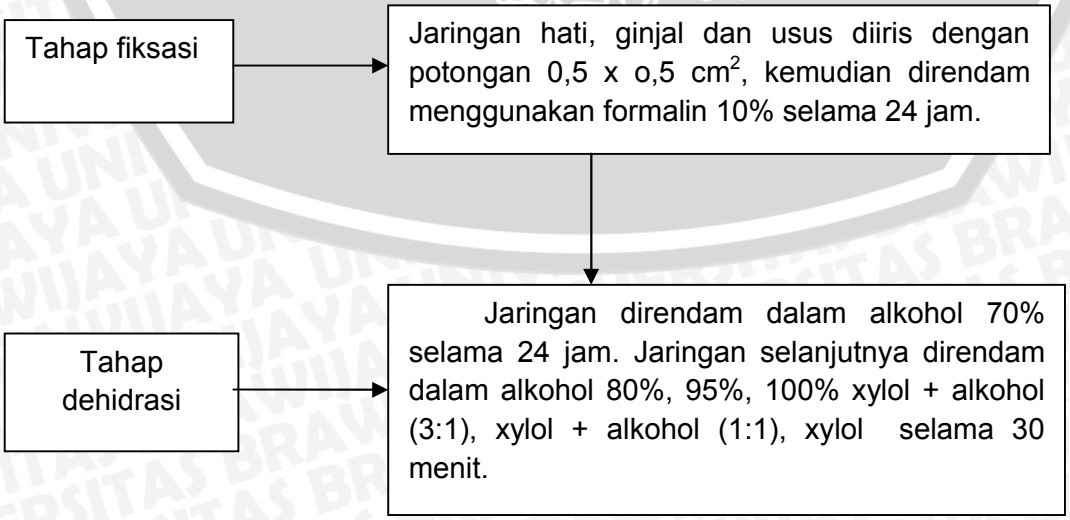
- **Tahap Dehidrasi**

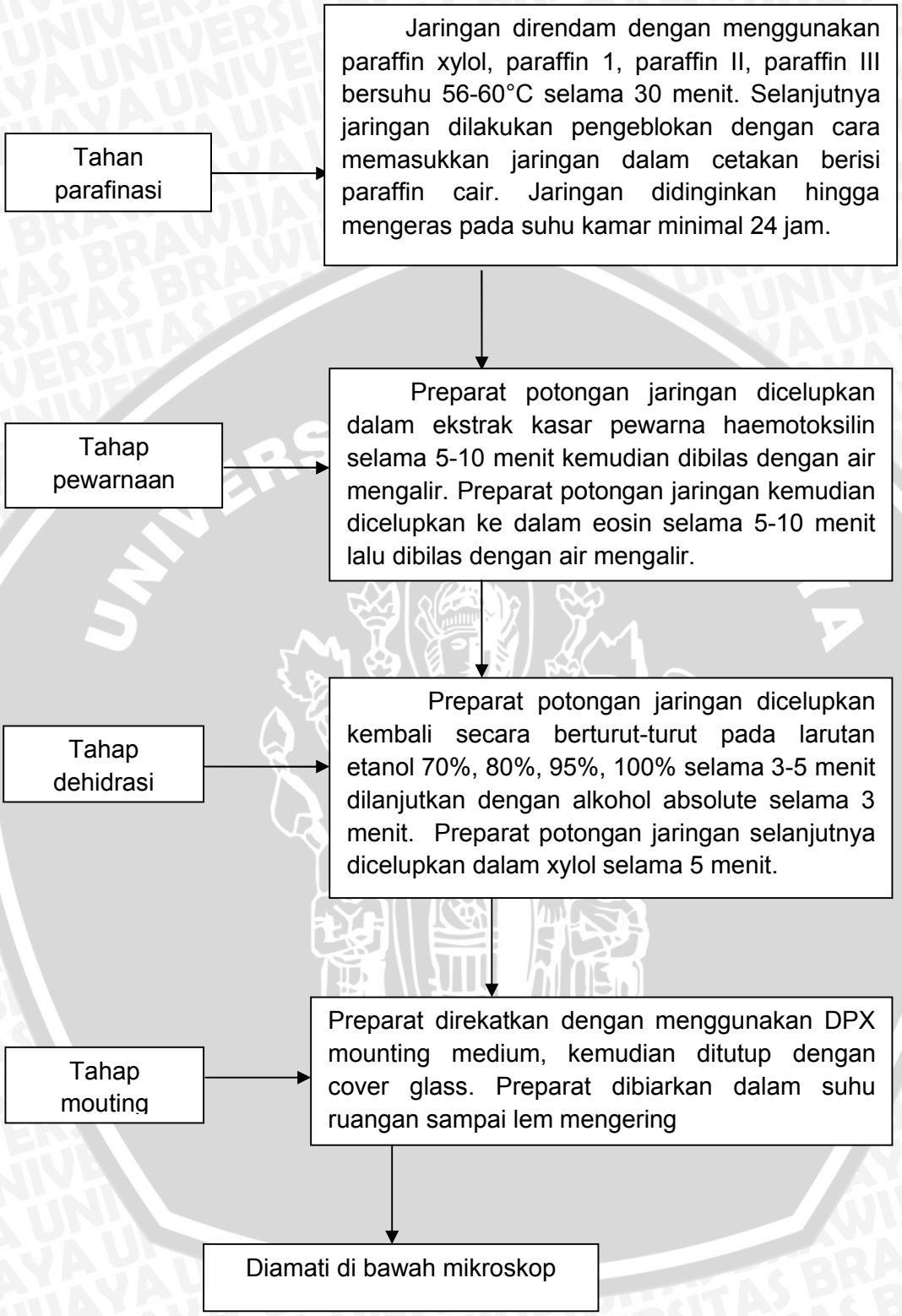
Preparat potongan jaringan dicelupkan kembali secara berturut-turut pada larutan etanol 70%, 80%, 95%, 100% selama 3-5 menit dilanjutkan dengan alkohol absolute selama 3 menit. Preparat potongan jaringan selanjutnya dicelupkan dalam xylol selama 5 menit.

