



**EFEK TOKSIK POLIFENOL (TANIN) DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*)
TERHADAP PARAMETER BIOKIMIA DARAH DAN HISTOLOGI
IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

TESIS



Oleh :

AFANDI SAPUTRA
NIM. 146080100111015

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**



**EFEK TOKSIK POLIFENOL (TANIN) DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*)
TERHADAP PARAMETER BIOKIMIA DARAH DAN HISTOLOGI
IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

TESIS

Untuk memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

Oleh :

AFANDI SAPUTRA
NIM. 146080100111015

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

Kedua orang tua dan rekan-rekan semuanya

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar - benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur - unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 2 Juni 2016

Mahasiswa



Afandi Saputra

NIM. 146080100111015

COPY

TESIS

EFEK TOKSIK POLIFENOL (TANIN) DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*)
TERHADAP PARAMETER BIOKIMIA DARAH DAN HISTOLOGI
IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)

Oleh

Afandi Saputra
NIM. 146080100111015

Telah dipertahankan didepan penguji

Pada tanggal 2 Juni 2016

Dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

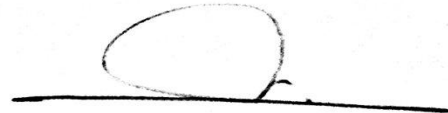
Komisi Pembimbing,

Ketua



Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS
NIP. 19611106 198602 2 001
20 JUN 2016

Anggota



Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 1960322 198601 1 001
20 JUN 2016

Mengetahui,

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS
NIP. 19591230 198503 2 002
20 JUN 2016



JUDUL TESIS

**EFEK TOKSIK POLIFENOL (TANIN) DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*)
TERHADAP PARAMETER BIOKIMIA DARAH DAN HISTOLOGI
IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

Nama Mahasiswa : Afandi Saputra

NIM : 146080100111015

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat Ilmu Studi : Penyakit

KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Anggota : Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

KOMISI PENGUJI :

Dosen Penguji 1 : Dr. Kartini Zailanie, MS

Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Muhammad Fadjar, M. Sc

Tanggal Pengujian : 2 Juni 2016

SK Penguji :

RIWAYAT HIDUP



Afandi Saputra lahir di Teluk Betung pada tanggal 3 Oktober 1984 dari pasangan suami-istri Djamhullah Usman dan Asni Barlian. Penulis merupakan anak bungsu dari tiga bersaudara. Penulis pernah mengenyam pendidikan di TK Pelita Teluk Betung pada tahun 1990-1991. Pendidikan Sekolah Dasar diselesaikan di SD Negeri 2 Kupang Kota, Bandar Lampung pada tahun 1991-1996. Pendidikan Sekolah Lanjutan Tengah Pertama diselesaikan di SLTP N 16 Bandar Lampung pada tahun 1996-1999. Pendidikan Sekolah Menengah Atas diselesaikan di SMAN 4 Teluk Betung, Bandar Lampung pada tahun 1999-2002. Pendidikan Diploma 4 (D4) diselesaikan di Pogram Studi Teknologi Akuakultur, Jurusan Teknologi Sumberdaya Perairan, Sekolah Tinggi Perikanan pada tahun 2002-2006. Saat ini penulis sedang menyelesaikan Pendidikan Strata (S2) Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2014-2016. Saat menempuh program S2 penulis membuat tesis yang berjudul "Efek Toksik Polifenol (Tanin) Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Parameter Biokimia Darah dan Histologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)"



UCAPKAN TERIMAKASIH

Tesis ini disusun atas bantuan dan dukungan dari banyak pihak. Oleh karena ini penulis menyampaikan rasa terimakasih sebesar-besarnya kepada :

- **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** dan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS** selaku komisi pembimbing 1 dan 2, atas segala bantuan dan bimbingan selama pelaksanaan penelitian sampai penyusunan laporan Tesis ini.
- **Dr. Kartini Zailanie, MS** dan **Dr. Ir. Muhammad Fadjar, M. Sc** selaku dosen penguji atas masukan dan arahnya.
- Kedua orang tua Alm. Ayahanda Drs. Djamhullah Usman dan Ibunda Asni Barlian, Amd atas dukungan moril dan materiil serta do'anya selama menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.
- Istri tercinta Shofia Kusuma Dewi yang dengan sabar dan memberikan dukungan moril serta doanya selama menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.
- Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) RI yang memberikan kemudahan dan dukungan materiil sebagai sponsor dalam menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.
- Kepala BAPPL STP Serang yang memberikan kemudahan dan dukungan dalam menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.
- Rekan-rekan angkatan 2013 dan 2014 Program Magister Budidaya Perairan Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, atas dukungan, bantuan dan do'nya.

Malang, 2 Juni 2016

Penulis



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tesis dengan judul “Efek Toksik Polifenol (Tanin) Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Parameter Biokimia Darah dan Histologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)”.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku ketua komisi pembimbing dan Bapak Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku anggota komisi pembimbing serta dukungan dari semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun senantiasa diharapkan agar dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan perikanan khususnya bagi kami pribadi dan pembaca.

Malang, 2 Juni 2016

Penulis

RINGKASAN

Afandi Saputra. Efek Toksik Polifenol (Tanin) Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Parameter Biokimia Darah dan Histologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). Komisi Pembimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** dan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**

Pabrik industri, domestik dan kegiatan pertanian menyebabkan kontaminasi racun pada lingkungan perairan yang mempengaruhi integritas lingkungan dan hewan air. Sebanyak 96% limbah fenol di lingkungan perairan terakumulasi dari berbagai kegiatan manusia seperti industri, pertanian dan lain-lainnya, sedangkan 4% berasal dari proses alam seperti dekomposisi dari daun, batang atau akar tumbuhan. Jenis tumbuhan aromatik memiliki kandungan senyawa fenolik, salah satunya adalah sirih merah. Daun sirih merah mengandung senyawa seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tannin.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, dimana metode ini digunakan untuk menguji hubungan sebab akibat melalui manipulasi variabel independent dan perubahan-perubahan yang diakibatkan oleh manipulasi tersebut. Tahapan penelitian: 1). Isolasi senyawa golongan polifenol *Piper crocatum* dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan FTIR. 2) Uji pengaruh senyawa polifenol ekstrak *P. crocatum* pada pemeliharaan ikan lele terhadap stress melalui parameter biokimia darah dan histology dalam skala laboratorium. Pemberian dosis dari polifenol (tannin) *Piper crocatum* pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) berukuran 10-15 gram menggunakan dosis 0.36 mg/kg, 1.08 mg/kg dan 1.80 mg/kg dan kontrol (+) senyawa fenol 3 mg/kg serta kontrol (-) sebagai pembandingan dengan cara injeksi dosis tunggal. Pengujian biokimia darah dan histologi dilakukan pasca injeksi 72 jam. Data hasil penelitian dianalisa menggunakan uji ANOVA.

Karakteristik polifenol (tannin) *Piper crocatum* berdasarkan uji UV-Vis menunjukkan adanya senyawa polifenol (tannin) dengan panjang gelombang 224 nm, 227 nm, 237 nm dan 275 nm. Uji FTIR menunjukkan adanya senyawa polifenol (tannin) dengan gugus hidroksil (OH), gugus alkenil (C-H), gugus Aromatik (C=O), gugus para dan meta dan gugus karbonil (C=C). Hasil identifikasi jika dibandingkan dengan standar tannin dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terkandung pada isolasi fraksi *Piper crocatum* adalah golongan tannin (Gallotanin). Hasil analisa data haematologi berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian injeksi polifenol (tannin) *Piper crocatum* berpengaruh nyata ($p < 0.05$) terhadap hematokrit, haemoglobin, glukosa, BUN, dan Alkali fosfatase. Uji hormon kortisol menunjukkan peningkatan pada perlakuan injeksi polifenol (tannin) dan fenol. Pada uji histologi ginjal menunjukkan nekrosis, edema dan kongesti pada semua dosis perlakuan polifenol *P. crocatum* dan K(+) dengan injeksi fenol 3 mg/kg, sedangkan pada uji histologi hati pada semua perlakuan mengalami nekrosis dan hipertropi. Pemberian polifenol (tannin) *Piper crocatum* yang paling toksik berdasarkan uji haematologi dan histologi adalah 1,8 mg/kg.



SUMMARY

Afandi Saputra. Toxic Effect Of Polyphenol (Tanin) Red betel leaf (*Piper crocatum*) On Blood Biochemical And Histology African Catfish (*Clarias gariepinus*). Advosir : **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS and Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**

Industrial factory, domestic and agricultural activities cause toxic contamination in the aquatic environment that affect aquatic animals and aquatic environmental integrity. As much as 96% phenol residues in aquatic environment accumulated from various human activities such as industrial and agricultural, while 4% accumulated from natural processes such as decomposition of leaves, stems and roots of plants. Aromatic plant species contains phenolic compounds, one of which is red betel. Red betel leaves contain flavonoid, alkaloid, terpenoid and tannin.

Method of research used experimental method, where this method is used to test the causality through manipulation of independent variable and the changes caused by the manipulation. Research stage : 1) Thin layer chromatography (TLC) and column chromatography. Then characterized using UV-Vis spectrophotometer and FTIR. 2) The test effect of polyphenol compound from *P. crocatum* extract in catfish maintenance through blood chemical and histological parameters in laboratory scale. Dosing of polyphenol (tannin) *P. crocatum* in African catfish (*C. gariepinus*) fish size 10-15 grams using a dose f 0.36 mg/kg, 1.08 mg/kg, and 1.80 mg/kg. Control (+) polyphenol compound 3 mg/kg and control (-) as compared by single dose injection. Blood biochemical and histological test conducted 72 hours post injection. Research data were analysed using ANOVA test.

Characteristic of *P. crocatum* polyphenols (tannin) based UV-Vis test showed polyphenol with wavelength 224 nm, 227 nm, 237 nm and 275 nm. FTIR test showed polyphenol compound with hydroxyl (OH), alkenyl (C-H), aromatic (C=O), para and meta, and carbonyl groups (C=C). Identification result compared with tannin standard. It can be concluded that the compound contained in fraction isolation *P. crocatum* is tannin (gallotanin). Result haematology data analysis by ANOVA test showed that the polyphenol injection significant effect on hematokrit, hemaglobin, glucose, BUN and alkali phosphatase (ALP). Cortisol hormone testing showed an increase in cortisol. Kidney histology testing showed necrosis, edema, and congestion at all dose polyphenol treatment, and control (+) with phenol injection 3 mg/kg. While in liver histology tests on all treatments showed necrosis and hypertrophy. The most toxic polyphenol dose based haematology and histology test was 1.8 mg/kg.



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	v
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	vi
UCAPAN TERIMAKASIH	vii
RINGKASAN	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Hewan Uji	6
2.1.1 Biologi Ikan lele	6
2.1.2 Habitat dan toksisitas	8
2.2 Tanaman Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i>)	9
2.2.1 Deskriptif Tanaman	9
2.2.2 Dinding sel daun	10
2.2.3 Kandungan kimia	11
2.3 Senyawa Fenol	14
2.3.1 Sifat dan karakteristik	14
2.3.2 Toksisitas Fenol	15
2.4 Ekstraksi	15
2.4.1 Ekstraksi Bahan Aktif	15
2.4.2 Pelarut	16
2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis	17
2.4.4 Kromatografi Kolom	18
2.4.5 Identifikasi senyawa	19
2.4.5.1 Spektrofotometer UV Vis	20
2.4.5.2 Spektrofotometri <i>infra red</i> (FT IR)	20
2.5 Uji Toksisitas Lethal	21
2.6 Parameter Biokimia Darah	22
2.6.1 Kadar Hemoglobin	22



2.6.2 Kadar Hematokrit.....	23
2.6.3 Kadar Nitrogen Urea Darah (BUN)	24
2.6.4 Enzim Fosfatase alkali (ALP)	24
2.6.5 Kadar Glukosa (Glu)	25
2.6.6 Hormon Kortisol	26
2.7 Parameter Histopatologi Ikan.....	27
2.7.1 Organ Hati Ikan.....	28
2.7.2 Organ Ginjal Ikan	29
III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	31
3.1 Landasan Teori.....	31
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	32
3.3 Kerangka Operasional Penelitian	34
3.4 Penelitian Terdahulu.....	36
IV. METODE PENELITIAN	37
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	37
4.2 Materi Penelitian	37
4.2.1 Hewan Uji.....	37
4.2.2 Media dan wadah pemeliharaan.....	37
4.2.3 Ekstrak Daun Sirih Merah.....	37
4.2.4 Alat.....	37
4.2.5 Bahan.....	38
4.3 Metodologi penelitian	38
4.3.1 Metode Penelitian	38
4.3.2 Rancangan Penelitian.....	39
4.3.3 Analisa Data.....	40
4.4 Prosedur Penelitian.....	41
4.4.1 Penelitian Tahap 1.....	41
4.4.1.1 Preparasi Sampel Daun Sirih	41
4.4.1.2 Ekstraksi fenolik daun sirih merah	42
4.4.1.3 Uji Fitokimia.....	43
4.4.1.4 Larutan Standar Galat.....	44
4.4.1.5 Pengukuran Absorbansi.....	45
4.4.1.6 Kromotografi Lapis Tipis (KLT) dan kolom.....	45
4.4.1.7 Identifikasi tannin dengan Spketrofotometer UV-Vis dan FTIR	47
4.4.2 Penelitian Tahap 2	47
4.4.2.1 Konsentrasi Lethal.....	48
4.4.2.2 Perlakuan Pemberian fenolik Ekstrak <i>P. crocatum</i>	48
4.5 Parameter Penelitian.....	49
4.5.1 Parameter Utama.....	49

xiii



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR

Halaman

1. Morfologi lele dumbo	7
2. Daun Sirih Merah	10
3. Dinding Sel Daun	11
4. Struktur kimia golongan flavonoid (rutin)	13
5. Struktur kimia golongan tannin (gallotanin)	14
6. Struktur fenol	14
7. Mekanisme toksik senyawa polifenol	22
8. Anatomi Lele dumbo	27
9. Hati lele terkena 70% fenol	29
10. Ginjal lele terkena 50% fenol	30
11. Kerangka Konsep	33
12. Diagram Alir Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Sirih Merah	34
13. Kerangka Operasional Penelitian	35
14. Denah Penelitian	40
15. Diagram Alir Pembuatan Serbuk Sirih Merah	42
16. Rerata total fenol dengan berbagai kondisi jenis daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	58
17. Persamaan regresi total fenol ekstrak daun sirih merah dengan berbagai perlakuan	59
18. Hasil KLT dari ekstrak metanol daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	61
19. Fraksi Hasil dari Kromatografi Kolom ekstrak daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	62
20. Identifikasi senyawa tannin pada fraksi 1 yang dibandingkan dengan standar tannin menggunakan UV –Vis	63
21. Pola Spektra Inframerah Fraksi Satu (1) Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (<i>P. croatum</i>)	64
22. Struktur kimia senyawa gallotanin	66
23. Rerata Hemoglobin Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi	



Polifenol <i>P. crocatum</i>	67
24. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah hemoglobin ikan lele dumbo	68
25. Rerata Hematokrit Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol <i>P. crocatum</i>	71
26. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah hematokrit ikan lele dumbo	72
27. Rerata Alkali Phosfatase (ALP) Ikan Lele Dumbo Pasca Injeksi Polifenol <i>P. crocatum</i>	74
28. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah Alkali Phosfatase (ALP) ikan lele dumbo	75
29. Rerata Nitrogen Urea Darah (BUN) Ikan Lele Dumbo Pasca Injeksi Polifenol <i>P. crocatum</i>	77
30. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah Nitrogen Urea Darah (BUN) ikan lele dumbo	78
31. Rerata Kadar Glukosa Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol <i>P. crocatum</i>	80
32. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan kadar glukosa ikan lele dumbo	81
33. Kadar Hormon Kortisol Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol <i>P. crocatum</i>	83
34. Histologi ginjal normal. Tanda panah No. 1. Tubulus distal (T); 2. Jaringan hematopoetik (JH). Mikroskop cahaya perbesaran 400x	85
35. Histopatologi Ginjal. (A) Ikan dengan injeksi polifenol <i>P. crocatum</i> dosis 0,36 mg/kg. (B) Ikan dengan injeksi polifenol <i>P. crocatum</i> dosis 1,08 mg/kg. (C) Ikan dengan injeksi polifenol <i>P. crocatum</i> dosis 1,80 mg/kg. (D) Ikan dengan injeksi fenol dosis 3 mg/kg. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Edema; 3. Kongesti. Mikroskop cahaya pembesaran 400x	87
36. Histologi hati normal. Tanda panah No. 1. Vena Sentralis (VS), 2. Sinusoid (S) . Mikroskop cahaya perbesaran 400x.	92

37. Histopatologi Hati. (A) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 0,36 mg/kg. (B) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,08 mg/kg. (C) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,80 mg/kg. (D) Ikan dengan injeksi fenol dosis 3 mg/kg. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Hipertropi. Mikroskop cahaya pembesaran 400x. 93



DAFTAR TABEL

TABEL

Halaman

1. Jenis-jenis Pelarut Untuk Ekstraksi Komponen Aktif	17
2. Urutan Kepolaran Eluen, Elusi Senyawa, dan Kekuatan Adsorben Dalam Kromatografi	19
3. Frekuensi inframerah khas pada golongan senyawa alam	21
4. Tabulasi Penelitian toksisitas Fenol dan daun sirih merah terhadap ikan	36
5. Rendemen Ekstrak <i>P. crocatum</i>	56
6. Hasil Skrining fitokimia daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	57
7. Hasil Spektrofotometer Ultraviolet Senyawa Aktif Fraksi satu (1) dan Standar tannin	63
8. Data Bilangan Pita Serapan Isolat dan Gugus Pada Fraksi Satu (1) <i>P. crocatum</i>	65
9. Rerata luasan pandang skoring kerusakan nekrosis pada Jaringan Ginjal Ikan Lele	87
10. Rerata luasan pandang skoring kerusakan edema pada Jaringan Ginjal Ikan Lele	89
11. Rerata luasan pandang skoring kerusakan kongesti pada Jaringan Ginjal Ikan Lele	90
12. Rerata luasan pandang skoring kerusakan nekrosis pada Jaringan hati Ikan Lele	94
13. Rerata luasan pandang skoring kerusakan hipertropi pada Jaringan hati Ikan Lele	95
14. Pengamatan Gejala Klinis Ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i> dan fenol	97
15. Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan ikan lele dumbo pra dan pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i> dan fenol	99



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN

Halaman

1. Hasil Uji Fitokimia Daun Sirih Merah (<i>P. crocatum</i>).....	115
2. Analisa Statistik Total fenol beberapa jenis daun sirih merah <i>P. crocatum</i>	117
3. Analisa Statistik Hemaglobin Lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i>	118
4. Analisa Statistik hematokrit Lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i>	119
5. Analisa Statistik ALP Lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i>	120
6. Analisa Statistik BUN Lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i>	121
7. Analisa Statistik Glukosa Lele dumbo pasca injeksi polifenol <i>P. crocatum</i>	122
8. Skoring Kerusakan Jaringan Ginjal Ikan lele.....	123
9. Skoring Kerusakan Jaringan Hati Ikan lele.....	124



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa Fenol dan polifenol adalah contoh bahan kimia beracun yang bertindak mengganggu sistem endokrin dan hormon. Senyawa ini juga memiliki potensi besar untuk mengganggu sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan kerentanan ikan terhadap infeksi sekunder (Writer *et al.*, 2010; Awachie and Ezenwaji., 1998). Senyawa ini ditemukan diperairan laut dan pada jaringan tubuh ikan (Mukherjee *et al.*, 1990). Senyawa ini bersifat toksisitas kronis dan immunotoxic (Taysse *et al.*, 1995), tetapi senyawa ini juga memiliki fungsi sebagai perlindungan terhadap kerusakan genetik atau kanker yang diinduksi oleh karsinogen (Stich, 1991). Limbah fenol terakumulasi dari berbagai kegiatan manusia seperti limbah industri, farmasi, pertanian bahkan proses alam seperti dekomposisi materi tanaman (Buikema *et al.*, 1979; Ali *et al.*, 2011).

Secara alami proses alam seperti dekomposisi materi tanaman sedikit banyaknya berkontribusi untuk akumulasi fenol dalam lingkungan air (Ali *et al.*, 2011). Buikema *et al.*, (1979) menambahkan residu fenol yang berasal dari limbah industri, farmasi dan lainnya senilai 96% sedangkan 4% berasal dari Dekomposisi alami dari tumbuhan seperti daun, batang atau akar. Jenis tumbuhan beraromatik memiliki kandungan senyawa polifenol, salah satunya adalah sirih merah. Tumbuhan ini berasal dari Peru, suku *Piperaceae* (Prihmantoro, 1997), habitatnya di daerah yang berhawa dingin. Di Indonesia tumbuhan tersebar di beberapa daerah seperti Aceh, Padang, Jawa Barat, Sulawesi dan beberapa daerah lainnya (Sudewo, 2010). Hasil penelitian Craft *et al.*, (2012) menginformasikan daun sirih merah menyimpan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tanin. Senyawa flavonoid dan tanin digolongkan senyawa yang bersifat polifenol, dimana senyawa flavonoid



mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon (Markham, 1982). Polifenol menjadi perhatian khusus karena memiliki efek toksisitas dalam lingkungan air, namun senyawa ini sulit dideteksi karena kurangnya rasa dan bau (Tilak et al., 2007). Emrizal et al., (2014) melaporkan aktivitas sitotoksik daun sirih merah pada artemia yang diujikan berdasarkan fraksi dan isolasi 2 senyawa memiliki nilai konsentrasi LC50 27.40 ± 2.6 ug/mL (metanol). Berdasarkan LC50 tersebut menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi senyawa sitotoksik. Dua senyawa terisolasi, diidentifikasi sebagai β -sitosterol dan 2-(5', 6'-dimetoksi-3', 4'-methylenedioxyphenyl)-6-(3'', 4'', 5''-trimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo [3,3,0] oktan.

Clarias gariepinus adalah salah satu ikan yang habitat atau lingkungan hidupnya adalah diperairan tawar seperti sungai, saluran irigasi, dan danau (Hernowo dan Suyanto, 2002). Ikan Lele dumbo beresiko terpapar bahan kimia di alam maupun dalam kegiatan budidaya dimana dalam kegiatan produksinya menggunakan air yang teresidu limbah fenol (James et al., 2008). Nazih et al., (2008) melaporkan di Mesir tingkat kandungan fenol pada air limbah adalah 0,05 ppm. Ikan *C. gariepinus* biasa digunakan sebagai hewan uji coba untuk mengamati mikroba, studi patologis atau lingkungan (Ibrahim et al., 2012). Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya secara in vivo secara injeksi pada LD 20 dan 50% ikan *C. Gariepinus* menunjukan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada kulit, insang, otak, hati dan ginjal. Sayangnya, sedikit informasi tentang toksikologi dan konsekuensi patologis di *C. gariepinus* yang terpapar senyawa polifenol akibat dekomposisi tanaman beraromatik disuatu perairan. Walaupun akhir-akhir ini penelitian tentang pengaruh senyawa fenol atau polifenol secara in vivo terhadap parameter darah ikan sudah ada, namun



belum ada informasi yang menyebutkan residu dan pengaruh senyawa polifenol

Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap toksisitasnya terhadap ikan lele.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui sejauh

mana pengaruh dari senyawa Polifenol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Secara In vivo Terhadap Parameter Biokimia Darah dan Histologi Ikan Lele

Dumbo (*Clarias gariepinus*).

