

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TERIPANG PASIR (*Holothuria scabra*)
TERHADAP HISTOPATOLOGI LIMPA IKAN PATIN (*Pangasius sp.*) YANG
DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

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

Oleh :
DWI CAHYANI
NIM. 105080500111036



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TERIPANG PASIR (*Holothuria scabra*)
TERHADAP HISTOPATOLOGI LIMPA IKAN PATIN (*Pangasius sp.*) YANG
DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

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

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

Oleh :
DWI CAHYANI
NIM. 105080500111036



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

SKRIPSI
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TERIPANG PASIR (*Holothuria scabra*)
TERHADAP HISTOPATOLOGI LIMPA IKAN PATIN (*Pangasius sp.*) YANG
DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh :
DWI CAHYANI
NIM. 105080500111036

telah dipertahankan di depan penguji pada
tanggal dan dinyatakan telah memenuhi
syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)

NIP. 19611106 198602 2 001

Tanggal :

Dosen Penguji II

(Ir. Heny Suprastyani, MS)

NIP. 19620904 198701 2 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Maftuch, MSi)

NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)

NIP. 19630924 199803 2 002

Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

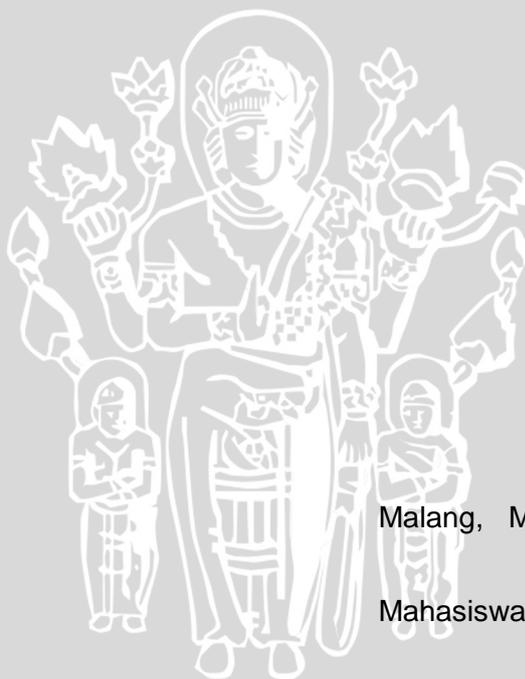
(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Malang, Maret 2015

Mahasiswa

Dwi Cahyani

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Maftuch, MSi selaku dosen pembimbing I dan Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing II yang dengan sabar membimbing penulis dalam menyelesaikan laporan ini. Berbagai koreksi dan motivasi yang diberikan memberikan banyak manfaat dalam kelengkapan laporan ini. Semoga berbagai hal baik yang telah diberikan beliau dibalas dengan kebaikan yang lebih sempurna oleh Allah SWT.
2. Keluarga yang telah memberikan segala dukungan, kepada Ayah (Tumirin), ibu (Wiwin Pujianti), kakak (Eko Nur Cahyo), dan adik (Rohmat Bayu Triono).
3. Tim Holothurian: Soni A., Erika N.M., Sofyan Hadi, Tegar W.P., Panjang U., A. Rizky Akbar dan Whinda I. yang telah banyak dukungan, bantuan, motivasi dalam penelitian ini.
4. Teman – teman kos yang sudah seperti saudara telah memberikan banyak dukungan dan kesabaran untuk membantu penulis, terimakasih Ika, Wulan, Rinta, dan Bunny bersaudara
5. Keluarga Besar Budidaya Perairan Brawijaya khususnya *Hooligans Family* (angkatan 2010) dan adik maupun kakak tingkat yang telah memberi dukungan dan semangat.
6. Semua pihak yang telah membantu penulis hingga terselesainya laporan hasil skripsi.

Malang, Maret 2015

Penulis

RINGKASAN

Dwi Cahyani. Pengaruh Pemberian Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Terhadap Histopatologi Limpa Ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diinfeksi *A. Hydrophila*. (di bawah bimbingan Dr. Ir. Maftuch, MSi dan Ir. Ellana Sanoesi, MP).

Ikan patin (*Pangasius* sp.) merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Berdasarkan data produksi perikanan budidaya, produksi ikan patin pada tahun 2005 mencapai 32.575 ton dan terus mengalami peningkatan hingga pada tahun 2007 sebesar 36.260 ton. Tingginya padat tebar dan pakan yang digunakan menjadi pendorong bagi timbulnya penyakit akibat menurunnya kualitas air karena timbunan bahan organik dari sisa pakan maupun ekskresi ikan. Budidaya ikan ini sangat potensial akan tetapi masih terkendala dengan rentannya penyakit terutama oleh bakteri dan pertumbuhannya relatif agak lambat. Tingkat penyerangan bakteri *A. Hydrophila* pada pembenihan ikan air tawar dapat dihitung dalam beberapa jam. Salah satu alternatif pencegahan dari efek penyakit yang menyerang ikan yaitu dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan (sistem imun). Teripang jenis *Holothuria* sp. Dapat digunakan sebagai imunostimulan karena mengandung komponen senyawa yang berperan dalam penanggulangan penyakit ikan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teripang pasir (*H.scabra*) yang berbeda terhadap histologi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius* sp) yang diinfeksi bakteri *A. Hydrophila* dan mengetahui berapakah dosis optimal ekstrak teripang pasir (*H scabra*) yang dapat meningkatkan respon imun non spesifik pada ikan patin (*Pangasius* sp.) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada Januari sampai April 2014.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah pemanfaatan ekstrak kasar teripang pasir *H scabra* dengan dosis 0 ppm sebagai kontrol (K), 50 ppm (A), 100 ppm (B), dan 150 ppm (C). Parameter utama yang diamati yaitu histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius* sp.) yang terinfeksi bakteri *A. Hydrophila* serta parameter penunjang adalah gejala klinis dan kualitas air yang meliputi: suhu ($^{\circ}\text{C}$), oksigen terlarut (DO) dan derajat keasaman (pH).

Pemberian ekstrak teripang pasir (*H.scabra*) meningkatkan respon imun non spesifik pada ikan patin (*Pangasius* sp.). Pemberian ekstrak kasar teripang pasir (*H. scabra*) pada 100 ppm (perlakuan B) merupakan dosis optimal sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan respon imun sehingga menurunkan nilai kerusakan jaringan pada limpa. Parameter gejala klinis yang dialami ikan patin (*Pangasius* sp.) paling parah ke ringan berturut-turut yaitu perlakuan K(0 ppm, C (150 ppm), A (50 ppm), dan B (100 ppm). Parameter kualitas air selama penelitian berada pada kisaran DO 5 – 6,9; ph 7 – 17; dan suhu 25,5 – 26,6 $^{\circ}$ C. Parameter kualitas air dalam kisaran optimal untuk pemeliharaan.

Pemberian imunostimulan ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) dengan dosis yang berbeda, berpengaruh sangat nyata terhadap histopatologi jaringan limpa ikan patin (*H. scabra*). Disarankan dilakukan pemberian ekstrak dengan konsentrasi 100 ppm.

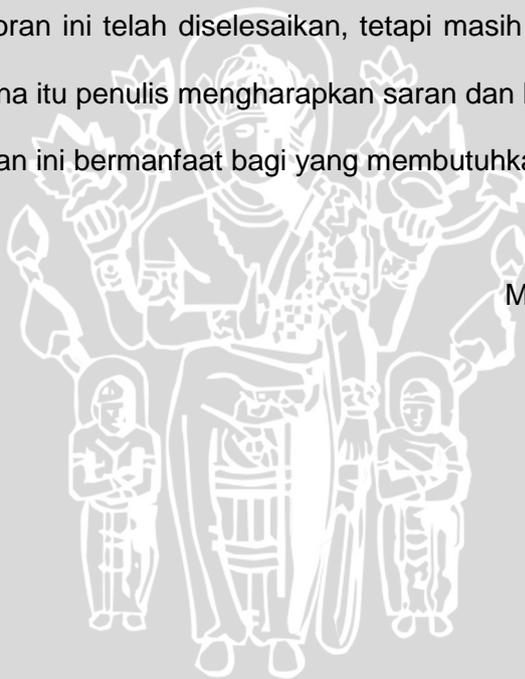
KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan laporan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Teripang Pasir (*H. Scabra*) Terhadap histopatologi Limpa ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diinfeksi *A. Hydrophila*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun laporan ini telah diselesaikan, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Maret 2015

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
DAFTAR ISTILAH.....	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1qq Latar Belakang	1
1.2qq Rumusan Masalah	3
1.3qq Tujuan	4
1.4qq Hipotesis	4
1.5qq Tempat dan Waktu.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1qq Teripang Pasis (<i>H. scabra</i>).....	5
2.1.1qq Klasifikasi dan Morfologi Teripang Pasis (<i>H. scabra</i>).....	5
2.1.2qq Habitat.....	6
2.1.3qq Manfaat dan Kegunaan	6
2.1.4qq Bahan Aktif Ekstrak Teripang Pasis (<i>H. scabra</i>).....	7
2.2qq Ekstrak Teripang Pasis (<i>H. scabra</i>).....	7
2.2.1 Ekstraksi.....	7
2.2.2 Senyawa dalam Ekstrak Teripang Pasis (<i>H. scabra</i>).....	7
2.3 Biologi Ikan Patin (<i>Pangasius sp.</i>).....	8
2.3.1qq Klasifikasi dan Morfologi.....	8
2.3.2 qq Habitat dan Daerah Penyebaran.....	9
2.3.3 Makanan dan Kebiasaan Makan.....	10
2.4 Bakteri <i>A. hydrophila</i>.....	11
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	11
2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan <i>A. hydrophila</i>	12
2.4.3 Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	12
2.5 Mekanisme Pertahanan Tubuh Ikan.....	13
2.5.1 Pertahanan Non-Spesifik.....	13
2.5.2 Pertahanan Spesifik.....	14
2.6 Imunostimulan.....	14

2.6.1	Metode Pemberian Imunostimulan.....	14
2.6.2	Mekanisme Kerja Imunostimulan.....	16
2.7	Pengamatan Histopatologi.....	16
2.8	Kerusakan Jaringan pada Limpa.....	19
2.9	Kualitas Air.....	19
2.8.1	Suhu.....	19
2.8.2	pH.....	20
2.8.3	Oksigen Terlarut.....	20
III.	MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1	Materi Penelitian.....	22
3.1.1	Alat-Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	22
3.1.2	Bahan Penelitian yang Digunakan dalam Penelitian.....	23
3.2	Metode Penelitian.....	24
3.3	Rancangan Penelitian.....	25
3.4	Prosedur Penelitian.....	26
3.4.1	Persiapan Penelitian.....	26
3.4.2	Pelaksanaan penelitian.....	28
3.5	Parameter Uji.....	31
3.5.1	Parameter Utama.....	31
3.5.2	Parameter Penunjang.....	31
3.6	Analisis Data.....	31
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Hasil Histologi Limpa.....	34
4.1.1	Gambaran Histologi Limpa Ikan Normal.....	34
4.1.2	Gambaran Histopatologi Limpa Perlakuan.....	35
4.2	Kerusakan Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius sp.</i>).....	36
4.2.1	Nekrosis.....	37
4.2.2	Kongesti.....	40
4.2.3	Hemoragi.....	44
4.3	Pengamatan Gejala Klinis Ikan.....	48
4.4	Pengamatan Kualitas Air.....	50
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan.....	52
5.2	Saran.....	52
	DAFTAR PUSTAKA.....	53

LAMPIRAN.....	56
DAFTAR ISTILAH.....	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Teripang Pasir (<i>H. Scabra</i>).....	6
2. Morfologi Ikan Patin (<i>Pangasius sp.</i>).....	9
3. Bakteri <i>A. hydrophila</i>	11
4. Denah Penelitian.....	26
5. Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zig Zag).....	32
6. Histologi Limpa Normal dan Limpa yang Terinfeksi Bakteri	34
7. Histopatologi Limpa Perlakuan.....	35
8. Grafik Hubungan antara Pemberian Imunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Limpa Ikan Patin Selama Penelitian.....	39
9. Grafik Hubungan antara Pemberian Imunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Kongesti selama Penelitian	43
10. Grafik Hubungan antara Pemberian Imunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Hemoragi.....	47
11. Gejala Klinis Ikan.....	50

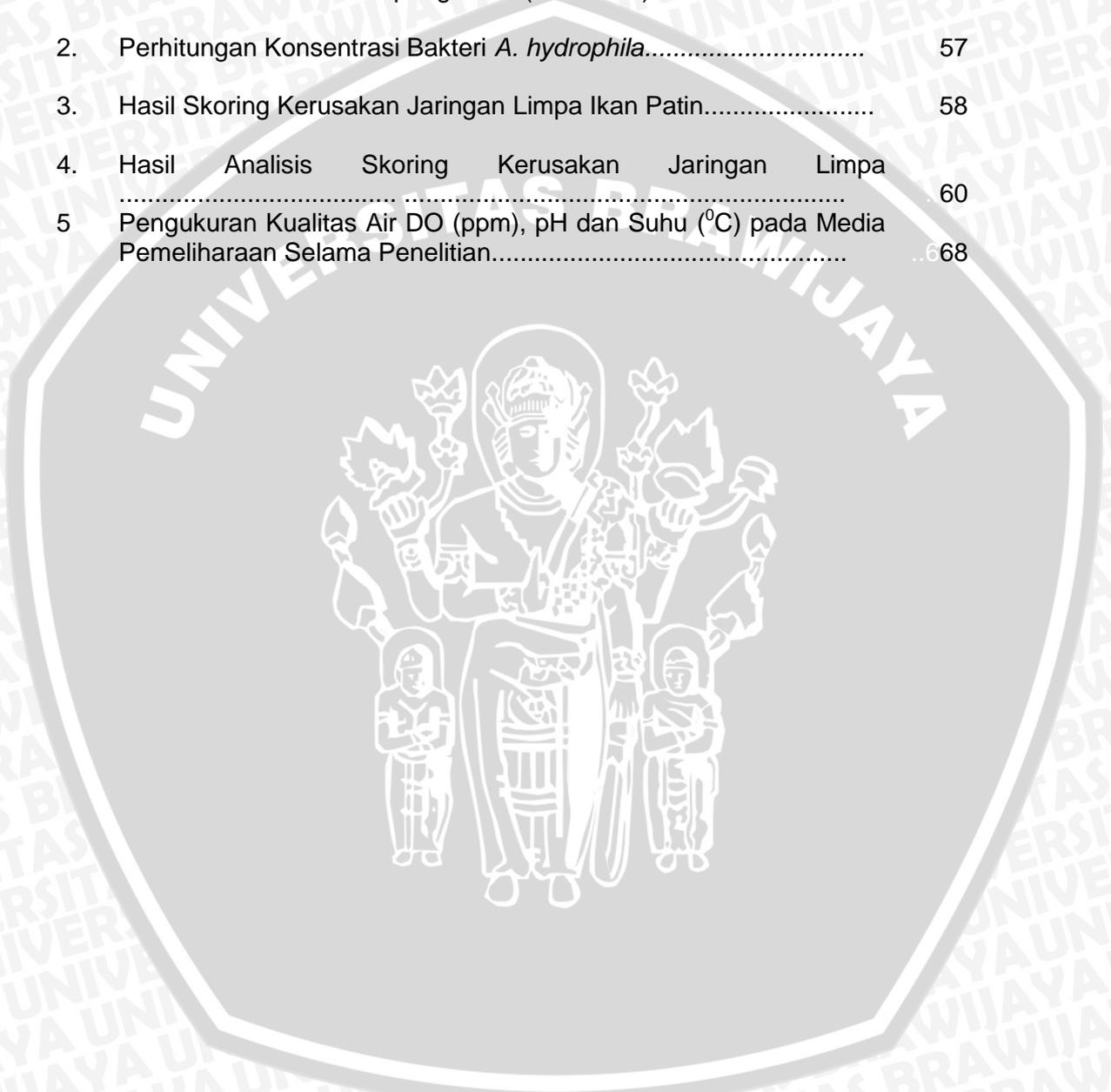


DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Alat-Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	22
2	Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....	23
3	Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	37
4	Sidik Rgam Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	38
5	Uji BNT Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	38
6	Rerata Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	41
7	Sidik Ragam Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	42
8	Uji BNT Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	42
9	Rerata Skoring Kerusakan Hemoragi pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	45
10	Sidik Ragam Skoring Kerusakan Hemoragi pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	45
11	Uji BNT Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penelitian.....	46
12	Pengamatan Gejala Klinis Ikan Uji Setelah Penginfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	49
13	Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Ekstrak Teripang Pasir (<i>H. scabra</i>).....	56
2. Perhitungan Konsentrasi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	57
3. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Limpa Ikan Patin.....	58
4. Hasil Analisis Skoring Kerusakan Jaringan Limpa	60
5. Pengukuran Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu (°C) pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian.....	68



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan laporan Kementerian Perdagangan Indonesia (2013), Indonesia adalah negara kepulauan yang terbentang sepanjang 3,977 mil di antara Samudera Hindia dan Samudera Pasifik, terdiri dari 1.922.500 km² daratan dan 3.257.483 km² lautan. Dengan demikian luas perairan Indonesia hampir tiga kali lebih luas daripada daratan. Kondisi ini tentunya menyediakan peluang ekonomi yang sangat besar bagi Indonesia melalui pemanfaatan hasil alam yang tersedia, salah satunya dari sektor perikanan. Hasil alam dari perairan yang memiliki nilai ekonomi tinggi di pasar ekspor, antara lain, ikan patin, tuna, udang dan rumput laut. Khusus ikan patin, potensi alam ini pada kenyataannya belum dieksplorasi semaksimal mungkin, baik untuk memenuhi kebutuhan konsumen domestik maupun permintaan pasar ekspor.