- **Tahap Mouting**

Preparat direkatkan 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.

Berikut adalah diagram alur pembuatan preparat histopatologi hati, ginjal dan usus ikan mas menurut Tim Balai Karantina Ikan Juanda (2005).




Tahan parafinasi
Jaringan direndam dengan menggunakan paraffin xylol, paraffin 1, paraffin II, paraffin III bersuhu 56-60°C selama 30 menit. Selanjutnya jaringan dilakukan pengeblokan dengan cara memasukkan jaringan dalam cetakan berisi paraffin cair. Jaringan didinginkan hingga mengeras pada suhu kamar minimal 24 jam.
Tahap pewarnaan
Preparat potongan jaringan dicelupkan dalam ekstrak kasar pewarna haemotoksilin selama 5-10 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat potongan jaringan kemudian dicelupkan ke dalam eosin selama 5-10 menit lalu dibilas dengan air mengalir.
Tahap dehidrasi
Preparat potongan jaringan dicelupkan kembali secara berturut-turut pada larutan etanol 70%, 80%, 95%, 100% selama 3-5 menit dilanjutkan dengan alkohol absolute selama 3 menit. Preparat potongan jaringan selanjutnya dicelupkan dalam xylol selama 5 menit.
Tahap mouting
Preparat direkatkan dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan cover glass. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering
Diamati di bawah mikroskop

Lampiran 4. Nilai Skoring Histopatologi Jaringan Ikan Mas

SKORING TEST HISTOPATOLOGI HATI

Organ	Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
				LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Hati	Kongesti	1 gr/l	1	3	2	4	3	3	3	2,8
			2	3	2	4	2	2	2,6	
			3	3	2	3	2	4	2,8	
		1,5 gr/l	1	1	2	1	2	1	1,4	1,6
			2	1	2	2	1	2	1,6	
			3	1	3	2	1	2	1,8	
		2 gr/l	1	3	2	4	3	4	3,2	3,0
			2	2	3	3	4	2	2,8	
			3	3	2	4	3	3	3	
		K(-)	1	4	4	4	4	3	3,8	3,5
			2	4	3	4	3	2	3,2	
			3	4	3	3	4	3	3,4	
		K(+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
	Nekrosis	1 gr/l	1	2	1	3	3	4	2,6	2,5
			2	3	2	3	3	2	2,6	
			3	3	2	3	3	1	2,4	
		1,5 gr/l	1	2	2	1	1	2	1,6	1,4
			2	2	1	1	1	1	1,2	
			3	1	1	2	1	2	1,4	
		2 gr/l	1	3	1	3	4	2	2,6	2,9
			2	3	3	3	4	3	3,2	
			3	2	4	3	3	2	2,8	
		K (-)	1	3	4	3	4	4	3,6	3,4
			2	3	3	4	3	3	3,2	
			3	3	3	4	3	4	3,4	
		K (+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	

Keterangan :

Nilai 1 = Ringan (Kerusakan 0-5%)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6-25%)

Nilai 3 = Berat (Kerusakan 26-50%)

Nilai 4 = Sangat Berat (Kerusakan >50%)

SKORING TEST HISTOPATOLOGI GINJAL

Organ	Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
				LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Ginjal	Kongesti	1 gr/l	1	3	3	3	4	2	3	2,7
			2	2	3	2	2	3	2,4	
			3	2	3	3	3	2	2,6	
		1,5 gr/l	1	2	1	2	1	2	1,6	1,4
			2	2	1	1	1	2	1,4	
			3	1	1	2	1	1	1,2	
		2 gr/l	1	2	3	4	2	4	3	2,9
			2	2	3	3	3	2	2,6	
			3	4	2	3	4	3	3,2	
		K(-)	1	3	4	4	4	4	3,8	3,6
			2	4	3	4	3	4	3,6	
			3	3	3	4	4	3	3,4	
		K(+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
	Sel Radang (Limfosit)	1 gr/l	1	2	4	3	4	2	3	2,7
			2	3	3	2	3	2	2,6	
			3	1	3	3	3	3	2,6	
		1,5 gr/l	1	2	1	1	2	2	1,6	1,7
			2	2	2	1	2	3	2	
			3	1	1	1	2	2	1,4	
		2 gr/l	1	3	3	2	3	4	3	3,0
			2	3	2	2	4	3	2,8	
			3	2	4	4	3	3	3,2	
		K (-)	1	3	4	3	4	4	3,6	3,4
			2	3	3	3	4	3	3,2	
			3	4	3	4	3	3	3,4	
		K (+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
	Nekrosis Tubulus	1 gr/l	1	3	1	4	3	2	2,6	2,6
			2	2	3	3	1	2	2,2	
			3	3	4	3	3	2	3	
		1,5 gr/l	1	2	1	1	1	2	1,4	1,4
			2	2	1	1	1	1	1,2	
			3	2	2	1	1	2	1,6	
		2 gr/l	1	3	3	3	2	3	2,8	2,8
			2	3	3	2	3	2	2,6	
			3	3	4	2	3	3	3	

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

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%)