1.2 Rumusan Masalah

Senyawa Fenol dan polifenol merupakan contoh bahan kimia beracun

yang bertindak sebagai pengganggu sistem endokrin. Senyawa ini juga memiliki

potensi besar untuk mengganggu sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan

kerentanan ikan terhadap infeksi sekunder. Fenol dibuang ke air dari limbah dari

berbagai industri cat, farmasi, industri resin, tekstil, dan petrokimia. Namun

proses alam seperti dekomposisi tumbuhan juga berkontribusi untuk akumulasi

fenol dalam lingkungan air (Buikema *et al.*, 1979; Ali *et al.*, 2011). Terkait hal

tersebut daun sirih merah merupakan tumbuhan yang beraromatik sehingga

terkandung senyawa-senyawa polifenol. Sedangkan berdasarkan penelitian

Roche dan Boge (1996) melaporkan bahwa senyawa polifenol secara in vivo

pada ikan dapat mempengaruhi tingkat stres dan keracunan pada ikan yang

dilihat dari parameter darah dan jaringan. Dari uraian tersebut, pemberian fraksi

polifenol *Piper crocatum* secara in vivo pada ikan masih memerlukan beberapa

kajian, hal tersebut meliputi :

1. Apakah dengan berbagai kondisi (kering, layu dan segar) daun sirih

merah (*P. crocatum*) berpengaruh terhadap nilai total fenol yang

dihasilkan.



2. Jenis senyawa polifenol apa yang terdapat pada *Piper crocatum* dengan metode maserasi, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom.

3. Apakah pemberian senyawa polifenol (tanin) dengan konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap toksisitas melalui parameter biokimia darah yaitu Efek metabolik Pengukuran BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol dan Glukosa; dan pengukuran hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht/PVC); dan parameter histologi pada jaringan ginjal dan hati.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh Pemberian Senyawa polifenol (tanin) Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Secara In vivo Terhadap Studi Biokimia Darah dan Histologi Pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*).

1. Mengetahui nilai total fenol terbaik pada beberapa jenis daun sirih merah (*P. crocatum*)
2. Mengisolasi dan karaktersitik kandungan senyawa polifenol (tanin) *Piper crocatum* dengan metode maserasi, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom.
3. Mengetahui apakah senyawa polifenol (tanin) dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap toksisitas melalui parameter biokimia darah yaitu Efek metabolik Pengukuran BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol dan Glukosa; dan Efek erythrotoxic pengukuran hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht/PVC); dan parameter histologi pada jaringan ginjal dan hati.



1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh toksisitas senyawa polifenol (tanin) *P. crocartum* terhadap parameter biokimia darah dan histologi ikan lele yaitu Efek metabolik Pengukuran BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol dan Glukosa; dan Efek erythrotoxic pengukuran hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht/PVC); dan jaringan organ hati dan ginjal yang dicobakan secara *in vivo*.

1.5 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah :

- H1 : Apakah kondisi (kering, layu dan segar) daun sirih merah (*P. crocatum*) berpengaruh terhadap nilai total fenol yang dihasilkan?
- H2 : Bagaimana isolasi senyawa polifenol *Piper crocatum* melalui metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom?
- H3 : Apakah senyawa polifenol (tanin) *P. crocatum* berpengaruh terhadap toksisitas melalui parameter biokimia darah yaitu Efek metabolik Pengukuran BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol dan Glukosa; dan Efek erythrotoxic pengukuran hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht/PVC); serta parameter Histologi organ ginjal dan hati ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*)?



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Uji

2.1.1 Habitat dan toksisitas

Habitat hidup lele adalah air tawar, dapat bersumber seperti air sungai, air tanah dan air sumur (Hernowo dan Suyanto, 2002). Ikan Lele dumbo, beresiko terpapar bahan kimia di alam maupun dalam kegiatan budidaya dimana dalam kegiatan produksinya menggunakan air yang teresidu limbah fenol (James *et al.*, 2008). Nazih *et al.*, (2008) melaporkan di Mesir tingkat kandungan fenol pada air limbah adalah 0,05 ppm. Ikan *C. gariepinus* biasa digunakan sebagai hewan uji coba untuk mengamati mikroba, studi patologis atau lingkungan (Ibrahim *et al.*, 2012). Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya secara *in vivo* pada LD 20 dan 50% ikan *C. Gariepinus* menunjukkan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada kulit, insang, otak, hati dan ginjal.

2.2 Tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum*)

2.2.1. Deskriptif Tanaman

Di Indonesia tanaman ini secara tradisional digunakan sebagai obat herbal untuk pengobatan orang diabetes dan untuk pencegahan penyakit jantung koroner, terutama di Batusangkar, Sumatera Barat. Tanaman ini dikonsumsi dengan maserasi dalam segelas air panas dan frekuensi konsumsi dua kali sehari (Emrizal *et al.*, 2014).



2.2.2. Kandungan kimia

Dalam genus Piperaceae, 677 senyawa berbeda telah diisolasi dari 112 spesies. Mereka ditemukan 190 alkaloid/amida, 49 lignan, 70 neolignans, 97 terpen, 39 fenilpropanoid, 15 steroid, 18 kavapyrones, 17 chalcones / dihydrochalcones, 16 flavon, flavanon 6, 4 piperolides (cinnamylidone butenolides) dan 146 senyawa lain-lain yang tidak masuk ke dalam kelompok besar umum metabolit sekunder (Dyer *et al.*, 2004).

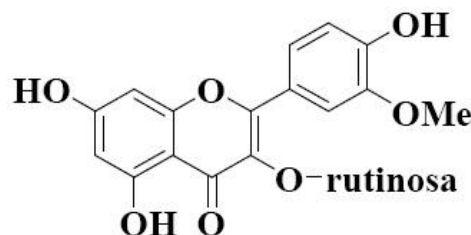
a. Flavonoid

Istilah flavonoid diambil dari satu golongan besar senyawa yang paling umum, yaitu flavan. Senyawa flavan ini terbentuk akibat adanya ikatan yang terjadi pada oksigen di posisi *orto* cincin A dengan C-3 yang membentuk cincin baru C. Senyawa flavan adalah bentuk oksidasi pada cincin C dengan tingkat oksidasi yang paling rendah.

Beragamnya senyawa flavonoid ini bukan disebabkan oleh beragamnya struktur tetapi lebih disebabkan kepada tingkat reaksi penambahan (atau pengurangan) hidroksilasi, metilasi, isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid, alkoksilasi, metilenasi gugus *ortodihidroksil*, dimerisasi (untuk menghasilkan biflavonoid) dan yang terpenting glikosilasi gugus hidroksil (untuk menghasilkan flavonoid O-glikosida). Senyawa flavonoid juga dapat dalam bentuk lebih dari 1 kerangka flavonoid, disebut juga poliflavonoid. Senyawa yang umum ditemukan adalah dalam bentuk biflavonoid yang terdiri atas 2 unit kerangka flavonoid. Senyawa biflavonoid tersebar pada Gymnospermae (kecuali Pinaceae dan Gnetales), senyawa ini juga terdapat pada beberapa Angiospermae, seperti pada *Casuarina sticta* Alt. Pada tumbuhan rendah seperti *Selaginella tamariscina* juga mengandung senyawa biflavonoid, misalnya amentoflavon. Salah satu senyawa



flavonoid yaitu senyawa rutin yang merupakan senyawa yang diisolasi dari daun *manihot utilissima* dengan struktur seperti terlihat dalam **Gambar 4.** dibawah ini (Markam, 1982).



Gambar 4. Struktur kimia Golongan Flavonoid (rutin) (Markam, 1982).

2.4 Ekstraksi Maserasi

2.4.1 Ekstraksi Bahan Aktif

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai sifat senyawa terlarut. Ekstraksi diharapkan tercapai apabila terjadi kesetimbangan antara senyawa dipelarut dengan konsentrasi dalam sel tumbuhan atau hewan. Houghton dan Raman (1998) menambahkan ada metode umum ekstraksi dapat berupa *supercritical fluid extraction*, distilasi, sublimasi dan yang pada umumnya dan mudah dilakukan adalah ekstraksi dengan bahan pelarut tertentu (maserasi). Ghavidel *et al.*, (2015) menginformasikan maserasi memiliki kelebihan namun ada juga kekurangannya karena dalam prosesnya akan membutuhkan pelarut yang banyak dan waktu yang cukup lama dalam prosesnya.

Metode Maserasi akan berhasil tergantung pada jenis pelarut yang dipilih yaitu berdasarkan kemampuan melarutkan senyawa tertentu yang terdapat pada bahan.

Pelarut yang digunakan diharapkan dapat melarutkan zat yang diinginkan tanpa



mengikut sertakan unsur-unsur yang tidak diperlukan (Achmadi, 1992). Khopkar (1990) menambahkan metode maserasi berdasarkan pelarut artinya senyawa terlarut yang bersifat polar akan terlarut oleh pelarut yang bersifat polar dan begitu juga pada senyawa semi polar dan non polar.

2.4.2 Pelarut

Salah satu faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak tumbuhan adalah pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Pemilihan pelarut didasarkan pada kemampuannya melarutkan ekstrak yang diinginkan saja serta mempunyai kelarutan yang besar (Guenther, 1987; Gaedcke *et al.*, 2003).

Jenis-jenis pelarut yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi senyawa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis-jenis Pelarut untuk Ekstraksi Komponen Aktif

Etanol	Metanol	Klorofom	Eter	Aseton
Tanin	Antosianin	Terpenoid	Alkaloid	Flavonol
Polifenol	Terpenoid	Flavonoid	Terpenoid	
Poliasetilen	Saponin		Coumarin	
Flavonol	Tanin		Asam lemak	
Terpenoid	Xanthosillin			
Sterol	Totarol			
Alkaloid	Quassinoid			
Propolis	Lakton			
	Flavon			
	Phenone			
	Polifenol			

Sumber : Kusumaningtyas (2008)

2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis

KLT dapat menggunakan banyak jenis pelarut dibandingkan KKT, dalam pengemban KLT memiliki ruang gerak yang luas dibandingkan pelarut yang akan digunakan. Pengukuran R_f di KLT dapat ditentukan dengan R_f baku atau standar



namun memiliki kelemahan dengan waktu yang cukup lama dalam prosesnya (Harbone, 1987). Dalam proses menentukan eluen kromatografi kolom, KLT merupakan metode alternatif untuk mengisolasi senyawa murni dengan skala yang sedikit. Bahan yang terdapat pada KLT berupa silika gel yang memiliki sifat tidak bereaksi dengan bahan-bahan pereaksi salah satunya adalah asam sulfat (Tyson, 1988).

2.4.4 Kromatografi Kolom

Komatografi kolom merupakan pemisah dari fase diam (zat padat) dengan fase gerak (pelarut) melalui proses dialiri (Sastrohamidjojo, 2007). Prinsip kerja kromatografi kolom yaitu pada fase diam dengan menahan komponen tunggal, kemudian pada fase gerak eluen mengalir sehingga senyawa akan pindah terbawa oleh eluen sesuai dengan sifat pelarutnya. Setelah proses akan dihasilkan fraksi-fraksi, setiap fraksi memiliki kandungan senyawa yang berbeda-beda (Rahimah *et al.*, 2013).

2.4.5 Identifikasi Senyawa

Identifikasi golongan senyawa bioaktif bergantung pada pengukuran sifat dan ciri lain yang dibandingkan dengan data standard dan literatur. Senyawa yang pernah diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan data spektrum Sinar Ultraviolet (UV-Vis) dan Spektrofotometri *infra red* (FTIR) (Harborne, 1996).

2.4.5.1. Spektrofotometer UV Vis

Spektrofotometer Sinar Ultraviolet (UV-Vis) mengukur panjang gelombang pada kisaran di sistem kimia dalam menghasilkan energi cahaya. Panjang gelombang sinar UV dan panjang gelombang tampak yakni kisaran 200 hingga



400 nm dan 400-750 nm (Rohman, 2007). Ginandjar *et al.*, (2011) menambahkan bahwa Panjang gelombang sinar UV berkisar 200-400 nm.

Radiasi sinar tampak dan ultraviolet yang terabsorpsi molekul organik pada senyawa aromatik molekul elektron π terkonjugasi dan atau suatu atom yang terdapat elektron n , membuat transisi pada elektron dari tingkatan energi elektron rendah ke tingkatan yang lebih tinggi dalam membentuk garis spectrum (Satiadarma, 2002). Spektrofotometer dapat mengetahui panjang absorpsi dan gelombang pada sampel, dengan begitu dapat mengetahui karakteristik pada ekstrak yang diuji. Spektrofotometer menganalisa berdasarkan warna tertentu, maka warna komplementernya merupakan bagian panjang gelombang (Apriyantono, *et al.*, 1989).

2.4.5.2. Spektrofotometri *infra red* (FT IR)

Spektrofotometri *infra red* adalah alat untuk mengidentifikasi ikatan dalam suatu senyawa. Proses menentukan suatu gugus fungsional maka harus diketahui ikatan suatu kovalen ada atau tidak, dalam hal ini contoh senyawa tertentu terdapat ikatan O-H sehingga senyawa tersebut dapat digolongkan senyawa alkohol (ROH) atau fenolik (AROH) (Fessenden and Fessenden, 1997).

FTIR biasa digunakan dalam mengukur spektrum inframerah dari suatu senyawa. Daerah spektrum inframerah diatas 1.200 cm^{-1} dapat menggambarkan pita hasil getaran dari molekul. Pita khas dari FTIR terekam pada skala seperti : L (Lemah), M (Menengah), K (Kuat), SK (Sangat Kuat) (Harbone, 1987)

Frekuensi inframerah terhadap beberapa golongan senyawa dapat dilihat pada Tabel 3.



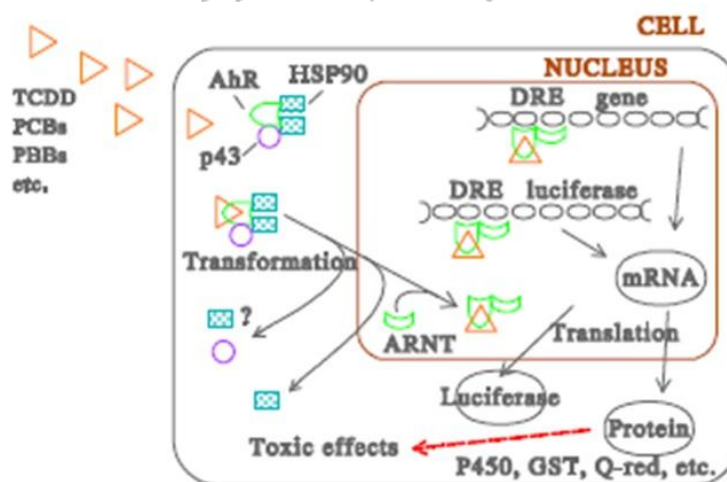
Tabel 3. Frekuensi inframerah khas pada golongan senyawa alam

No	Golongan	Pita Khas diatas 1200 cm ⁻¹
1	Alkana	2940 (K), 2860 (M), 1455 (K), 1380 (M)
2	Alkena	3050 (L-M), 1850 (L), 1650 (L-M), 1410 (L)
3	Senyawa Aromatik	3050 (L-M), 210-1700 (L), 1600, 1580, 1500 (L-M)
4	Alkohol dan Fenolik	3610 (L-M), 3600-2400 (L), 1410 (M)
5	Aldehida dan Keton	2750 (L), 2680 (L), 1820-1650 (K), 1420 (L-M)
6	Asam Karboksilat	3520 (L), 3400-2500 (M), 1760 (K), 1710 (K)

Sumber : Harbone, (1987)

2.5 Uji Toksisitas Lethal

Mekanisme toksik suatu senyawa sebagai contoh polifenol akan bekerja dengan merusak membran sitoplasma secara total dengan mengendapkan protein sel. Ah receptor (AhR) dapat mengikat ligan seperti senyawa polifenol, HK aromatik polisiklik atau dioksin (Madigan, 2005). Proses toksis senyawa polifenol dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Mekanisme toksik senyawa polifenol (Madigan, 2005)

2.6 Parameter Biokimia Darah

Komponen darah serta kelainan bentuk dan fungsional dari sel darah dipelajari di hematologi. Terjadinya kelainan bentuk sel darah bahkan ke fungsinya terkait



adanya respon ikan terhadap lingkungan dan kondisi tersebut dijadikan indikator.

Berdasarkan pengelompokannya darah ikan darah ikan terdiri dari sel dan plasma.

Komponen-komponen plasma terdiri dari bahan organik dan fibrinogen yang memiliki peran dalam proses metabolisme (Fujaya, 2004)

2.6.1 Kadar Hemoglobin

Hamoglobin (Hb) adalah plasma darah yang berperan dalam peredaran gas oksigen dari insang yang dipompakan jantung ke sel dan organ tubuh ikan, dan dalam peredaran nutrient ke dalam sel. Wahjuningrum *et al.*, (2008) menambahkan bahwa jumlah Hb rendah mengindikasikan bahwa ikan dalam keadaan sakit sedangkan dalam kondisi tinggi mengindikasikan ikan dalam keadaan stress.

Umumnya kadar Hb ikan lele dumbo yang sehat berkisar antara 12-14 Hb/100 ml darah. Pada ikan yang normal, jumlah sel darah merah berkisar antara $1.05 - 3.00 \times 10^6$ sel/mm³ darah (Robert, 1978), Sel darah merah ikan berkisar antara 20.000-3.000.000 sel tiap mm³ darah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Well *et al.* (2005), pada ikan salmon catfish *Arius leptaspis* dan ikan tarpon *Megalops cyprinoides*, didapat hasil bahwa pada ikan Tarpon yang dapat mengambil oksigen langsung dari udara memiliki jumlah sel darah merah yang lebih tinggi.

2.6.2 Kadar Hematokrit

Hematokrit merupakan volume sel-sel darah dibandingkan dengan plasma darah yang dinyatakan dalam prosentase. Kadar hematokrit dapat digunakan untuk menunjukkan kesehatan ikan (Hastuti *et al.*, 2003). Menurut Bastiawan *et al.* (1995) bahwa hematokrit ikan lele dumbo yang normal berkisar 30,8-45,5%.



Nilai hematokrit standar adalah sekitar 45%, namun nilai ini dapat berbeda-beda tergantung species. Nilai hematokrit biasanya dianggap sama manfaatnya dengan hitungan sel darah merah total (Frandsen, 1992). Wahjuningrum, et al., (2008) menambahkan nilai hematokrit dibawah 30% mengindikasikan ikan mengalami infeksi oleh patogen.

2.6.3 Kadar Nitrogen Urea Darah (BUN)

Nitrogen urea darah merupakan nilai serum (plasma urea) yang terkandung nitrogen. Kondisi terjadinya peningkatan maupun penurunan kadar BUN dikaitkan dengan kondisi ginjal yang tidak normal atau gagal ginjal. Kondisi yang cukup parah berupa hemodialisis dilakukan agar urea dan produk akhir metabolisme dari dalam darah mengalami penurunan. Kondisi reaksi tersebut berlangsung siklus urea yang terdapat pada mitokondria (George et al., 1999). Ringkasan reaksi siklus urea adalah sebagai berikut:



Roche and Boge, (2000) melaporkan bahwa nilai BUN ikan *Dicentrarchus labrax* yang diinjeksi dosis tunggal dan fraksi NaCl sebagai kontrol memiliki nilai berkisar 90-120 mg/L.

2.6.4 Enzim Alkali Fosfatase (ALP)

Enzim Fosfatase alkali (ALP) merupakan katalisator untuk mengendapkan unsur-unsur kalsium dan fosfor dalam pembentukan tulang. Enzim ini merupakan enzim hirolase dimana tempat diproduksi adalah epitel hati dan osteoblast (sel-sel pembentuk tulang baru). Roche and Boge, (2000) melaporkan bahwa nilai ALP



ikan *Dicentrarchus labrax* yang diinjeksi dosis tunggal dan fraksi NaCl sebagai kontrol memiliki nilai berkisar 30-60 U/L.

2.6.5 Kadar Glukosa (Glu)

Didalam darah terdapat zat glukosa, glukosa ini gunanya untuk dibakar agar mendapatkan kalori atau energi. Sebagian glukosa yang ada dalam darah adalah hasil penyerapan dari usus dan sebagian lagi dari hasil pemecahan simpanan energi dalam jaringan (Bastiawan *et al.*, 1995). Dalam keadaan normal, tubuh ikan mempertahankan kadar glukosa antara 70-110 mg/dL (Subandiono *et al.*, 2003). Heath (1987) menambahkan bahwa kadar glukosa darah pada ikan lele dumbo dalam kondisi normal berkisar antara 41-150 mg/dL.

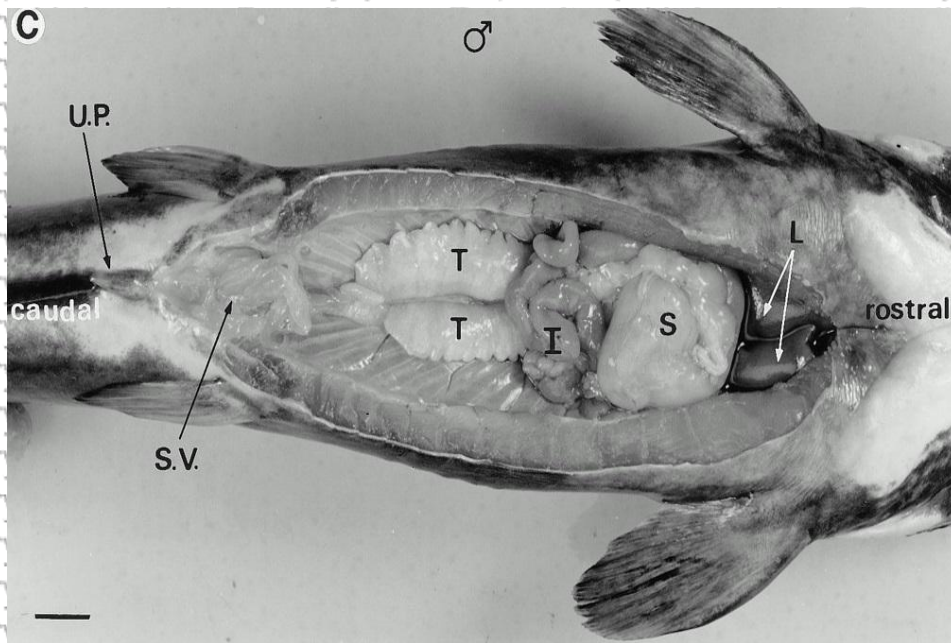
2.6.6 Hormon Kortisol

Hormone kortisol merupakan hasil sekresi kelenjar endokrin, dimana kelenjar-kelenjar endokrin menyusun sistim endokrin yang memiliki fungsi mengatur kerja proses fisiologis tubuh. Sistim endokrin mengontrol respon stres dengan melepaskan hormone kortisol dan katekolamin. Stres didefinisikan sebagai sejumlah respon fisiologis yang terjadi pada saat hewan berusaha mempertahankan homeostatis (Barton, 1987). Roche and Boge, (2000) melaporkan bahwa nilai kortisol ikan *Dicentrarchus labrax* yang diinjeksi dosis tunggal dan fraksi NaCl sebagai kontrol memiliki nilai berkisar 110-150 ng/ml. Varadarajan *et al.*, (2014) menambahkan bahwa nilai kontrol kortisol ikan *Oreochromis mossambicus* memiliki nilai berkisar 23-25 µg/dl.