Menurut Minggawati dan Saptono (2011), ikan patin adalah salah satu ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan karena merupakan salah satu ikan unggul. Ikan patin merupakan ikan penting di dunia karena mengandung protein yang tinggi dan kolesterol yang rendah. Penggemar daging patin bahkan terdapat di berbagai negara melintasi benua. Selain merupakan ikan berukuran besar dan pertumbuhannya cepat, patin juga respon terhadap pakan buatan serta dapat dibudidayakan di berbagai tipe perairan dan wadah budidaya, salah satu contohnya adalah di kolam. Ikan patin termasuk kedalam kelompok *catfish* yang berukuran besar. Ikan patin adalah salah satu dari kelompok *Pangasius* yang banyak terdapat di sungai, danau dan perairan umum lainnya di Indonesia. Karena itu, pasar patin terbuka lebar. Melihat kenyataan ini maka terbuka peluang usaha untuk membudidayakan ikan patin khususnya pembesaran ikan patin. Budidaya patin dapat dijadikan alternatif komoditi air tawar untuk masa

mendatang. Sebagai ikan ekonomis, budidaya ikan patin di kolam merupakan peluang usaha yang prospektif, tidak hanya bagi pemodal besar, tetapi juga bagi masyarakat umum yang memiliki modal kecil dan lahan terbatas dan dapat menjadi salah satu pilihan usaha untuk meningkatkan pendapatan dan membuka lapangan kerja.

Penghambat dalam budidaya ikan adalah munculnya penyakit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kordi (2004), serangan penyakit yang disertai gangguan hama dapat menyebabkan pertumbuhan ikan menjadi sangat lambat (kekerdilan), padat tebar sangat rendah, lebih lama, dan ini berarti meningkatnya biaya produksi. Tahap lanjut serangan penyakit dan gangguan hama tidak hanya menyebabkan menurunnya hasil panen (produksi) tetapi juga kegagalan panen yang tentunya berdampak pada kerugian ekonomi yang cukup besar.

Sebagian besar kegiatan budidaya ikan saat ini dilakukan dengan menggunakan sistem budidaya intensif. Sistem ini dilakukan untuk memperoleh hasil produksi yang maksimal dengan luas lahan yang minimal. Kamaluddin (2011) menyatakan bahwa, sistem budidaya intensif yang menerapkan padat penebaran tinggi menyebabkan ikan lebih rentan terserang penyakit. Pemeliharaan ikan jenis *cattfish* sebagai ikan komoditas budidaya seringkali terkendala oleh penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Salah satu alternatif penanggulangan penyakit, serta peningkatan kekebalan ikan adalah menggunakan *imunostimulan*. Menurut Anderson (1992) dalam Alifuddin (2002), *imunostimulan* merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan. 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 dalam Suhermanto *et al.*, 2011).

Teripang pasir (*Holothuria scabra*) berpotensi menjadi sumber biofarma baru melalui proses pemisahan senyawa aktif atau ekstraksi. Bordbar *et al.* (2011) dalam Pranoto, Ma'ruf dan Pringgenies (2012) melaporkan, ekstrak dari *H. scabra* di Asia menunjukkan aktivitas antimikroba, antibakteri, dan antijamur.

1.2 Perumusan Masalah

Salah satu permasalahan utama pada usaha budidaya ikan patin (*Pangasius sp.*) adalah adanya serangan penyakit terhadap kesehatan ikan yang disebabkan oleh bakteri, virus maupun mikroorganisme patogen lainnya. Adapun penyakit yang sering menyerang ikan patin yaitu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Bakteri ini menjadi penyebab penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada ikan air tawar. Penyakit ini dapat mengakibatkan terjadinya kematian masal ikan sehingga merugikan bagi para pembudidaya ikan. Upaya pencegahan penyakit ini biasanya dilakukan dengan penggunaan bahan kimia. Namun, penggunaan bahan kimia tersebut dapat menimbulkan resistensi tubuh terhadap penyakit bila dikonsumsi dalam jangka waktu yang panjang. Oleh karena itu, dilakukan penelitian tentang penggunaan immunostimulan berbahan alami sebagai upaya pencegahan penyakit yang tidak menimbulkan efek negatif pada lingkungan perairan.

Menurut Stonik (1986); Tian *et al.* (2007) dalam Suhermanto *et al.* (2011), teripang jenis *Holothuria sp.* dapat digunakan sebagai alternatif untuk immunostimulan karena mengandung komponen bioaktif yang berperan dalam penanggulangan penyakit ikan. Senyawa yang terkandung dalam teripang

adalah lektin, sterol, saponin/ triperten glikosid, penelitian mengenai penggunaan total glikosida triterpen dari teripang pasir (*H. scabra*) sebagai immunostimulan pada ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) perlu dilakukan, khususnya ditinjau dari histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius sp.*).

Berdasarkan uraian di atas, ekstrak teripang pasir (*H. Scabra*) diduga dapat digunakan sebagai imunostimulan untuk ikan patin yang dapat menurunkan jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah, maka dapat dirumuskan masalah: apakah pengaruh pemberian dosis ekstrak teripang pasir (*H. Scabra*) yang berbeda terhadap histologi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.* Yang sehat dan histopatologi setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) yang berbeda terhadap histologi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang sehat dan histopatologi jaringan limpa ikan patin setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga bahwa penggunaan ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap histopatologi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) pasca infeksi.

H_1 : Diduga bahwa penggunaan ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap histopatologi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) pasca infeksi.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang pada 2 Februari sampai 27 April 2014.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teripang Pasir (*H. scabra*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Teripang Pasir (*H. scabra*)

Menurut Wibowo *et al.* (1997) dan Martoyo *et al.* (2004) dalam Aras (2013), klasifikasi teripang *H. scabra* (Gambar 1) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Echinodermata
Class	: Holothuridea
Order	: Aspidochirotida
Family	: Holothuriidae
Genus	: <i>Holothuria</i>
Species	: <i>H. scabra</i>



Gambar 1. Teripang Pasir (*H. Scabra*)(Aras, 2013)

Teripang umumnya berbentuk bulat panjang atau silindris sekitar 10-30 cm, dengan mulut pada salah satu ujungnya dan dubur pada ujung lainnya. Mulut teripang dikelilingi oleh tentakel-tentakel atau lengan peraba yang kadang bercabang-cabang. Tubuhnya berotot (dapat tipis atau tebal, lembek, atau licin), sedangkan kulitnya dapat halus dan berbintil-bintil. Warnanya bermacam-macam, ada yang hitam pekat, coklat, abu-abu, mempunyai bercak-bercak atau garis-garis pada punggung dan sisinya. Untuk melindungi diri dari musuhnya,

teripang mengeluarkan lendir yang beracun dari tubuhnya. Adapula jenis yang dapat menyempotkan getah seperti benang yang sangat lengket dari tubuhnya apabila diganggu, misalnya teripang getah (*Holothuria vacabunda*) (Kordi, 2010).

2.1.2 Habitat

Menurut Martoyo *et al.* (2007), pada umumnya teripang hidup sebagai bentik di tempat berpasir atau tempat yang agak lunak (pasir berlumpur). Teripang dapat ditemukan hampir di seluruh perairan pantai, mulai daerah pasang surut yang dangkal sampai perairan yang lebih dalam. Untuk hidupnya, teripang lebih menyukai perairan yang jernih dan airnya relatif tenang (Andari *et al.*, 1988). Hewan ini bergerak lamban di dasar perairan yang gelap, di bawah batu, di sela-sela lamun dan karang atau menguburkan diri di dalam pasir.

Teripang umumnya hidup berasosiasi dengan ekosistem terumbu karang dan lamun pada zona intertidal sampai kedalaman 20 m dengan dasar berpasir halus dengantanaman pelindung seperti lamun, terlindung dari hempasan ombak, dan perairan yang kaya akan detritus. Di Indonesia, hewan ini banyak tersebar di daerah Riau, Lampung, Sulawesi, Nusa Tenggara Barat dan Timur, Maluku, dan Papua (Azis 1997 dalam Hana, 2011).

2.1.3 Manfaat dan Kegunaan

Salah satu biota laut yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai bahan baku obat-obatan adalah teripang. Menurut Matranga (2005) teripang sudah ratusan tahun digunakan sebagai obat - obatan di Cina yang diyakini mampu menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Efek penyembuhan tersebut mungkin disebabkan senyawa bioaktif yang terdapat pada tubuh teripang seperti saponin (*triterpen glikosida*) (Dyck *et al.*, 2010 dalam Albuntana *et al.*, 2011).

Bahan bioaktif di dalam teripang juga dikenal sebagai antioksidan yang membantu mengurangi kerusakan sel dan jaringan tubuh. Kandungan anti bakteri dan anti fungi teripang meningkatkan kemampuannya untuk tujuan perawatan kulit. Teripang juga diketahui mempunyai efek antinosiseptif (penahan sakit) dan anti-inflamasi (melawan radang dan mengurangi pembengkakan) (Wibowo *et al.*, 1997 dalam Kustiariyah, 2006).

2.1.4 Bahan Aktif Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*)

Berdasarkan hasil penelitian Rasyid (2012), mengenai senyawa metabolit sekunder dan uji aktivitas antibakteri dan antioksidan ekstrak methanol teripang dihasilkan bahwa golongan metabolit sekunder ekstrak metanol teripang yaitu steroid dan saponin/glikosida triterpen.

Menurut Himaya *et al.*, (2010), dalam Suhermanto *et al.*, (2011), teripang jenis *Holothuria* sp. Dapat digunakan sebagai imunostimulan karena mengandung komponen yang berperan dalam penanggulangan penyakit ikan. Senyawa di dalam teripang antara lain lektin, sterol, saponin/triterpen glikosid, mineral, pelifenol, flavonoid, dan total phenol.

2.2 Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*)

2.2.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penarikan kandungan senyawa kimia dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dengan menggunakan alat yang sesuai (Febriansyah, 2009).

2.2.2 Senyawa dalam Ekstrak Teripang Pasir

Menurut Zhang *et al.* (2006) dalam Aras (2013) senyawa metabolit yang dominan dihasilkan teripang berupa saponin. Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks yang kerangka dasarnya berhubungan dengan struktur

gugus glukosa dan triterpenoid. Apabila senyawa tersebut dihidrolisis akan menghasilkan suatu senyawa triterpenoid dan glikosida (gula).

Glikosida saponin adalah glikosida yang aglikonnya berupa sapogenin. Glikosida saponin bisa berupa saponin steroid atau saponin triterpenoid. Saponin tersebar luas antara tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaan saponin sangat mudah ditandai dengan pembentukan larutan koloidal dengan air yang apabila direbus menimbulkan buih yang stabil (Gunawan, 2004).

2.3 Biologi Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Ikan Patin (*Pangasius sp.*) merupakan spesies ikan air tawar dari jenis Pangasidae yang memiliki ciri-ciri umum tidak bersisik, tidak memiliki banyak duri, kecepatan tumbuhnya relatif cepat, fekunditas dan sintasannya tinggi. Bleeker (1846) mengklasifikasikan ikan patin sebagai berikut :

Domain : Eukaryota
 Kingdom : Animalia
 Subkingdom : Bilateria
 Phylum : Chordata
 Subphylum : Vertebrata
 Infraphylum : Gnathostomata
 Superclass : Osteichthyes
 Class : Osteichthyes
 Subclass : Actinopterygii
 Order : Siluriformes
 Family : Pangasiidae
 Genus : *Pangasius*
 Scientific name : *Pangasius sp.*

Menurut Hadinata (2009) Tubuh ikan patin secara morfologi dapat dibedakan yaitu bagian kepala dan badan. Bagian kepala terdiri dari : Rasio panjang standar/panjang kepala 4,12 cm, Kepala relatif panjang, melebar ke arah punggung, Mata berukuran sedang pada sisi kepala, Lubang hidung relatif membesar, Mulut subterminal relatif kecil dan melebar ke samping, Gigi tajam dan sungut mencapai belakang mata, dan Jarak antara ujung moncong dengan tepi mata lebih panjang. Sedangkan bagian badan terdiri dari : Rasio panjang standar/tinggi badan 3.0 cm, Tubuh relatif memanjang, Warna punggung kebiru-biruan, pucat pada bagian perut dan sirip transparan, Perut lebih lebar dibandingkan panjang kepala, dan Jarak sirip perut ke ujung moncong relatif panjang. Gambar ikan patin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi Ikan Patin (*Pangasius sp.*)(Hardinata, 2009)

2.3.2 Habitat dan Daerah Penyebaran Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Menurut Ramadhan *et al.* (2010), ikan patin merupakan ikan air tawar yang hidup bebas di sungai. Ikan ini ditemukan disungai-sungai besar dan beberapa anak sungainya. Ikan ini hidup secara bergerombolan menyukai bagian perairan sungai yang berair tenang. Ikan ini mampu hidup di perairan yang miskin oksigen. Larva ikan patin dapat hidup di air dengan salinitas 5 ppt, tetapi menjelang dewasa akan mencari perairan tawar sampai masuk jauh ke sungai-sungai di pedalaman.

Menurut Khairuman dan Amri (2011), di habitat aslinya, ikan ini selalu bersembunyi di dalam lubang-lubang. Sebagai ikan nokturnal (aktif pada malam hari), patin baru keluar dari liang persembunyiannya ketika hari mulai gelap. Kebiasaan lain, ikan ini lebih banyak menetap di dasar perairan daripada muncul di permukaan air. Karena itu, ikan patin digolongkan sebagai ikan dasar perairan (demersal). Hal ini dapat dibuktikan dari bentuk mulutnya yang melebar, seperti mulut ikan-ikan demersal pada umumnya.

Menurut Ciptanto (2010), ikan patin hidup di sungai-sungai besar di Sumatera (Way Rarem, Musi, Batanghari, dan Indragiri), Jawa (Brantas dan Bengawan Solo) dan Kalimantan (Kayan, Berau, Mahakam, Barito, Kahayan, dan Kapuas). Selain di sungai-sungai besar, patin juga terdapat di waduk-waduk.

2.3.3 Makanan dan Kebiasaan Makan Ikan Patin (*Pangasius* sp.)

Menurut Ramadhan *et al.* (2010), ikan patin termasuk ke dalam kelompok ikan pemakan segala (omnivore), tetapi ada pula yang menyebutkan bahwa ikan ini cenderung menjadi karnivora (pemakan daging). Hal tersebut terlihat dari kebiasaannya memakan ikan-ikan kecil. Ketika masih kecil, ikan ini menyukai plankton serta tumbuhan air. Namun setelah dewasa, selain pakan yang disebutkan tadi, ikan ini juga memangsa hewan seperti ikan kecil, udang kecil, atau serangga air. Apabila dibudidayakan dikolam, ikan patin dapat diberi pakan alami dan pakan tambahan berupa pakan buatan seperti pellet. Kualitas dan kuantitas pakan sangat penting dalam budidaya ikan patin, karena hanya dengan pakan yang baik ikan dapat tumbuh dan berkembang sesuai dengan yang diinginkan. Pakan yang baik adalah pakan yang mempunyai gizi seimbang, baik protein, karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral.

Ikan patin mempunyai sifat yang termasuk omnivora atau golongan ikan pemakan segala. Malam hari ia akan keluar dari lubangnya dan mencari makanan renek yang terdiri atas cacing, serangga, udang sungai, jenis-jenis siput

dan biji–bijian. Dari sifat makannya ikan ini juga tergolong ikan yang sangat rakus karena jumlah makannya yang besar. Sedangkan untuk larva ikan patin yang dipelihara pada kolam – kolam maupun akuarium dapat diberikan makanan alami seperti artemia untuk memenuhi kebutuhan hidupnya (Maswira, 2009 dalam Yuliarti, 2011).

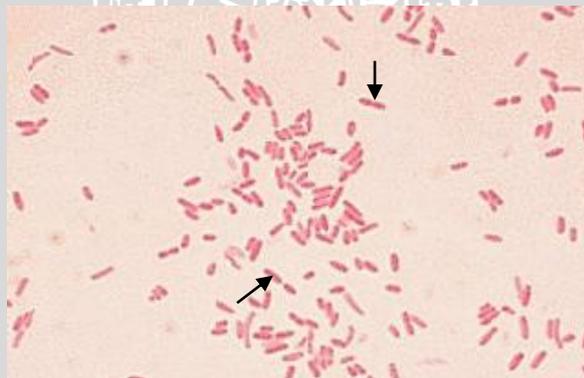
2.4 Bakteri *A. hydrophila*

2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri *A. hydrophila*

Menurut Janda dan Sharon (2010) dalam Sari (2013), klasifikasi bakteri

A. hydrophila adalah sebagai berikut :

Filum	: Protobacteria
Klas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Aeromonadales
Family	: Aeromonadaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>A. hydrophila</i>



Gambar 3. Bakteri *A. hydrophila* (tanda panah)(Anonymous 2012).

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0-1,5 μm dan lebar 15,7-15,8 μm , termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu polar flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakultatif anaerobik dan merupakan bakteri penyebab penyakit *Haemorrhagic*

septicaemia yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C (Kabata, 1985 dalam Samsundari, 2006). Bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 4.

2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan *A. Hydrophila*

A. hydrophila termasuk kelompok bakteri gram negatif yang tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38°C-41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0°C-50°C dengan kisaran pH 5,5-9 (Arifianto dan Liviawaty, 1992). Sutjiati (2004), menambahkan bahwa bakteri *A. hydrophila* biasanya muncul pada musim kemarau karena pada saat tersebut kandungan bahan organik di perairan relatif tinggi. Bakteri *A. hydrophila* berperan dalam penguraian bahan organik sehingga sering ditemukan di perairan yang subur. Kandungan oksigen yang rendah, suhu yang tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan dan padat tebar ikan yang tinggi sangat menunjang perkembangbiakan bakteri ini.

2.4.3 Infeksi Bakteri *A. Hydrophila*

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

A. hydrophila sebelum melakukan infeksi, terlebih dahulu melakukan penempelan menggunakan flagel ke dalam *host cell*. Faktor virulen dalam mikroba beradaptasi dalam sel host/inang dan memantapkan keberadaannya. Umumnya *A. hydrophila* menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh ikan disertai dengan pendarahan pada organ dalam. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat

pada padat penebaran tinggi dan dapat mengakibatkan kematian benih sampai 90 % (Shome dan Shome, 1999).

2.5 Mekanisme Pertahanan Tubuh Ikan

2.5.1 Pertahanan Non-Spesifik

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

Respon imun ikan terdiri dari respon seluler dan respon humoral. Respon seluler bersifat non-spesifik sedangkan respon humoral bersifat spesifik. Aktivitas respon imunitas tersebut dapat distimulasi oleh imunostimulator. Respon imunitas dibentuk oleh jaringan limfoid yang menyatu dengan myeloid yang dikenal dengan jaringan limfomyeloid pada ikan. Organ limfomyeloid pada ikan teleostei adalah limpa, hati dan ginjal depan. Produk jaringan limfomyeloid adalah sel-sel darah dan respon imunitas baik seluler maupun humoral. Interleukin, interferon, dan sitokin tersebut berperan sebagai komunikator dan amplikasi dalam mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan. Oleh sebab itu, mekanisme pertahanan tubuh yang sinergis antara pertahanan humoral dan

seluler ditandai dengan adanya interleukin, interferon dan sitokin (Aliffudin, 2002).