SKORING TEST HISTOPATOLOGI USUS

Organ	Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area Lapang Pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
				LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5		
Usus	Nekrosis	1 gr/l	1	3	3	3	4	3	3,2	2,7
			2	3	3	2	2	2	2,4	
			3	2	3	3	2	3	2,6	
		1,5 gr/l	1	1	1	2	2	2	1,6	1,3
			2	1	2	2	1	1	1,4	
			3	1	1	1	1	1	1	
		2 gr/l	1	3	3	3	4	3	3,2	2,9
			2	3	3	2	2	3	2,6	
			3	4	3	3	3	2	3	
		K(-)	1	3	4	4	4	4	3,8	3,6
			2	3	3	4	4	4	3,6	
			3	4	4	3	3	3	3,4	
		K(+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	
	Edema	1 gr/l	1	2	3	2	4	3	2,8	2,7
			2	3	3	3	3	2	2,8	
			3	2	3	2	3	3	2,6	
		1,5 gr/l	1	1	1	1	2	2	1,4	1,4
			2	2	2	2	1	1	1,6	
			3	1	1	1	1	2	1,2	
		2 gr/l	1	2	3	3	4	3	3	2,9
			2	3	4	3	3	3	3,2	
			3	2	3	2	3	3	2,6	
		K (-)	1	3	4	3	4	4	3,6	3,4
			2	2	4	4	4	4	3,6	
			3	3	4	3	3	2	3	
		K (+)	1	1	1	1	1	1	1	1,0
			2	1	1	1	1	1	1	
			3	1	1	1	1	1	1	

Keterangan :

Nilai 1 = Ringan (Kerusakan 0-5%)

Nilai 2 = Sedang (Kerusakan 6-25%)

Nilai 3 = Berat (Kerusakan 26-50%)

Nilai 4 = Sangat Berat (Kerusakan >50%)

Lampiran 5. Hasil Skoring Histopatologi Kerusakan Jaringan Hati, Ginjal dan Usus Menggunakan Program SPSS 16

Organ	Kerusakan Patologi	Ulangan	Dosis Ekstrak Fenol *Gracilaria* Sp.				
			K(+)	K(-)	1 gr/l	1.5 gr/l	2 gr/l
Hati	Kongesti	1	1	3,8	3,0	1,4	3,2
		2	1	3,2	2,6	1,6	2,8
		3	1	3,4	2,8	1,8	3,0
	Nekrosis	1	1	3,6	2,6	1,6	2,6
		2	1	3,2	2,6	1,2	3,2
		3	1	3,4	2,4	1,4	2,8
Ginjal	Kongesti	1	1	3,8	3,0	1,6	3,0
		2	1	3,6	2,4	1,4	2,6
		3	1	3,4	2,6	1,2	3,2
	Sel radang (Limfosit)	1	1	3,6	3,0	1,6	3,0
		2	1	3,2	2,6	2,0	2,8
		3	1	3,4	2,6	1,4	3,2
	Nekrosis Tubulus	1	1	3,4	2,6	1,4	2,0
		2	1	3,2	2,2	1,2	2,6
		3	1	3,6	3,0	1,6	3,0
Usus	Nekrosis	1	1	3,8	3,2	1,6	3,2
		2	1	3,6	2,4	1,4	2,6
		3	1	3,4	2,6	1,0	3,0
	Edema	1	1	3,6	2,8	1,4	3,0
		2	1	3,6	2,8	1,6	3,2
		3	1	3,0	2,6	1,2	2,6

Lampiran 5 (Lanjutan).

a. Jaringan Hati

KONGESTI

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	3,0	2,6	2,8	8,4	2,8
1,5 gr/l (B)	1,4	1,6	1,8	4,8	1,6
2 gr/l (C)	3,2	2,8	3,0	9,0	3,0
Kontrol negatif K(-)	3,8	3,2	3,4	10,4	3,5

Hasil Uji Normalitas Kolmogrof-Smirnov (p>0,05)
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kongesti
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2.7167
	Std. Deviation	0,74569
Most Extreme Differences	Absolute	0,211
	Positive	0,141
	Negative	-0,211
Kolmogorov-Smirnov Z		0,731
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,658

a, Test distribution is Normal.
Nilai Z = 0,731, α>0,05, Sehingga data diatas normal.

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	5,690	1,897	35,563	0,000*
Acak	8	0,427	0,053		
Total	**11**	**6,117**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,600	-	-	a
1 ppt	3	-	2,8000	-	b
2 ppt	3	-	3,0000	-	b
0 ppt	3	-	-	3,4667	c
Sig.		1,000	0,721	1,000	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			kongesti
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,581
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,581
	Standar error		0,133
	Signifikansi		0,002
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,889
		Tertinggi	-0,274
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,033
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,033
	Standar error		0,133
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,726
		Tertinggi	1,341
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,701
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,701
	Standar error		0,133
	Signifikansi		0,001
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,393
		Tertinggi	1,008

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,725	0,525	0,419	0,568

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,140	0,747	-2,863	-2.863	0,019
Dosis ** 2	0,867	0,370	1,813	2.342	0,044
(Perbandingan)	3,553	0,327		10,882	0,000