2.7 Parameter Histopatologi Ikan

Histologi merupakan parameter yang penting untuk menentukan perubahan jaringan (Dutta, 1996). Anatomi ikan lele dumbo dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Anatomi lele dumbo. T, testis; SV, vesikula seminalis; UP, papilla urogenital; S, perut; I, usus; L, lobus hati (bar = 3 cm). (Eduardo et al., 1998)

Nekrosis menggambarkan kondisi sel mengalami kerusakan yang mengalami kematian. Terjadinya kematian sel dapat disebabkan pemaparan senyawa atau bahan kimia yang dapat menyebabkan rusaknya dinding sel hingga inti sel dan sitoplasma akan sangat mengecil dan pecah. Pengamatan melalui biota disuatu perairan yang terpapar konsentrasi bahan racun untuk mengetahui tingkat pencemaran di dalam lingkungan perairan (Banks, 1986).

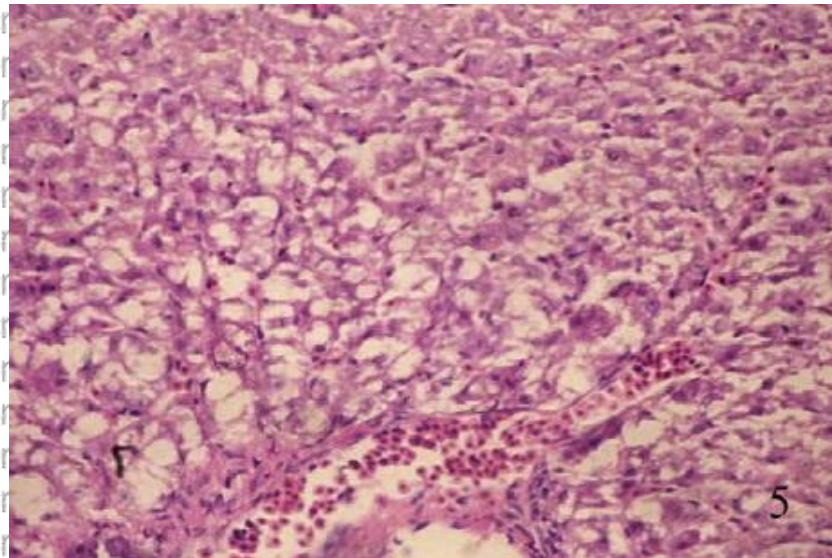
2.7.1 Organ Hati Ikan

Hati merupakan organ yang berfungsi mensintesis nutrisi yang terserap dan sebagai pembuangan limbah dari darah (Subandiyono dan Hastuti, 2010). Ibrahim,



(2012) melaporkan dalam risetnya secara in vivo pada LD 20 dan 50% ikan *C. Gariepinus* menunjukkan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada hati setelah dipapar senyawa fenol. Nekrosis pada hati ikan lele dapat dilihat pada

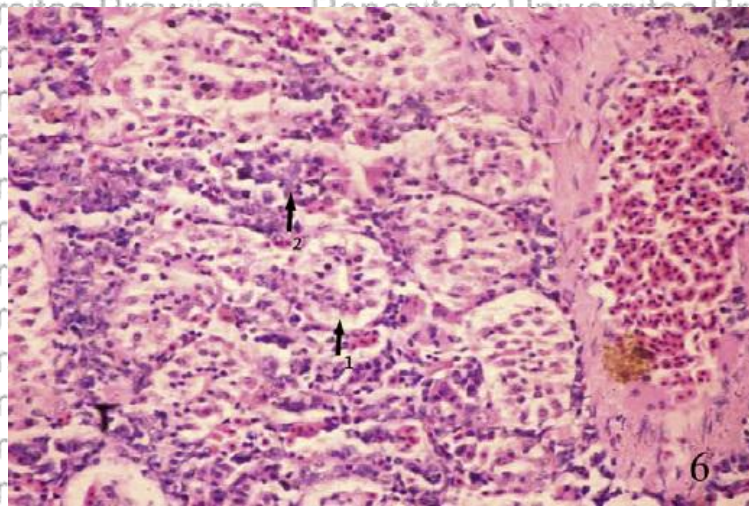
Gambar 9.



Gambar 9. Hati lele dumbo terkena 70% fenol dari LC50 menunjukkan degenerasi vacuolar dengan penyumbatan sinusoid (Perbesaran 400x) (Ibrahim, 2012).

2.7.2 Organ Ginjal Ikan

Ginjal berperan mengekskresi metabolisme dan pencernaan serta sebagai tempat penyimpanan. Organ ginjal dapat mengekskresi bahan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh seperti senyawa yang bersifat toksik. (Erlangga, 2007). Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya secara in vivo pada LD 20 dan 50% ikan *C. Gariepinus* menunjukkan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada ginjal setelah dipapar senyawa fenol. Nekrosis pada ginjal ikan lele dapat dilihat pada **Gambar 10.**



Gambar 10. Jaringan ginjal lele dumbo terkena LD 50% fenol dari LC50 menunjukkan degenerasi hidropik (panah 1) dan nekrosis (panah 2) (Perbesaran 400x) (Ibrahim, 2012)



III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Pabrik industri, domestik dan kegiatan pertanian menyebabkan kontaminan racun terhadap lingkungan perairan (Ololade and Oginni, 2010).

Bahan kimia beracun mengganggu integritas lingkungan air dan mempengaruhi hewan air (Abel, 1996). Limbah fenol terakumulasi dari berbagai kegiatan manusia seperti limbah industri, farmasi, pertanian bahkan proses alam seperti dekomposisi materi tanaman (Buikema et al., 1979; Ali et al., 2011). Secara alami proses alam seperti dekomposisi materi tanaman sedikit banyaknya berkontribusi untuk akumulasi fenol dalam lingkungan air (Ali et al., 2011). Jenis tumbuhan beraromatik memiliki kandungan senyawa fenolik, salah satunya adalah sirih merah. Hasil penelitian Craft et al., (2012) menginformasikan daun sirih merah menyimpan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tannin. Beberapa tahun ini dilakukan penelitian tentang pengaruh senyawa fenol atau fenolik secara in vivo terhadap ikan sudah ada.

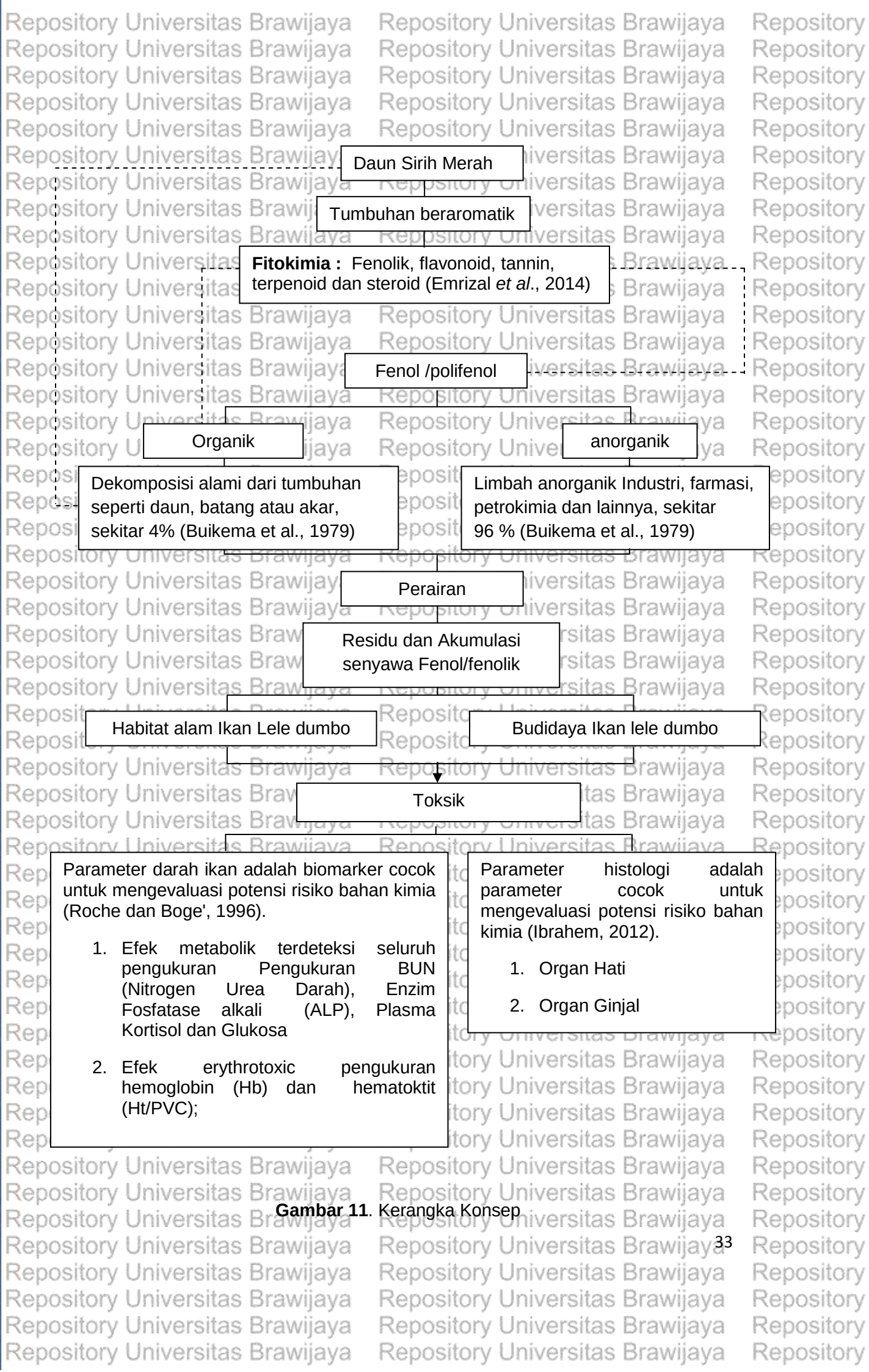
Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya terjadi perubahan degeneratif dan nekrosis pada jaringan kulit, insang, otak, hati dan ginjal pada ikan lele dumbo yang terpapar senyawa fenolik dengan nilai mean $\pm$ SE adalah $4,3 \pm 0,05$ ppm (dosis 20%) dan $6,65 \pm 0,05$ ppm (50%). Roche and Boge, (2000) melaporkan hal yang sama dalam risetnya secara in vivo OH-phenol terhadap ikan *Dicentrarchus labrax* menunjukkan gangguan dalam indikator metabolik seperti hipoglikemia, rendahnya tingkat nitrogen urea darah (BUN) dan penurunan aktivitas alkali fosfatase (ALP). Varadarajan et al., (2014) menambahkan dalam risetnya secara in vivo memaparkan senyawa fenolik pada ikan *O. mossambicus* menunjukkan terjadinya stres dalam metabolik, merusak



fungsi branchial dan cenderung menginduksi kerusakan jaringan ikan. Semua riset secara in vivo tersebut memaparkan senyawa fenolik sebagai toksisitasnya namun belum ada informasi yang menyebutkan residu dan pengaruh dari dekomposisi tumbuhan beraromatik dalam hal ini senyawa fenolik (tannin) dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap toksisitasnya terhadap ikan lele secara in vivo.

3.2 Kerangka Konsep

Berdasarkan landasan teori yang telah dijelaskan, maka pemberian fraksi polifenol dari daun sirih merah harus diperhatikan terkait dengan sifat toksisitas senyawa fenolik. Pada penelitian ini dipelajari pengaruh senyawa fenolik (tannin) dari bahan alami *P.crocatum* terhadap parameter biokimia darah dan histopatologi secara in vivo pada ikan Lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Kerangka konseptual dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Kerangka Konsep



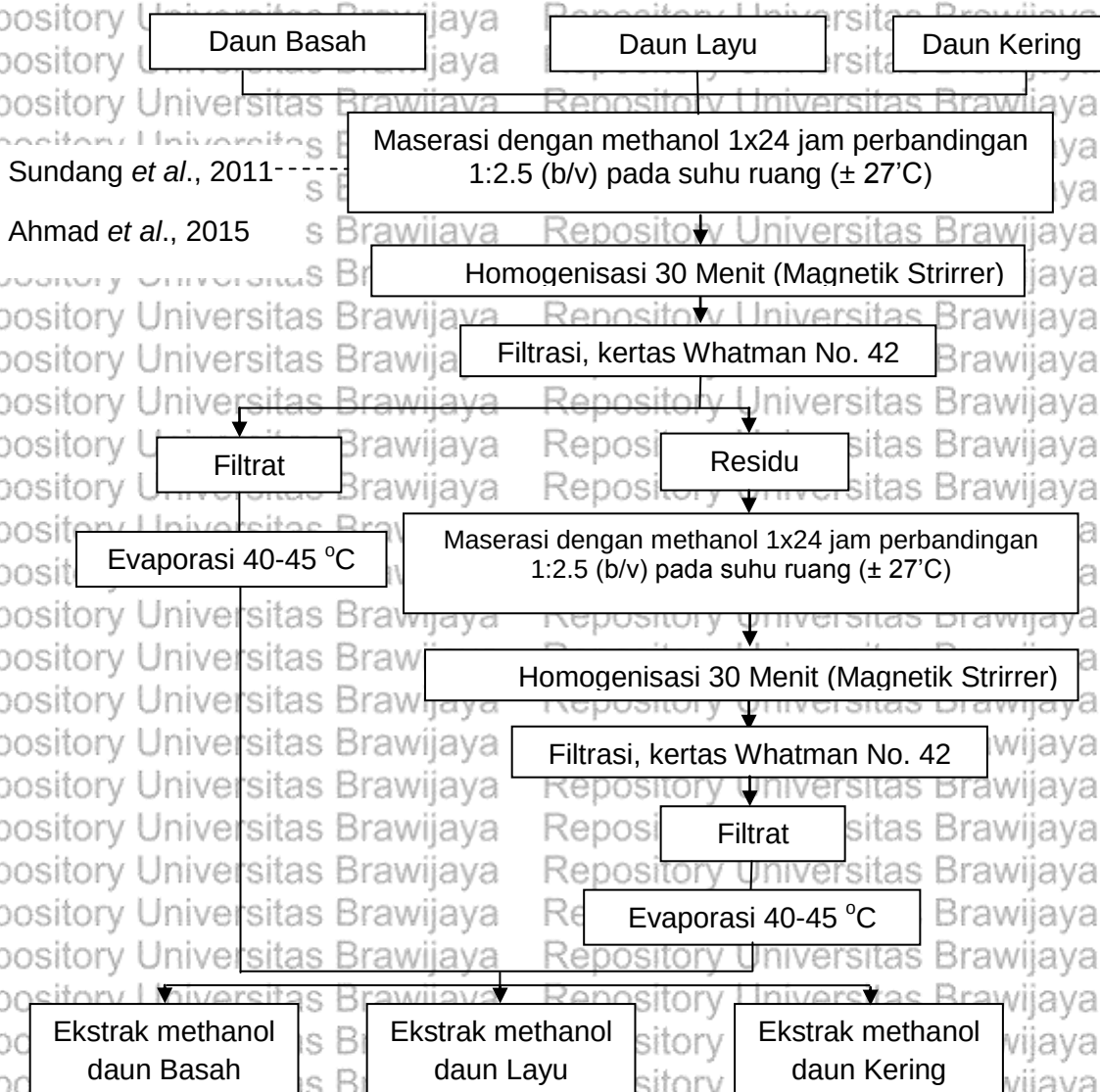
3.3 Kerangka Operasional Penelitian

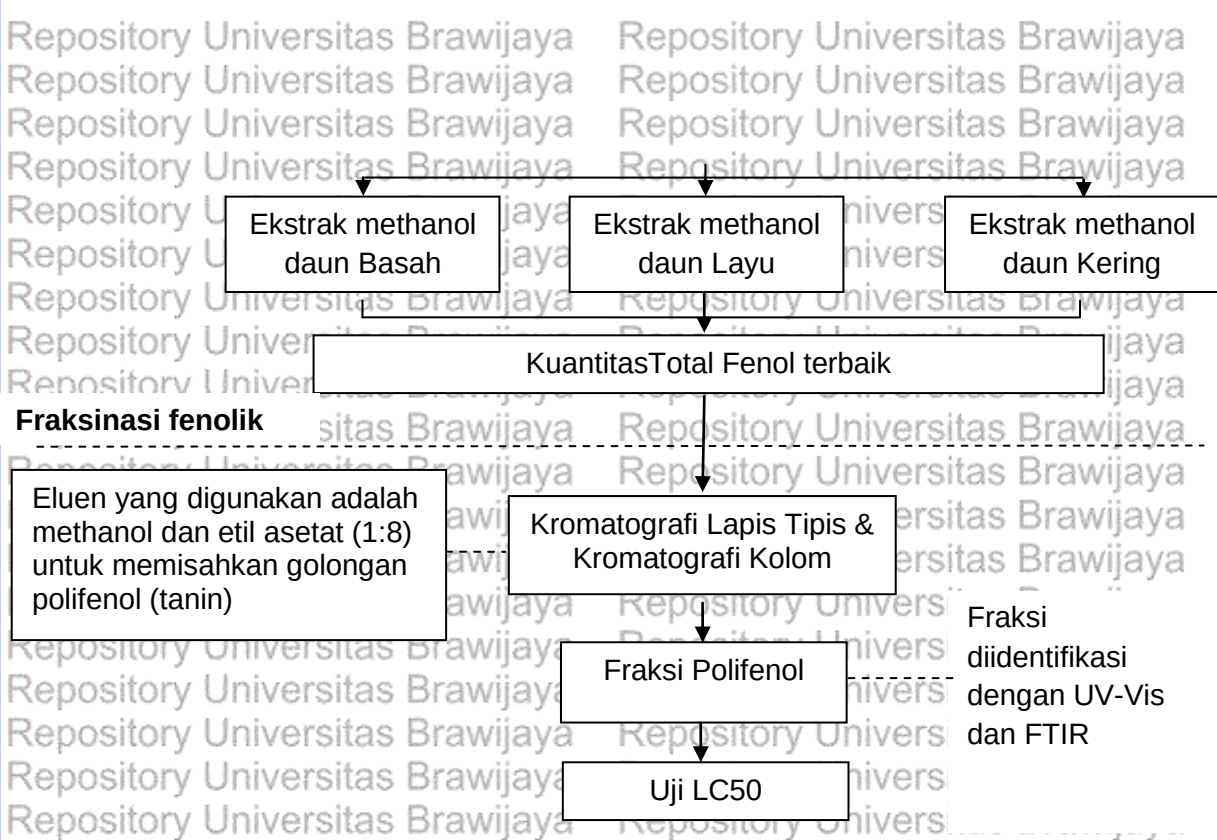
Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah metode yang digunakan untuk menguji hubungan sebab akibat melalui pemanipulasian variabel independen (Subana dan Sudrajat, 2005).

Penelitian ini terbagi atas 2 tahapan sebagai berikut:

a. Tahap 1

Ekstraksi kasar *P. crocatum* dengan metode maserasi (modifikasi Sundang et al., 2011 dan Ahmad et al., 2015) kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi kolom (Metode Bigoniya dan Singh 2014; Vasconcelos et al., 2010) Dapat dilihat pada **Gambar 12**.

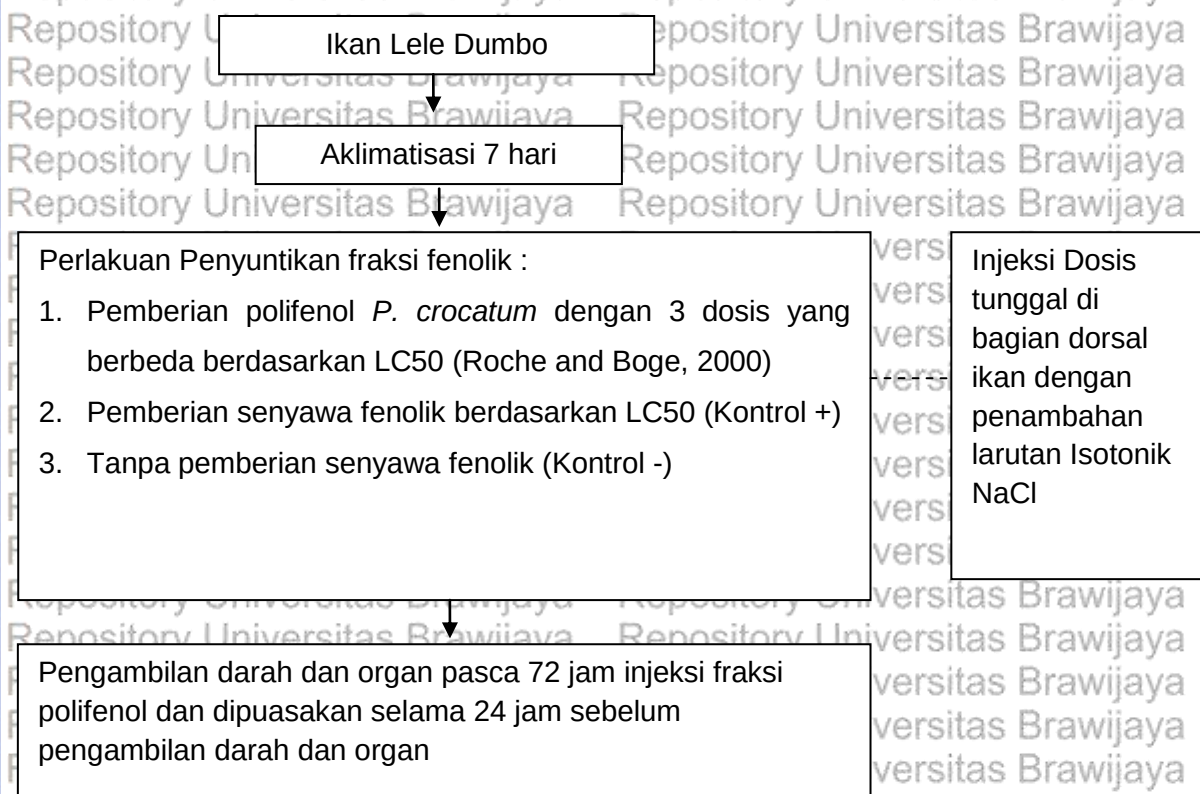




Gambar 12. Diagram Alir Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Sirih Merah

b. Tahap 2

Uji pengaruh senyawa golongan polifenol ekstrak *P. crocatum* pada pemeliharaan ikan lele terhadap stress melalui parameter biokimia darah dalam skala laboratorium. Dapat dilihat pada **Gambar 13.**



Pengambilan darah dan organ pasca 72 jam injeksi fraksi polifenol dan dipuasakan selama 24 jam sebelum pengambilan darah dan organ

Parameter darah ikan adalah biomarker cocok untuk mengevaluasi potensi risiko bahan kimia (Roche dan Boge', 1996).

1. Efek metabolik terdeteksi seluruh pengukuran Pengukuran BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol dan Glukosa
2. Efek erythrotoxic pengukuran hemoglobin (Hb) dan hematokrit (Ht/PVC);

Parameter histopatologi adalah parameter cocok untuk mengevaluasi potensi risiko bahan kimia (Ibrahim, 2012).

1. Organ Hati
2. Organ Ginjal

Gambar 13. Kerangka Operasional Penelitian

3.4 Penelitian Terdahulu

Tabel 4. Tabulasi Penelitian toksisitas Fenol dan daun Sirih Merah terhadap ikan

No	Judul	Tahun	Peneliti
1	Cytotoxic Activities of Fractions and Two Isolated Compounds from Sirih Merah (Indonesian red betel), <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav	2014	Emrizal, Armon, F., Riska, Y., Kamal, R., Nola, R.I., Adriani S., Reni, Y., Farediah A., Hasnah M.S., Dayar A
2	In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	2000	He'le'ne Roche, Ge'rrard Boge



IV. METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Desember 2015 – Maret 2016 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan (FPIK), Laboratorium Mikrobiologi (FPIK Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Kimia UIN Malik Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan lele dumbo (*C. garipienus*) dengan size 10-12 gram sebanyak 10 ekor/wadah pemeliharaan. Ikan Lele diperoleh dari Kepanjen, Jawa Timur.