2.5.2 Pertahanan Spesifik

Sistem imun spesifik (*adaptive immunity*) merupakan mekanisme interaksi antara sel limfosit dan fagosit. Respon spesifik ini diawali dengan aktifitas sel-sel fagosit atau *antigen presenting cells* (APC) yang memproses dan mempresentasikan potongan-potongan antigen pada sel-sel imun spesifik. Sel limfosit merupakan inti dalam respon imun spesifik karena sel-sel ini merupakan sel yang mengenal berbagai antigen, baik antigen yang terdapat intraselular maupun ekstraselular (dalam cairan tubuh ataupun dalam darah) (Kresno, 2001 dalam Maswan, 2009).

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

2.6 Immunostimulan

2.6.1 Metode Pemberian Immunostimulan

Imunostimulasi merupakan cara untuk memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut (Baratawidjaja, 2006 dalam Jasmanidar, 2009). Menurut Trevesbrown (2000) dalam Jasmanidar (2009), immunostimulan merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi patogen. Penggunaan immunostimulan dilakukan pada budidaya ikan karena kemoterapi yang diberikan pada ikan menyebabkan resistensi pada bakteri tertentu. Immunostimulan dapat meningkatkan daya tahan

terhadap penyakit infeksi, bukan karena dapat meningkatnya respon imun spesifik tapi oleh karena meningkatnya mekanisme pertahanan non spesifik dari organisme tersebut.

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

Dugger dan Jory (1999) dalam Jasmanidar (2009), menyatakan bahwa pemberian immunostimulan secara luas dengan maksud untuk mengaktifkan sistem imun non-spesifik sel seperti makrofag pada vertebrata dan *hemocyte* pada avertebrata. Pemberian immunostimulan dapat dilakukan dengan :

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

2.6.2 Mekanisme Kerja Immunostimulan

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. Pertahanan non spesifik terhadap antigen ini disebut paramunitas, dan zat berhubungan dengan penginduksi disebut paraimunitas. Induktor semacam ini biasanya tidak atau sedikit sekali kerja antigennya, akan tetapi sebagian besar bekerja sebagai mitogen yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel tujuan adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B, karena induktor paramunitas ini bekerja menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Mitogen ini dapat bekerja langsung maupun tak langsung (misalnya melalui sistem komplemen atau limfosit, melalui produksi interferon atau enzim lisosomal) untuk meningkatkan fagositosis mikro dan makro. Mekanisme pertahanan spesifik maupun non spesifik umumnya saling berpengaruh (Alifuddin, 2002)

Sistem imun aktif jika ada bahan asing (antigen) beredar di dalam tubuh setelah masuk dinding sel. Hal ini terjadi disebabkan pertahanan pertama tubuh tidak mampu menetralsir agen infeksi sehingga agen infeksi tersebut masuk dan beredar melalui peredaran darah keseluruh tubuh. Pertahanan pertama yang bertanggung jawab terhadap serangan agen infeksi adalah sel imun non spesifik (*innate immunity*) seperti sel monosit, makrofag, neutrofil, basofil, polimorfonuklear, sel dendrit, sel langerhan dan sel mast. Jika sel-sel tersebut tidak mampu menetralsir agen infeksi maka selanjutnya terjadilah penginfeksian dan kemudian sistem pertahanan kedua muncul yang dikenal *adaptive immune responses*. Pertahanan kedua aktif setelah terjadi komunikasi diantara sel imun yang didahului adanya sekresi sitokin dan ekspresi peptida antigen ke permukaan sel imun nonspesifik yang dikenal dengan *antigen precenting*

cells (APC) dan selanjutnya akan mengaktifkan sel B dan sel T. (Jorgensen, 1993 dalam Jasmanidar, 2009).

2.7 Pengamatan Histopatologi

Martinez and Marina (2007) dalam Setyowati, Dewi, Awik dan Nurlita (2012), menyatakan analisa histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ 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.

Menurut Humason (1967) dalam Ersu (2008), spesimen organ (insang) yang telah ada, dipotong dengan ukuran 1x1 cm dengan ketebalan 2-3 mm dan diletakkan dalam *tissue cassette*. Langkah-langkahnya yaitu:

- a. Organ yang telah dipotong direndam ke dalam larutan fiksasi Buffer Netral Formalin (BNF) 10%, minimal selama 24 jam.
- b. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi, yaitu proses untuk menarik air dari jaringan dengan merendam organ hasil fiksasi ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95% dan alkohol absolut 100%. Perendaman organ hasil fiksasi pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 2 jam.
- c. Tahap selanjutnya adalah clearing, yaitu proses yang dilakukan dengan cara merendam organ hasil dehidrasi pada larutan xylol.
- d. Setelah dilakukan proses clearing, maka dilakukan infiltrasi, yaitu proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan organ. Parafin yang digunakan adalah berplastik yang memiliki titik lebur 58°C. Proses infiltrasi dilakukan

dengan dua tahap, yaitu tahap parafinisasi 1 dan parafinisasi 2, masing-masing tahapan dilakukan selama dua jam agar pori-pori jaringan organ terisi parafin dengan sempurna.

- e. Embedding (*blocking*) merupakan proses penanaman spesimen organ ke dalam parafin yang dicetak menjadi blok-blok parafin dalam wadah khusus berupa *tissue cassette*/block besi. Parafin yang digunakan sama dengan parafin yang digunakan dalam proses infiltrasi.
- f. Setelah parafin menjadi blok-blok, maka selanjutnya dilakukan pemotongan spesimen berparafin menggunakan *Rotary Mikrotom Spencer, USA*. Spesimen dipotong dengan ketebalan 4-5 μm yang nantinya akan berupa “pita-pita” jaringan yang saling bersambungan.
- g. Potongan-potongan tersebut diletakkan di atas penangas air dengan suhu 37°C. Sediaan potongan-potongan jaringan, dipilih yang terbaik dan diletakkan pada gelas objek yang telah ditetesi perekat putih telur. Kemudian disimpan di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 56°C untuk mencairkan parafin yang melekat pada jaringan dan melekatkan jaringan pada gelas objek secara sempurna.
- h. Preparat yang telah difiksasi pada gelas objek diwarnai dengan Haematoxyllin dan Eosin. Awalnya preparat dimasukkan kedalam xylo 1 dan xylo 2 selama dua menit untuk melarutkan parafin yang masih melekat pada gelas objek. Untuk hidrasi diperlukan larutan alkohol absolut 100% selama dua menit, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing selama satu menit.
- i. Kemudian cuci dalam air kran selama satu menit, dimasukkan ke dalam pewarna Mayer's Haematoxyllin selama 10 menit, cuci lagi dalam air kran selama 30 detik, dimasukkan ke dalam Lithium carbonat selama 15-30 detik, dan cuci dalam air kran selama dua menit. Setelah itu preparat dimasukkan ke dalam larutan pewarna Eosin selama 2-3 menit, kemudian cuci dalam air

kran selama 30-60 detik untuk menghilangkan Eosin yang masih tertinggal. Setelah pewarnaan, preparat dimasukkan ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut 1 sebanyak 10 celupan serta alkohol absolut 2 selama dua menit.

- j. Setelah tahap pewarnaan selesai, maka dilakukan perekatan (*mounting*) menggunakan zat perekat permount dengan entelan, kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Selanjutnya sediaan preparat siap diamati.

2.8 Kerusakan Jaringan pada Limpa

a. Nekrosis

Nekrosis merupakan kematian sel yang bersifat *Irrevesibel*. Nekrosis memiliki ciri-ciri yaitu: *piknosis* (inti *hiperkromatik* dan mengecil), *karyotheksis* (inti pecah pecah), dan *karyolisis* (inti hilang). nekrosis juga hampir mirip dengan *autolisis posmortum*. Ciri-ciri lain jaringan yang mengalami nekrosis adalah tampak ada sel hidup di sekitar sel yang mati, masih terlihat adanya eritrosit dan adanya zona radang di sekitar sel yang mati. Nekrosis dapat disebabkan karena tidak cukup darah mengalir ke jaringan, baik karena cedera maupaun terkena bahan kimia (Darmawan, 2012).

b. Kongesti

Kongesti ditandai dengan sel berwarna lebih merah dan berukuran lebih lebar dibandingkan dengan sel normal. Hal ini terjadi akibat adanya pendarahan yang terjadi dalam pembuluh darah sehingga fungsi kapiler darah menjadi terganggu. Menurut Kurniasih (1999), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit.

c. Hemoragi

Menurut Asniatih *et al.*, (2013), hemoragi adalah keadaan keluarnya darah dari kardiovaskular. Hemoragi dapat disebabkan oleh trauma atau meningkatnya porositas yang disebabkan oleh bakteri, virus, atau toksin. Bercak merah lebar pada jaringan menunjukkan terjadinya pendarahan hingga keluar dari pembuluh.

2.9 Kualitas Air

2.9.1 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). Pola temperatur ekosistem air dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti intensitas cahaya matahari, pertukaran panas antara air dengan udara sekelilingnya, ketinggian geografis dan juga oleh faktor kanopi (penutup oleh vegetari) dari pepohonan yang tumbuh sel tepi (Brehm dan Melfering, 1990, dalam Barus, 2010).

Faktor-faktor yang mempengaruhi suhu antara lain musim, ketinggian permukaan laut (altitude), waktu dalam hari, sirkulasi udara, penutup awan dan aliran serta kedalaman badan air. Pengaruh suhu juga dirasakan oleh organisme akuatik. Organisme akuatik mempunyai kisaran suhu tertentu (batas atas atau bawah) yang disukai bagi pertumbuhannya (Effendi, 2003).

2.9.2 pH

Derajat keasaman lebih dikenal dengan istilah pH (singkatan dari *pulscane negative de H*), yaitu logaritma dari kepekatan ion-ion H (hidrogen) yang terlepas dalam satu cairan. Derajat keasaman atau pH air menunjukkan aktifitas ion hydrogen dalam larutan tersebut dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hydrogen (dalam nol per liter) pada suhu tertentu atau dapat ditulis $\text{pH} = -\log(\text{H}^+)$ (Kordi dan Tanjung, 2007).

Sementara keasaman air untuk reproduksi atau perkembangbiakan biasanya akan baik pada pH 6,4 – 7,0 sesuai jenis ikan oleh karena itu dalam pemeliharaan ikan sebaiknya kondisi air dijaga agar berada pada kisaran nilai tersebut (Lesmana. 2001).

2.9.3 Oksigen Terlarut

Oksigen adalah salah satu jenis gas yang larut di dalam air dengan jumlah yang sangat banyak, yaitu menempati urutan kedua setelah nitrogen. Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas sehingga apabila ketersediaannya di dalam air tidak mencukupi kehidupan biota budidaya, maka segala aktivitas biota akan terhambat. Biota air membutuhkan oksigen seperti aktivitas berenang, pertumbuhan, reproduksi dan sebaliknya (Kordi dan Tanjung, 2007).

Oksigen terlarut dapat berasal dari proses fotosintesis tumbuhan air dan dari proses fotosintesis tumbuhan air dan dari udara yang masuk ke dalam air. Konsentrasi DO dalam air tergantung pada suhu dan tekanan udara. Pada suhu 20°C tekanan udara satu atmosfer konsentrasi DO dalam keadaan jenuh 9,2 ppm dan pada suhu 50° C (tekanan udara sama) konsentrasi DO adalah 5,6 ppm (Manik, 2003).

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat – Alat yang digunakan dalam Penelitian

Berikut peralatan beserta fungsinya yang akan digunakan pada penelitian terdapat pada Tabel 1:

Tabel 1. Alat-Alat yang digunakan dalam Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Baskom	Sebagai tempat bahan
2.	Nampan	Sebagai tempat alat dan bahan
3.	Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
4.	Pisau	Sebagai alat pemotong bahan
5.	Timbangan digital	Sebagai alat penimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2}
6.	Hot plate	Sebagai alat pemanas
7.	Beaker glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
8.	Gelas ukur	Sebagai alat pengukur jumlah larutan tertentu
9.	Rotary evaporator vacuum	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak
10.	Akuarium	Sebagai wadah air media
11.	Aerator	Sebagai alat bantu aerasi
12.	Batu aerasi	Sebagai alat bantu aerasi
13.	Selang aerator	Sebagai alat bantu aerasi
14.	Blower	Sebagai alat penghasil oksigen
15.	Scoop net	Sebagai alat untuk memindahkan ikan uji
16.	Termometer	Sebagai alat untuk mengukur suhu
17.	pH-meter	Sebagai alat untuk mengukur pH air media
18.	DO-meter	Sebagai alat pengukur kandungan oksigen terlarut
19.	Spektrofotometer	Sebagai alat pengukur panjang gelombang bahan
20.	Sectio set	Sebagai alat untuk membedah ikan
21.	Fotomikroskop	Sebagai alat untuk pengamatan jaringan
22.	Botol	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
23.	Labu Erlenmeyer	Sebagai tempat pembiakan bakteri
24.	Botol Akuades	Sebagai tempat akuades
25.	Cawan Petri	Sebagai tempat agar dan bakteri
26.	Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
27.	Autoclave	Sebagai alat sterilisasi
29.	Loyang	Sebagai tempat bahan dalam proses waterbath
30.	Bunsen	Sebagai alat sterilisasi
31.	Magnetik Stirer	Untuk menghomogenkan larutan
32.	Tabung Reaksi	Sebagai tempat kultur bakteri
33.	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
34.	Jarum Ose	Sebagai alat penggoresan bakteri
35.	Spatula	Untuk menghomogenkan larutan

Tabel 1. (Lanjutan)

36.	Lemari Pendingin	Untuk menyimpan bakteri pada suhu rendah
37.	Vortex mixer	Untuk menghomogenkan larutan
38.	Pipet Volume	Untuk mengambil larutan dalam jumlah banyak
39.	Mikropipet	Untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit
40.	Bola Hisap	Sebagai alat bantu untuk mengambil larutan
41.	Triangle	Sebagai penyangga pada bunsen
42.	Mistar	Untuk mengukur zona hambat bakteri

3.1.2 Bahan-Bahan yang digunakan dalam Penelitian

Berikut bahan beserta fungsinya yang akan digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan-Bahan yang digunakan dalam Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1.	Ekstrak glikosida triterpen <i>H. scabra</i>	Sebagai bahan immunostimulan
2.	Biakan Murni Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	Sebagai bahan penginfeksi
3.	Spirtus	Sebagai bahan pembakaran pada bunsen
4.	Kertas cakram	Bahan zona hambat
5.	Alkohol	Sebagai bahan sterilisasi
6.	Etanol 80%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
7.	Etanol 90%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
8.	Aseton	Sebagai bahan pengawet jaringan limpa (proses <i>dehidrasi</i>)
9.	Xylol	Sebagai bahan pengawet jaringan limpa (proses <i>cleaning</i>)
10.	Formalin 10%	Sebagai bahan pengawet jaringan limpa
11.	Akuades	Sebagai pelarut
12.	Es batu	Sebagai pendingin dalam proses rotary
13.	Kertas Label	Sebagai penanda
14.	Kertas Koran	Sebagai pembungkus dalam sterilisasi
15.	Kertas Saring	Untuk menyaring bahan ekstrak
16.	Tissue	Sebagai bahan pembersih
17.	Kapas	Untuk menutup labu erlemeyer
18.	Hematoksilin eosin	Sebagai bahan pewarna pada jaringan limpa
19.	Benang	Sebagai pengikat
20.	Parafin cair	Sebagai bahan pengawet jaringan limpa (proses <i>impregnasi</i>)
21.	Parafin blok	Sebagai bahan pengawet jaringan limpa (proses <i>embedding</i>)
22.	Masker	Sebagai penutup mulut
23.	Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan
24.	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	Sebagai media kultur bakteri (cair)
25.	TSA (<i>Trypton Soya Agar</i>)	Sebagai bahan media tumbuh bakteri

Tabel 2. (Lanjutan)

26.	Litium karbonat	Sebagai bahan untuk memekatkan warna pigmen
27.	NA (<i>Nutrient Agar</i>)	Sebagai bahan peremajaan bakteri
28.	Entellan	Sebagai bahan perekat sampel pada <i>cover glass</i>
29.	Ikan patin (<i>Pangasius</i> sp.)	Sebagai hewan uji
30.	Air tawar	Sebagai media hidup hewan uji
31.	Pakan Ikan	Sebagai nutrisi ikan uji
32.	Chlorin	Untuk bahan diisfektan pada akuarium
33.	Na-Thiosulfat	Untuk menghilangkan toksik pada akuarium

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.

Metode penelitian dalam menganalisa histopatologi limpa ikan patin menggunakan metode deskriptif yaitu menurut Hartoto (2009), penelitian deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasi objek sesuai dengan apa adanya. Penggunaan metode deskriptif, penelitian memungkinkan untuk melakukan hubungan antar variabel, menguji hipotesis, mengembangkan generalisasi, dan mengembangkan teori yang memiliki validitas universal. Selain itu, penelitian deskriptif juga merupakan penelitian, 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 menyelidik 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) untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang *seragam* atau *homogen*, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena lingkungan homogen maka lingkungan atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut (Sastrosupadi, 2000) :

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

Keterangan:

Y_{ij} : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

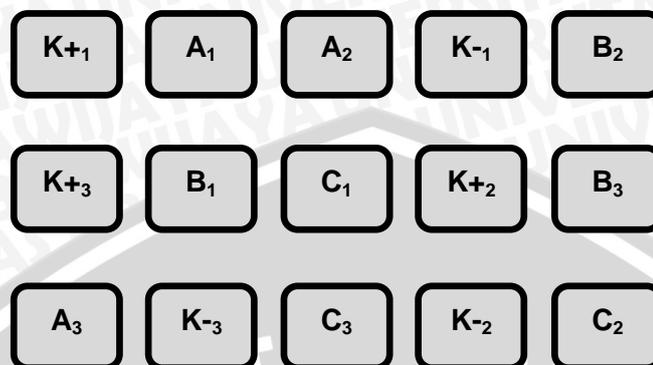
T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh ghalat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Pada penelitian ini, sebagai perlakuan menggunakan Ikan patin (*Pangasius sp.*) dengan ukuran 10-12 cm sedangkan untuk bahan ekstrak yang digunakan yaitu teripang pasir (*H. scabra*) berasal dari Kecamatan Soca, Kabupaten Sampang. Variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak *H. scabra* dengan dosis 50 ppm, 100ppm, dan 150 ppm sebagai immunostimulan.