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

$Y= 3,553 – 2,140x + 0,867x^2$

$Y' = -2,140+ (2),0,867x$

$Y' = - 2,140 + 1,734x$

$2,140 = 1,734x$

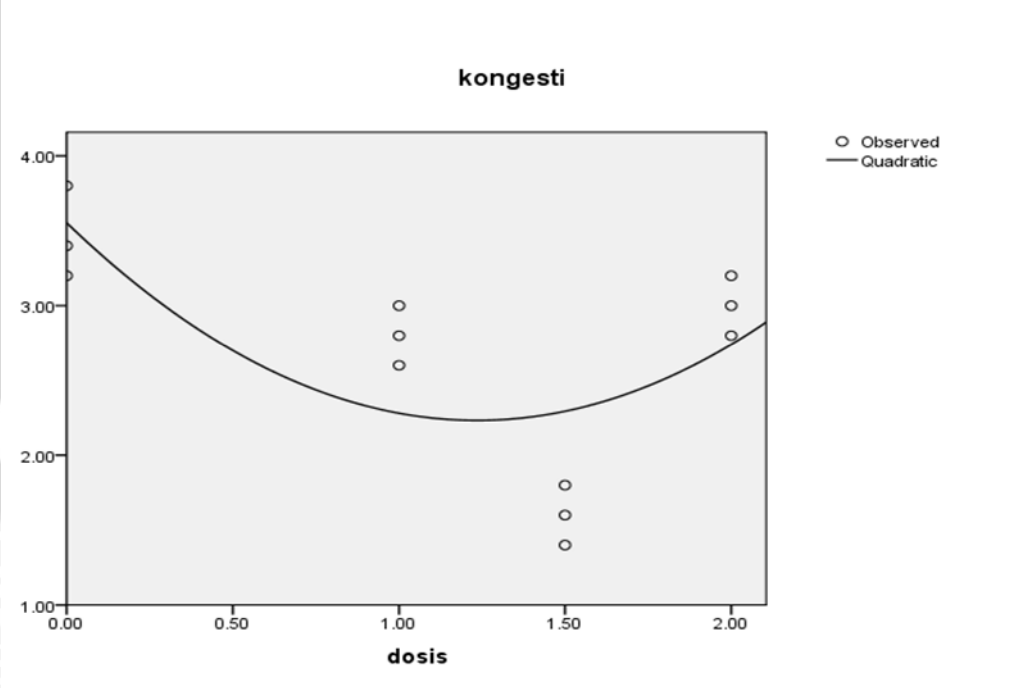
X= 1,235

$Y= 3,553 – 2,140 (1,235) + 0,867 (1,235)^2$

$Y= 3,553 – 3,375 +1,071$

Y= 1,249

Grafik Kongesti Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (lanjutan)

NEKROSIS

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	2,6	2,6	2,4	7,6	2,5
1,5 gr/l (B)	1,6	1,2	1,4	4,2	1,4
2 gr/l (C)	2,6	3,2	2,8	8,6	2,9
Kontrol negatif K(-)	3,6	3,2	3,4	10,2	3,4

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		NEKROSIS
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,5500
	Std. Deviation	0,78682
Most Extreme Differences	Absolute	0,192
	Positive	0,136
	Negative	-0,192
Kolmogorov-Smirnov Z		0,665
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,768

a. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,665, α<0,05. Sehingga data diatas normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	6,437	2,146	45,976	0,000*
Acak	8	0,373	0,047		
Total	**11**	**6,117**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,4000	-	-	a
1 ppt	3	-	2,5333	-	b
2 ppt	3	-	2,8667	2,8667	bc
0 ppt	3	-	-	3,4000	c
Sig.		1,000	0,304	0,064	

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Nekrosis
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,611
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,611
	Standar error		0,125
	Signifikansi		0,001
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,889
		Tertinggi	-0,324
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,167
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,167
	Standar error		0,125
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,879
		Tertinggi	1,454
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,641
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,641
	Standar error		0,125
	Signifikansi		0,001
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,353
		Tertinggi	0,929

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,779	0,606	0,519	0,546

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,470	0,718	-2,425	-3,440	0,007
Dosis ** 2	1,018	0,356	2,019	2,864	0,019
(Perbandingan)	3,484	0,314		11,104	0,000

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

$Y= 3,484 – 2,470x + 1,018x^2$

$Y' = -2,470+ (2),1,018x$

$Y' = - 2,470 + 2,036x$

$2,470 = 2,036x$

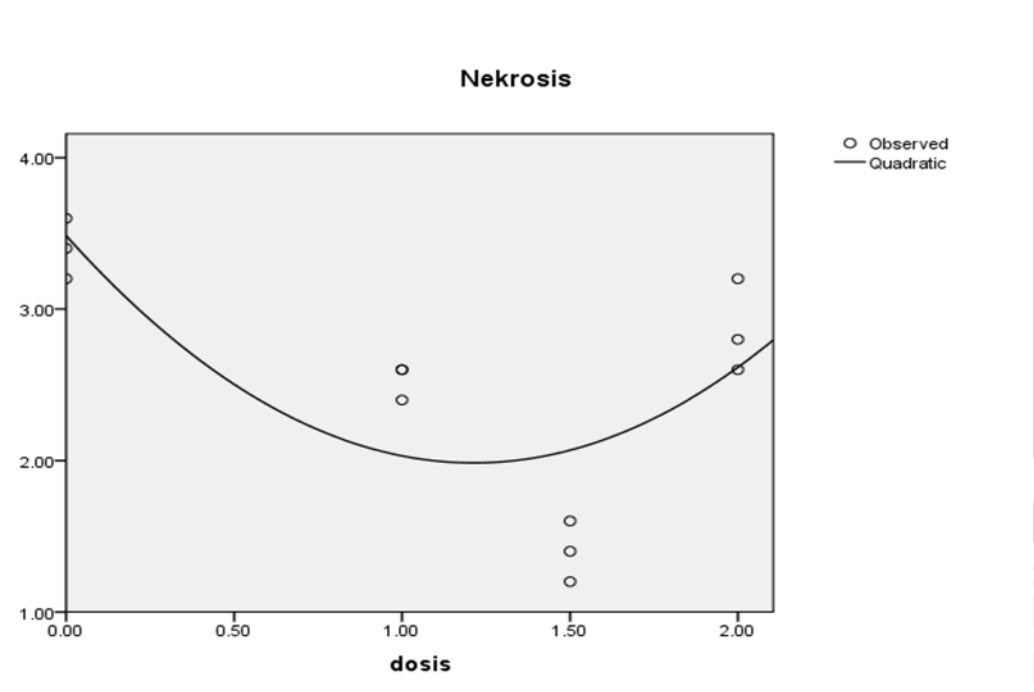
X= 1,214

$Y= 3,484– 2,470 (1,214) + 1,018 (1,214)^2$

$Y= 3,484 – 2,998 +1,234$

Y= 1,72

Grafik Nekrosis Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (Lanjutan)

b. Jaringan Ginjal

KONGESTI

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	3,0	2,4	2,6	8,0	2,7
1,5 gr/l (B)	1,6	1,4	1,2	4,2	1,4
2 gr/l (C)	3,0	2,6	3,2	8,8	2,9
Kontrol negatif K(-)	3,8	3,6	3,4	10,8	3,6