4.2.2 Media dan Wadah Pemeliharaan

Media yang digunakan adalah air tawar dan wadah yang digunakan adalah akuarium yang berukuran 30 x 30 x 30 cm dengan volume air tawar 25 liter dengan kepadatan 10 ekor serta diberi aerasi.

4.2.3 Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Daun sirih merah (*P. crocatum*) dengan lebar daun $\pm$ 10-15 cm didapat dari Jogjakarta, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan untuk maserasi, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom berupa Metanol, etil asetat dan air.

4.2.4 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi thermometer, DO meter, pH meter, akuarium, aerator, coolbox, blender, lemari pendingin, satu set alat bedah, tabung falcon, rotary evaporator vacuum, hot plate, mikropipet, magnetic stirrer, oven, timbangan analitik, gelas ukur (10 ml, 50 ml dan 250ml), corong,



spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spuit suntik 1 ml, pipa kapiler, cawan petri, jarum ose, bunsen, pipet volume, pipet tetes, spektrofotometer, erlenmeyer (250 ml, 500 ml dan 1000 ml), beaker glass (500 ml dan 1000 ml), autoclave, incubator, tabung effendorf, spuit, pipet thoma leukosit, mikrosentrifuge, haemocytometer, objek glass, cover glass, mikroskop cahaya, handtally counter, Mikroctome, alat bedah, automatic tissue processor, tissue embedding machine, Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR.

4.2.5 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fenol (C_6H_5OH), Metanol, etil asetat, Larutan Isotonik NaCl, aquades steril, kapas, tissue, kertas saring 42, kertas label, aluminium foil, cotton swap, asam galat, reagen follin ciocalteu, larutan hayem, larutan giemsa, anti koagulan (Na-sitrat 3,8%), formalin, hematoxilin, sampel darah ikan lele dumbo dan organ ginjal serta hati.

4.3 Metodologi Penelitian

4.3.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, dimana metode ini digunakan untuk menguji hubungan sebab akibat melalui pemanipulasian variabel independent dan perubahan-perubahan yang diakibatkan oleh pemanipulasian tersebut (Subana dan Sudrajat, 2005). Singarimbun dan Effendi (1983), menambahkan penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding.

Tujuan metode eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana



hubungan kausal antara variable-variable yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 1988).

Variabel penelitian terbagi menjadi dua yaitu variabel bebas yang merupakan variabel yang diselidiki pengaruhnya dan variabel terikat yang merupakan variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel-variabel yang digunakan meliputi :

- Variabel bebas : Pemberian senyawa polifenol (tanin) ekstrak *P. crocatum* yang berbeda dan kontrol positif (+) dan negatif (-) dengan tiga kali ulangan.
- Variabel terikat : BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol, Glukosa, hemoglobin (Hb), dan hematokrit (Ht/PVC); serta histologi organ ginjal dan hati.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Menurut Sastrosupadi (2000), beberapa keuntungan dari penggunaan RAL adalah :

- a. Analisis statistiknya masih mudah karena komponen perhitungan sesuai dengan sumber keragaman meliputi perlakuan, galat dan total.
- b. Dengan derajat bebas galat maksimal memungkinkan memperoleh KT galat yang kecil sehingga peluang mendapatkan F_{hit} dengan nilai yang besar.
- c. Karena tempat percobaan tidak mempengaruhi nilai pengamatan, maka memungkinkan setiap perlakuan diberi ulangan yang tidak sama. Sebaiknya ulangan dibuat sama agar memudahkan perhitungan.



Perlakuan pada penelitian ini adalah perbedaan dosis dengan kisaran berbeda, kontrol positif dan kontrol negatif yang diulang sebanyak 3 kali. Adapun perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut :

Perlakuan A = Pemberian polifenol ekstrak *P. crocatum* (Dosis 0.36 mg/kg)

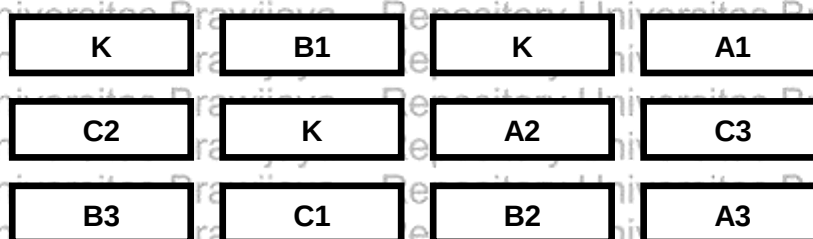
Perlakuan B = Pemberian polifenol ekstrak *P. crocatum* (Dosis 1.08 mg/kg)

Perlakuan C = Pemberian polifenol ekstrak *P. crocatum* (Dosis 1.80 mg/kg)

Kontrol (-) = Tanpa Pemberian senyawa fenolik

Kontrol (+) = Pemberian senyawa fenol Dosis 3 mg/kg

Berikut ini adalah denah penelitian setelah pengacakan yang dapat dilihat pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Denah Penelitian

Keterangan :

A, B, C = Perlakuan

1, 2, 3 = Ulangan

K = Kontrol

4.3.3 Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diamati yakni dengan menggunakan analisis satu arah yang disebut One Way Anova. Jika hasil sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata atau sangat nyata maka dilakukan uji lanjutan disebut Uji BNT untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan respon beda nyata sehingga dapat dilanjutkan dengan regresi dan korelasi.



Untuk hasil uji histopatologi ginjal pada ikan lele (*C. gariepinus*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan ginjal dan hati ikan lele yang diberikan polifenol daun sirih merah maka dilakukan analisis statistik pemberian skoring menurut (Gasperz, 1991) dengan metode semi kuantitatif menurut Kakkilaya (2002) yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya.

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang. Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria nekrosis, degenerasi, pyknosis, hialinasi, edema (meningkatnya jumlah cairan antar jaringan) (Panigoro et al., 2007). Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut Kim (2006) dengan rumus:

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

Jumlah sel analisis

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%.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Penelitian Tahap 1

4.4.1.1 Preparasi Sampel Daun Sirih

Setelah daun sirih dipanen, kemudian dilakukan sortasi dari kotoran. Tahap setelah sortasi adalah dilakukan pencucian dengan air mengalir agar debu dan



kotoran kecil yang lain bisa hilang. Setelah pencucian selanjutnya dilakukan pengeringan. Daun kering dikeringkan hanya dengan cara diangin-anginkan selama 6 hari. Daun layu dikeringkan hanya dengan cara diangin-anginkan selama 3 hari. Setelah siap, daun sirih merah dihancurkan dengan blender dengan tujuan untuk mendapatkan serbuk daun sirih merah. Setelah hancur, tahapan selanjutnya adalah dengan melakukan pengayakan dengan saringan ukuran 40 mesh untuk memperoleh serbuk halus. Lebih rincinya dapat dilihat pada bagan alir dibawah ini tentang pembuatan serbuk sirih merah. Diagram Alir Pembuatan Serbuk Sirih Merah dapat dilihat di **Gambar 15**. Tahapan atau langkah berikutnya adalah maserasi dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 15. Diagram Alir Pembuatan Serbuk Sirih Merah

4.4.1.2 Ekstraksi fenolik daun sirih merah

Ekstraksi polifenol daun sirih merah dilakukan menggunakan metode dari Sundang et al., (2011) sedangkan untuk Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi kolom menggunakan metode dari Bigoniya dan Singh 2014; dan



Vasconcelos *et al.*, 2010. Ekstraksi fenolik dari daun sirih merah dilakukan dengan cara bubuk daun sirih merah (Basah, Layu dan Kering) 100 gram dilarutkan kedalam beerglass 500 ml yang terisi pelarut methanol (250 ml) kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 30 menit. Sample kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman 42. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dalam rotary evaporator pada suhu 40-45 °C. Hasil ekstraksi methanol kemudian diukur dengan metode Sundang, *et al* (2012) pada panjang gelombang 760 nm dengan menggunakan reagen Folin- Ciocalteu dan konsentrasinya diukur berdasarkan kurva standar asam galat. Karakterisasi total fenol daun sirih merah dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Lee *et al.*, 2003). Hasil total fenol terbaik secara kuantitas ekstraksi methanol dari ketiga jenis daun kering, layu dan basah kemudian dilarutkan dalam 0,5 ml metanol ; etil asetat (1:8, v/v) untuk memisahkan senyawa polifenol (tanin) sehingga diperoleh ekstrak pekat.

4.4.1.3 Uji Fitokimia

Identifikasi fitokimia dilakukan terhadap ekstrak methanol *Piper crocatum* yang menghasilkan kuantitas total fenol terbaik dengan memakai metode Harborne (1996) dengan langkah sebagai berikut:

Uji alkaloid

2 ml HCL dicampurkan ke dalam 5 ml ekstrak daun *Piper crocatum* kemudian reagen Dragendroff ditambahkan ke dalamnya. Ekstrak positif mengandung alkaloid apabila terlihat warna merah atau oranye pada campuran tersebut.

Uji steroid

Dilarutkan ekstrak daun *Piper crocatum* sebanyak 1 ml ke dalam 10 ml kloroform dan ditambahkan 10 ml asam sulfur. Ekstrak yang positif mengandung



steroid, jika disinari dengan green fluorescence maka akan terlihat lapisan asam sulfur berwarna kuning dan lapisan atas berwarna merah.

Uji flavonoid

Ditambahkan beberapa tetes sodium hidroksida ke dalam 1 ml ekstrak daun *Piper crocatum*. Jika ekstrak positif mengandung flavonoid maka setelah ditetesi asam maka warna kekuningan pada ekstrak akan hilang.

Uji Tanin

Ditetesi 1% lead asetat ke dalam 5 ml ekstrak daun *Piper crocatum*. Ekstrak positif mengandung tanin jika terbentuk warna kuning di dalamnya.

Uji Terpenoid

Ditambahkan 2 ml kloroform ke dalam 0.5 g ekstrak *Piper crocatum*. Kemudian dimasukkan 3 ml asam sulfat sedikit demi sedikit hingga terbentuk lapisan berwarna. Ekstrak yang positif mengandung terpenoid akan menunjukkan warna merah kecoklatan.

Uji Saponin

Ditambahkan 5 ml aquades ke dalam tabung reaksi berisi 0.5 gram ekstrak daun *Piper crocatum* kemudian dihomogenkan. Selanjutnya minyak zaitun sebanyak 3 tetes ditambahkan ke dalamnya lalu dikocok. Ekstrak positif mengandung saponin jika terbentuk emulsi.

4.4.1.4 Larutan Standar Galat

Pembuatan larutan induk asam galat (5 mg/ml) dengan menimbang 5 g asam galat yang kemudian ditambahkan aquadest sampai 500 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 mg/ml. Larutan induk diambil dengan menggunakan pipet sejumlah 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ml dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml, sehingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 50, 100, 150, dan 200 mg/L asam galat (Lee et al., 2003).



4.4.1.5 Pengukuran Absorbansi

Ekstrak Ditimbang sejumlah 0,3 gram kemudian dilarutkan sampai 10 ml dengan perbandingan metanol dengan air sejumlah 1 : 1. Larutan ekstrak 0,2 ml diambil dan ditambahkan 15,8 ml aquadest. 1 ml reagens Follin Ciocalteu ditambahkan kemudian diaduk. Kemudian ditambahkan 3 ml Na_2CO_3 20 %. Ukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 760 nm yang akan memberikan kompleks biru. Kemudian tentukan kadar fenol dalam mg/L (Lee et al., 2003).

4.4.1.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kolom

Untuk memisahkan polifenol (tanin) daun sirih merah, maka dilakukan dengan kromatografi kolom dengan methanol ; etil asetat (1:8, v/v) untuk memisahkan senyawa golongan polifenol (tanin). Sebelum dilakukan pemisahan polifenol dengan kromatografi kolom, maka dilakukan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui nilai *Retardation factor* (R_f) yang berfungsi untuk mengidentifikasi bagian fenolik (polifenol) pada silica gel.

Fase diam yang digunakan pada KLT adalah plat silica gel, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah metanol;etil asetat (1:8, v/v) untuk memisahkan senyawa polifenol (tanin). Plat KLT ukuran 1 x 5 cm terlebih dahulu diaktifkan dengan cara mengeringkannya dalam oven pada suhu 100-120 °C untuk menguapkan kandungan air. Filtrat pekat dilarutkan dalam ± 0.5 ml metanol ; etil asetat (1:8, v/v) untuk polifenol. Kemudian diambil ± 5 μl dengan microsyringe dan ditotolkan pada plat KLT 1 cm dari tepi bawah dengan garis tengah 5mm. Untuk memudahkan penotolan dibuat garis lemah dengan pensil, disebut garis awal. Plat KLT dimasukan berdiri tegak ke dalam chamber 250 ml yang telah berisi pelarut metanol;etil asetat (1:8, v/v) ± 10 ml kemudian ditutup dengan clingwrap untuk menghindari penguapan. Apabila eluen telah mencapai



batas atas maka plat KLT diambil menggunakan pinset. Kemudian nilai R_f dihitung untuk isolasi polifenol (tanin) pada kromatografi kolom sesuai dengan nilai R_f pada plat KLT.

Isolasi golongan polifenol dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silica gel G₆₀ dan fase gerak metanol ; etil asetat (1:8, v/v) ± 100 ml. Silica gel ditimbang ± 20 mg kemudian disuspensikan ke dalam fase gerak metanol ; etil asetat (1:8, v/v) ± 50 ml dan diaduk dengan magnetic stirrer selama 1 jam agar pada saat silica gel dimasukan ke dalam kolom tidak retak.

Pada ujung kran gelas kolom (50ml) diisi kapas kemudian kolom dipasang pada statif dan diisi fase gerak untuk membasahi kapas. Tahap selanjutnya, kolom diisi fase gerak secara perlahan melalui dinding kolom hingga penuh. Kemudian bubuk silica gel dimasukan ke dalam kolom sampai isi kolom terbentuk sempurna dan silica gel dalam kolom mencapai $\frac{3}{4}$ tinggi kolom. Tahap selanjutnya, pasir laut dimasukkan dalam kolom agar pelarut tidak mengenai silica gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukan.

Filtrate pekat kemudian dilarutkan kedalam 0.5 ml metanol ; etil asetat (1:8, v/v), selanjutnya dimasukan ke dalam kolom secara perlahan agar tidak merusak silica gel. Kran pada kolom dibuka secara perlahan, kemudian larutan pita warna tanin yang sesuai dengan standard R_f ditampung dalam tabung reaksi. Tambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silica gel tidak kering. Lakukan isolasi polifenol (tanin) berdasarkan prosedur tersebut sampai didapatkan jumlah larutan yang diinginkan. Larutan tanin kemudian diperkatkan dalam nitrogen evaporator pada suhu 40-45 °C sehingga didapatkan ekstrak tanin kering. Ekstrak tanin tersebut kemudian dimasukan kedalam botol yang telah dilapisi alumunium foil yang selanjutnya ekstrak polifenol tersebut ditimbang



untuk disuntikan kepada ikan lele (*C. garipienus*) untuk melihat toksisitasnya melalui studi biokimia darah dan histologi organ ginjal dan hati.

4.4.1.7 Identifikasi senyawa polifenol (tanin) dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR

Untuk mengidentifikasi golongan polifenol dari daun sirih merah dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tahap pertama, sampel hasil Kromatografi kolom sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam cuvet. Tahap selanjutnya, spektrofotometer di scanning dengan panjang gelombang dari 200 nm hingga 550 nm dan dikalibrasi dengan menggunakan aseton. Cuvet yang berisi filtrate polifenol dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan scanning dijalankan pada panjang gelombang 200 – 550 nm. Jumlah polifenol ($\mu\text{g/gr}$) tersebut dihitung dengan persamaan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$.

4.4.2 Penelitian Tahap 2

4.4.2.1 Konsentrasi Lethal

Sebanyak 100 ekor hewan uji yang dibagi menjadi 10 perlakuan. Uji pendahuluan ini bertujuan untuk memperkirakan dosis senyawa fenolik yang menyebabkan mortalitas 50% dan mengetahui batas bawah dan batas atas penggunaan senyawa fenolik dengan menggunakan metode *Range Finding Test* (RFT). Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui nilai uji LC50 (Lethal concentration) dalam waktu 96 jam untuk mengetahui LC50. Pada paparan akut (acute exposure), organisme mengalami kontak dengan bahan kimia yang dapat berupa paparan tunggal atau beberapa paparan yang terjadi dalam jangka pendek, yang umumnya dalam hitungan jam hingga hari. Paparan akut terhadap bahan kimia yang dapat secara cepat terabsorpsi umumnya langsung memberikan dampak/efek.



Pada awal uji LC50 menggunakan dosis polifenol (tanin) untuk penyuntikan yaitu 0 mg/kg, 0.36 mg/kg, 1.08 mg/kg, 1.80 mg/kg, 2.52 mg/kg, 3.24 mg/kg, sedangkan untuk senyawa fenol LC50 diberikan dosis 0 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg dan 5 mg/kg sebagai kontrol negatif.

Hasil yang diperoleh adalah kematian ikan sampai 50% terjadi pertama pada dosis 2,53 mg/kg untuk perlakuan polifenol sedangkan untuk perlakuan fenol sintetis pada dosis 4 mg/kg sehingga diasumsikan dosis yang digunakan adalah kurang dari 2,54 mg/kg untuk polifenol daun sirih merah dan kurang dari 4 mg/kg untuk fenol sintetis. Menurut Roche dan Boge (2000) penentuan dosis LC50 merupakan hasil dosis penyuntikan polifenol dengan lethal 50% kurang dari 96 jam.

4.4.2.2 Perlakuan Pemberian fenolik Ekstrak *P. crocatum*

Wadah pemeliharaan yang akan digunakan sebelumnya harus di treatment terlebih dahulu yaitu dengan memberi 5 ml clorin 50 liter selama 3 hari. Tambahkan 5 ml Na-thiosulfat untuk menghilangkan efek dari pemberian clorin.

Langkah selanjutnya, 50% ikan lele dari populasi dipilih berdasarkan ukuran yang seragam yaitu 10-15 gram dan diaklimatisasi selama 7 hari dalam wadah pemeliharaan. Pada hari ke 8, ikan lele diinjeksi senyawa polifenol (tannin) *P. crocatum* dengan dosis 0.36 mg/kg, 1.08 mg/kg dan 1.80 mg/kg, sedangkan Kontrol (+) ikan lele diinjeksi senyawa fenol sintetis 3 mg/kg. Pasca pemaparan 72 jam kemudian dilakukan pengamatan terhadap hematologi ikan lele berdasarkan studi biokimia darah yang meliputi pengujian BUN (Nitrogen Urea Darah), Enzim Fosfatase alkali (ALP), Plasma Kortisol, Glukosa, hemoglobin (Hb), dan hematokrit (Ht/PVC); serta histologi hati dan ginjal ikan lele.



4.5. Parameter Penelitian

4.5.1 Parameter Utama

4.5.1.1 Parameter Biokimia Darah

Hewan uji yaitu ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum* diambil sampel darahnya, sebelum dilakukan pengambilan darah ikan tersebut dipuasakan ± 24 jam. Menurut Harikrishnan *et al.*, (2011), untuk menghindari penggumpalan darah saat pengambilan maupun penyimpanan maka spuit suntik dan tube darah diberi anti koagulan Na.citrat 5 % sebanyak 0,1 ml. Setelah ikan pingsan, pengambilan darah dilakukan pada pangkal ekor (antara sirip ekor dengan gurat sisi) menggunakan spuit suntik ukuran 1 ml dengan ujung jarum mengarah pada bagian bawah tulang punggung dengan kemiringan dibawah 45°C . Darah yang telah diambil dimasukkan pada tube darah dan disimpan pada refrigerator.

a. BUN (Nitrogen Urea Darah)

BUN (Nitrogen Urea Darah) diukur menggunakan metoda Chaney dan Marbach, (1962); Search *et al.*, (1967). Adapun tahapan pengukuran BUN dengan membawa reagen disuhu ruangan, Untuk pipet (tabung reaksi berlabel) sebagai berikut :

	Blank	Standar	Sampel
Urea Standar	-	10 μl	-
Sampel	-	-	10 μl
Reagen (A)	1 ml	1 ml	1 ml
Reagen (B)	1 ml	1 ml	1 ml

Ambil plasma sebanyak 10 μl , lalu dicampur reagen (pereaksi Urea kit) sebanyak 1000 μl Kemudian lakukan pengadukan hingga homogen dan inkubasi tabung selama 10 menit pada suhu kamar $16-25^{\circ}\text{C}$ atau selama 5 menit pada suhu 37°C . Baca serapan (Absorbansi) (A) distandar dan sampel pada panjang gelombang 600 nm. Warna akan stabil setelah 2 jam.



b. Kadar Glukosa Darah

Kadar glukosa diukur dengan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer. Adapun tahapan pengukuran glukosa darah dengan membawa reagen disuhu ruangan, Untuk pipet (tabung reaksi berlabel) sebagai berikut :

	Blank	Standar	Sampel
Urea Standar	-	10 μ l	-
Sampel	-	-	10 μ l
Reagen (A)	1 ml	1 ml	1 ml

Ambil plasma sebanyak 10 μ l, lalu dicampur reagen (pereaksi glukosa kit) sebanyak 1000 μ l Kemudian lakukan pengadukan hingga homogen dan inkubasi tabung selama 10 menit pada suhu kamar 16-25 $^{\circ}$ C atau selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Baca serapan (Absorbansi) (A) distandar dan sampel pada panjang gelombang 500 nm. Warna akan stabil setelah 2 jam.

c. Alkali Fosfatase (ALP)

Enzim Alkali Fosfatase diukur menggunakan metode Kolorimetri untuk menentukan orthophosphoric monoester phosphohydrolase. Adapun tahapan pengukuran alkali fosfatase darah dengan membawa reagen disuhu ruangan, Untuk pipet (tabung reaksi berlabel) sebagai berikut :

	Blank	Standar	Sampel
Urea Standar	-	10 μ l	-
Sampel	-	-	20 μ l
Reagen (A)	1 ml	1 ml	1 ml

Ambil plasma sebanyak 20 μ l, lalu dicampur reagen (pereaksi alkali fosfatase kit) sebanyak 1000 μ l Kemudian lakukan pengadukan hingga homogen dan inkubasi tabung selama 10 menit pada suhu kamar 16-25 $^{\circ}$ C atau selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Baca serapan (Absorbansi) (A) distandar dan sampel pada panjang gelombang 405 nm. Warna akan stabil setelah 2 jam.



d. Plasma Kortisol

Konsentrasi kortisol plasma (Cort) dinilai oleh radioimmuno assay (RIA) (Foster dan Dunn, 1974) dengan penggunaan KIT dari Negara Hungaria (Budapest). Pengukuran kortisol dilakukan dengan melakukan ekstraksi sampel yang kemudian dilakukan pembacaan *optical density* dengan menggunakan alat baca RIA yang diatur dengan filter berpanjang gelombang 450 nm. Hasil perolehan data yang berupa optikal densiti diinterpolasikan dengan menggunakan rumus :

$$Y = -a \ln(x) + b$$

4.5.1.2 Parameter Histologi

a. Pengambilan organ hati dan ginjal

Pengambilan organ hati dan ginjal dilakukan dengan cara membedah tubuh ikan dimulai dari lubang anus hingga ke bagian sirip dada, kemudian memisahkan hati dan ginjal ikan. Organ tersebut kemudian diawetkan dengan formalin.

a. Pembuatan preparat histologi

Tahap Fiksasi

- Jaringan hati dan ginjal diiris dengan ukuran 0.5 x 0.5 cm²
- Dilakukan perendaman dengan formalin 10%.