Untuk mempermudah dalam menganalisa diperlukan kontrol-kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol positif perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri tanpa pemberian ekstrak *H. scabra* sedangkan kontrol negatif yaitu ikan sehat tanpa perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 15 sampel. Denah penelitian disajikan pada Gambar 5 berikut ini.



Gambar 4. Denah Penelitian

Keterangan:

K(+)₁ : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa pemberian ekstrak teripang.

K(-)₁ : Akuarium dengan perlakuan ikan tanpa diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan tanpa pemberian ekstrak teripang.

A₁ : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak teripang 50 ppm.

B₁ : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak teripang 100 ppm.

C₁ : Akuarium dengan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak teripang 150 ppm.

1,2,3 : ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian yang akan dilakukan meliputi ekstraksi senyawa glikosida triterpen *H. scabra*, pengukuran kadar ekstrak glikosida triterpen *H.*

scabra, pembiakan bakteri *A. hydrophila*, persiapan alat dan persiapan hewan uji.

a. Ekstraksi teripang pasir *H. scabra*

Bahan teripang pasir (*H. scabra*) dalam keadaan basah disiapkan. Dibersihkan dan dipisahkan bagian dalam teripang pasir dari kotoran yang menempel. Dipotong kecil-kecil. Dimasukkan bahan 1 kg ke dalam masing-masing botol volume 2,5 liter. Ditambahkan pelarut metanol 1 liter dengan perbandingan bahan dengan pelarut yaitu 1:1. Didiamkan selama 48 jam dengan jeda waktu 4 jam dilakukan pengocokan dan 12 jam sekali dilakukan pergantian pelarut. Filtrat disaring dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam wadah yang lain. Filtrar yang di dapat diuapkan menggunakan Rotary Vacuum Evaporator (Suhu 40°C dan kecepatan 90 rpm) untuk memisahkan pelarut dengan bioaktif. Ekstrak teripang yang telah diuapkan dilakukan proses partisi bertingkat dengan menggunakan n butanol. Partisi dilakukan secara bertahap mulai dari pelarut metanol hingga cloroform dalam corong pisah yang didiamkan selama 24 jam hingga terbentuk beberapa fase.

b. Uji Kualitatif (Reaksi Warna) Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*)

Larutan DPPH 0.004% (b/v) sebanyak 4,0 ml ditambahkan larutan uji sebanyak 2,0 ml untuk tiap konsentrasi. Jika hasilnya positif, warna larutan akan berubah menjadi pink atau merah jambu.

c. Pembiakan bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dengan kepadatan 10^{10} sel/ml sebanyak 1000 ml. Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan patin yaitu dengan kepadatan 10^8 sel/ml (Selvaraj *et al.*, 2009 dalam Samad, 2010), sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dapat dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Dimana :

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

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

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

d. Persiapan alat dan hewan uji

Persiapan akuarium (ukuran 30x30x30 cm) dan alat pendukung (erasi, termometer, timbangan, seser dan lain-lain). Akuarium diisi air sebanyak 10 liter lalu dipasang aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut. Hewan uji yang digunakan yaitu Ikan patin (*Pangasius* sp.) sebanyak 10 ekor untuk masing-masing akuarium. Masing-masing akuarium diberi 10 ekor ikan patin

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Perlakuan Pemberian Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*)

Ikan patin (*Pangasius* sp.) diadaptasikan (aklimatisasi) selama 1 minggu. Media (air) sebelum digunakan telah di *treatment* terlebih dahulu dengan pemberian 2 ml chlorin dalam masing-masing akuarium (volume air 10 liter), selama 1 hari sebagai disinfektan dan membersihkan akuarium dari bakteri dan kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian diberikan 2 ml Na-thiosulfat untuk menghilangkan toksik dari efek perlakuan chlorin selama 1 hari. Langkah selanjutnya, akuarium dibersihkan menggunakan air bersih dan didiamkan selama 1 hari, akuarium siap untuk digunakan. Setelah dilakukan *treatment*, masing-masing akuarium diisi air sebanyak 10 liter (2/3 volume akuarium) dan diberi aerasi. Kemudian dilakukan pemberian ekstrak *H. scabra* dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 50 ppm, 100 ppm dan 150 ppm selama 10 jam.

b. Penginfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Penginfeksi dilakukan maksimal 24 jam setelah perendaman ekstrak yang kedua. Penginfeksi menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman pada akuarium yang berbeda selama 24 jami dengan kepadatan bakteri 10^8 sel/ml. Bakteri yang tersedia diencerkan dengan menggunakan air media pemeliharaan. Dari hasil perhitungan pengenceran bakteri, dapat diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan untuk penginfeksi sebanyak 0,1 liter dan air tawar sebanyak 9,9 liter. Selanjutnya, 10 ekor ikan patin dimasukkan dalam akuarium dan direndam selama 24 jam sampai ikan menunjukkan gejala-gejala terserang *A. hydrophila* (warna tubuh pucat, berenang tidak seimbang dan sering ke permukaan). Kemudian setelah diinfeksi, ikan diamati gejala klinis selama 7 hari.

c. Pembuatan Histopatologi Limpa Ikan patin

Setelah masa adaptasi selesai, ikan diambil sampel Limpa untuk diamati histopatologinya. Sampel limpa dimasukkan ke dalam botol film dan diberi bahan pengawet yaitu formalin 10%, dilanjutkan dengan pembuatan preparat untuk histopatologi dan pengamatan preparat hasil histopatologi. Tahapan pembuatan histopatologi pada jaringan limpa adalah sebagai berikut:

- Tahap Fiksasi

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

- Tahap Dehidrasi

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

2 jam, alkohol 96% selama 2 jam, alkohol absolute 1 selama 2 jam dan alkohol absolute 2 selama 2 jam.

- **Tahap Clearing**

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

- **Tahap Impregnasi**

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

- **Tahap Embedding (pengeblokan)**

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

- **Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE**

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

- **Tahap Mounting**

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

tua oleh Haematoksilin yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah gejala klinis dan kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal 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.

Hasil uji histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan limpa ikan patin yang telah diberi imunostimulan, dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif menurut Kakkilaya (2002) yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala kemudian turun ke bawah dan bergeser ke arah ekor kembali (gerak zig zag) yang dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zig Zag)

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 kongesti, fusi, dan nekrosis. Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut KIM (2006) dalam Raza'i (2008) dengan rumus:

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

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

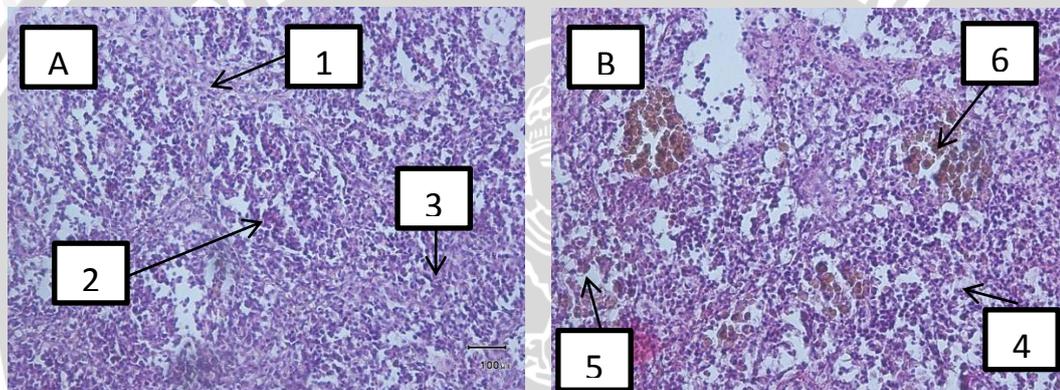


4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Analisis Histologi Limpa

4.1.1 Gambaran Histologi Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Normal

Berdasarkan dari hasil pengamatan selama penelitian, menunjukkan gambaran jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) normal (tanpa immunostimulan ekstrak *H. scabra* dan tanpa diinfeksi bakteri) dan ikan patin (*Pangasius sp.*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa immunostimulan ekstrak *H. scabra* ditunjukkan pada Gambar 6.



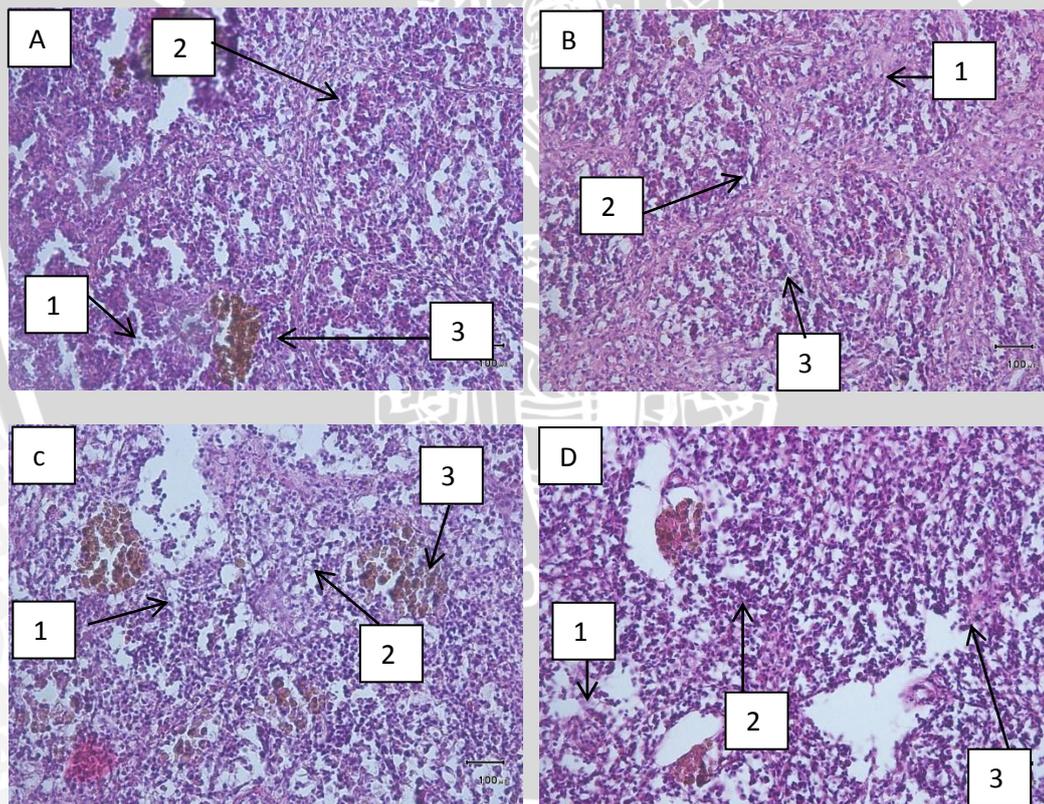
Gambar 6. Histologi Limpa Normal (A) dan Limpa yang Terinfeksi Bakteri (B). Tanda Panah No. 1. Trabekula; 2. Pulpa Merah; 3. Pulpa Putih; 4. Nekrosis; 5. Kongesti; 6. Hemoragi. Mikroskop Cahaya Perbesaran 100x

Penampang dari jaringan limpa normal (A) memiliki susunan dan bagian yang masih terlihat tidak terdapat kerusakan nekrosis, kongesti, dan hemoragi. Kerusakan nekrosis ditunjukkan dengan adanya kematian sel yang ditandai dengan sel berwarna lebih pucat dari sel disekitarnya. Kongesti ditunjukkan dengan adanya pembengkakan sel. Hemoragi ditunjukkan dengan adanya keluarnya darah dari kardiovaskuler. Pada limpa yang telah terinfeksi bakteri (B) terlihat jelas terdapat kerusakan seperti nekrosis, hemoragi, dan kongesti. Struktur dari *trabekula* (perpanjangan kapsula dalam parenkim limpa) terlihat memiliki serat halus pembuluh. *Trabekula* yang mengandung arteri, vena, saraf,

dan parenkim limpa. Parenkim limpa biasa disebut dengan pulpa yang terdiri dari pulpa merah dan pulpa putih. Secara histologis, pada jaringan limpa biasa terjadi kesulitan dalam membedakan antara hemoragi dan kongesti dari kondisi fisiologis limpa karena limpa memiliki banyak eritrosit

4.1.2 Gambaran Histopatologi Limpa Perlakuan

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian, diperoleh hasil bahwa gambaran jaringan limpa pada perlakuan pemberian immunostimulan ekstrak teripang pasir (*H. Scabra*) 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 150 ppm mengalami kerusakan jaringan yang yaitu nekrosis, kongesti, dan hemoragi dengan tingkat kerusakan yang berbeda, ditunjukkan pada gambar Gambar 7.



Gambar 7. Histopatologi Limpa, (A) Ikan dengan Immunostimulan Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*) 50 ppm, (B) Ikan dengan Immunostimulan Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*) 100 ppm, (C) Ikan dengan Immunostimulan Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*) 150 ppm, (D) Ikan dengan Immunostimulan Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*) 0 ppm. Tanda Panah No. 1. Nekrosis; 2. Kongesti; 3. Hemoragi. Mikroskop Cahaya Perbesaran 100 kali

Pemberian ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) dengan konsentrasi yang berbeda sebagai imunostimulan pada ikan patin memiliki pengaruh terhadap perbedaan tingkat kerusakan jaringan limpa ikan. Hal ini dapat diketahui dari hasil nilai skoring kerusakan jaringan limpa. Pada perlakuan A (Gambar 8A) terlihat adanya kongesti yang ditandai dengan warna parenkim limpa yang kemerahan dan ukurannya melebar. susunan tidak teratur dan kerusakan nekrosis terjadi hampir di seluruh bagian penampang jaringan limpa. Hal ini terlihat dari banyaknya sel yang mengalami kematian dan adanya lubang-lubang pada jaringan limpa. Menurut Ersa (2008), nekrosis dapat disebabkan oleh trauma, agen-agen biologis (virus, bakteri, jamur dan parasit), agen-agen kimia atau terjadinya gangguan terhadap penyediaan darah pada suatu daerah khusus. Nekrosis pencairan adalah jenis nekrosis yang paling umum terjadi pada ikan. Enzim-enzim di dalam sel akan menghancurkan sel dan jika hal ini terjadi pada epitelium atau otot ikan, maka jaringan yang nekrosa akan terkelupas.

Pada perlakuan B (Gambar 8B) trubekula dan parenkim limpa memiliki susunan yang teratur, meskipun masih terdapat sedikit kerusakan nekrosis, kongesti, dan hemoragi. Pada perlakuan C (Gambar 8C) menunjukkan tingkat struktur jaringan limpa menjadi terlihat jelas yang menunjukkan bahwa perlakuan C mengalami kerusakan. Susunan antara trubekula dan parenkim limpa terlihat pudar. Sedangkan pada perlakuan K+ (Gambar 8D) menunjukkan tingkat kerusakan yang sangat berat. Hal ini dapat dilihat dari jaringan memiliki banyak lubang, warna pudar, dan struktur antara bagian jaringan tidak terlihat.

4.2 Kerusakan Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius* sp.)

Analisa data kerusakan jaringan limpa berdasarkan pengamatan nilai skoring dengan metode semi kuantitatif selama penelitian adalah sebagai berikut:

4.2.1 Nekrosis

Hasil perhitungan rerata skoring kerusakan nekrosis pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) dengan perlakuan konsentrasi ekstrak (A) 50 ppm, (B) 100 ppm, (C) 150 ppm, dan (K) 0 ppm, disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
50 ppm (A)	2,4	2,4	2,8	7,6	2,5
100 ppm (B)	2,4	1,8	2,0	6,2	2,0
150 ppm (C)	3,2	3,0	2,8	9,0	3,0
Kontrol positif (K+)	3,6	3,8	3,8	11,2	3,7
Kontrol negatif (K-)	1,0	1,0	1,2	3,2	1,1

Berdasarkan hasil rata-rata skoring kerusakan nekrosis jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*), nilai skoring tertinggi pada perlakuan K(+) yaitu 3,7. Perlakuan mulai dari tinggi ke rendah selanjutnya secara berturut-turut adalah perlakuan C (150 ppm) dengan skor 3; A (50 ppm) dengan skor 2,5; perlakuan B (100 ppm) dengan skor 2; dan yang terendah perlakuan K(-) dengan nilai 1,1. Nilai skor 3 pada jaringan dikategorikan mengalami kerusakan cukup parah, karena kerusakan yang dialami 26-50 %, yaitu pada perlakuan K(+) dan C (150 ppm). Sedangkan nilai skor 2 pada jaringan dikategorikan mengalami kerusakan sedang, karena kerusakan yang dialami 6-25 % yaitu pada perlakuan A (50 ppm) dan B (100 ppm). Nilai skor 1 pada jaringan dikategorikan mengalami kerusakan ringan karena kerusakan yang dialami hanya 0-5%.