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KONGESTI
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,6500
	Std. Deviation	0,86182
Most Extreme Differences	Absolute	0,158
	Positive	0,138
	Negative	-0,158
Kolmogorov-Smirnov Z		0,546
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,927

b. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,546, α > 0,05 sehingga data tersebut normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	7,637	2,546	38,183	0,000*
Acak	8	0,533	0,067		
Total	**11**	**8,17**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,46667	-	-	a
1 ppt	3	-	2,6667	-	b
2 ppt	3	-	2,9333	2,9333	bc
0 ppt	3	-	-	3,6000	c
Sig.		1,000	0,607	0,053	

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Nekrosis
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,730
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,730
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,001
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-1,074
		Tertinggi	-0,324
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,233
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,233
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,890
		Tertinggi	1,577
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,701
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,701
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,002
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,357
		Tertinggi	1,044

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,775	0,601	0,512	0,602

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,624	0,792	-2,352	-3,314	0,009
Dosis ** 2	1,055	0,392	1,909	2.690	0,025
(Perbandingan)	3,691	0,346		10,670	0,000

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

$Y= 3,691 – 2,624x + 1,055x^2$

$Y' = -2,624+ (2),1,055x$

$Y' = - 2,624 + 2,11x$

$2,470 = 2,11x$

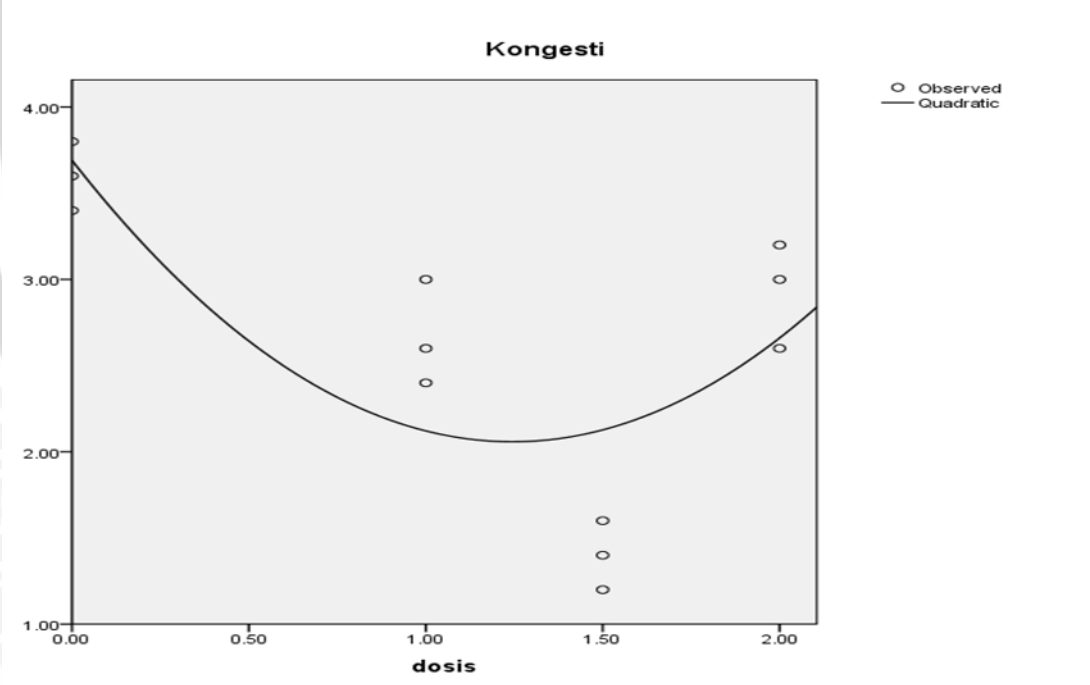
X= 1,171

$Y= 3,691 – 2,624 (1,171) + 1,055 (1,171)^2$

$Y= 3,691 – 3,795 +2,226$

Y= 2,122

Grafik Kongesti Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (Lanjutan)

SEL RADANG

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	3,0	2,6	2,6	8,0	2,7
1,5 gr/l (B)	1,6	2,0	1,4	4,2	1,7
2 gr/l (C)	3,0	2,8	3,2	8,8	3,0
Kontrol negatif K(-)	3,6	3,2	3,4	10,8	3,4

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SEL RADANG
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,7000
	Std. Deviation	0,70065
Most Extreme Differences	Absolute	0,193
	Positive	0,108
	Negative	-0,193
Kolmogorov-Smirnov Z		0,669
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,761

c. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,669, α > 0,05 sehingga data tersebut normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	4,947	1,649	29,098	0,000*
Acak	8	0,453	0,057		
Total	**11**	**8,17**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,6667	-	-	a
1 ppt	3	-	2,7333	-	b
2 ppt	3	-	3,0000	3,0000	bc
0 ppt	3	-	-	3,4000	c
Sig.		1,000	0,548	0,245	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Sel Radang
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,507
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,507
	Standar error		0,137
	Signifikansi		0,006
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,824
		Tertinggi	-0,190
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,000
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,000
	Standar error		0,137
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,683
		Tertinggi	1,317
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,626
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,626
	Standar error		0,137
	Signifikansi		0,002
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,309
		Tertinggi	0,943