Tahap Dehidrasi

- Dilakukan perendaman menggunakan alkohol 70%
- Dilakukan perendaman kembali dengan alkohol 80%, 95%, dan 100%, xylol + alkohol (3:1), xylol + alkohol (1:1).

Tahap parafinasi

- Perendaman jaringan dengan paraffin dalam oven dengan suhu berkisar antara 50-60 °C.



- Dilakukan pegeblokan dengan cara memasukan jaringan dalam cetakan berisi paraffin cair.

Tahap Deparafinasi

- Blok paraffin dipotong dengan menggunakan mikrotome.
- Potongan jaringan dicelupkan secara berturut-turut pada larutan xylol dan alcohol.

Tahap Pewarnaan

- Preparat jaringan diwarnai dengan haemotoksilin.
- Preparat direndam ke dalam eosin dan dibilas dengan air mengalir.

Tahap Mounting

- Preparat dilem dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan cover glass dan dihindari adanya gelembung.
- Preparat dibiarkan dalam suhu ruang sampai lem mengering kemudian diamati di bawah mikroskop.
- Dengan pewarnaan W, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh haematomksilin yang bersifat netral, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

4.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah pengamatan terhadap perubahan morfologi dan tingkah laku ikan serta pengukuran kualitas air meliputi suhu, pH dan DO (oksigen terlarut).



V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penelitian Tahap Satu (I)

5.1.1 Ekstraksi dan Fitokimia Daun Sirih Merah (*P. crocatum*)

Ekstraksi polifenol daun sirih merah dilakukan menggunakan metode modifikasi dari Sundang *et al.*, (2011) sedangkan untuk Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi kolom menggunakan metode dari Bigoniya dan Singh (2014); dan Vasconcelos *et al.*, (2010). Proses ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut metanol (polar) perbandingan (1:2.5 : b/v) selama 2x24 jam dengan bahan daun kering, daun layu dan daun segar sirih merah. Hasil ekstraksi daun sirih merah (*P. crocatum*) yang dinyatakan dalam persen rendemen dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rendemen Ekstrak *P. crocatum*

Jenis Daun	Rendemen Ekstrak (%)
Daun Kering	9,62
Daun Layu	8,34
Daun Segar	7,16

Pada ekstrak daun sirih kering memiliki nilai rendemen ekstrak yang paling tinggi yaitu 9,62%, diikuti daun layu yaitu 8,34% dan daun segar yaitu 7,16%. Rendemen ekstrak yang dihasilkan daun sirih kering menunjukkan hasil rendemen yang paling banyak dibandingkan dengan daun layu dan segar. Hal ini menunjukkan kandungan senyawa-senyawa bioaktif daun kering lebih banyak karena kandungan airnya yang rendah dan membrane sel daun mulai menipis karena proses pengeringan. Membrane sel yang tipis sangat mudah ditembus uap air dan minyak yang berada pada dinding membuat senyawa-senyawa aktif terperangkap pada membrane sel daun. Sunardi *et al.*, (2008) mengemukakan rendemen tinggi disebabkan karena pengeringan yang dilakukan mengakibatkan pengurangan air di dalam sel sehingga sel-sel lebih mudah ditembus uap, karena



kadar air yang dikandung lebih sedikit, maka uap lebih mudah menguapkan minyak pada daun.

Uji fitokimia *P. crocatum* menggunakan metode yang dilakukan oleh Harbourne (1996) yang meliputi uji alkaloid, uji steroid, uji flavonoid, uji tanin/polifenol, uji terpenoid, dan uji saponin. Hasil analisa uji fitokimia ekstrak metanol daun sirih merah dapat dilihat pada **Tabel 6** dan **Lampiran 1**.

Tabel 6. Hasil Skrining fitokimia daun sirih merah (*P. crocatum*)

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Alkaloid	-	Terbentuk warna kekuning-kuningan
- Alkaloid Meyer	-	Terbentuk endapan jingga
- Alkaloid Dragendroff	+	Perubahan warna hijau menjadi orange
Flavonoid	+	Terbentuk warna hijau kebiruan
Streoid	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
Tanin	+++	Terbentuk busa
Saponin	+	Terbentuk cincin kecoklatan
Tripteren	-	

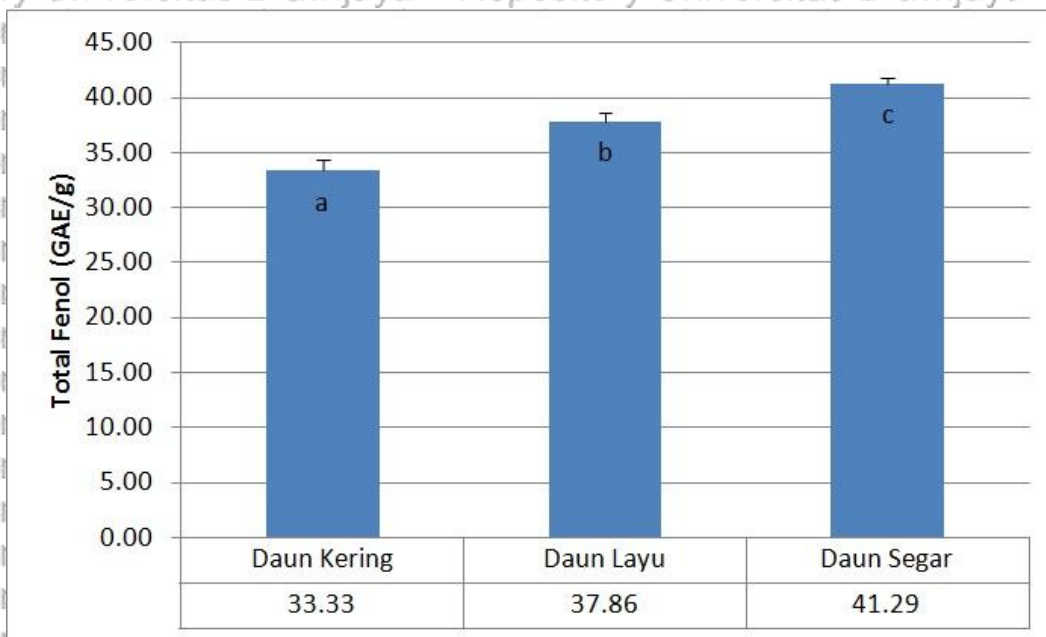
Keterangan : (+) Terdeteksi, (-) Tidak terdeteksi

Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak metanol daun *P. crocatum* sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Craft *et al.*, (2012) dimana analisis fitokimia menginformasikan daun sirih merah menyimpan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tannin. Senyawa flavonoid dan tannin merupakan senyawa polifenol yang artinya senyawa yang memiliki bagian berupa fenolik. Flavonoid mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon, sedangkan senyawa tanin merupakan polimer dari flavonoid yang dihubungkan dengan melalui C8 dengan C4 (Emrizal *et al.*, 2014; Hagerman, 2002). Cowan (1999) menambahkan senyawa polifenol dan tanin dapat menghambat aktivitas enzim protease, menghambat enzim pada protein transpor selubung sel bakteri, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.



5.1.2 Nilai Total Fenol Sirih Merah (*P. crocatum*)

Pasca proses ekstraksi dengan metode maserasi pada kondisi daun sirih yang berbeda dilakukan pengukuran kandungan total fenol pada semua perlakuan daun. Hasil nilai total fenol pada perlakuan daun sirih merah (*P. crocatum*) dapat dilihat pada **Gambar 16**.

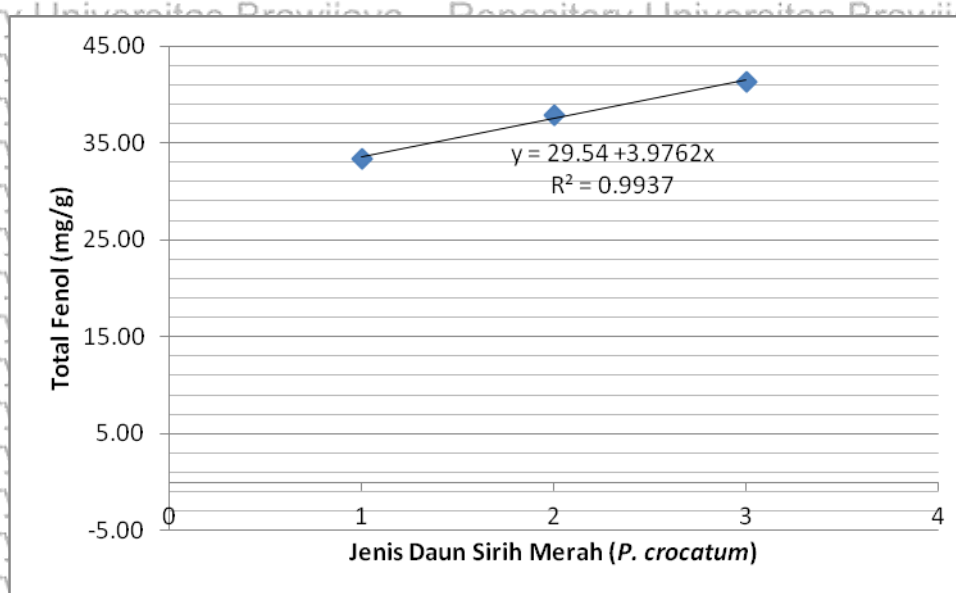


Gambar 16. Rerata total fenol dengan berbagai kondisi jenis daun sirih merah (*P. crocatum*)

Hasil rerata total fenol ekstrak daun sirih merah dari Gambar 16 menunjukkan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan daun sirih segar senilai $41,29 \pm 0,52$ GAE/g. Diikuti perlakuan daun sirih layu senilai $37,86 \pm 0,71$ mg GAE/g dan pada perlakuan daun kering kandungan total fenol adalah yang terendah yakni sejumlah $33,33 \pm 1,09$ GAE/g. Total fenol ekstrak daun sirih merah kering walau nilainya terendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya namun nilai tersebut tidak jauh berbeda dibandingkan dengan nilai total fenol genus *Piper* lainnya. Sundang, et al (2012) melaporkan nilai total fenol ekstrak metanol daun kering *Piper betle* sejumlah 34,29 GAE/g.



Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana nilai total fenol pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai Fhit 72,83 lebih besar dibandingkan dengan Ftab 5% 5,14. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 1,62 dengan notasi total fenol pada semua perlakuan, baik daun kering (a), layu (b) dan segar (c) menunjukkan hasil yang berbeda nyata (**Lampiran 2**).



Gambar 17. Persamaan regresi total fenol ekstrak daun sirih merah dengan berbagai perlakuan

Pada **Gambar 17** Hasil regresi linier didapatkan hubungan kondisi daun sirih merah *P. crocatum* dengan total fenol melalui persamaan $y = 29,54 + 3,9762x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9937. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi perlakuan daun sirih merah berpengaruh 99,37%. Dari hasil analisis menunjukkan perlakuan daun sirih kering adalah perlakuan terbaik untuk kandungan total fenol. Tingginya nilai total fenol ekstrak metanol daun sirih merah segar dibandingkan dengan daun sirih merah yang kering disebabkan

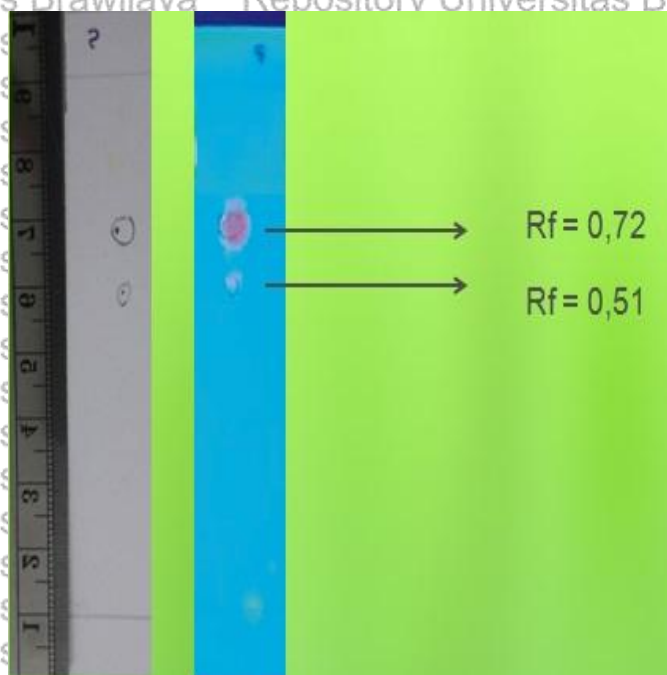


tingginya kandungan air yang terdapat pada daun segar sehingga jumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam daun lebih tinggi. Agustini et al., (2014) menyatakan fenolik seperti senyawa golongan flavonoid umumnya melekat pada kelompok gula yang akibatnya flavonoid dapat dengan mudah larut dalam air atau pelarut polar lainnya. Selain itu, pengeringan yang tidak tepat dapat menyebabkan lepasnya kandungan air dalam daun sehingga senyawa fenolik yang terdapat dalam di lapisan membrane sel daun juga ikut hilang. Faktor lain juga berpengaruh terhadap nilai kandungan total fenol seperti lamanya proses ekstraksi. Gao et al., (2006) menyatakan bahwa tingginya kadar fenol seiring meningkatnya lama ekstraksi karena semakin lama pelarut menembus dinding sel maka kerusakan jaringan bahan semakin optimal dan akhirnya senyawa fenol yang terlarut lebih banyak.

5.1.3 Pemisahan Senyawa Polifenol (tannin) Ekstrak Metanol Daun Sirih merah (*P. crocatum*)

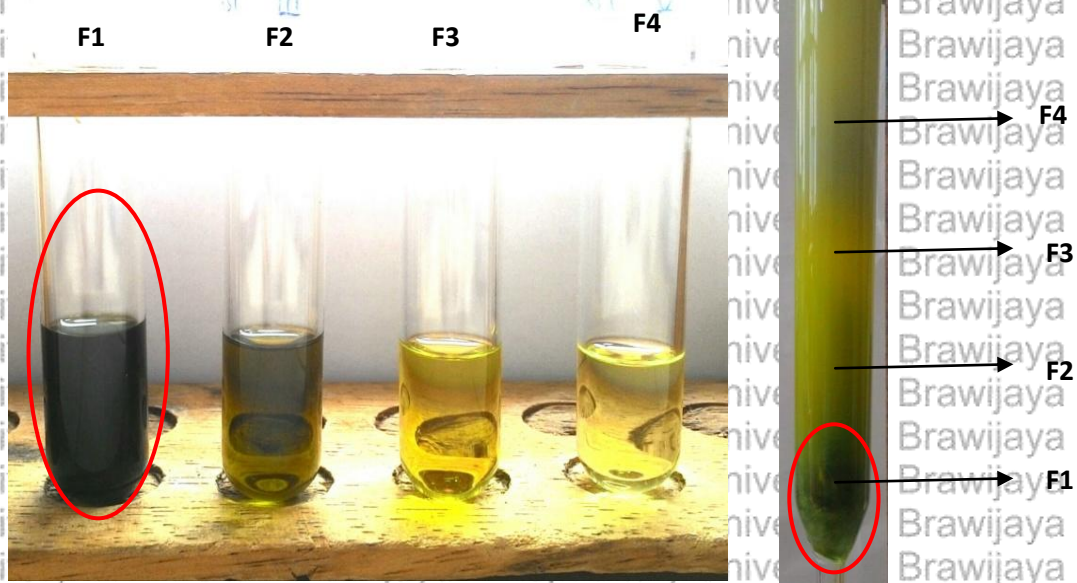
Berdasarkan nilai kandungan total fenol menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *P. crocatum* segar yang memiliki nilai yang tertinggi dibandingkan dengan daun layu dan kering. Selanjutnya dilakukan pemisahan senyawa polifenol (tannin) dari ekstrak metanol daun *P. crocatum* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom. Berdasarkan hasil KLT dengan eluen metanol : etil asetat (1:8 ; v/v) menghasilkan 2 isolat pada plat KLT. Pada **Gambar 18** plat KLT pasca dielus menunjukkan nilai R_f 0,72 dan 0,51. Senyawa tannin terdapat pada Isolat 2 dengan nilai R_f 0,72, hal tersebut sesuai dengan hasil panjang gelombang standar tannin yang dibandingkan dengan panjang gelombang isolat 2. Senyawa golongan tannin dilihat dari warna menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 256 menampilkan warna

merah muda. Penentuan eluen sangat penting terkait isolasi senyawa murni skala kecil, semakin tepat percampuran antar pelarut berdasarkan kepolarannya semakin baik senyawa murni dapat di isolasi. Tyson (1988) menyatakan proses menentukan eluen merupakan alternatif yang dapat digunakan dalam isolasi senyawa murni.



Gambar 18. Hasil KLT dari ekstrak metanol daun sirih merah (*P. crocatum*)

Pasca penentuan eluen di KLT tahapan selanjutnya isolasi senyawa golongan tannin *P. crocatum* menggunakan metode kromatografi kolom berdasarkan metode dari Bigoniya dan Singh (2014); dan Vasconcelos *et al.*, (2010). Hasil kolom terdapat 4 fraksi yang kemudian tiap fraksi di spektrofotometer UV-Vis untuk melihat panjang gelombang yang dibandingkan dengan standar tannin (**Gambar 19**). Pada fraksi satu (I) menunjukkan panjang gelombang yang sama dengan panjang gelombang standar tannin.



Gambar 19. Fraksi Hasil dari Kromatografi Kolom ekstrak daun sirih merah (*P. crocatum*) Ket. F = Fraksi

5.1.4 Identifikasi Senyawa Polifenol (tannin) dari Fraksi Ekstrak Metanol Daun *P. crocatum*

Fraksi purifikasi kromatografi kolom ekstrak metanol daun sirih *P. Crocatum* kemudian diidentifikasi kandungan senyawa dengan spektrofotometer Uv-vis dan FT-IR.

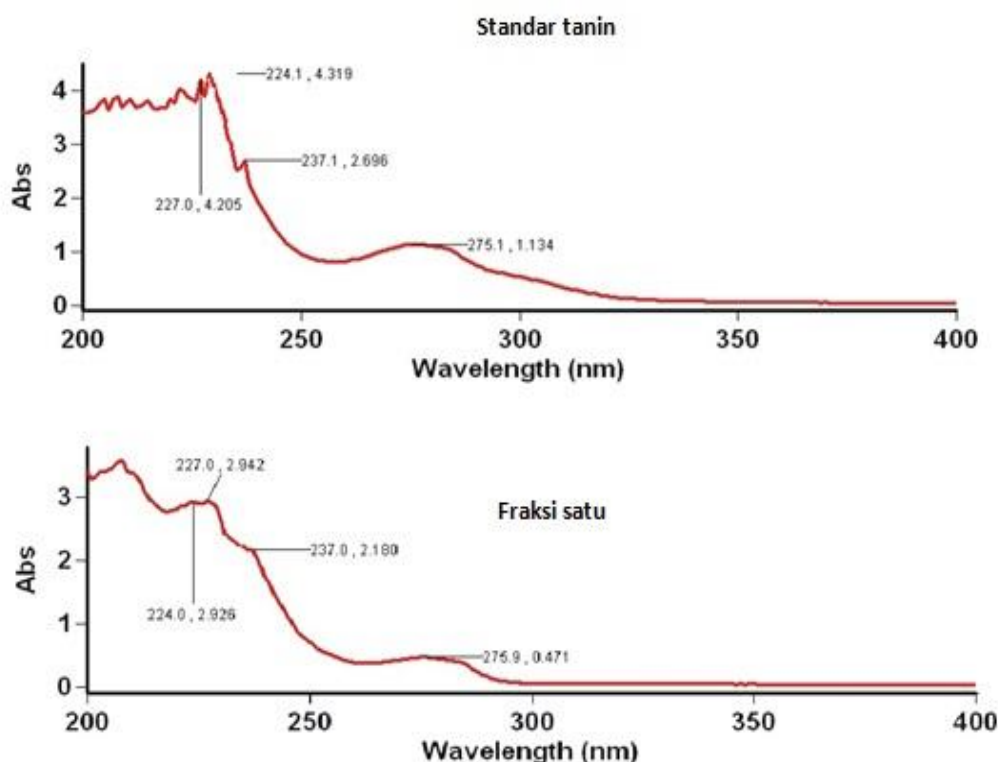
5.1.4.1 Ultraviolet-Visible Spectrofotometric (Uv-Vis)

Hasil karakterisasi senyawa aktif daun sirih merah fraksi satu (1) dibandingkan dengan standar menggunakan spektrofotometer ultraviolet yang berupa spektra dan data absorbansi serta panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 20.



Tabel 7. Hasil Spektrofotometer Ultraviolet Senyawa Aktif Fraksi satu (1) dan Standar tannin

Sampel	Panjang Gelombang Maksimum (nm)	Absorbansi Maksimum
Standar Tanin	224	4,319
	227	4,205
	237	2,696
	275	1,134
Fraksi Satu (1)	224	2,942
	227	2,926
	237	2,180
	275	0,471



Gambar 20. Identifikasi senyawa tannin pada fraksi satu (1) yang dibandingkan dengan standar tannin menggunakan spektrofotometer UV –Vis

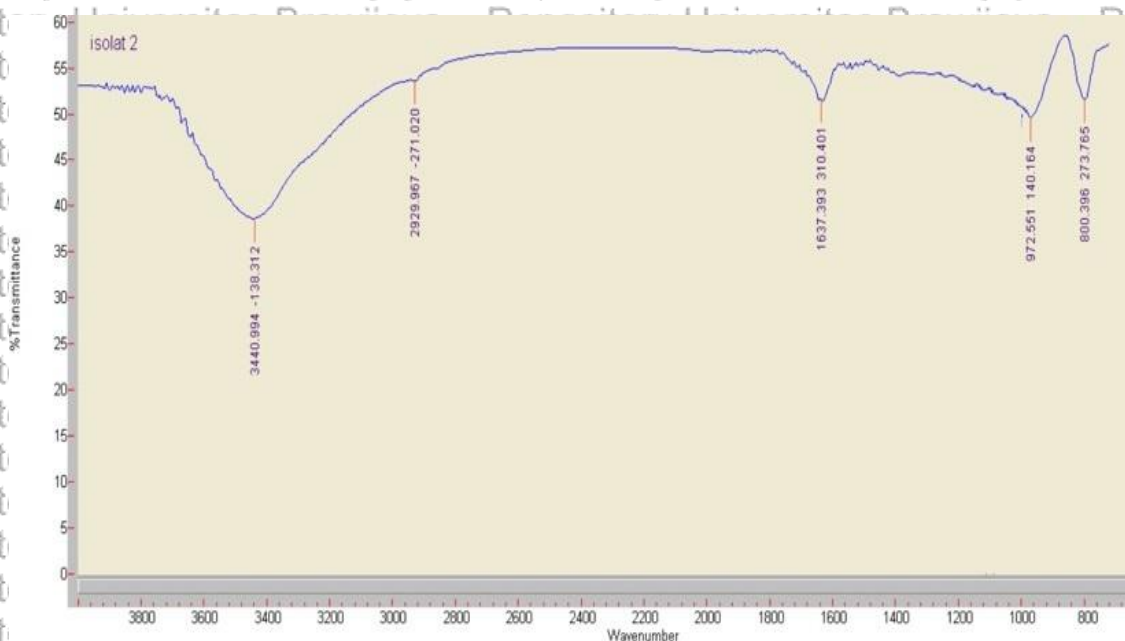
Data pengukuran serapan menggunakan spektrofotometri ultraviolet antara fraksi satu dan standar tannin menunjukkan panjang gelombang yang sama dengan luasan area panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang yang terdeteksi terdapat pada 224 nm, 227 nm, 237 nm dan 275 nm. Harbone (1987) menyatakan senyawa polifenol mempunyai panjang gelombang pada



spektra UV-Vis berkisar antara 200-270 nm dan 330-350 nm. Gandjar *et al* (2007), menambahkan bahwa serapan maksimum yang diperoleh dari spektrum UV panjang gelombang diatas 200 nm terindikasi adanya ikatan rangkap terkonjugasi.