Berdasarkan Tabel 3, dilakukan uji sidik ragam. Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *H. scabra* terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan limpa.. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan nekrosis pada jaringan limpa disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	4,55	1,51	30,31**	4,07	7,59
acak	8	0,4	0,05			
total	11	4,95				

Keterangan: * berbeda sangat nyata (**)

Perhitungan analisis sidik ragam (Tabel 4.) menunjukkan bahwa nilai F hitung lebih besar daripada F tabel 5% dan F tabel 1 %, yang artinya adalah berbeda sangat nyata. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian immunostimulan ekstrak *H. scabra* berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan nekrosis pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh yang diberikan oleh masing-masing perlakuan, dilanjutkan dengan BNT. Hasil penghitungan uji BNT nilai skoring kerusakan nekrosis pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji BNT Skoring Kerusakan Nekrosis pada Jaringan limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Rata-rata Perlakuan		B (100 ppm)	A (50 ppm)	C (150 ppm)	K (0 ppm)	Notasi
		2,06	2,53	3,00	3,73	
B (100 ppm)	2,06	-	-	-	-	a
A (50 ppm)	2,53	0,46*	-	-	-	b
C (150 ppm)	3,00	0,93**	0,46*	-	-	c
K (0 ppm)	3,73	1,66**	1,20**	0,73*	-	d

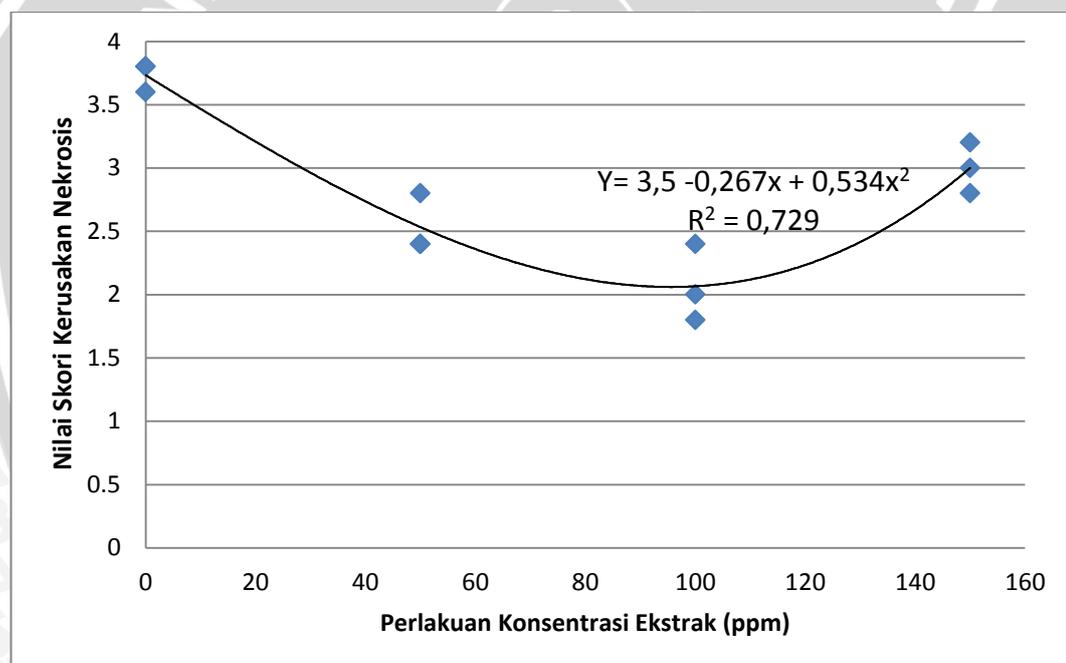
Keterangan : * berbeda nyata

** berbeda sangat nyata

Tabel 5 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis berupa notasi a, b, c, dan d. Hal ini berarti menunjukkan antar perlakuan B (100 ppm), A (50 ppm), C (150 ppm), dan K+ (0 ppm) berbeda sangat nyata. Kerusakan nekrosis pada jaringan limpa yang paling

parah pada perlakuan K+, diikuti dengan B(150 ppm), A(50 ppm), dan kerusakan paling rendah B(100ppm). Menurut Darmawan (2012), kerusakan jaringan nekrosis atau kematian sel dapat terjadi karena kurangnya aliran darah ke jaringan baik karena cedera maupun bahan kimia. Dalam hal ini, bahan kimia pada ekstrak teripang pasir dapat menyebabkan kerusakan parah jika konsentrasinya terlalu tinggi.

Hasil perhitungan uji BNT, menunjukkan hasil yang berbeda nyata, sehingga dilanjutkan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui respon pemberian ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) terhadap histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius* sp.) yang dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik Hubungan antara Pemberian Imunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Nekrosis Limpa Ikan Patin Selama Penelitian

Grafik Gambar 8 menunjukkan bahwa perlakuan B(100 ppm) mengalami kerusakan yang paling rendah, yaitu pada kisaran nilai skor 2. Kerusakan terparah dialami pada perlakuan K+ yaitu pada kisaran nilai skor diatas 3. Semakin kecil nilai skor yang diperoleh, maka semakin baik hasil yang didapat.

Grafik pada Gambar 8 menunjukkan bahwa, antara dosis ekstrak teripang pasir yang diberikan berpengaruh nyata pada kerusakan nekrosis histologi limpa yang ditunjukkan dengan R^2 yaitu 0,729. Sehingga persamaan yang didapat $Y = 3,5 - 0,267x + 0,0534x^2$ yang membentuk grafik model kuadratik. Perbedaan nilai skor histopatologi limpa dapat disebabkan karena dosis ekstrak yang diberikan berbeda. Pemberian ekstrak yang paling baik untuk memperkecil kerusakan nekrosis pada limpa adalah pada perlakuan B (100 ppm). Berdasarkan data diatas, menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak teripang pasir dengan konsentrasi minimal komponen/senyawa aktif pada ekstrak tidak mampu mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh bakteri. Sebaliknya, jika konsentrasi ekstrak teripang pasir yang diberikan terlalu tinggi, maka dapat bersifat racun, yang dapat memperparah terjadinya kerusakan jaringan. Pemberian konsentrasi ekstrak teripang pasir yang optimal diperlukan untuk membantu meningkatkan respon imun ikan patin untuk mengantisipasi serangan benda asing lainnya (bakteri *A. hydrophila*). Himaya *et al.*, (2010), dalam Suhermanto *et al.*, (2011) menyatakan bahwa komponen dalam teripang pasir dapat berperan dalam penanggulangan penyakit ikan. Tetapi, dosis yang digunakan jika terlalu sedikit tidak dapat banyak membantu, tetapi jika dosis terlalu tinggi dapat bersifat racun yang justru akan merusak organ atau jaringan ikan, sehingga harus diberikan pada dosis optimal.

4.1.2 Kongesti

Hasil perhitungan rerata skoring kerusakan kongesti pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius* sp.) dengan perlakuan konsentrasi ekstrak (A) 50 ppm, (B) 100 ppm, (C) 150 ppm, dan (K) 0 ppm, disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Rerata Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
50 ppm (A)	3	3,2	2,8	9	3
100 ppm (B)	1,6	1,2	1,6	4,4	1,4
150 ppm (C)	3,6	3,4	3,2	10,2	3,4
Kontrol positif (K+)	3,8	3,6	3,8	11,2	3,7
Kontrol negatif (K-)	1,4	1,0	1,4	3,8	1,2

Berdasarkan hasil rata-rata skoring kerusakan kongesti jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*), kerusakan terparah pada perlakuan K(+) dengan nilai skor 3,7. Perlakuan mulai dari tinggi ke rendah selanjutnya secara berturut-turut adalah perlakuan C (150 ppm) dengan skor 3,4; A (50 ppm) dengan skor 3; perlakuan B (100 ppm) dengan skor 1,4; dan yang terendah perlakuan K(-) dengan nilai 1,2. . Kerusakan kongesti yang parah ditandai dengan sel berwarna lebih merah dan berukuran lebih lebar dibandingkan dengan sel normal. Hal ini terjadi akibat adanya pendarahan yang terjadi dalam pembuluh darah sehingga mengganggu fungsi kapiler darah. Menurut Lukostyowati dan Kurniasih (2011), kongesti adalah kenaikan jumlah darah di dalam pembuluh darah, yang secara mikroskopik terlihat bahwa kapiler darah tampak melebar terisi eritrosit. Kongesti yang terlalu parah dapat berdampak kerusakan yang lebih parah yaitu terjadinya hemoragi.

Berdasarkan Tabel 6, dilakukan uji sidik ragam. Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *H. scabra* terhadap kerusakan kongesti pada jaringan limpa. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan kongesti pada jaringan limpa disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	9,02	3,00	82,06**	4,07	7,59
acak	8	0,29	0,03			
total	11	9,32				

Keterangan: ** berbeda sangat nyata

Tabel 7 menunjukkan bahwa nilai F hitung lebih besar daripada nilai F tabel 5% dan F tabel 1 % yang artinya sangat berbeda nyata, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian immunostimulan ekstrak *H. scabra* berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan kongesti pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

Adapun untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, digunakan Uji BNT. Hasil penghitungan uji BNT skoring kerusakan kongesti pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Uji BNT Skoring Kerusakan Kongesti pada Jaringan limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Rata-rata Perlakuan	B (100 ppm)	A (50 ppm)	C (150 ppm)	K (0 ppm)	Notasi
	1,46	3,00	3,40	3,73	
B (100 ppm)	1,46	-	-	-	a
A (50 ppm)	3,00	1,53**	-	-	b
C (150 ppm)	3,40	1,93**	0,40*	-	c
K (0 ppm)	3,73	2,26**	0,73**	0,33ns	cd

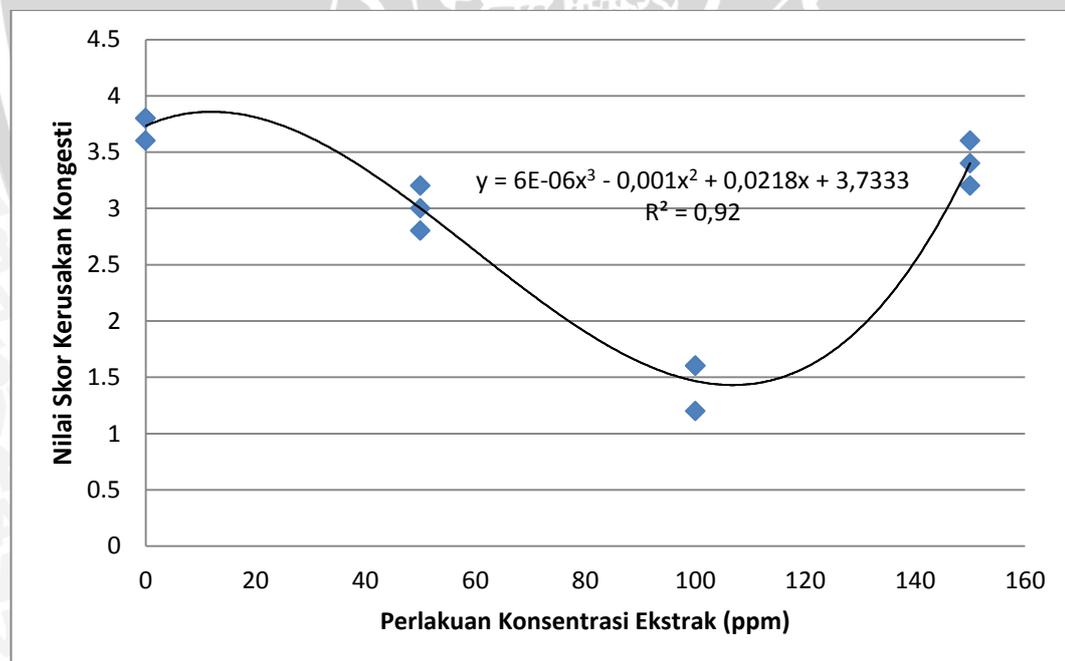
Keterangan: * berbeda nyata

** berbeda sangat nyata

Tabel 8 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami kongesti berupa notasi a, b, c dan cd. Hal ini berarti perlakuan B (100 ppm) dengan berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (50 ppm), C (150 ppm)

dan K+ (0 ppm). Perlakuan A (50 ppm) berbeda nyata dengan perlakuan C (150 ppm) dan perlakuan K+ (0 ppm). Perlakuan C (150 ppm) berbeda nyata terhadap perlakuan B dan A, tetapi berbeda nyata terhadap perlakuan K+. Kerusakan kongesti pada jaringan limpa yang paling parah berada pada perlakuan K+, diikuti dengan 150 ppm dan 50 ppm serta rerata kerusakan terendah dengan kerusakan teringan pada dosis 100 ppm. Pemberian immunostimulan pada ikan sebaiknya tidak terlalu tinggi dan juga tidak terlalu rendah. Menurut Jawetz *et al.*, (1996) dalam Sukmaningtyas (2012) bahwa dosis immunostimulan yang terlalu kecil menyebabkan pengaruh dalam sistem imun kecil. Sedangkan jika terlalu tinggi juga dapat berubah menjadi toksin.

Hasil perhitungan uji BNT, menunjukkan hasil yang berbeda nyata, sehingga dilanjutkan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui respon pemberian ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) terhadap histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Hubungan antara Pemberian Immunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Kongesti Limpa Ikan Patin Selama Penelitian

Gambar 9 menunjukkan bahwa perlakuan B(100 ppm) mengalami kerusakan yang paling rendah, yaitu pada kisaran nilai skor dibawah 2. Kerusakan terparah dialami pada perlakuan K+ yaitu pada kisaran nilai skor diatas 3. Semakin kecil nilai skor yang diperoleh, maka semakin baik hasil yang didapat. Grafik pada Gambar 9 menunjukkan bahwa, antara dosis ekstrak teripang pasir yang diberikan berpengaruh nyata pada kerusakan kongesti histologi limpa yang ditunjukkan dengan R^2 mendekati 1, yaitu 0,92. Sehingga persamaan yang didapat $Y = 3,733 - 0,0218x + 0,001x^2 + 0,000006 x^3$ yang membentuk grafik model kubik. Perbedaan nilai skor histopatologi limpa disebabkan karena dosis ekstrak yang diberikan berbeda. Pemberian ekstrak yang paling baik untuk memperkecil kerusakan kongesti pada limpa adalah perlakuan B (100 ppm).

Kerusakan kongesti pada suatu jaringan ditandai dengan pembengkakan sel. Sel berisi darah lebih banyak, sebagai respon salah satu respon imun. Pemberian suatu zat yang sifat dasarnya beracun dapat membantu memberikan respon imun jika diberikan pada dosis yang tepat. Menurut Sukmaningtyas (2012), organisme memiliki sifat dasar memberikan respon imun untuk melindungi dirinya jika dalam keadaan bahaya. Jika organisme diberikan zat asing ke dalam tubuhnya, maka akan direspon dengan berbagai cara sesuatu fungsi organ atau jaringan. Meskipun pada awalnya mengalami penurunan fungsi, jika direspon oleh tubuh dengan baik, dapat membantu memberikan kecepatan respon ketika datang benda asing yang lainnya.

4.1.3 Hemoragi

Hasil perhitungan rerata skoring kerusakan kongesti pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) dengan perlakuan konsentrasi ekstrak (A) 50 ppm, (B) 100 ppm, (C) 150 ppm, dan (K) 0 ppm, disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Rerata Skoring Kerusakan Hemoragi pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
50 ppm (A)	2,8	2,6	2,6	8	2,6
100 ppm (B)	1,4	1,8	1,4	4,6	1,5
150 ppm (C)	3	3,2	3	9,2	3,0
Kontrol positif (K+)	3,4	3,2	3,4	10	3,3
Kontrol negatif (K-)	1,2	1,4	1	3,6	1,2

Berdasarkan hasil rata-rata skoring kerusakan hemoragi jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*), kerusakan terparah pada perlakuan K(+) dengan nilai skor 3,3. Perlakuan mulai dari tinggi ke rendah selanjutnya secara berturut-turut adalah perlakuan C (150 ppm) dengan skor 3; A (50 ppm) dengan skor 2,6; perlakuan B (100 ppm) dengan skor 1,5; dan yang terendah perlakuan K(-) dengan nilai 1,2. . Kerusakan hemoragi adalah kelanjutan dari kongesti, dimana darah terjadi penumpukan darah pada sel sehingga sel menjadi pecah, selain itu darah dapat keluar dari pembuluhnya.

Berdasarkan Tabel 9, dilakukan uji sidik ragam. Sidik ragam digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *H. scabra* terhadap kerusakan hemoragi pada jaringan limpa. Hasil uji sidik ragam skoring kerusakan hemoragi pada jaringan limpa disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Sidik Ragam Skoring Kerusakan Hemoragi pada Jaringan limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	5,66	1,88	80,90**	4,07	7,59
Acak	8	0,18	0,02			
Total	11	5,85				

Keterangan: ** berbeda sangat nyata

Tabel 10 menunjukkan bahwa nilai F hitung lebih besar daripada nilai F tabel 5 % dan F tabel 1 %. sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian immunostimulan ekstrak *H. scabra* berpengaruh sangat nyata terhadap kerusakan hemoragi pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Mudjiutami *et al.*, (2007), menyatakan bahwa immunostimulan adalah suatu zat yang termasuk dalam pencegahan, mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Penggunaan immunostimulan pada budidaya ikan merupakan sesuatu yang baru bagi kesehatan ikan dan pencegahan penyakit.

Adapun untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan, digunakan Uji BNT. Hasil penghitungan BNT skoring kerusakan hemoragi pada jaringan limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Uji BNT Skoring Kerusakan Hemoragi pada Jaringan Limpa Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Selama Penelitian

Rata-rata Perlakuan	B (100 ppm)	A (50 ppm)	C (150 ppm)	K (0 ppm)	Notasi
	1,53	2,66	3,06	3,33	
B (100 ppm)	1,53	-	-	-	a
A (50 ppm)	2,67	1,13**	-	-	b
C (150 ppm)	3,06	1,53**	0,40*	-	c
K (0 ppm)	3,33	1,80**	0,66**	0,26 ^{ns}	cd

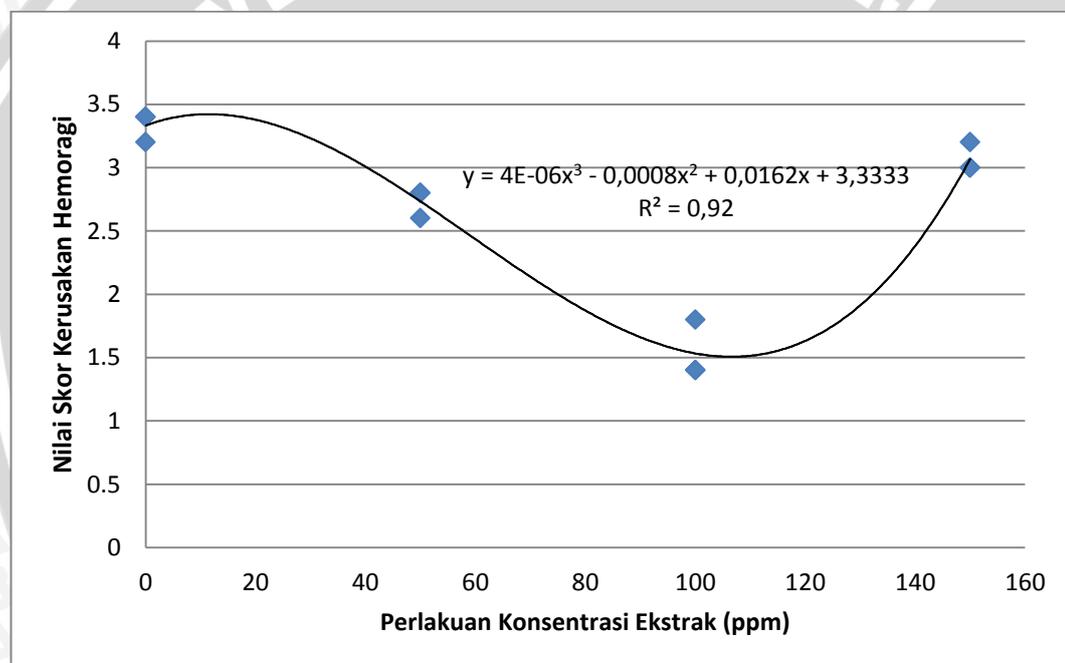
Keterangan : * berbeda nyata

** Berbeda sangat nyata

Tabel 11 menunjukkan hasil notasi dari kerusakan jaringan yang mengalami nekrosis berupa notasi a, b, c, dan bc. Hal ini berarti perlakuan B (100 ppm) berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (50 ppm), C (150 ppm) dan K+ (tanpa immunostimulan ekstrak *H. scabra*). Sedangkan perlakuan C(150 ppm) berbeda nyata dengan perlakuan K(0 ppm). Kerusakan hemoragi

pada jaringan limpa yang paling parah pada perlakuan K+, diikuti dengan C(150 ppm), A(50 ppm), dan kerusakan paling rendah B(100ppm). Menurut Sari *et al.*,(2013), hemoragi terjadi jika darah keluar dari pembuluh darah. Terjadinya dapat berawal dari adanya kongesti disertai oleh peningkatan jumlah sel-sel granul eosinofil.