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,733	0,537	0,434	0,527

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,079	0,694	-2,292	-2,997	0,015
Dosis ** 2	0,861	0,343	1,916	2,506	0,034
(Perbandingan)	3,479	0,303		11,481	0,000

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

$Y= 3,479 – 2,079x + 0,861x^2$

$Y' = -2,079+ (2), 0,861x$

$Y' = - 2,079 + 2,11x$

$2,079 = 2,11x$

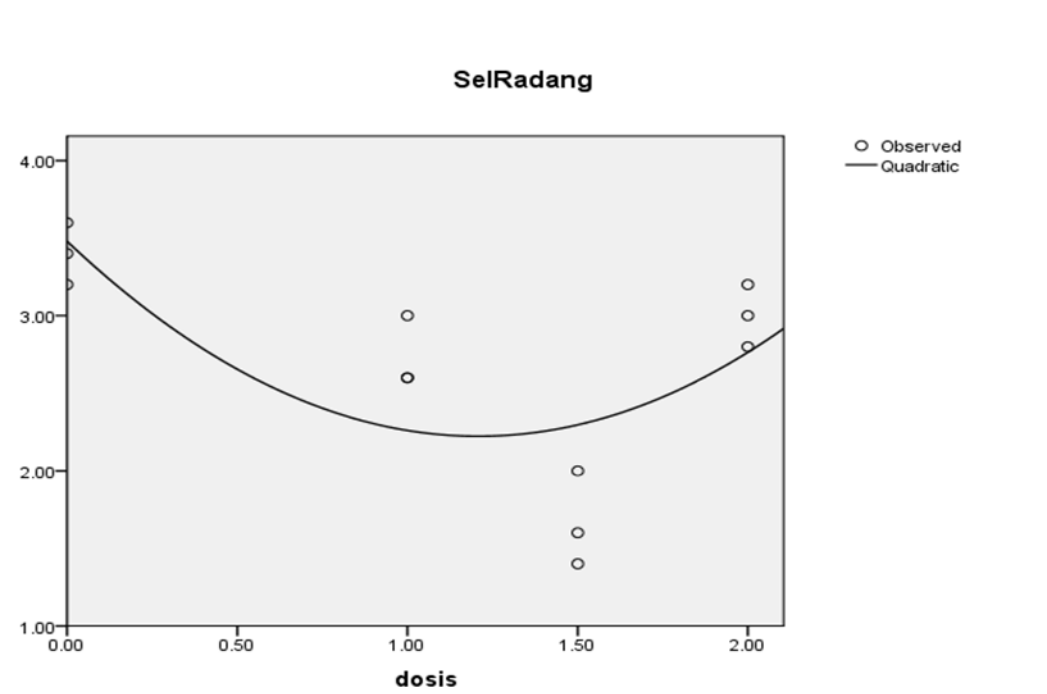
X= 0,986

$Y= 3,479 – 2,079 (0,986) + 0,861 (0,986)^2$

$Y= 3,479 – 3,065 +1,847$

Y= 2,261

Grafik Sel Radang Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (Lanjutan)

NEKROSIS TUBULUS

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	2,6	2,2	3,0	7,8	2,6
1,5 gr/l (B)	1,4	1,2	1,6	4,2	1,4
2 gr/l (C)	2,8	2,6	3,0	8,4	2,8
Kontrol negatif K(-)	3,4	3,2	3,6	10,2	3,4

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		nekrosis
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,5500
	Std. Deviation	0,79143
Most Extreme Differences	Absolute	0,192
	Positive	0,135
	Negative	-0,192
Kolmogorov-Smirnov Z		0,665
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,769

a. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,665, α>0,05. Sehingga data normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	6,330	2,110	30,143	0,000*
Acak	8	0,560	0,070		
Total	**11**	**6,89**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,4000	-	-	a
1 ppt	3	-	2,6000	-	b
2 ppt	3	-	2,8000	2,8000	bc
0 ppt	3	-	-	3,4000	c
Sig.		1,000	0,792	0,091	

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Nekrosis
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,671
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,671
	Standar error		0,153
	Signifikansi		0,002
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-1,023
		Tertinggi	-0,319
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,100
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,100
	Standar error		0,153
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,748
		Tertinggi	1,452
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,672
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,672
	Standar error		0,153
	Signifikansi		0,002
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,319
		Tertinggi	1,023

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,754	0,569	0,473	0,574

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,325	0,756	-2,270	-3,078	0,013
Dosis ** 2	0,927	0,374	1,828	2,478	0,035
(Perbandingan)	3,485	0,330		10,557	0,000