5.1.4.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fraksi satu (1) kemudian dilanjutkan dengan uji Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FT-IR). Pola spektra FT-IR fraksi satu (1) dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Pola Spektra Inframerah Fraksi Satu (1) Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*P. croatum*)

Gambar diatas menunjukkan bahwa dalam fraksi yang dianalisis tersebut mengandung beberapa gugus fungsi. Masing-masing gugus fungsi tersebut memberikan serapan yang berbeda pada setiap daerah spesifik. Data bilangan pita serapan isolat dan gugus pada fraksi satu *P. Crocatum* dapat dilihat pada

Tabel 8.



Tabel 8. Data Bilangan Pita Serapan Isolat dan Gugus Pada Fraksi Satu *P. crocatum*

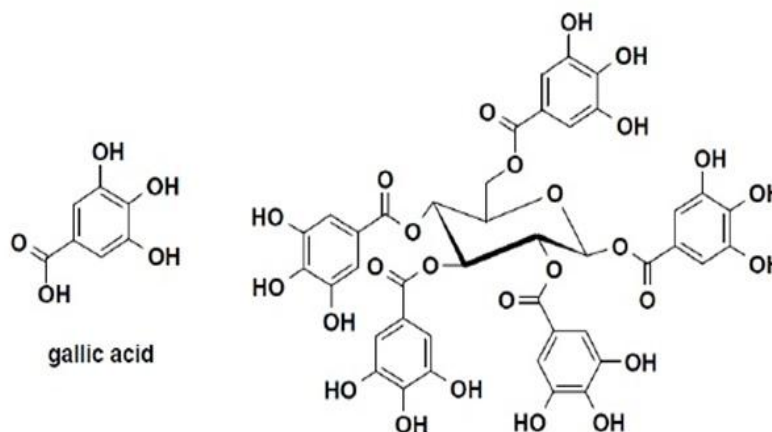
No.	Bilangan Pita Serapan* (Harborne,1988; Silverstein, et al., 2005)	Bilangan Pita	Gugus	Transmittance (%)
1	3300 – 3500 1340 – 1470	3440	OH	138,312
2	2850 – 2970	2929	CH alifatik	271,020
3	1600 – 1750	1637	C=O	310,401
4	750-810	800	meta	273,765
5	790-840	800	para	273,765
6	670 – 995	972	C-H	140.164

Pada Tabel diatas menunjukkan bahwa fraksi satu *P. crocatum* mempunyai beberapa gugus fungsi pada daerah serapan spesifik yaitu gugus hidroksi (OH) yang ditandai dengan serapan 3440 cm^{-1} , rentangan gugus Hidroksi C-H Alifatik pada daerah serapan 2929 cm^{-1} . Serapan pada daerah 1637 cm^{-1} adanya gugus karbonil C=O. Serapan pada daerah 800 cm^{-1} merupakan meta dan para (sangat tajam) dan daerah serapan 972 cm^{-1} merupakan gugus CH.

Golongan senyawa fenol meliputi beragam senyawa yang berasal dari tumbuhan dan memiliki struktur kimia yang sama, yaitu mengandung satu atau dua gugus hidroksil (OH) (Apak, et. al., 2007). Pambayun dkk. (2007) menyatakan campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O yang merupakan senyawa tanin. Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua macam yaitu tanin terkondensasi (*condensed tannins*) dan tanin-terhidrolisiskan (*hydrolysable tannins*) (Sjostrom, 1981). Hagerman (2002) menambahkan rantai di dalam gallotanin terbentuk dari meta-atau para



yang melibatkan hidroksil fenolik dari pada gugus hidroksi alifatik yang merupakan senyawa gabungan dari karbohidrat dengan asam galat. Berdasarkan data spektra tersebut diduga pada fraksi satu (1) merupakan turunan dari tanin yaitu gallotanin (tanin terhidrolisis). Struktur kimia senyawa gallotanin menurut Hagerman (2002) dapat dilihat pada **Gambar 22**.



Gambar 22. Struktur kimia senyawa gallotanin

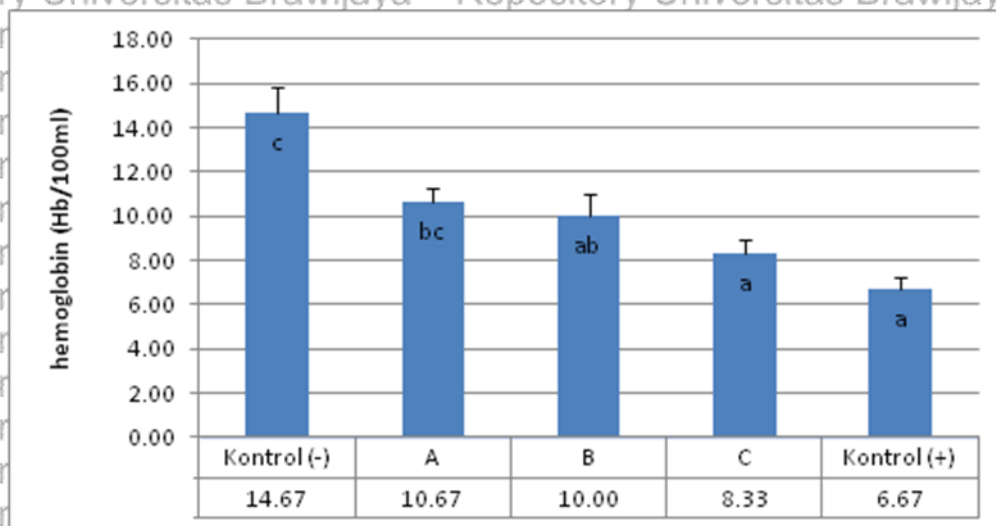
5.2 Penelitian Tahap Dua (II)

5.2.1 Parameter Biokimia Darah

5.2.1.1 Hemoglobin

Hemoglobin merupakan suatu molekul seperti kandungan zat besi dan rantai polipeptida globin, berada di dalam eritrosit dan bertugas untuk mengangkut oksigen. Hemoglobin bertanggungjawab terhadap transport oksigen dan karbondioksida dalam darah. Peningkatan kadar hemoglobin akan diikuti oleh peningkatan kadar hematokrit (Soetrisno, 1987). Nilai rerata hemoglobin pada ikan lele pasca injeksi senyawa polifenol *P. crocatum* dapat dilihat pada

Gambar 23.



Keterangan :

K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)

A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg

B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg

C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg

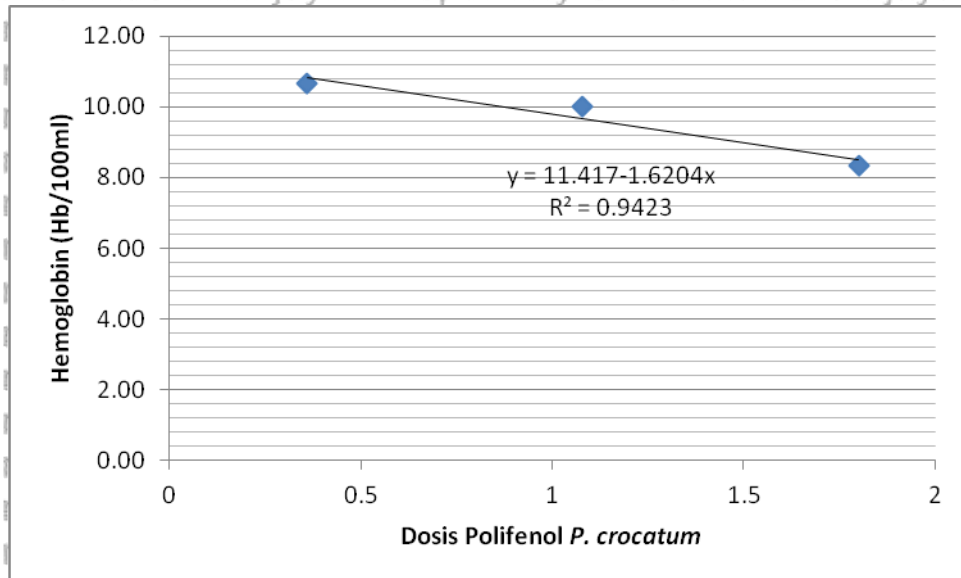
K (+) = Pemberian fenol sintetis 3 mg/kg

Gambar 23. Rerata Hemoglobin Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Gambar diatas, dapat diketahui nilai rerata hemoglobin pada kontrol sejumlah 14,67 hb/100ml sedangkan pada perlakuan A, B dan C sejumlah 10,67 hb/100ml, 10 hb/100ml dan 8,33 hb/100ml. Pada perlakuan Kontrol (+) memiliki nilai rerata hemoglobin yang terendah yaitu 6,67 hb/100ml. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian polifenol *P. crocatum* dan fenol sintetis berpengaruh terhadap turunya kandungan nilai hemoglobin.

Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana nilai hemoglobin pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai $F_{hit} 40,60 > F_{tab} 5\% 3,48$. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 1,49 dengan notasi hemoglobin pada perlakuan K (-) berbeda nyata terkecil dengan

perlakuan B, C dan K(+) namun tidak berbeda nyata terkecil dengan perlakuan A (Lampiran 3).



Gambar 24. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah hemoglobin ikan lele dumbo

Pada **Gambar 24** Hasil regresi linier didapatkan hubungan dosis polifenol *P. crocatum* dengan hemoglobin melalui persamaan $y = 11,417 - 1,6204x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9423. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi perlakuan daun sirih merah berpengaruh 94,23%. Dari hasil analisis menunjukkan perlakuan C dengan dosis polifenol ekstrak daun sirih merah sebesar 1,80 mg/kg menunjukkan dosis yang paling toksik.

Berdasarkan hasil penelitian, nilai hemoglobin pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) sejumlah 14,67 hb/100ml, hal tersebut sesuai dengan pendapat Alamanda, et al. (2007) yang menyatakan umumnya kadar Hb ikan lele dumbo yang sehat berkisar antara 12-14 Hb/100 ml darah. Kondisi yang berbeda menunjukkan pasca injeksi polifenol *P. crocatum* hemoglobin menurun cukup signifikan pada perlakuan C yaitu 8,33 Hb/100ml. Nilai hemoglobin tersebut



menurun seiring dengan bertambahnya dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan, sedangkan pada kontrol (+) menunjukkan nilai hemoglobin yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan C yaitu 6,67 hb/100ml. Varadarajan *et al.*, (2014), melaporkan hasil penelitiannya dengan pemberian fenolik pada ikan *Oreochromis mossambicus* menunjukkan penurunan kandungan hemoglobin yang dibandingkan dengan kontrol dari kisaran 45-50 g/L menjadi 40-45 mg/100 ml. Wahjuningrum *et al.*, (2008) menambahkan bahwa jumlah Hb rendah mengindikasikan bahwa ikan dalam keadaan sakit sedangkan dalam kondisi tinggi mengindikasikan ikan dalam keadaan stress.

Menurunnya kandungan hemoglobin terjadi akibat kerusakan sel pada hati dan darah ikan lele dumbo, kondisi tersebut sesuai dengan hasil histologi yang menunjukkan kerusakan nekrosis pada hati pasca injek polifenol *P. crocatum* dan fenol. Roche dan Boge, (2000) menyatakan meningkat atau turunnya plasma konsentrasi hemoglobin adalah tanda adanya gangguan dari sel. Harikrishnan *et al.*, (2003) menambahkan penurunan kandungan Hb diakibatkan adanya pembengkakan atau rusaknya sel darah merah. Perubahan kandungan Hb yang signifikan erat kaitannya dengan penurunan jumlah eritrosit, kondisi ini disebabkan *hypochromic microcytic anemia*. Penurunan konsentrasi Hb juga memperlihatkan bahwa sel darah merah rusak karena *leukositosis* dan selanjutnya berdampak terjadinya *erythroblastosis*. Penurunan jumlah sel eritrosit disebabkan organ yang memproduksi darah merah yaitu di ginjal dan limpa serta organ hemopoetik lainnya terganggu dalam memproduksi darah merah jika terinfeksi bakteri, sehingga jumlah eritrosit berkurang (Kabata, 1985).

Hemoglobin merupakan salah satu komponen yang terdapat pada Eritrosit atau sel darah merah. Hemoglobin yang terkandung dalam sel darah merah berfungsi untuk mengangkut oksigen dari insang menuju ke jaringan

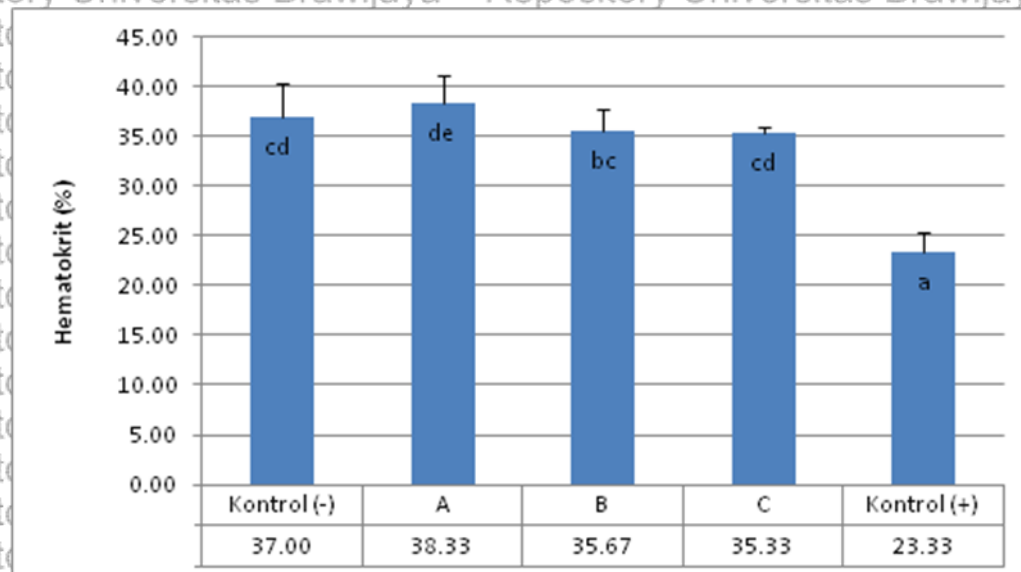


(Wahjuningrum *et al.*, 2008). Kondisi keadaan stress atau sakit pada ikan akan mengakibatkan peningkatan metabolisme tubuh terutama pada otot-otot skeletal, peningkatan metabolisme ini bertujuan meningkatkan produksi energi (ATP) untuk memenuhi kebutuhan energi untuk aktivitas tersebut (Ganong, 1999). Williams, (2007), menambahkan peningkatkan metabolisme yang terus menerus tersebut akan menimbulkan keadaan hipoksia pada tubuh, pada level seluler keadaan hipoksia ini akan memicu faktor transkripsi HIF-1 (*hypoxia induced factor-1*) yang berperan dalam adaptasi jaringan terhadap keadaan rendah oksigen, HIF-1 pada jaringan di ginjal dan hati akan memicu transkripsi gen eritropoietin sehingga akan dihasilkan eritropoietin yang akan dilepas ke peredaran darah. Kondisi kerusakan hati dan ginjal dapat menyebabkan transkrip gen eritropoietin terganggu sehingga menghambat terbentuknya eritropoietin dan hemoglobin tidak dapat terbentuk.

5.2.1.2 Hematokrit

Hematokrit merupakan volume sel-sel darah dibandingkan dengan plasma darah yang dinyatakan dalam prosentase. Kadar hematokrit dapat digunakan untuk menunjukkan kesehatan ikan (Hastuti *et al.*, 2003). Peningkatan kadar hemoglobin akan diikuti oleh peningkatan kadar hematokrit (Soetrishno, 1987).

Nilai rerata hematokrit pada **Gambar 25** menjelaskan pada kontrol sejumlah 37% sedangkan pada perlakuan A, B dan C sejumlah 38,33%, 35,67% dan 35,33%. Pada perlakuan Kontrol (+) memiliki nilai rerata hemoglobin yang terendah yaitu 23,33 %. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian polifenol *P. crocatum* (dosis B dan C) dan fenol sintetis berpengaruh terhadap menurunnya kandungan nilai hematokrit.



Keterangan :

K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)

A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg

B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg

C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg

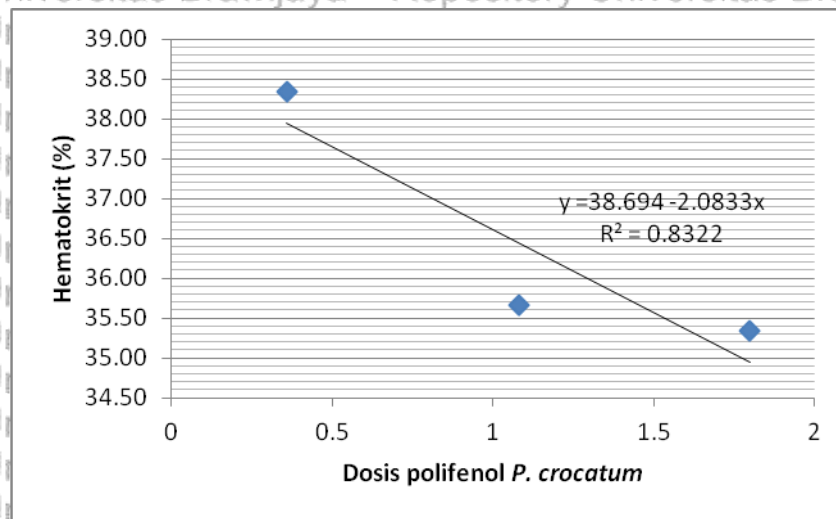
K (+) = Pemberian fenol sintetis 3 mg/kg

Gambar 25. Rerata Hematokrit Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana nilai hematokrit pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai $F_{hit} 18,68 > F_{tab} 5\% 3,48$. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 4,41 dengan notasi hematokrit pada perlakuan K (+) berbeda nyata terkecil dengan perlakuan A, B, C dan K (-) (Lampiran 4).

Pada **Gambar 26** Hasil regresi linier didapatkan hubungan dosis polifenol *P. crocatum* dengan nilai hematokrit melalui persamaan $y = 38,694 - 2,0833x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,8322. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi perlakuan daun sirih merah berpengaruh 83,22%. Dari hasil analisis

menunjukkan perlakuan C dengan dosis polifenol ekstrak daun sirih merah sebesar 1,80 mg/kg menunjukkan dosis yang paling toksik



Gambar 26. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah hematokrit ikan lele dumbo

Berdasarkan hasil penelitian, nilai hematokrit pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) sejumlah 38%, hal tersebut sesuai dengan pendapat Bastiawan *et al.* (1995) bahwa hematokrit ikan lele dumbo yang normal berkisar 30,8-45,5%. Anderson dan Siwicki, (1994) menambahkan pada ikan Rainbow Trout yang sehat level hematokritnya sekitar 30-40%. Nilai hematokrit yang sama dengan kontrol (-) terjadi pada perlakuan A, B dan C, namun kondisi yang berbeda menunjukkan pasca injeksi fenol menyebabkan penurunan nilai hematokrit yang cukup signifikan pada perlakuan K (+) yaitu 23,33%. Hal ini menjelaskan bahwa nilai hematokrit pada perlakuan dosis injeksi polifenol *P. crocatum* mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan, namun nilai tersebut masih masuk dalam ambang batas normal kandungan hematokrit. Roche dan Boge (2000), melaporkan hasil penelitiannya dengan injeksi fenolik secara fraksi pada ikan *Dicentrarchus labrax* menunjukkan tidak adanya perubahan yang signifikan terhadap turun atau



naiknya nilai kandungan hematokrit, hematokrit *D. labrax* normal yaitu berkisar 25-30% sedangkan perlakuan injeksi fenolik berkisar 25-30 %.

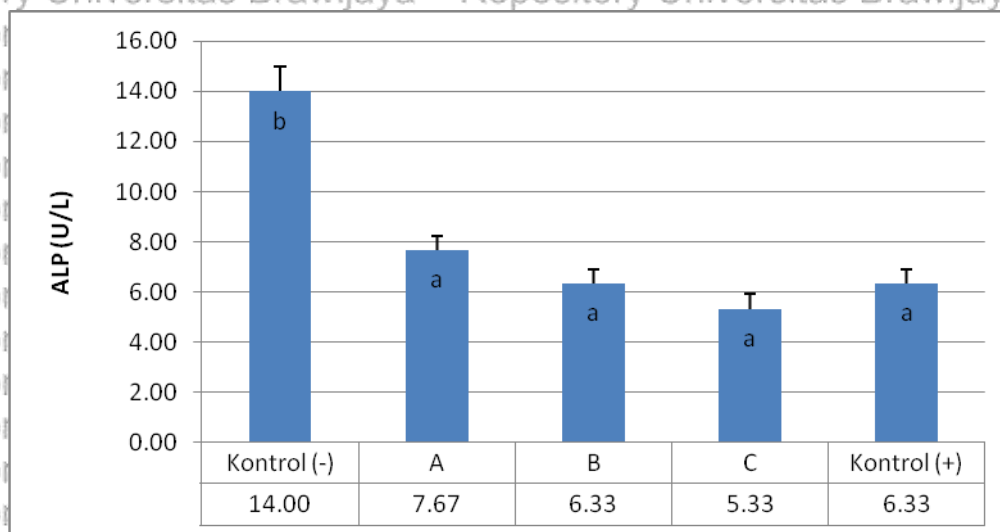
Nilai pada Kontrol (+) menunjukkan nilai hematokrit yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan C yaitu 23,33%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa perlakuan kontrol (+) injeksi fenol sintetis dengan dosis 3 mg/kg sangat berpengaruh terhadap turunnya kandungan hematokrit ikan lele dumbo. Namun kondisi tersebut tidak berbeda dengan nilai perlakuan injeksi polifenol *P. crocatum* bahwa nilai hematokrit yang diperoleh masih dalam batas ambang normal, hal tersebut sependapat dengan Tsuzuki *et al.*, (2001) yang menyatakan Ikan air tawar dikatakan sehat apabila kadar hematokritnya berkisar antara 22-60%. Apabila hematokrit ikan kurang dari 22% dinyatakan terjadinya anemia, sama halnya apabila nilai hematokrit lebih besar dari 60% menandakan bahwa ikan dalam keadaan stress. Anderson dan Siwicki, (1994) menambahkan rendahnya hematokrit juga dapat menunjukkan terjadinya kontaminasi ikan.