Hasil perhitungan BNT, menunjukkan hasil yang berbeda nyata, sehingga dilanjutkan uji polynomial orthogonal untuk mengetahui respon pemberian ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) terhadap histopatologi limpa ikan patin (*Pangasius sp.*) yang dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 10.



Gambar 10. Grafik Hubungan antara Pemberian Imunostimulan Ekstrak Teripang Pasir dengan Nilai Skoring Kerusakan Hemoragi Limpa Ikan Patin Selama Penelitian

Gambar 10. menunjukkan bahwa perlakuan B(100 ppm) mengalami kerusakan yang paling rendah, yaitu pada kisaran nilai skor dibawah 1-2. Kerusakan terparah dialami pada perlakuan K+ yaitu pada kisaran nilai skor diatas 3. Semakin kecil nilai skor yang diperoleh, maka semakin baik hasil yang didapat. Grafik pada Gambar 10 menunjukkan bahwa, antara dosis ekstrak

teripang pasir yang diberikan berpengaruh nyata pada kerusakan kongesti histologi limpa yang ditunjukkan dengan R^2 mendekati 1, yaitu 0,92. Sehingga persamaan yang didapat $Y = 3,333 + 0,0162x - 0,0008x^2 + 0,000004x^3$ yang membentuk grafik model kubik. Perbedaan nilai skor histopatologi limpa dapat disebabkan karena dosis ekstrak yang diberikan berbeda. Pemberian ekstrak yang paling baik untuk memperkecil kerusakan hemoragi pada limpa adalah pada perlakuan B (100 ppm).

Hemoragi pada dasarnya adalah kelanjutan dari kerusakan kongesti. Keadaan sel pada jaringan yang tidak dapat menampung darah (pembengkakan) sehingga menyebabkan darah keluar dari tempatnya. Upaya meminimalkan kerusakan dalam hal ini adalah pemberian imunostimulan ekstrak teripang pasir sebagai imunostimulan dengan dosis yang tepat. Menurut Mudjiutami *et al.*, (2007), pemberian imunostimulan sebagai upaya pencegahan mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Penggunaan imunostimulan pada budidaya ikan dapat mencegah terjadinya serangan yang lebih parah dari zat asing lain yang masuk ke dalam tubuh. Dalam hal ini, ekstrak teripang pasir mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila* lebih parah.

4.3 Pengamatan Gejala Klinis Ikan

Pengamatan gejala klinis ikan patin (*Pangasius* sp.) dilakukan selama 7 hari setelah penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan bakteri sebesar 10^8 . Hasil dari pengamatan gejala klinis ikan uji dalam penelitian disajikan pada Tabel 12. Adapun gambar untuk gejala klinis dapat dilihat pada Gambar 11.

Tabel 12. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Uji Setelah Penginfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Hari	Perlakuan	Gejala Klinis
1	K	Ikan bergerak cepat di kolom air Kepala ikan terlihat sedikit memerah Media pemeliharaan terlihat keruh
	A	Ikan bergerak cepat dan cenderung sering menuju ke permukaan air Tubuh ikan terlihat berwarna agak pucat Media pemeliharaan tidak terlalu keruh.
	B	Ikan bergerak menuju ke permukaan Tubuh ikan terlihat berwarna sedikit pucat Media pemeliharaan terlihat agak keruh
	C	Ikan bergerak cepat, cenderung berenang di bagian permukaan Media pemeliharaan keruh. Tubuh ikan terlihat berwarna pucat
2	K	Ikan bergerak cepat dan berenang ke permukaan dan dasar air Terdapat lendir pada kulit ikan Kepala ikan berwarna sedikit merah Air media pemeliharaan terlihat keruh
	A	Ikan bergerak semakin agresif Tubuh ikan berwarna agak pucat Air media pemeliharaan terlihat sedikit keruh
	B	Ikan bergerak cenderung tenang Tubuh ikan berwarna pekat (normal) Media pemeliharaan agak keruh
	C	Ikan bergerak agresif dan cenderung bergerak menuju permukaan Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh ikan Air media pemeliharaan terlihat agak keruh
3	K	Ikan berenang cepat di permukaan air Terdapat lendir pada kulit ikan Air media terlihat berwarna agak keruh
	A	Gerakan ikan agak agresif Ikan berwarna sedikit pucat Media air berwarna sedikit keruh
	B	Ikan bergerak cenderung tenang Tubuh ikan berwarna pekat (normal) Media pemeliharaan agak keruh

Tabel 12. (Lanjutan)

4	C	Ikan bergerak agresif dan cenderung bergerak menuju permukaan Tidak ditemukan kerusakan tubuh ikan Air media pemeliharaan terlihat agak keruh
	K	Ikan berenang di permukaan air Terdapat lendir pada kulit ikan Air media berwarna semakin keruh
	A	Ikan bergerak sedikit lambat dan cenderung sering menuju ke permukaan air Air media tidak terlalu keruh Tubuh ikan terlihat berwarna agak pucat
	B	Tubuh ikan berwarna pekat (normal) Media pemeliharaan agak keruh Ikan bergerak tenang
	C	Ikan bergerak lambat dan cenderung bergerak menuju permukaan Beberapa ikan mengalami kematian Air media pemeliharaan terlihat agak keruh
	K	Ikan bergerak lambat dan cenderung diam di dasar air Kepala ikan terlihat sedikit memerah Beberapa ikan mengalami kematian Media pemeliharaan terlihat keruh

Keterangan :

K = Ikan Uji dengan Immunostimulan Ekstrak *H. scabra* Konsentrasi 0 ppm

A = Ikan Uji dengan Immunostimulan Ekstrak *H. scabra* Konsentrasi 50 ppm

B = Ikan Uji dengan Immunostimulan Ekstrak *H. scabra* Konsentrasi 100 ppm

C = Ikan Uji dengan Immunostimulan Ekstrak *H. scabra* Konsentrasi 150 ppm



A



B

Gambar 11. (A) Insang Ikan Berwarna Merah Kehitaman pada Ikan Sakit; (B) Warna Ikan Cerah pada Ikan Sehat

4.4 Pengamatan Kualitas Air

Kualitas air selama masa pemeliharaan berlangsung merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan dalam suatu penelitian karena kualitas air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 13 dan Lampiran 6.

Tabel 13. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

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

Berdasarkan Tabel 13 diperoleh hasil bahwa air sebagai media pemeliharaan dan media hidup ikan uji selama perlakuan masih memenuhi syarat sehingga tidak berpengaruh terhadap penurunan kondisi fisiologis ikan uji. Menurut Partosuwiryo dan Warseno (2011), keberhasilan dalam budidaya ikan salah satunya yaitu dipengaruhi oleh kualitas air. Pada lokasi harus terdapat sumber air yang memenuhi syarat, baik kualitas maupun kuantitas (debit) air sepanjang tahun.

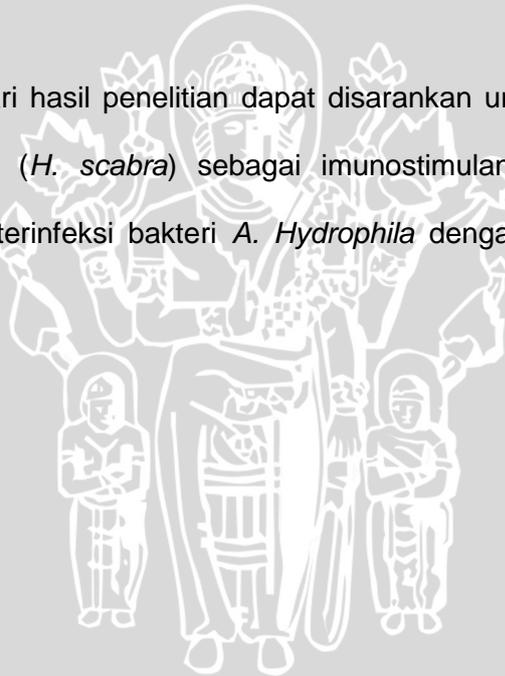
V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa pemberian immunostimulan ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh pada peningkatan dan penurunan terhadap kerusakan histologi jaingan limpa ikan patin (*Pangasius* sp.) yang dinfeksi bakteri *A. Hydrophila* dimana konsentrasi ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) yang optimal adalah pada perlakuan B dengan konsentrasi 100 ppm

5.2 Saran

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disarankan untuk menggunakan ekstrak teripang pasir (*H. scabra*) sebagai imunostimulan pada ikan patin (*Pangasius* sp.) yang terinfeksi bakteri *A. Hydrophila* dengan konsentrasi 100 ppm.



DAFTAR PUSTAKA

- Albuntana, Yasman, dan Wardhana. 2011. Uji toksisitas ekstrak empat jenis teripang suku holothuridae. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Tropis*. 3 (1): 65-72.
- Alifuddin, M. 2002. Immunostimulasi pada hewan akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 1 (2): 87-92.
- Amri, K. 2007. Budidaya Ikan Patin. Penebar Swadaya. Jakarta. 90 hlm.
- Aras. 2013. *Uji toksisitas ekstrak teripang *Holothuria scabra* terhadap *artemia salina**. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar. 39 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Arifianto, E dan E. Liviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta. 20 hlm.
- Atmodjo. 2011. Jenis Metode Penelitian. Universitas Mercubuana. Jakarta. 19 hlm.
- Barus. 2001. Pengantar Limnologi. Swadaya Cipta. Jakarta. 67 hlm.
- Ciptanto. 2010. Top 10 Ikan Air Tawar. Lily Publisher. Yogyakarta. 168 hlm.
- Effendi, 2003. Telaah Kualitas Air. Kanisius. Yogyakarta. 257 hlm.
- Ersa. 2008. *Gambaran histopatologi insang, usus dan otot pada ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) di daerah Ciampea Bogor*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 66 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Gunawan, D. dan S. Mulyani. 2004. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi). Penerbit Swadaya. Jakarta. 105 hlm.
- Hadinata, F. 2009. Pembenuhan Ikan Patin Djambal. Balai Budidaya Air Tawar Jambi. 66 hlm.
- Hartoto. 2009.** Penelitian Deskriptif. <http://www.penalarnan-unm.org.pdf>. Diakses 20 Desember 2013
- Jasmanidar, Y. 2009. *Penggunaan Ekstrak *Gracilaria Verrucosa* untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang *Vaname Litopenaeus vannamei**. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 61 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Kordi, M. G. H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hlm.
- _____. 2010. Panduan Lengkap Memelihara Ikan Air Tawar Di Kolam Terpal. Lily Publisher. Yogyakarta. 279 hlm.

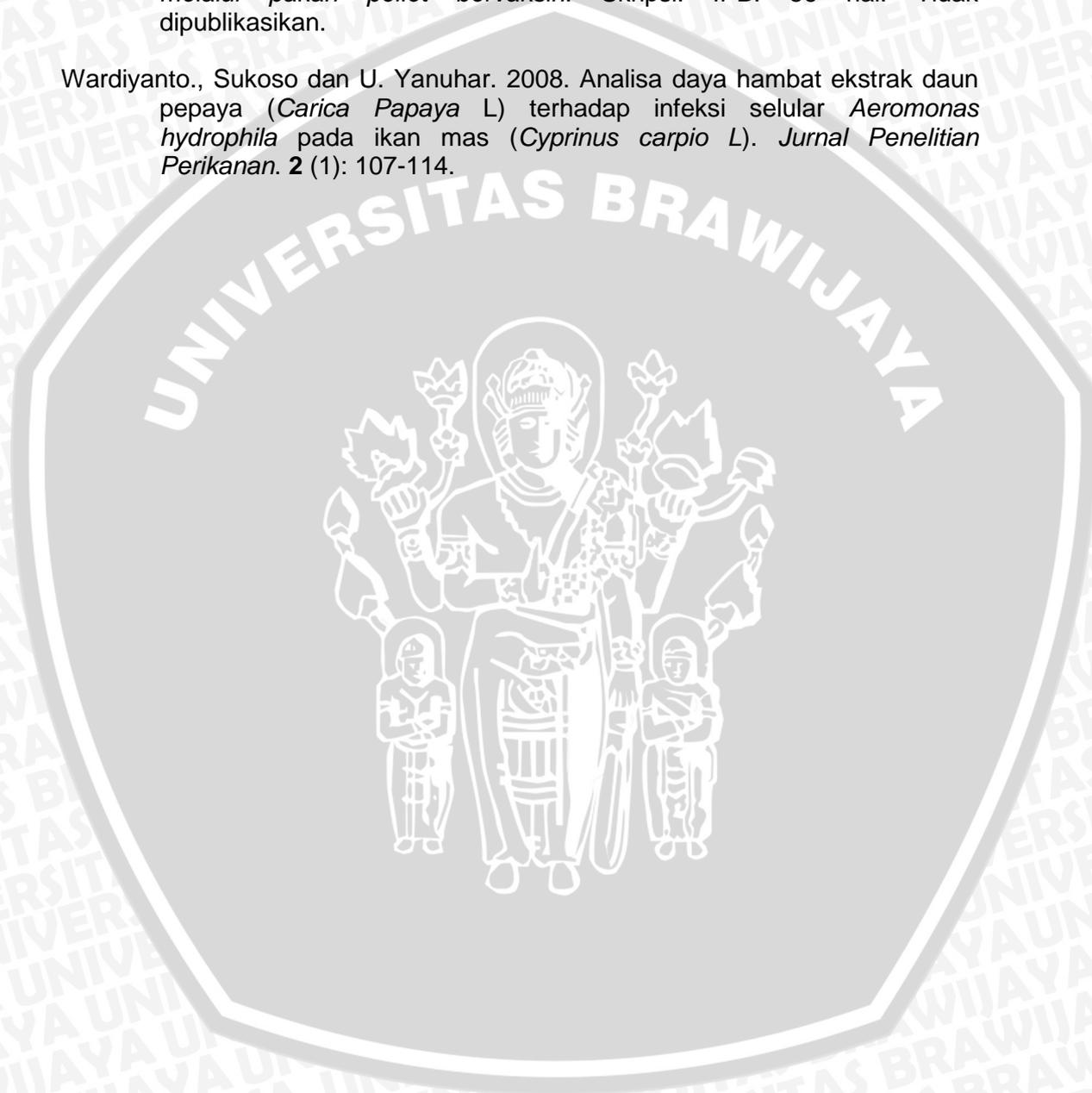
- _____. 2010. Buku Pintar. Pemeliharaan 14 Ikan Air Tawar Ekonomis di Keramba Jaring Apung. Lily Publisher. Yogyakarta. 324 hlm.
- Kordi, M.G. dan A. Tanjung. 2002. Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan. Rineka Cipta. Jakarta. 224 hlm.
- Khairuman, H. dan Amri. 2011. Budi Daya Dan Bisnis 15 Ikan Konsumsi. Agromedia Pustaka. Jakarta. 268 hlm.
- Kustiariyah. 2006. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Biologis Senyawa Steroid dari Teripang sebagai Aprodisiaka Alami. Thesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. Tidak dipublikasikan.
- Lesmana. 2001. Kualitas Air untuk Ikan Hias Tawar. Penebar Swadaya. Jakarta. 96 hlm.
- Manik. 2003. Pengelolaan Lingkungan Hidup. Djambatan. Jakarta. 259 hlm.
- Martoyo, J. N. Aji, dan T. Winanto. 2007. Budidaya Teripang. Penebar Swadaya. Jakarta. 76 hlm.
- Maswan, N. A. 2009. Pengujian Efektifitas Dosis Vaksin DNA dan Korelasinya Terhadap Parameter Hematologi Secara Kuantitatif. Skripsi. IPB Bogor. 55 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Ramadhan, M. A., A. Azam, M. S. Pradana, H. Junian, M. Y. Akbar. 2010. Teknik Pembesaran Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) dengan Sistem Resirkulasi Tertutup. Universitas Airlangga. Surabaya. 12 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Raza'l, T. S. 2008. Analisis Histopatologi Organ Insang dan Usus Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus Coloides*) yang Diberi Khamir Laut (Marine Yeast) Sebagai Immunostimulan. Tesis. UB. Malang. 95 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Samsundari, S. 2006. Pengujian Ekstrak Temulawak dan Kunyit terhadap Resistensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang Menyerang Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal GAMMA*. 1 (2): 71-83.
- Sari, N. R. 2013. Pengaruh Pemberian Immunostimulan Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap Histopatologi Insang Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang. 92 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm
- Suhermanto, A., S. Andayani dan Maftuch. 2011. Pemberian total fenol teripang pasir (*Holothuria scabra*) untuk meningkatkan leukosit dan diferensial leukosit ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Kelautan*. 4 (2).