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

$Y= 3,485 – 2,325x + 0,927x^2$

$Y' = -2,325+ (2),0,927x$

$Y' = - 2,325 + 1,854x$

$2,325 = 1,854x$

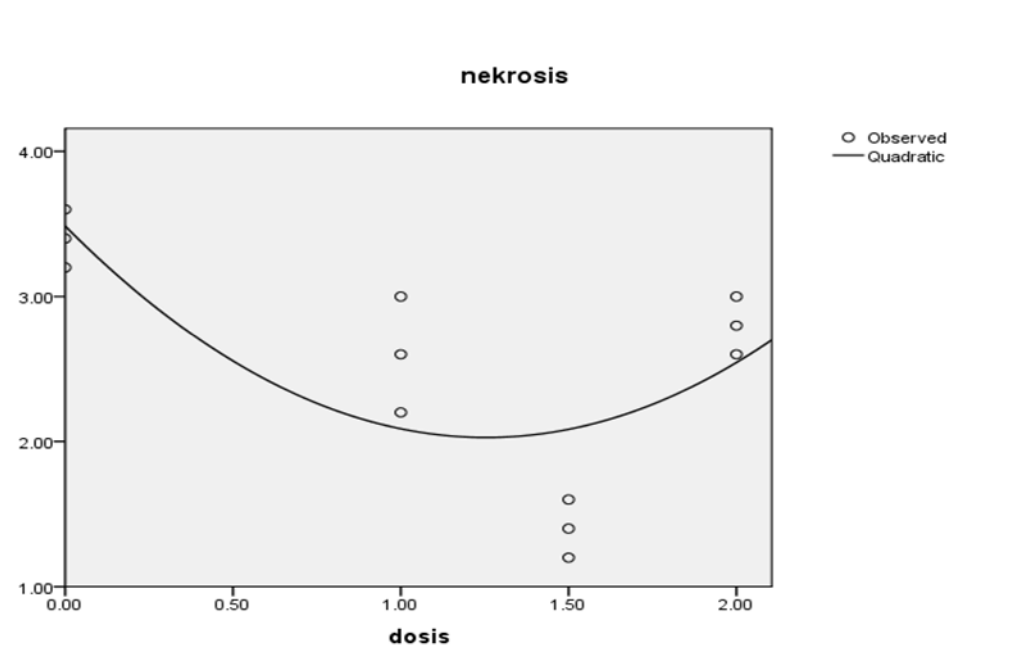
X= 1,255

$Y= 3,485– 2,325 (1,255) + 0,927 (1,255)^2$

$Y= 3,485 – 2,918 +1,164$

Y= 1,731

Grafik Nekrosis Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (Lanjutan)

c. Jaringan Usus

NEKROSIS

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	3,2	2,4	2,6	8,2	2,7
1,5 gr/l (B)	1,6	1,4	1,0	4,0	1,3
2 gr/l (C)	3,2	2,6	3,0	8,8	2,9
Kontrol negatif K(-)	3,8	3,6	3,4	10,8	3,6

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Nekrosis
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,6500
	Std. Deviation	0,90303
Most Extreme Differences	Absolute	0,151
	Positive	0,128
	Negative	-0,151
Kolmogorov-Smirnov Z		0,523
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,948

d. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,523, α > 0,05 sehingga data tersebut normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	8,170	2,723	27,233	0,000*
Acak	8	0,800	0,100		
Total	**11**	**8,17**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Lampiran 5 (lanjutan)

Perlakuan	N	Subset			Notasi
		1	2	3	
1,5 ppt	3	1,3333	-	-	a
1 ppt	3	-	2,7333	-	b
2 ppt	3	-	2,9333	2,9333	bc
0 ppt	3	-	-	3,6000	c
Sig.		1,000	0,864	0,120	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Nekrosis
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,760
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,760
	Standar error		0,183
	Signifikansi		0,003
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-1,181
		Tertinggi	-0,339
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,233
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,233
	Standar error		0,183
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,812
		Tertinggi	1,654
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,790
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,790
	Standar error		0,183
	Signifikansi		0,003
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,369
		Tertinggi	1,211

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,740	0,547	0,447	0,672

Lampiran 5 (lanjutan)
Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,593	0,884	-2,218	-2,935	0,017
Dosis ** 2	1,030	0,437	1,780	2,355	0,043
(Perbandingan)	3,699	0,386		9,584	0,000

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

$Y= 3,699 – 2,593x + 1,030x^2$

$Y' = -2,593+ (2),1,030x$

$Y' = - 2,593 + 2,06x$

$2,593 = 2,06x$

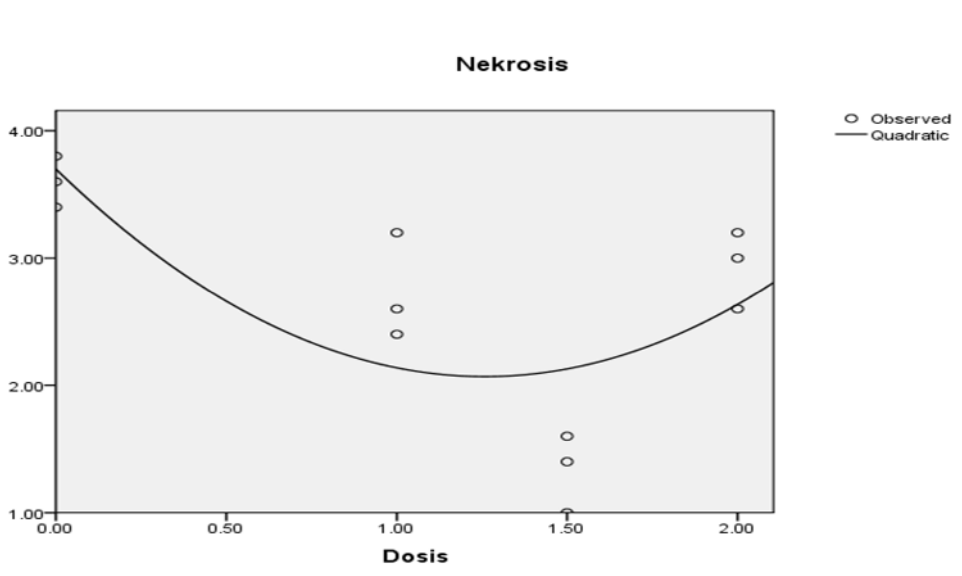
X= 1,259

$Y= 3,699 – 2,593 (1,259) + 1,030 (1,259)^2$

$Y= 3,699 – 3,265 +1,297$

Y= 1,731

Grafik Nekrosis Sebagai Berikut :



Lampiran 5 (Lanjutan)