5.2.1.3 Alkali Phospatase (ALP)

Alkali fosfatase (alkaline phosphatase, ALP) merupakan enzim hidrolase yang diproduksi terutama oleh epitel hati dan osteoblast (sel-sel pembentuk tulang baru); enzim ini juga berasal dari usus, tubulus proksimalis ginjal. Jumlah enzim ALP di dalam tubuh sangat dipengaruhi oleh berbagai kondisi dan penyakit. Tes ALP terutama digunakan untuk mengetahui apakah terdapat penyakit hati dan ginjal (Danyal, 2009).

Gambar 27 menjelaskan nilai rerata ALP pada kontrol sejumlah 14 U/L sedangkan pada perlakuan A, B dan C sejumlah 7,67 U/L, 6,33 U/L dan 5,33 U/L. Pada perlakuan Kontrol (+) memiliki nilai rerata ALP yang sama dengan Perlakuan B yaitu 6,33 U/L. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa

pemberian polifenol *P. crocatum* dosis B dan fenol sintetis memiliki berpengaruh yang sama terhadap menurunnya nilai ALP.



Keterangan :

K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)

A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg

B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg

C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg

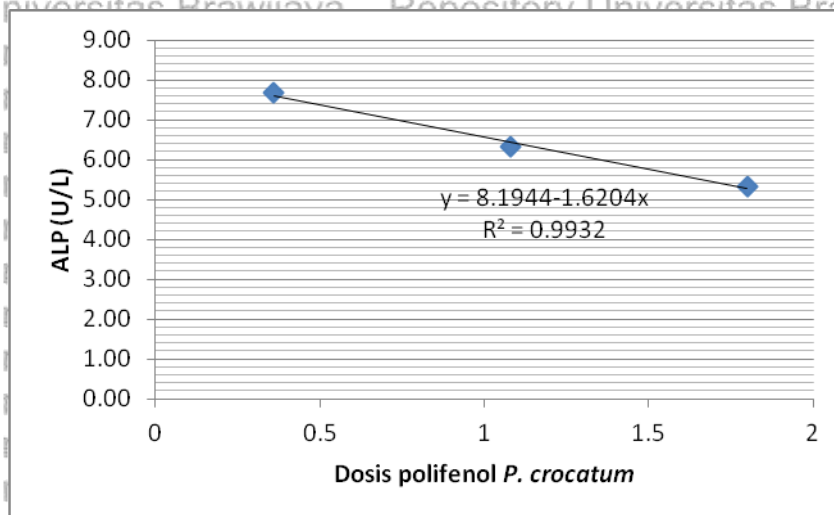
K (+) = Pemberian fenol sintetis 3 mg/kg

Gambar 27. Rerata Alkali Phosphatase (ALP) Ikan Lele Dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana nilai ALP pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai $F_{hit} 78,36 > F_{tab} 5\% 3,48$. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 1,24 dengan notasi ALP pada perlakuan K (-) berbeda nyata terkecil dengan perlakuan A, B, C dan K(+) (Lampiran 5).

Pada Gambar 28 Hasil regresi linier didapatkan hubungan dosis polifenol *P. crocatum* dengan ALP melalui persamaan $y = 8,1944 - 1,6204x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9932. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi

perlakuan daun sirih merah berpengaruh 99,32%. Dari hasil analisis menunjukkan perlakuan C dengan dosis polifenol ekstrak daun sirih merah sebesar 1,80 mg/kg menunjukkan dosis yang paling toksik.



Gambar 28. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah Alkali Phosfatase (ALP) ikan lele dumbo

Berdasarkan hasil penelitian, nilai ALP pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) sejumlah 14 U/L. Roche and Boge, (2000) melaporkan dalam risetnya kondisi nilai ALP normal ikan *Dicentrarchus labrax* adalah berkisar 30-60 U/L. Kondisi nilai ALP kontrol ikan lele dumbo tersebut sangat rendah dibandingkan dengan ALP ikan *Dicentrarchus labrax*. Kondisi tersebut diduga disebabkan berbagai faktor seperti umur, berat badan dan spesies. Ikan *Dicentrarchus labrax* yang digunakan dalam penelitian Roche and Boge (2000) berukuran 100 gram sedangkan ikan lele dumbo yang digunakan dalam penelitian polifenol *P. crocatum* berukuran 10-15 gram. Selain hal tersebut spesies yang berbeda akan menunjukkan nilai ALP yang berbeda, hal tersebut sesuai dengan pendapat Frandson, (1992) yang menyatakan nilai biokimia darah dapat berbeda-beda tergantung spesiesnya.



Berdasarkan hasil yang diperoleh nilai ALP pada perlakuan pasca injeksi polifenol *P. crocatum* menunjukkan penurunan yang cukup signifikan pada semua perlakuan. Pada perlakuan A dengan dosis terendah mengalami penurunan nilai ALP sejumlah 6,33 U/L. Nilai ALP tersebut menurun seiring dengan bertambahnya dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan, sedangkan pada kontrol (+) menunjukkan nilai ALP yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan C yaitu 5,33 U/L atau selisih 1 U/L. Roche dan Boge (2000), melaporkan hasil penelitiannya dengan injeksi fenolik secara fraksi pada ikan *Dicentrarchus labrax* menunjukkan penurunan nilai ALP dari kisaran 50-75 U/L menjadi 25-50 U/L. Peters, et al., (1997) menambahkan konsekuensi pengaruh dari senyawa fenolik terhadap metabolik seperti penurunan aktivitas ALP merupakan akibat penyakit nefrotoksitas dan eliminasi.

Nefrotoksitas merupakan penyakit derajat toksik atau kerusakan terhadap sel ginjal, salah satu macam nefrotoksitas adalah nefrotoksitas aminoglikosida. Gejala-gejala penyakit pada nefrotoksik yakni berkurangnya filtrasi glomerulus. Pengurangan filtrasi glomerulus dapat disebabkan oleh adanya obstruktubular dan kerusakan tubulus, yang berumpan balik menyebabkan aktivasi vasokonstriksi ginjal. Ricardi (2011), menyatakan sitotoksitas gentamisin terjadi pada sel-sel dimana senyawa tersebut terakumulasi. Pada ginjal, akumulasi senyawa terjadi di sel-sel epitelial korteks, terutama bagian tubulus proksimalnya serta terjadi pula akumulasi di tubulus distal dan duktus.

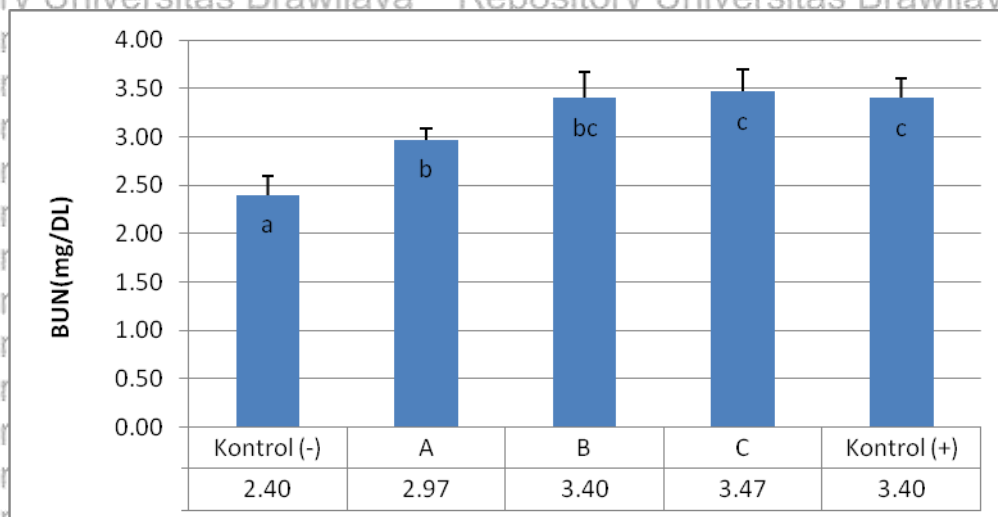
5.2.1.4 Kadar Nitrogen Urea Darah (BUN)

Nitrogen urea darah (*blood urea nitrogen*) adalah konsentrasi serum atau plasma urea, yang ditentukan dengan kandungan nitrogen, sebuah indikator



penting dari fungsi ginjal. Urea adalah produk utama nitrogen di akhir metabolisme protein, dibentuk di hati dari asam amino dan dari senyawa amoniak (George et al., 1999).

Nilai rerata BUN pada Gambar 29 menjelaskan pada kontrol senilai 2,4 mg/dL sedangkan pada perlakuan A, B, C dan kontrol (+) senilai 2,97 mg/dL, 3,40 mg/dL, 3,47 mg/dL dan 3,40 mg/dL. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian polifenol *P. crocatum* dan fenol sintetis berpengaruh terhadap meningkatnya nilai BUN, korelasi menunjukkan semakin tingginya dosis yang diberikan pada perlakuan semakin tingginya nilai BUN.



Keterangan :

- K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)
- A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg
- B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg
- C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg
- K (+) = Pemberian fenol sintetis 3 mg/kg

Gambar 29. Rerata Nitrogen Urea Darah (BUN) Ikan Lele Dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana nilai BUN pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai

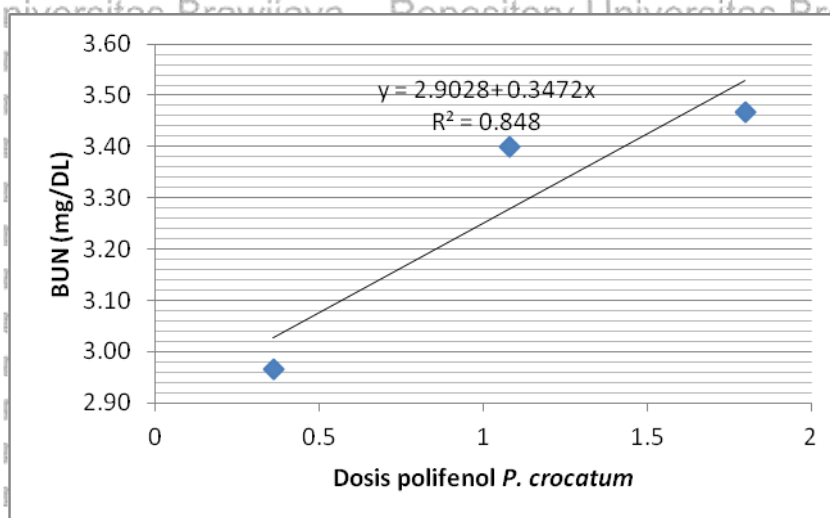
$F_{hit} 14,17 > F_{tab} 5\% 3,48$. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji



BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 0,38 dengan notasi BUN pada perlakuan K (-) berbeda nyata terkecil dengan perlakuan A, B, C dan K(+).

Pada perlakuan A dan B berbeda nyata dengan perlakuan Kontrol (-), perlakuan C dan Kontrol (+), sedangkan pada perlakuan C berbeda nyata dengan perlakuan A, perlakuan B dan kontrol (-) (**Lampiran 6**).

Pada **Gambar 30** Hasil regresi linier didapatkan hubungan dosis polifenol *P. crocatum* dengan BUN melalui persamaan $y = 2,9028 + 0,3472x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,848. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi perlakuan daun sirih merah berpengaruh 84,80%. Dari hasil analisis menunjukkan perlakuan C dengan dosis polifenol ekstrak daun sirih merah sebesar 1,80 mg/kg menunjukkan dosis yang paling toksik



Gambar 30. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan jumlah Nitrogen Urea Darah (BUN) ikan lele dumbo

Berdasarkan hasil penelitian, nilai BUN pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) sejumlah 2,4 mg/dL. Roche and Boge, (2000) melaporkan dalam risetnya kondisi nilai BUN normal ikan *Dicentrarchus labrax* adalah berkisar 9-12 mg/dL. Kondisi nilai BUN kontrol ikan lele dumbo tersebut sangat



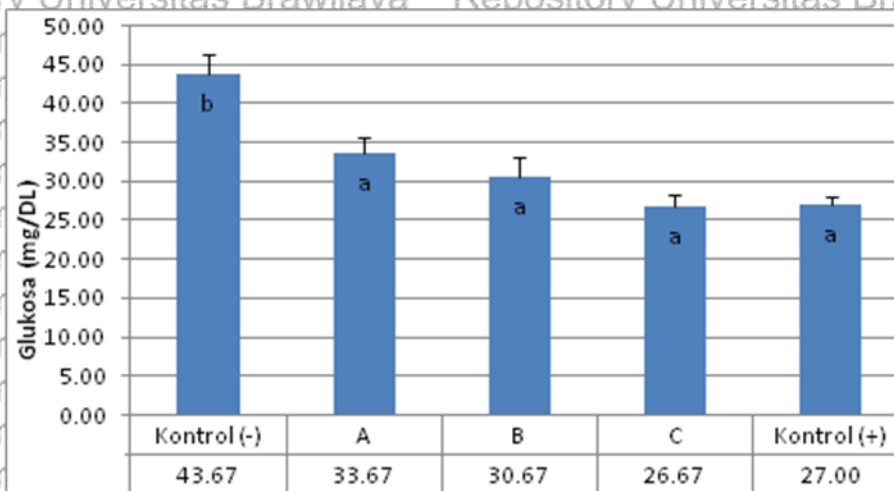
rendah dibandingkan dengan BUN ikan *Dicentrarchus labrax* yaitu selisih 8,1 mg/dL. Kondisi tersebut diduga disebabkan berbagai faktor seperti umur, berat badan dan spesies. Ikan *Dicentrarchus labrax* yang digunakan dalam penelitian Roche and Boge, (2000) berukuran 100 gram sedangkan ikan lele dumbo yang digunakan dalam penelitian polifenol *P. crocatum* berukuran 10-15 gram. Selain hal tersebut spesies yang berbeda akan menunjukkan nilai BUN yang berbeda, hal tersebut sesuai dengan pendapat Frandson, (1992) yang menyatakan nilai biokimia darah dapat berbeda-beda tergantung spesiesnya.

Berdasarkan hasil yang diperoleh nilai BUN pada perlakuan pasca injeksi polifenol *P. crocatum* menunjukkan peningkatan pada semua perlakuan. Pada perlakuan A dengan dosis terendah mengalami peningkatan nilai BUN sejumlah 0,57 mg/dL atau 19,19%. Nilai BUN tersebut meningkat seiring dengan bertambahnya dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan, sedangkan pada kontrol (+) menunjukkan nilai BUN yang sama dibandingkan dengan perlakuan B yaitu 3,40 mg/dL. Roche dan Boge (2000), melaporkan hasil penelitiannya dengan injeksi fenolik secara fraksi pada ikan *Dicentrarchus labrax* menunjukkan peningkatan nilai BUN dari kisaran 19-12 mg/dL menjadi 12-15 mg/dL. Peters, *et al.*, (1997) menambahkan konsekuensi pengaruh dari senyawa fenolik terhadap metabolisme seperti peningkatan nilai BUN merupakan akibat penyakit nefrotoksitas dan eliminasi. Nefrotoksitas merupakan penyakit derajat toksik atau kerusakan terhadap sel ginjal, dimana ginjal merupakan organ ekskresi dalam vertebrata yang berbentuk mirip kacang. Sebagai bagian dari sistem urin, ginjal berfungsi menyaring kotoran (terutama urea) dari darah dan membuangnya bersama dengan air dalam bentuk urin.



5.2.1.5 Kadar Glukosa (Glu)

Didalam darah terdapat zat glukosa, glukosa ini gunanya untuk dibakar agar mendapatkan kalori atau energi. Sebagian glukosa yang ada dalam darah adalah hasil penyerapan dari usus dan sebagian lagi dari hasil pemecahan simpanan energi dalam jaringan (Bastiawan et al., 1995). Nilai rerata kadar glukosa darah pada ikan lele pasca injeksi senyawa polifenol *P. crocatum* dapat dilihat pada **Gambar 31**.



Keterangan :

- K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)
- A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg
- B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg
- C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg
- K (+) = Pemberian fenol sintetis 3 mg/kg

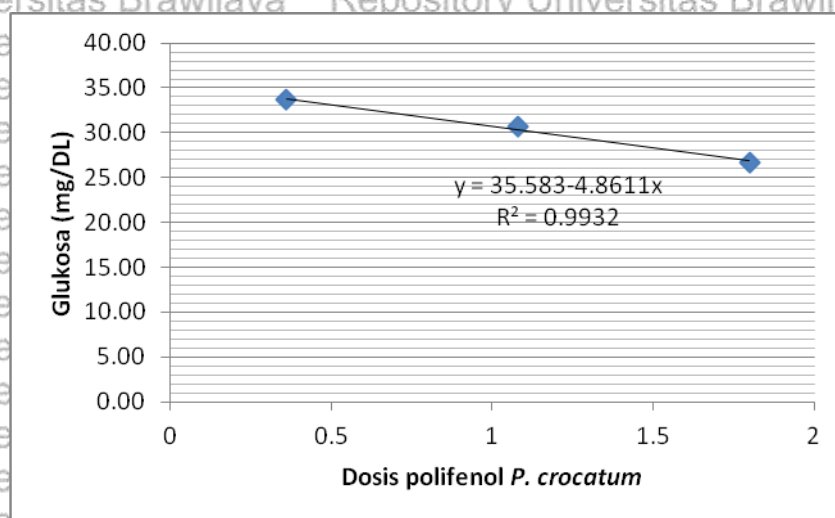
Gambar 31. Rerata Kadar Glukosa Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Gambar diatas, dapat diketahui nilai rerata kadar glukosa pada kontrol sejumlah 43,67 mg/dL sedangkan pada perlakuan A, B dan C sejumlah 33,67 mg/dL, 30,67 mg/dL dan 26,67 mg/dL. Pada perlakuan Kontrol (+) memiliki nilai rerata kadar glukosa yang hampi sama dibanding pelakuan C yaitu 27 mg/dL. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pemberian polifenol *P. crocatum*



dengan perlakuan C dosis 1,08 mg/kg memiliki dampak toksik yang hampir sama dibandingkan dengan perlakuan kontrol (+) penggunaan fenol dosis 3 mg/kg.

Analisa data yang digunakan adalah analisa keragaman satu arah (one way anova) dimana kadar glukosa pada perlakuan berbeda sangat nyata dengan nilai $F_{hit} 35,70 > F_{tab} 5\% 3,48$. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan uji BNT 5% (derajat kepercayaan 95%) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Pada perlakuan memperoleh nilai BNT 5% 3,67 dengan notasi kadar glukosa pada perlakuan K (-) berbeda nyata terkecil dengan perlakuan A, B, C dan K(+) (**Lampiran 7**).



Gambar 32. Persamaan regresi dosis polifenol daun sirih merah dengan kadar glukosa ikan lele dumbo

Pada **Gambar 32** hasil regresi linier didapatkan hubungan dosis polifenol *P. crocatum* dengan glukosa melalui persamaan $y = 35,583 - 4,8611x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9932. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi perlakuan polifenol daun sirih merah berpengaruh 99,32%. Dari hasil analisis menunjukkan perlakuan C dengan dosis polifenol ekstrak daun sirih merah sebesar 1,80 mg/kg menunjukkan dosis yang paling toksik.



Berdasarkan hasil penelitian, kadar glukosa pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) sejumlah 43,67 mg/dL, hal tersebut sesuai dengan pedapat Heath (1987) menyatakan bahwa kadar glukosa darah pada ikan lele dumbo dalam kondisi normal berkisar antara 41-150 mg/dL. Kondisi yang berbeda menunjukkan pasca injeksi polifenol *P. crocatum* kadar glukosa menurun cukup signifikan pada perlakuan C yaitu sejumlah 26,67 mg/dL atau selisih 17 mg/dL dibandingkan perlakuan kontrol. Korelasi Kadar glukosa tersebut menurun seiring dengan bertambahnya dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan.

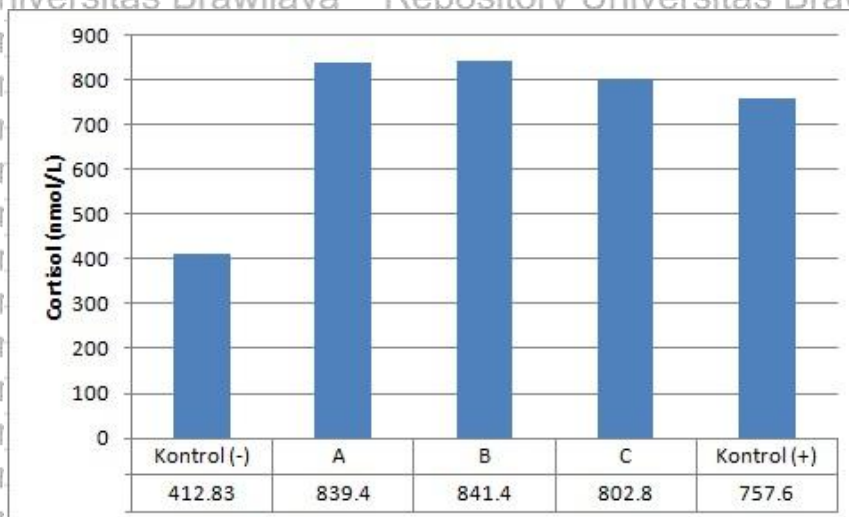
Varadarajan et al. (2014) melaporkan hasil penelitiannya dengan pemberian fenolik pada ikan *Oreochromis mossambicus* menunjukkan penurunan kadar glukosa yang dibandingkan dengan kontrol dari kisaran 45-50 mg/dL menjadi 35-40 mg/dL. Hastuti et al. (2003); Pilliang et al. (2000) menambahkan salah satu pendekatan yang bisa dilihat pada tubuh ikan saat stress adalah perubahan turun naiknya kadar glukosa.

Varadarajan et al., (2014) menyatakan paparan fenol menyebabkan penurunan kadar glukosa darah akibat meningkatkan metabolisme dalam tubuh, homeostasis glukosa darah dan terganggunya hormon. Mekanisme menurunnya kadar glukosa terjadi akibat adanya kerusakan sel pada hati sehingga ketika terjadi rangsangan oleh insulin, hati tidak dapat mengubah glikogen menjadi glukosa agar dapat digunakan sebagai tenaga untuk kontraksi otot. Berdasarkan fungsinya, hati juga termasuk sebagai alat ekskresi. Hal ini dikarenakan hati membantu fungsi ginjal dengan cara memecah beberapa senyawa yang bersifat racun (detoksifikasi) dan menghasilkan amonia, urea, dan asam urat dengan memanfaatkan nitrogen dari asam amino. Kondisi tersebut sesuai dengan hasil histologi yang menunjukkan kerusakan nekrosis pada hati pasca injek polifenol *P. crocatum* dan fenol.



5.2.1.6 Hormon Kortisol

Hormon Kortisol adalah hormon steroid dari golongan glukokortikoid yang umumnya diproduksi oleh sel di dalam zona fasikulata pada kelenjar adrenal (Michael., 2015). Hormon ini merupakan hasil sekresi kelenjar endokrin, dimana kelenjar-kelenjar endokrin menyusun sistim endokrin yang memiliki fungsi mengatur kerja proses fisiologis tubuh. Sistim endokrin mengontrol respon stres dengan melepaskan hormon kortisol dan katekolamin (Barton, 1987). Nilai hormon kortisol pada ikan lele pasca injeksi senyawa polifenol *P. crocatum* dan fenol dapat dilihat pada **Gambar 33**.