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

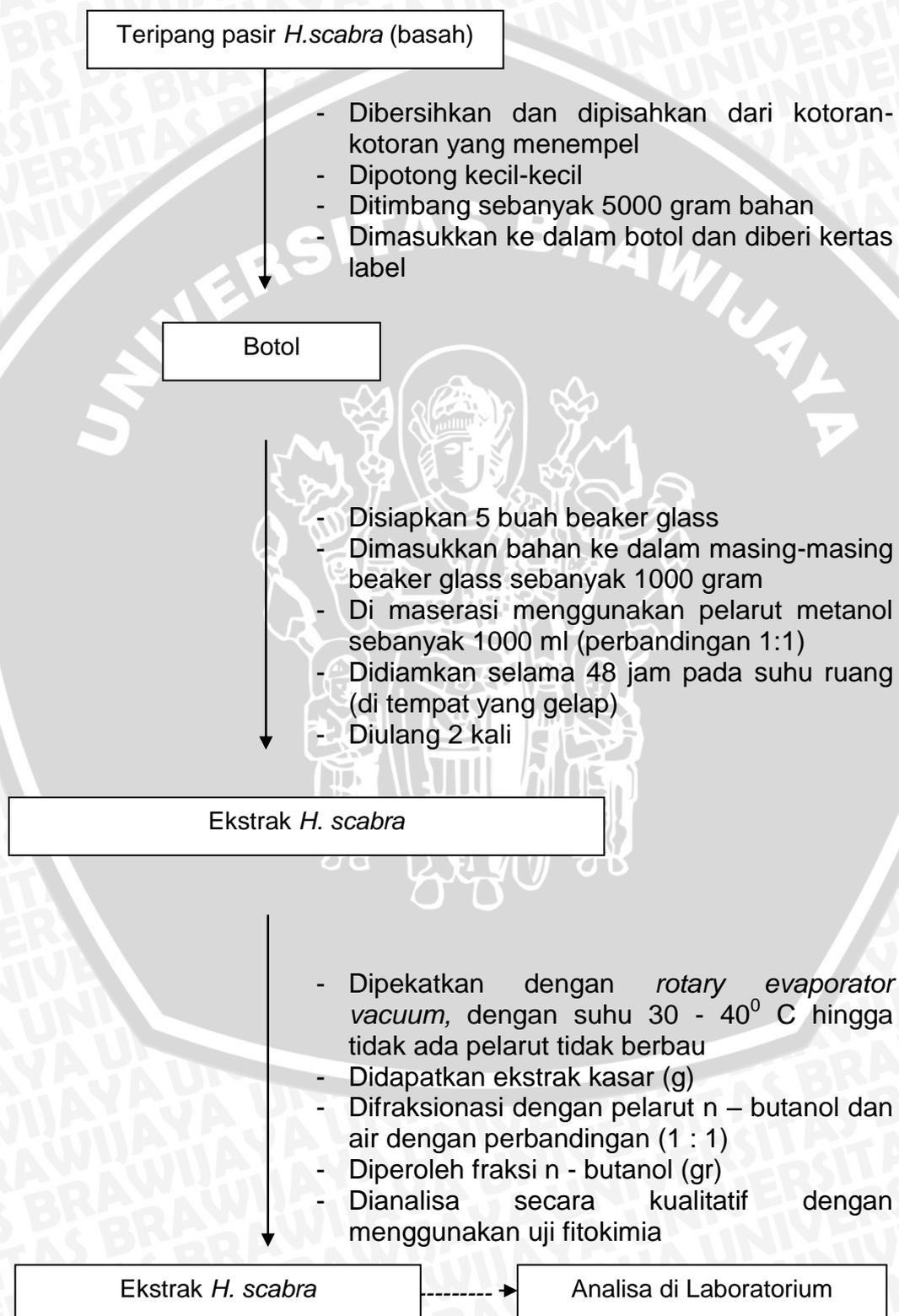
Sutjiati, M. 2004. Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 34 hlm.

Utomo, Y. E. 2001. *Uji lapang vaksin A. hydrophila terhadap ikan mas (C. Carpio) melalui pakan pellet bervaksin*. Skripsi. IPB. 56 hal. Tidak dipublikasikan.

Wardiyanto., Sukoso dan U. Yanuhar. 2008. Analisa daya hambat ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya* L) terhadap infeksi selular *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L). *Jurnal Penelitian Perikanan*. 2 (1): 107-114.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Ekstrak Teripang Pasir (*H. scabra*)

Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi Bakteri *A. hydrophila*

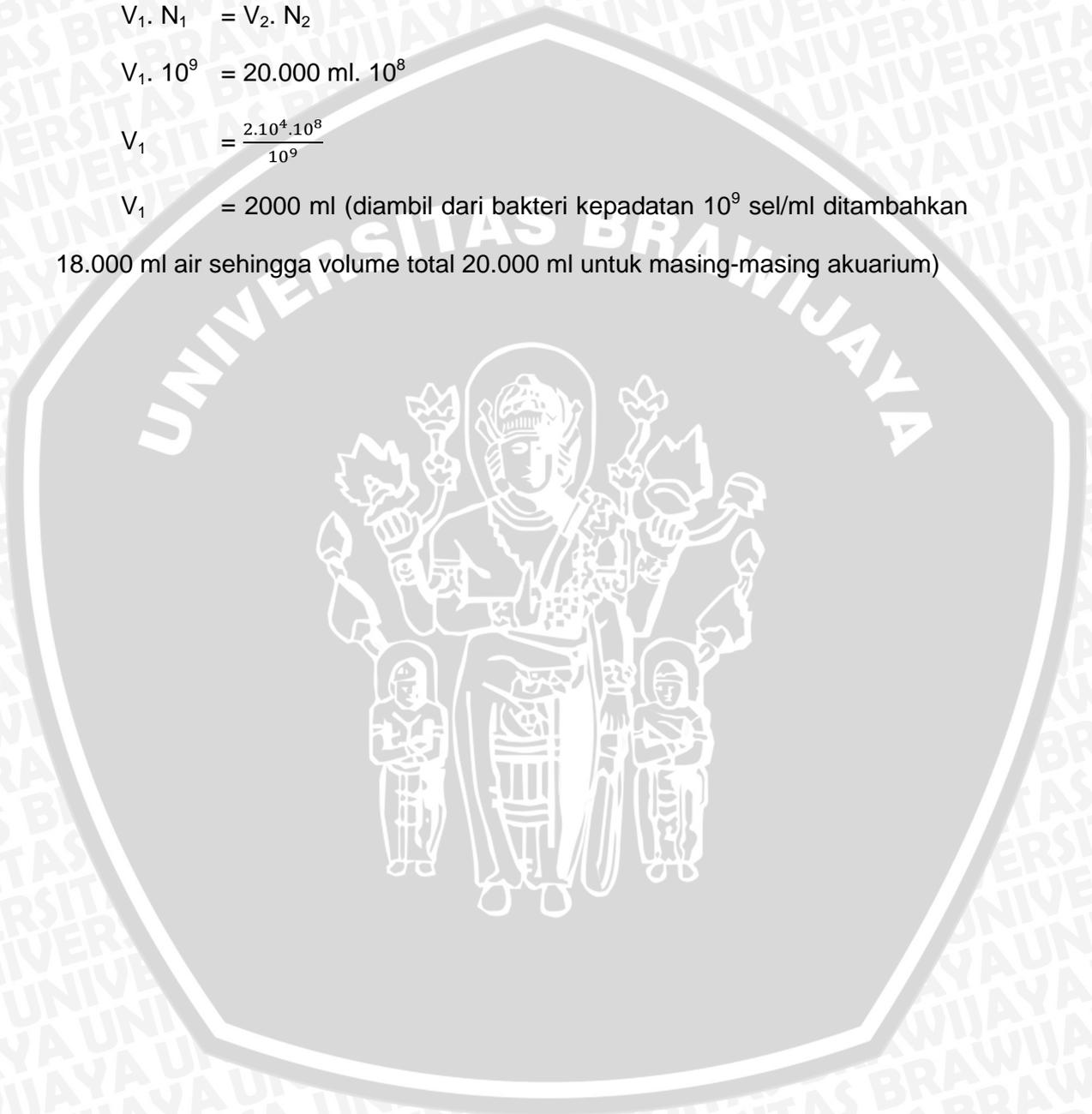
Pada penelitian ini, ikan patin (*Pangasius* sp.) direndam dalam akuarium berisi bakteri kepadatan 10^8 sel/ml dengan volume air sebesar 20.000 ml. Jika stok bakteri *A. hydrophila* memiliki kepadatan 10^9 sel/ml, maka:

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

$$V_1 \cdot 10^9 = 20.000 \text{ ml} \cdot 10^8$$

$$V_1 = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot 10^8}{10^9}$$

$$V_1 = 2000 \text{ ml (diambil dari bakteri kepadatan } 10^9 \text{ sel/ml ditambahkan } 18.000 \text{ ml air sehingga volume total } 20.000 \text{ ml untuk masing-masing akuarium)}$$



Lampiran 3. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang Ikan Patin

Kelainan Patologi	Sampel	Ulangan	Area lapang pandang					Rerata LP	Rerata Sampel
			1	2	3	4	5		
nekrosis	A	1	3	2	2	3	2	2,4	2,533
		2	3	2	2	2	3	2,4	
		3	3	3	3	2	3	2,8	
	B	1	3	2	2	3	2	2,4	2,066
		2	2	1	2	2	2	1,8	
		3	2	3	1	2	2	2	
	C	1	3	4	3	3	3	3,2	3
		2	3	3	3	3	3	3	
		3	3	3	3	3	2	2,8	
K+	1	4	3	4	4	3	3,6	3,733	
	2	4	4	4	3	4	3,8		
	3	3	4	4	4	4	3,8		
K-	1	1	1	1	1	1	1	1,066	
	2	1	1	1	1	1	1		
	3	1	1	1	2	1	1,2		
kongesti	A	1	3	4	2	2	4	3	3
		2	3	3	2	4	4	3,2	
		3	3	2	3	3	3	2,8	
	B	1	2	2	1	2	1	1,6	1,466
		2	1	2	1	1	1	1,2	
		3	1	2	2	1	2	1,6	
	C	1	4	3	3	4	4	3,6	3,4
		2	3	4	4	3	3	3,4	
		3	3	4	3	3	3	3,2	
K+	1	4	3	4	4	4	3,8	3,733	
	2	3	4	4	3	4	3,6		

Lampiran 3. (Lanjutan)

K-	3	4	4	3	4	4	3,8	1,266
	1	2	2	1	1	1	1,4	
	2	1	1	1	1	1	1	
A	3	1	2	2	1	1	1,4	2,666
	1	3	2	4	3	2	2,8	
	2	3	3	3	2	2	2,6	
B	3	2	3	2	3	3	2,6	1,533
	1	1	2	2	1	1	1,4	
	2	1	2	2	2	2	1,8	
C	3	1	1	1	2	2	1,4	3,066
	1	3	3	3	2	4	3	
	2	3	4	4	3	2	3,2	
K+	3	3	3	3	3	3	3	3,333
	1	4	3	3	4	3	3,4	
	2	4	3	3	3	3	3,2	
K-	3	2	1	1	1	1	1,2	1,2
	1	1	2	2	1	1	1,4	
	2	1	1	1	1	1	1	
hemoragi	3	3	2	4	3	2	2,8	
	1	4	3	3	4	3	3,4	
	2	3	4	4	3	3	3,4	

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 4. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Limpa Menggunakan Microsoft Excel

Nekrosis

Perlakuan	Ulangan Rerata Lapang Pandang			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
50 ppm (A)	2,4	2,4	2,8	7,6	2,5
100 ppm (B)	2,4	1,8	2,0	6,2	2,0
150 ppm (C)	3,2	3,0	2,8	9,0	3,0
Kontrol positif (K+)	3,6	3,8	3,8	11,2	3,7
Kontrol negatif (K-)	1,0	1,0	1,2	3,2	1,1

FK 96,33333333
 JK Total 4,946666667
 JK Perlakuan 4,546666667
 JK Acak 0,4

Tabel sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	4,546667	1,515556	30,31111111	4,07	7,59
Acak	8	0,4	0,05			
Total	11	4,946667				

**** berbeda sangat nyata**

SED 0,182574186
 BNT 5 % 0,421016073
 BNT 1 % 0,612607597

Tabel BNT

	B	A	C	K
Rata2 Perlakuan	2,066666667	2,533333	3	3,733333333
2,066666667	-	-	-	-
2,533333333	0,466666667	-	-	-
3	0,933333333	0,466667	-	-
3,733333333	1,666666667	1,2	0,733333	-

Rata2 Perlakuan	2,066666667	2,533333	3	3,733333333	Notasi
2,066666667	-	-	-	-	A
2,533333333	*	-	-	-	B
3	**	*	-	-	C
3,733333333	**	**	*	-	D



Dari tabel diatas, diurutkan perlakuan terbaik (kerusakan paling kecil) B, A, C, K

Perlakuan	Hasil (ti)	Perbandingan (Ci)			Q Linier	Q Kuadrat	Q Kubik
		Linier	kuadrat	kubik			
A	7,6	-3	1	-1	-22,8	7,6	-7,6
B	6,2	-1	-1	3	-6,2	-6,2	18,6
C	9	1	-1	-3	9	-9	-27
K	11,2	3	1	1	33,6	11,2	11,2
Q		13,6	3,6	-4,8			
Hasil Kuadrat		20	4	20			
Kr		60	12	60			
JK		0,453333	1,08	0,384			

JK Regresi 1,917333333

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	f5%	F1%
Perlakuan	3	4,546667			4,07	7,59
Linier	1	0,453333	0,453333	9,066666667	**	
kuadrat	1	1,08	1,08	21,6	**	
Kubik	1	0,384	0,384	7,68	**	
Acak	8	0,4	0,05			
Total	11	4,946667				

Karena regresi linear, kuadrat, dan ubik berbeda sangat nyata, maka dihitung R² masing2 regresi

R ² Linier	0,53125
R ² Kuadrat	0,72972973
R ² Kubik	0,489795918

Mencari persamaan regresi kuadrat $y=b_0\pm b_1x\pm b_2x^2$

Perlakuan	Konsentrasi
K	0
A	50
B	100
C	150
Rata2	75
d(selang	50

	uj	uj ²
x=0	-1,5	2,25
x=50	-0,5	0,25
x=100	0,5	0,25
x150	1,5	2,25

Sehingga didapat

	0	50	100	150	Total
uj	-1,5	-0,5	0,5	1,5	0
uj ²	2,25	0,25	0,25	2,25	5
uj ⁴	5,0625	0,0625	0,0625	5,0625	10,25
Yy	11,2	7,6	6,2	9	34
ujYy	-16,8	-3,8	3,1	13,5	-4
uj ² Yy	25,2	1,9	1,55	20,25	48,9

$$Y = b_0^1 + b_1^1uj + b_2^1uj^2$$

$$1. \sum ujYy = b_1^1 \cdot r \cdot \sum uj^2$$

$$b_1^1 = -0,266666667$$

$$2. \sum Yy = b_0^1 \cdot n + b_2^1 \cdot r \cdot \sum uj^2$$

$$34 = b_0^1 \cdot 12 + b_2^1 \cdot 3 \cdot 5$$

$$34 = 12b_0^1 + 15b_2^1$$

$$3. \sum uj^2Yy = b_0^1 \cdot r \cdot \sum uj^2 + b_2^1 \cdot r \cdot \sum uj^4$$

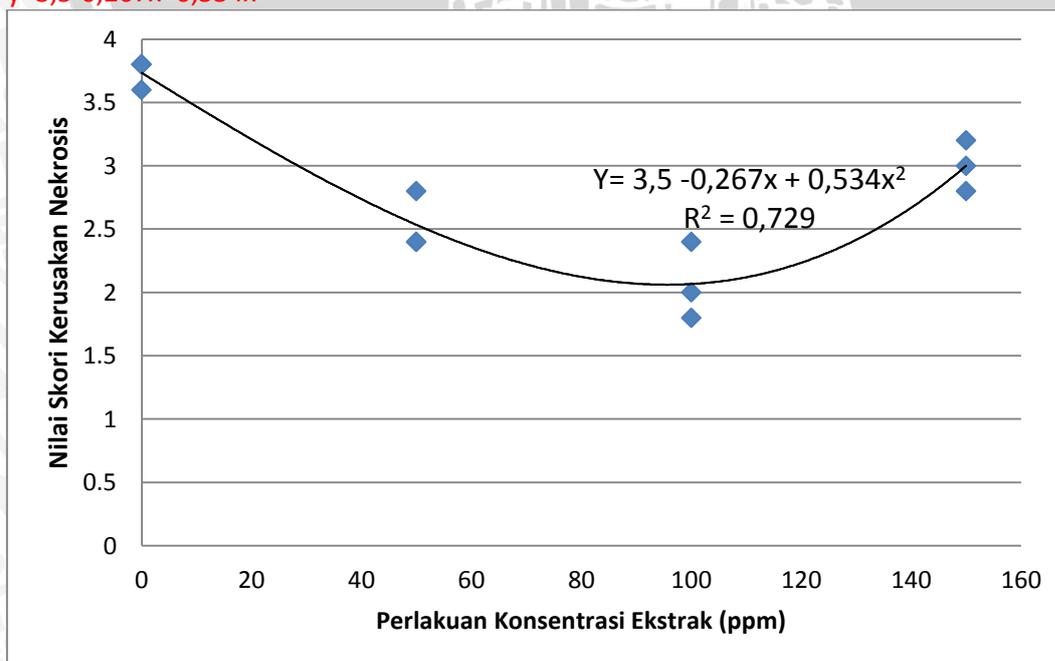
$$48,9 = b_0^1 \cdot 3 \cdot 5 + b_2^1 \cdot 3 \cdot 10,25$$

$$48,9 = 15b_0^1 + 30,75b_2^1$$

disubstitusikan 2 dan 3

b_0^1	3,5
b_1^1	-0,266666667
b_2^1	0,533333333

$$y = 3,5 - 0,267x + 0,534x^2$$



Kongesti

Perlakuan	Ulangan			total	rerata
	1	2	3		
A (50 ppm)	3	3,2	2,8	9	3
B (100 ppm)	1,6	1,2	1,6	4,4	1,466667
C (150 ppm)	3,6	3,4	3,2	10,2	3,4
K+ (0 ppm)	3,8	3,6	3,8	11,2	3,733333
				34,8	