EDEMA

Perlakuan	Ulangan Rerata LP (Lapang Pandang)			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
1 gr/l (A)	2,8	2,8	2,6	8,2	2,7
1,5 gr/l (B)	1,4	1,6	1,2	4,2	1,4
2 gr/l (C)	3,0	3,2	2,6	8,8	2,9
Kontrol negatif K(-)	3,6	3,6	3,0	10,2	3,4

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Edema
N		12
Normal Parameters[a]	Mean	2,6167
	Std. Deviation	0,80660
Most Extreme Differences	Absolute	0,242
	Positive	0,146
	Negative	-0,242
Kolmogorov-Smirnov Z		0,837
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,485

e. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0,837 , α > 0,05 sehingga data tersebut normal

Uji antar Perlakuan dan Efek

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Significansi
Perlakuan	3	6,623	2,208	33,117	0,000*
Acak	8	0,533	0,067		
Total	**11**	**8,17**			

Keterangan : * berbeda nyata (sig<0,05)

Perlakuan	N	Subset		Notasi
		1	2	
1,5 ppt	3	1,4000	-	a
1 ppt	3	-	2,7333	b
2 ppt	3	-	2,9333	b
0 ppt	3	-	3,4000	c
Sig.		1,000	0,053	

Kelompok yang homogen akan ditampilkan.

Lampiran 5 (lanjutan)

Uji Polinomial Orthogonal

Hasil Perbandingan (K Matrix)

Polinomial			Variabel Terikat
			Edema
Linear	Perkiraan Perbandingan		-0,611
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		-0,611
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,003
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	-0,955
		Tertinggi	-0,267
Kuadratik	Perkiraan Perbandingan		1,100
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		1,100
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,000
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,756
		Tertinggi	1,444
Kubik	Perkiraan Perbandingan		0,790
	Nilai Hipotesis		0
	Perbedaan (Perkiraan - Hipotesis)		0,790
	Standar error		0,149
	Signifikansi		0,001
	Nilai Kepercayaan 95%	Terendah	0,446
		Tertinggi	1,134

Ringkasan Model

R	R^2	Penyesuaian R^2	Perkiraan Standar Error
0,705	0,497	0,386	0,632

Koefisiensi

	Bukan Koefisien Standar		Standar Koefisien		
	B	Standar Error	Beta	t	Sig.
Dosis	-2,256	0,832	-2,161	-2,713	0,024
Dosis ** 2	0,915	0,412	1,770	2,222	0,053
(Perbandingan)	3,496	0,363		9,622	0,000

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

$Y= 3,496 – 2,256x + 0,915x^2$

$Y' = -2,256 + (2)\ 0,915x$

$Y' = -\ 2,256 + 1,83x$

$2,256 = 1,83x$

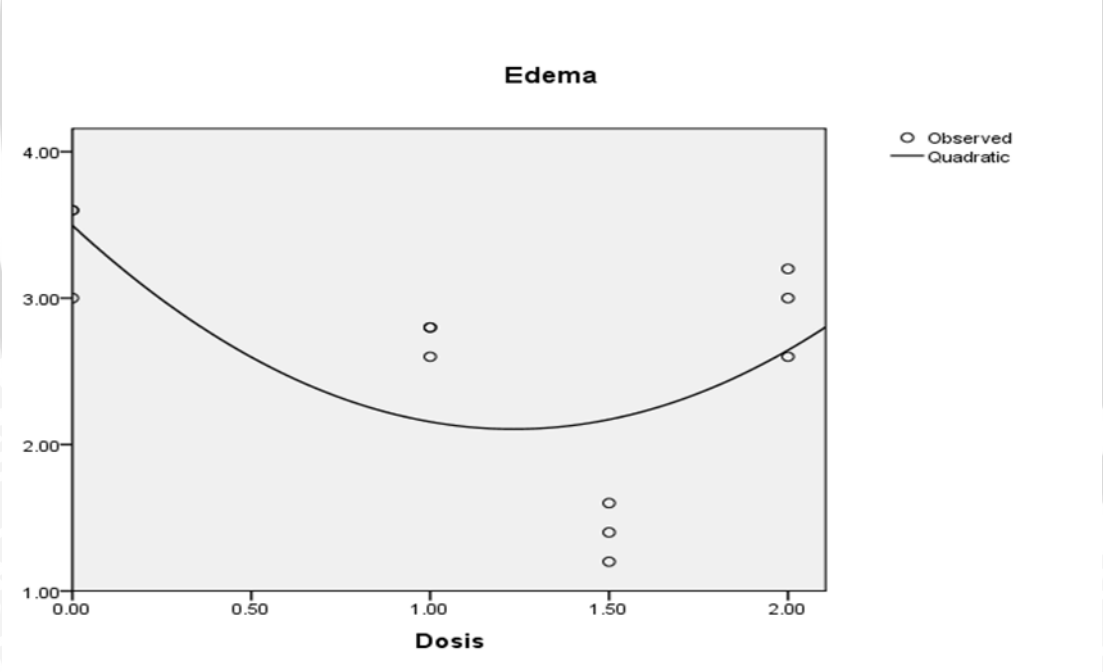
X= 1,233

$Y= 3,496 – 2,256\ (1,233) + 0,915\ (1,233)^2$

$Y= 3,496 – 2,782 + 1,129$

Y= 1,843

Grafik Edema Sebagai Berikut :



Lampiran 6. Data Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu (^{0}C) pada Media Pemeliharaan Selama Perlakuan

DATA DO (ppm)

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

DATA pH

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

DATA SUHU (^{0}C)

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

Lampiran 7. Data pengamatan gejala klinis pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi *Aeromonas* sp.

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

Keterangan :

K(+) = Dengan penambahan ekstrak kasar *Gracilaria* sp. tanpa bakteri.

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

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