FK 100,92
 JK Total 9,32
 JK Perlakuan 9,026667
 JK Acak 0,293333

Tabel analisa sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	9,026667	3,008889	82,06061	4,07	7,59
acak	8	0,293333	0,036667			
total	11	9,32				

**** berbeda sangat nyata**

SED 0,156347
 BNT 5 % 0,360537
 BNT 1 % 0,524606

Tabel BNT

Rata2 Perlakuan	B	A	C	K
1,466667	1,466667	3	3,4	3,733333
3	-	-	-	-
3,4	1,533333	-	-	-
3,733333	1,933333	0,4	-	-
	2,266667	0,733333	0,333333	-

Rata2 Perlakuan	1,466667	3	3,4	3,733333	Notasi
1,466667	-	-	-	-	a
3	**	-	-	-	b
3,4	**	*	-	-	C
3,733333	**	**	ns	-	cd



Dari tabel diatas, diurutkan perlakuan terbaik (kerusakan paling kecil) B, A, C, K

Perlakuan	Hasil (ti)	Perbandingan (Ci)			Q Linier	Q Kuadratik	Q Kubik
		linier	kuadratik	kubik			
A	9	-3	1	-1	-27	9	-9
B	4,4	-1	-1	3	-4,4	-4,4	13,2
C	10,2	1	-1	-3	10,2	-10,2	-30,6
K	11,2	3	1	1	33,6	11,2	11,2
Q		12,4	5,6	-15,2			
Hasil Kuadrat		20	4	20			
Kr		60	12	60			
JK		0,413333	2,613333	3,850667			

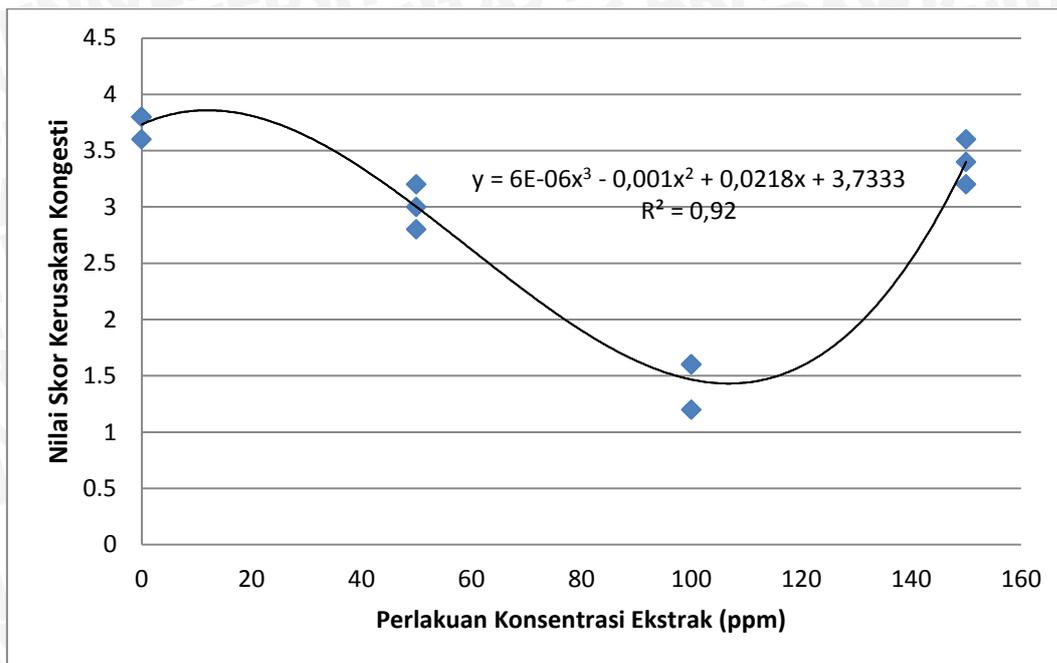
JK Regresi 6,877333

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	f5%	F1%
Perlakuan	3	9,026667			4,07	7,59
Linier	1	0,413333	0,413333	11,27273	**	
kuadratik	1	2,613333	2,613333	71,27273	**	
kubik	1	3,850667	3,850667	105,0182	**	
acak	8	0,293333	0,036667			
Total	11	9,32				

Karena regresi linear, kuadratik, dan kubik berbeda sangat nyata, maka dihitung R² masing2 regresi

R ² Linier	0,584906
R ² Kuadratik	0,899083
R ² Kubik	0,929215



hemoragi

Perlakuan	ulangan			total	rerata
	1	2	3		
A (50 ppm)	2,8	2,6	2,6	8	2,666667
B (100 ppm)	1,4	1,8	1,4	4,6	1,533333
C (150 ppm)	3	3,2	3	9,2	3,066667
K+ (0 ppm)	3,4	3,2	3,4	10	3,333333
				31,8	

FK	84,27
JK Total	5,85
JK Perlakuan	5,663333
JK Acak	0,186667

Tabel analisa sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
perlakuan	3	5,663333	1,887778	80,90476	4,07	7,59
acak	8	0,186667	0,023333			
total	11	5,85				

** berbeda sangat nyata

SED	0,124722
BNT 5 %	0,287609
BNT 1 %	0,418491



Tabel BNT

	B	A	C	K
Rata2 Perlakuan	1,533333	2,666667	3,066667	3,333333
1,533333	-	-	-	-
2,666667	1,133333	-	-	-
3,066667	1,533333	0,4	-	-
3,333333	1,8	0,666667	0,266667	-

Rata2 Perlakuan	1,533333	2,666667	3,066667	3,333333	Notasi
1,533333	-	-	-	-	a
2,666667	**	-	-	-	b
3,066667	**	*	-	-	c
3,333333	**	**	ns	-	cd

Dari tabel diatas, diurutkan perlakuan terbaik (kerusakan paling kecil) B, A, C, K

Perlakuan	Hasil (ti)	Perbandingan (Ci)			Q Linier	Q Kuadrat	Q Kubik
		linier	kuadrat	kubik			
A	8	-3	1	-1	-24	8	-8
B	4,6	-1	-1	3	-4,6	-4,6	13,8
C	9,2	1	-1	-3	9,2	-9,2	-27,6
K	10	3	1	1	30	10	10
Q		10,6	4,2	-11,8			
Hasil Kuadrat		20	4	20			
Kr		60	12	60			
JK		0,353333	1,47	2,320667			

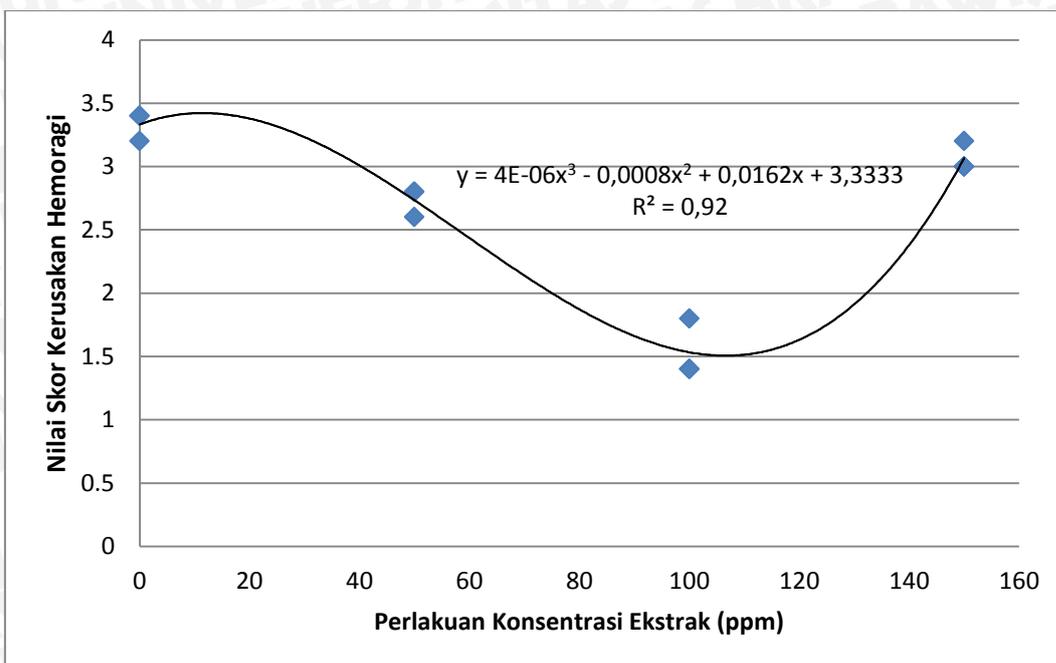
JK Regresi 4,144

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	f5%	F1%
Perlakuan	3	5,663333			4,07	7,59
Linier	1	0,353333	0,353333	15,14286	**	
kuadrat	1	1,47	1,47	63	**	
kubik	1	2,320667	2,320667	99,45714	**	
acak	8	0,186667	0,023333			
Total	11	5,85				

Karena regresi linear, kuadrat, dan ubik berbeda sangat nyata, maka dihitung R² masing2 regresi

R² Linier	0,654321
R² Kuadrat	0,887324
R² Kubik	0,925552



Lampiran 5. Pengukuran Kualitas Air DO (ppm), pH dan Suhu ($^{\circ}\text{C}$) pada Media Pemeliharaan Selama Penelitian

DATA DO (ppm)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi													
	Sore	6.03	6.55	5.67	6.23	6.12	6.35	6.23	6.21	5.37	6.32	6.75	5.43	5.37 - 6.75
2	Pagi	5.32	5.02	5.43	5.6	5.37	5.75	5.43	5.23	5.46	5.34	5.54	5.21	5.02 - 5.75
	Sore	5.73	6.53	6.24	6.45	5.67	5.59	6.2	6.02	6.06	6.32	6.12	5.96	5.59 - 6.45
3	Pagi	5.02	5	5.12	6.4	5.3	5.7	5.42	5.01	5.38	5.21	5.1	5.2	5 - 6.4
	Sore	6.02	6.21	6.12	6.22	6.23	6.11	6.32	5.92	5.78	6.03	6.13	6.13	5.78 - 6.32
4	Pagi	5.04	5.35	5.76	5.34	5.27	5.84	5.63	5.75	5.38	5.57	5.53	5	5 - 5.84
	Sore	6.04	6.14	6.45	6.03	6.01	6.02	6.21	6.22	6.31	5.94	5.87	6.04	5.87 - 6.45
5	Pagi	5.03	5.14	5.53	5.22	5.34	5.15	5.25	5.67	5.64	5.67	5.73	5.47	5.03 - 5.73
	Sore	5.97	6.03	5.97	6.04	6.17	6.14	6.26	5.93	6.08	6.01	5.97	6.01	5.93 - 6.17
6	Pagi	5.52	5.46	5.67	5.37	5.67	5.76	5.68	5.37	5.73	5.16	5.37	5.28	5.16 - 5.76
	Sore	6.03	6.15	6.27	6.33	6.29	6.25	5.98	6.36	6.48	6.37	6.28	6.25	6.03 - 6.48
7	Pagi	5.58	5.37	5.28	5.58	5.37	5.37	5.39	5.42	5.48	5.38	5.39	5.32	5.28 - 5.58
	Sore	6.03	6	6.11	6.14	6.25	6.23	6.15	6.22	6.34	6.35	6.33	6.37	6 - 6.37
8	Pagi	5.45	5.48	5.29	5.39	5.67	5.45	5.48	5.36	5.28	5.48	5.68	5.34	5.28 - 5.68
	Sore	6.01	6.05	6.22	6.35	6.55	6.31	6.33	5.97	6.01	6.17	5.95	6.01	5.95 - 6.55

Lampiran 6. (Lanjutan)

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
4	Pagi	7.23	7.28	7.35	7.29	7.37	7.52	7.56	7.72	7.17	7.62	7.61	7.58	7.17 – 7.62
	Sore	8.04	8.29	8.29	8.17	7.59	8.03	8.01	8.22	8.23	7.83	7.61	7.62	7.59 – 8.29
5	Pagi	7.12	7.18	6.58	7.52	7.53	7.42	7.43	7.44	7.24	7.52	7.35	7.33	6.58 – 7.53
	Sore	8.01	7.59	7.78	7.89	7.86	7.88	7.98	7.85	7.76	7.63	7.95	8.01	7.59 – 8.01
6	Pagi	7.56	7.55	7.47	7.48	7.56	7.58	7.47	7.55	7.58	7.45	7.57	7.58	7.58 – 7.45
	Sore	7.89	7.95	8.01	8.03	7.95	7.88	7.96	7.84	7.88	7.83	7.92	7.84	7.83 – 8.03
7	Pagi	7.59	7.55	7.84	7.74	7.56	7.58	7.67	7.45	7.67	7.56	7.37	7.36	7.36 – 7.84
	Sore	8.25	8.05	7.95	7.89	8.02	8.05	7.96	7.89	7.95	7.89	7.93	7.95	7.96 – 7.89
8	Pagi	7.79	7.89	7.58	7.35	7.56	7.55	7.56	7.68	7.48	7.49	7.37	7.45	7.35 – 7.89
	Sore	8.01	8.04	8.04	8.04	7.96	8.01	7.98	7.95	7.88	7.92	7.91	7.88	7.88 – 8.04

Lampiran 6. (Lanjutan)

DATA SUHU (°C)

Hari Ke-		A			B			C			K			Kisaran
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	Pagi													
	Sore	25.6	26.2	26.1	26	26.4	26.5	26.6	26.4	26.3	26.1	26.5	26.6	26 – 26.6
2	Pagi	26.6	26.1	26	26.1	26.3	26.5	26.6	26.4	26.2	26.3	26.2	25.9	25.9 – 26.6
	Sore	26.1	26.4	25.9	25.7	25.5	25.6	25.7	25.8	25.7	26	25.7	25.6	25.5 – 26.1
3	Pagi	26.4	26.5	26.6	26.5	26.4	26.5	26.3	26.4	26.3	26.4	26	26.1	26 – 26.6
	Sore	25.5	26.1	25.6	25.7	25.8	25.5	25.6	25.8	25.7	25.8	25.7	25.6	25.5 – 26.1
4	Pagi	26.1	26.4	26.1	26.3	26.4	26.2	26.1	26.5	26.4	26.3	25.9	26.1	25.9 – 26.5
	Sore	25.7	25.7	25.8	25.9	25.6	25.5	25.5	25.7	25.8	25.8	25.5	25.7	25.5 – 25.9
5	Pagi	26.6	26.3	25.7	26.2	26.4	26.5	25.9	26.1	26	25.9	25.8	25.7	25.7 – 26.6
	Sore	25.9	25.8	25.9	25.8	25.7	25.8	25.8	25.7	25.6	25.7	25.6	25.8	25.6 – 25.9
6	Pagi	26.4	26.1	26.2	26.3	26.1	25.9	26.1	26.2	26.5	26.4	26.6	26.2	25.9 – 26.6
	Sore	25.8	25.9	25.8	26.1	26.2	25.9	26.1	25.8	25.8	25.8	25.7	25.9	25.7 – 26.2
7	Pagi	25.9	26.3	26.5	26.4	26.5	26.3	26.5	26.3	26.4	26.1	26.3	26.3	25.9 – 26.5
	Sore	25.4	25.9	25.7	26.1	25.9	25.9	25.8	25.9	26.1	25.8	25.7	25.9	25.4 – 26.1
8	Pagi	25.6	25.8	26.1	26.5	26.4	26.3	26.3	26.2	26.5	26.4	26.1	26.2	25.8 – 26.5
	Sore	26.1	25.9	25.7	25.9	25.8	25.9	25.7	25.9	25.8	26.1	25.8	25.7	25.7 – 26.1



DAFTAR ISTILAH

Istilah	Uraian
A	
Aglikon	Komponen non gula dari suatu glikosida
Antibodi / Imunoglobulin (Ig)	Substansi kimia berupa glikoprotein dengan struktur tertentu yang terbentuk sebagai respon terhadap keberadaan benda asing (antigen) yang tidak dikehendaki oleh tubuh
Antigen	Zat yang dapat merangsang respon imun terutama dalam menghasilkan antibodi
Antioksidan	Zat yang mampu mencegah proses oksidasi
B	
Bioaktif	Senyawa kimia yang menghasilkan aktifitas biologi dalam tubuh
F	
Fagosit	Penggolongan dari sel darah putih yang berperan dalam sistem kekebalan dengan cara fagositosis (menelan patogen)
H	
Hemoragi	Kongesti yang sangat parah, sehingga pembuluh darah pecah dan darah berada pada tempat yang tidak semestinya
I	
imunostimulan	Agen kimia yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik
Imunitas humoral	Kekebalan yang dihasilkan dari aktivitas unsur-unsur dalam darah dan jaringan, seperti antibodi, bukan sel
Imunitas selular	Respon imun terhadap antigen yang diperankan oleh limfosit T dengan atau tanpa bantuan komponen sistem imun lainnya
Ireversibel	Tidak dapat kembali ke keadaan semula
K	
Kongesti	Pelebaran pembuluh darah dan di dalam pembuluh darah

tersebut penuh berisi darah (melebihi kapasitas normal)

M

Makrofag

Jenis sel darah putih yang membersihkan tubuh dari partikel mikroskopis yang tidak diinginkan dengan cara menelan partikel tersebut dan 'memakan'-nya

Motile Aeromonas
Septicemia (MAS)

Penyakit merah yang biasa menyerang ikan budidaya disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophilla*

N

Nekrosis

Kematian patologis suatu sel / sekelompok sel, yang dihasilkan dari kerusakan ireversibel. Terjadi ketika tidak ada cukup darah mengalir ke jaringan, baik karena cedera, radiasi, atau bahan kimia

P

Patogen

Agen biologis yang menyebabkan penyakit pada inangnya

Proteolitik

Sifat yang dapat memecah protein (dilakukan oleh proteinase/protease)

Pulpa merah

bagian limpa yang berfungsi untuk filtrasi dan bertindak sebagai *reservoir* (penampung) untuk darah

Pulpa putih

Terdiri dari agregat jaringan limfoid yang berfungsi mengidentifikasi antigen dan memproduksi antibodi

R

Reservoir

Tempat terakumulasinya

T

Trabekula

Perpanjangan kapsula e dalam parenkim limpa

V

Virulen

Faktor yang dapat menyebabkan penyakit dan mampu menyerang jaringan tubuh