Keterangan :

K (-) = Tidak ada Perlakuan (kontrol)

A = Pemberian polifenol *P. crocatum* 0,36 mg/kg

B = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,08 mg/kg

C = Pemberian polifenol *P. crocatum* 1,80 mg/kg

K (+) = Pemberian fenol sintesis 3 mg/kg

Gambar 33. Kadar Hormon Kortisol Pada Ikan Lele dumbo Pasca Injeksi Polifenol *P. crocatum*

Gambar diatas, dapat diketahui nilai kortisol pada kontrol senilai 412,83 nmol/L sedangkan pada perlakuan A, B dan C senilai 839,4 nmol/L, 841,4 nmol/L dan 802,8 nmol/L. Pada perlakuan Kontrol (+) memiliki nilai hormon kortisol yang lebih rendah dibanding perlakuan A yaitu 757,6 nmol/L. Kondisi



tersebut menunjukkan bahwa pemberian polifenol *P. crocatum* pada semua perlakuan memberikan dampak toksik bahkan dibandingkan dengan perlakuan kontrol (+) yang menggunakan fenol dosis 3 mg/kg.

Berdasarkan hasil penelitian, nilai kortisol pada ikan lele dumbo tanpa perlakuan (kontrol) memiliki nilai 412,83 nmol/L. Nilai yang sama terjadi pada penelitian Roche and Boge, (2000) yang melaporkan bahwa nilai kortisol ikan *Dicentrarchus labrax* sebagai kontrol memiliki nilai berkisar 349,8 – 445,2 nmol/L, pasca injeksi fenol meningkat menjadi 1113 – 1272 nmol/L. Peningkatan hormon kortisol pada perlakuan A (polifenol 0,36 mg/kg) merupakan nilai yang tertinggi dibandingkan pada perlakuan C (polifenol 1,80 mg/kg), bahkan pada perlakuan kontrol (+) injeksi fenol 3 mg/kg. Namun nilai hormon kortisol pada semua perlakuan menunjukkan peningkatan yang cukup signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (K-), dimana peningkatan nilai hormon tersebut sebanyak 103,3% pada perlakuan A, 103,8% pada perlakuan B, 94,46% pada perlakuan C, dan 83,51% pada perlakuan kontrol positif (K+).

Roche dan Boge, (2000) menyatakan terjadi peningkatan stressor pada ikan pasca injeksi fenol tunggal maupun fraksi disebabkan adanya gangguan pada sel. Adanya kerusakan pada sel endokrin baik pada hati maupun ginjal menyebabkan nilai biokimia darah tidak normal, salah satunya yang berperan besar adalah pada hemoglobin. Rendah hb pada perlakuan injeksi polifenol menunjukkan bahwa penyebaran oksigen dalam tubuh ikan lele dumbo terganggu. Ikan yang mengalami stres secara fisiologis akan mengembangkan suatu kondisi yang homeostatis yang baru dengan mengubah metabolismenya.

Respons terhadap stres ini dikontrol oleh sistem endokrin melalui pelepasan hormon kortisol dan katekolamin (Barton 1987). Hastuti et al., (2003) menambahkan bahwa mekanisme stres adalah adanya stressor yang diterima

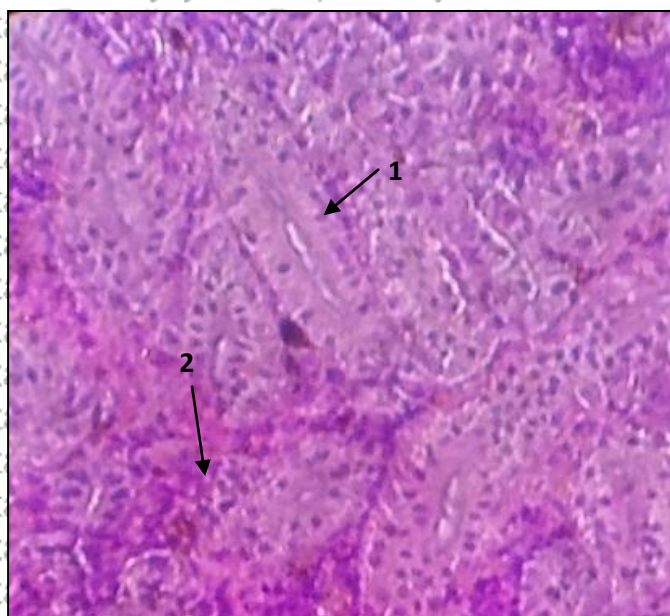


oleh organ reseptor kemudian informasi tersebut disampaikan ke otak bagian hipotalamus melalui sistem saraf. Saat yang bersamaan, hipotalamus otak mensekresi *CRF* (*corticotropin releasing factor*) yang meregulasi kelenjar pituitari untuk mensekresi *ACTH* (*Adenocorticotrophic hormone*), *MSH* (*Melanophore-Stimulating hormone*) dan β -*End* (β -*endorphin*). Hormon tersebut akan meregulasi sekresi hormon kortisol dari sel interrenal sehingga terjadi peningkatan.

5.2.2 Parameter Histologi

5.2.2.1 Gambaran Histologi Ginjal Sehat Ikan Iele dumbo (*C. gariepinus*)

Ginjal ikan terletak pada posisi retroperitoneal dibagian ventral dari tulang punggung, di bawah kolum vertebrae. Ginjal terbagi atas bagian anterior dan posterior (Ferguson, 1989). Ginjal berfungsi untuk filtrasi dan mengekskresi bahan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh, termasuk senyawa dan logam berat yang toksik. Hal ini menyebabkan ginjal sering mengalami kerusakan akibat daya toksik senyawa maupun logam (Erlangga, 2007).



Gambar 34. Histologi ginjal normal. Tanda panah No. 1. Tubulus distal (T); 2. Jaringan hematopoetik (JH). Mikroskop cahaya perbesaran 400x.



Gambar 34 menjelaskan bahwa kondisi jaringan hati tidak mengalami kerusakan, baik ditubulusa distal maupun di jaringan hematopoetik. Kondisi tersebut dapat menjelaskan kondisi ikan sehat, dimana sistem kerja organ endokrin bekerja normal. (Plumb, 1994) menyatakan patologi merupakan suatu studi penyakit mencakup fungsional dan perubahan morfologi serta reaksi yang berkembang pada organisme akibat infeksi agen dan kekurangan nutrisi.

5.2.2.2 Gambaran Histologi Ginjal Ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum*

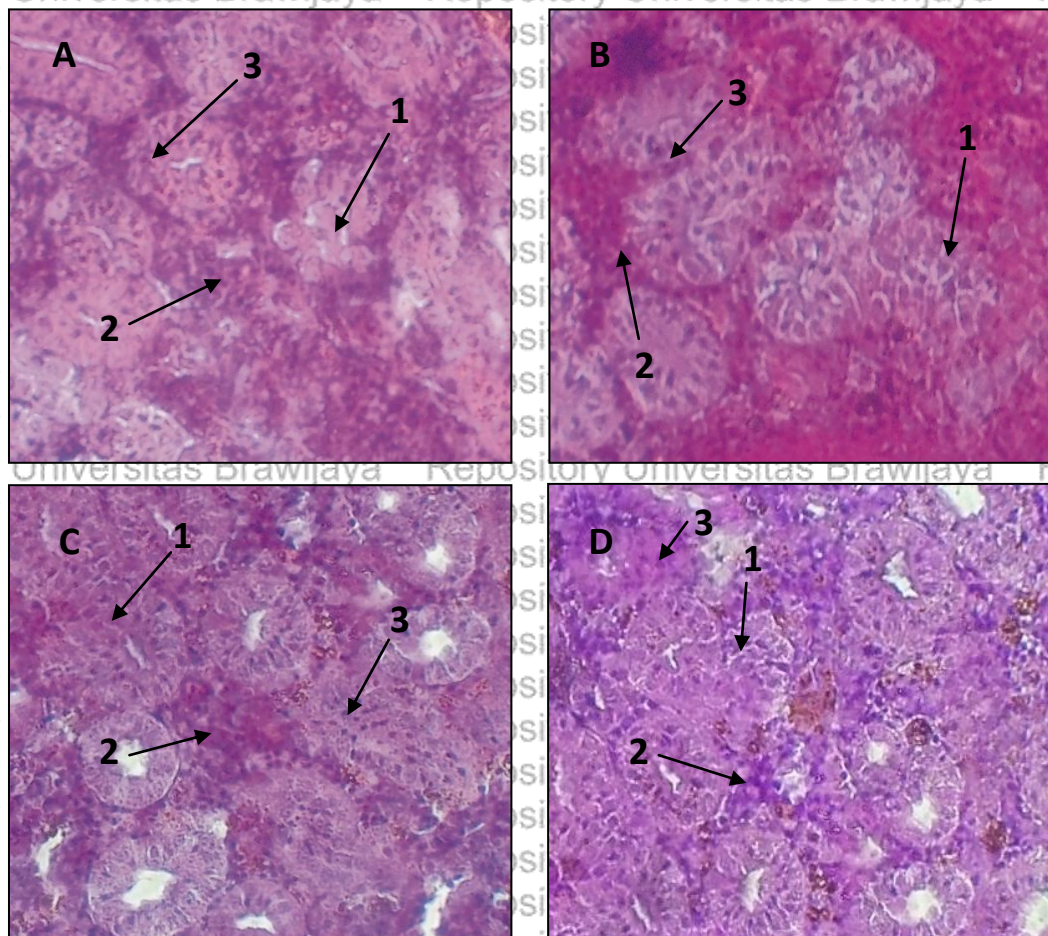
Pengamatan histopatologi digunakan untuk melihat perubahan jaringan pada ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) pasca injeksi senyawa golongan polifenol *P. crocatum* dan fenol sintetis. Berdasarkan hasil gambar jaringan ginjal yang diperoleh pada perlakuan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 0,36 mg/kg, 1,08 mg/kg dan 1,80 mg/kg serta fenol sintetis sebagai kontrol positif (K+) memberikan dampak kerusakan berupa nekrosis, edema dan kongesti. Pada **Gambar 35** dilihat jaringan ginjal ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol sintetis memberikan gambaran kerusakan jaringan yang berbeda berdasarkan dosis yang diberikan. Hal tersebut dapat diketahui dari hasil skoring kerusakan jaringan ginjal. Hasil rerata luas pandangan menunjukkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal berupa nekrosis, edema dan kongesti memiliki hasil yang berbeda-beda.

Hasil data skoring pada jaringan ginjal pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol sebagai berikut :

a. Kerusakan Nekrosis Pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dengan berbagai dosis yang berbeda dan senyawa fenol sebagai pembanding (kontrol +). Kondisi jaringan ginjal

kerusakan nekrosis diamati dengan penilaian skoring. Hasil perhitungan rerata skoring luasan pandang pada jaringan ginjal ikan lele dapat dilihat pada Tabel 9.



Gambar 35. Histopatologi Ginjal. (A) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 0,36 mg/kg. (B) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,08 mg/kg. (C) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,80 mg/kg. (D) Ikan dengan injeksi fenol dosis 3 mg/kg. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Edema; 3. Kongesti. Mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Tabel 9. Rerata luasan pandang skoring kerusakan nekrosis pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Kelainan Patologi	Perlakuan	Rerata Luas Pandang
Nekrosis	Kontrol negatif (K-)	1
	0,36 mg/kg (A)	1,8
	1,08 mg/kg (B)	2
	1,80 mg/kg (C)	2,2
	Kontrol positif (K+)	2,2



Berdasarkan Tabel 9 dapat dilihat pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 0,36 mg/kg (A) menunjukkan nilai skoring yang terendah yakni masuk dalam kriteria kerusakan jaringan yang ringan. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal senilai 1,8. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,08 mg/kg (B), 1,80 mg/kg (C) dan kontrol positif (K+) dosis fenol 3,0 mg/kg, menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2 dan 2,2 (**Lampiran 8**).

Kondisi skoring tersebut menjelaskan bahwa dosis polifenol *P. crocatum* dan fenol yang diberikan memberikan dampak kerusakan yang cukup signifikan hingga berdampak terjadi nekrosis. Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya secara *in vivo* pada LD 20% dan 50% ikan *C. gariepinus* menunjukkan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada ginjal setelah dipapar senyawa fenol. Kondisi organ endokrin yang rusak akibat nekrosis dapat mengganggu metabolisme suatu organisme, sehingga fungsi dari organ tersebut tidak dapat bekerja normal. Price and Wilson, (2006) menyatakan nekrosis merupakan kondisi dimana sel-sel jaringan mengalami kematian yang diawali dengan rendahnya aktivitas dalam jaringan, kondisi tersebut menyebabkan rendah bahkan hilangnya fungsi dari daerah yang terjadi nekrosis. Erlangga, (2007), menambahkan ginjal mempunyai peran utama dalam ekskresi metabolisme, pencernaan dan tempat penyimpanan berbagai unsur serta sebagai filtrasi bahan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh, termasuk senyawa dan logam berat yang toksik. Hal ini menyebabkan ginjal sering mengalami kerusakan akibat daya toksik senyawa maupun logam.

Toksikan merupakan zat (berdiri sendiri atau dalam campuran zat, limbah, dan sebagainya) yang dapat menghasilkan efek negatif bagi semua atau



sebagian dari tingkat organisasi biologis (populasi, individu, organ, jaringan, sel, biomolekul) dalam bentuk merusak struktur maupun fungsi biologis (Soemirat, 2003). Mekanisme toksik suatu senyawa sebagai contoh polifenol akan bekerja dengan merusak membran sitoplasma secara total dengan mengendapkan protein sel. Ah receptor (AhR) dapat mengikat ligan seperti senyawa polifenol, HK aromatik polisiklik atau dioksin (Madigan, 2005).

b. Kerusakan Edema Pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dengan berbagai dosis yang berbeda dan senyawa fenol sebagai pembanding kontrol positif (K+). Kondisi jaringan ginjal kerusakan edema diamati dengan penilaian skoring. Hasil perhitungan rerata skoring luasan pandang pada jaringan ginjal ikan lele dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Rerata luasan pandang skoring kerusakan edema pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Kelainan Patologi	Perlakuan	Rerata Luas Pandang
Edema	Kontrol negatif (K-)	1
	0,36 mg/kg (A)	1,6
	1,08 mg/kg (B)	1,6
	1,80 mg/kg (C)	2,2
	Kontrol positif (K+)	2,2

Berdasarkan Tabel 10 dapat dilihat pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 0,36 mg/kg (A) dan dosis 1,08 mg/kg (B) menunjukkan nilai skoring yang terendah yakni masuk dalam kriteria kerusakan jaringan yang ringan. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal senilai 1,6. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,8 mg/kg (B) dan kontrol positif (K+) dosis fenol 3,0 mg/kg, menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2,2.



Kondisi skoring tersebut menjelaskan bahwa dosis polifenol *P. crocatum* dan fenol yang diberikan memberikan dampak kerusakan hingga berdampak terjadi edema. Ersu (2008) menyatakan edema merupakan akumulasi cairan yang tidak normal yang terdapat pada ruang-ruang interstitial atau rongga tubuh jaringan sehingga terjadi pembengkakan. Hibiya dan Fumio (1995), menambahkan edema mengindikasikan terjadinya disfungsi ginjal, dimana penyebabnya dikaitkan dengan bahan-bahan kimia yang toksik.

c. Kerusakan Kongesti Pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dengan berbagai dosis yang berbeda dan senyawa fenol sebagai pembanding (kontrol +). Kondisi jaringan ginjal kerusakan kongesti diamati dengan penilaian skoring. Hasil perhitungan rerata skoring luasan pandang pada jaringan ginjal ikan lele dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Rerata luasan pandang skoring kerusakan kongesti pada Jaringan Ginjal Ikan Lele

Kelainan Patologi	Perlakuan	Rerata Luas Pandang
Kongesti	Kontrol negatif (K-)	1
	0,36 mg/kg (A)	1,4
	1,08 mg/kg (B)	1,6
	1,80 mg/kg (C)	1,8
	Kontrol positif (K+)	2

Berdasarkan Tabel 11, dapat dilihat pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 0,36 mg/kg (A) menunjukkan nilai skoring yang terendah yakni masuk dalam kriteria kerusakan jaringan yang ringan. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal senilai 1,4. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,08 mg/kg (B) dan dosis 1,80 mg/kg (C), menunjukkan nilai skoring masuk dalam kriteria kerusakan jaringan mendekati sedang. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan



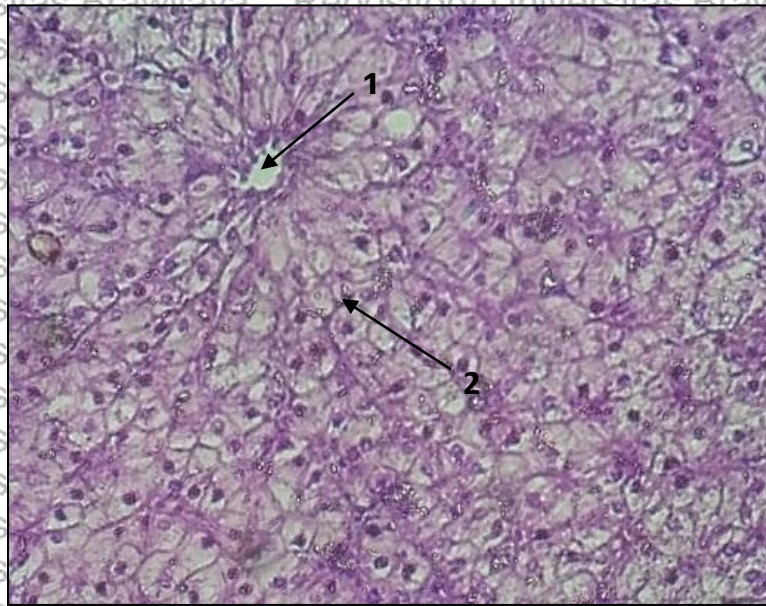
ginjal senilai 1,6 dan 1,8. Sedangkan pada perlakuan kontrol positif (K+) dosis fenol 3,0 mg/kg, menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2.

Nilai skoring kerusakan jaringan kongesti pada perlakuan menunjukkan kondisi dimana semakin tinggi dosis yang diberikan semakin besar tingkat kerusakan yang terdapat pada jaringan. Wikiandy *et al.*, (2013) menyatakan kongesti pada tingkat yang paling berat akan menyebabkan pembuluh darah pecah atau keluar dari sirkulasi kardiovaskuler (arteri, vena dan kapiler), yang pada akhirnya akan menyebabkan sel mati atau nekrosis.

5.2.2.3 Gambaran Histologi Hati Sehat Ikan lele dumbo (*C. gariepinus*)

Hati merupakan organ terbesar pada tubuh ikan yang terletak dibagian sisi perut, dalam rongga *pelitoneal* dan melingkupi *viscera*. Hati memiliki bentuk seperti huruf U dan berwarna merah kecoklatan. Fungsi lain dari hati yaitu pembentukan dan ekskresi empedu, metabolisme gram empedu, metabolisme karbohidrat (glikogenesis, glikogenolisis dan glukoneogenesis), sintesis protein, metabolisme dan penyimpanan lemak (Anderson, 1995). Gambaran jaringan hati ikan lele yang normal (tanpa injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol) dapat dilihat pada **Gambar 36**.

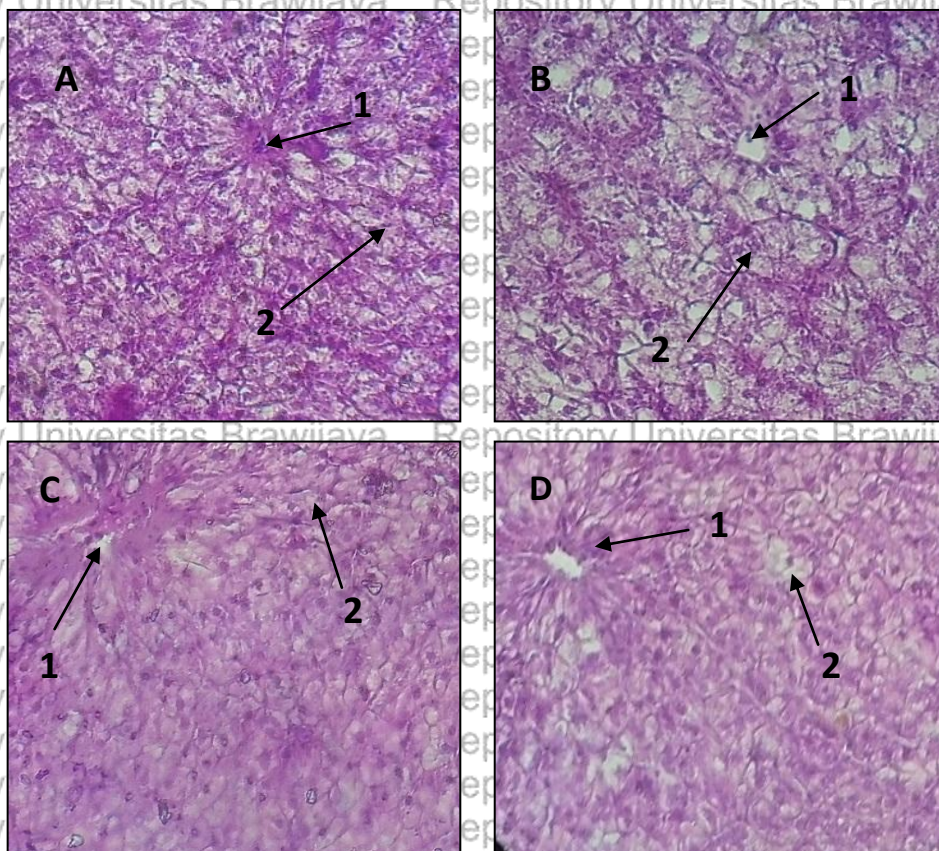
Pada Gambar 36 dapat dilihat bahwa kondisi jaringan hati tidak mengalami kerusakan, baik di vena sentralis maupun di sinusoid. Kondisi tersebut dapat menjelaskan kondisi ikan sehat, dimana sistem kerja organ endokrin bekerja normal. Yuniar (2009) menyatakan hati termasuk organ yang sensitif terhadap perubahan konsentrasi senyawa-senyawa kimia di dalam tubuh.



Gambar 36. Histologi hati normal. Tanda panah No. 1: Vena Sentralis (VS), 2: Sinusoid (S). Mikroskop cahaya perbesaran 400x.

5.2.2.4 Gambaran Histologi Hati Ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum*

Pengamatan histopatologi digunakan untuk melihat perubahan jaringan pada ikan lele dumbo (*C. gariepinus*). Kerusakan jaringan hati lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol dapat dilihat pada **Gambar 37**. Berdasarkan hasil gambar jaringan hati yang diperoleh pada perlakuan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 0,36 mg/kg, 1,08 mg/kg dan 1,80 mg/kg serta fenol sintesis sebagai kontrol positif (K+) memberikan dampak kerusakan berupa nekrosis dan hipertropi. Hati merupakan salah satu organ utama pertahanan agen toksik, fungsi lain dari hati yaitu pembentukan dan ekskresi empedu, metabolisme gram empedu, metabolisme karbohidrat (glikogenesis, glikogenolisis dan glukoneogenesis), sintesis protein, metabolisme dan penyimpanan lemak (Anderson, 1995).



Gambar 37. Histopatologi Hati. (A) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 0,36 mg/kg. (B) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,08 mg/kg. (C) Ikan dengan injeksi polifenol *P. crocatum* dosis 1,80 mg/kg. (D) Ikan dengan injeksi fenol dosis 3 mg/kg. Tanda panah No. 1. Nekrosis; 2. Hipertropi. Mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Hasil rerata luas pandangan menunjukkan hasil bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan hati berupa nekrosis, lisis dan hipertropi memiliki hasil yang berbeda-beda. Hasil data skoring pada jaringan hati pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol sebagai berikut :

a. Kerusakan Nekrosis Pada Jaringan Hati Ikan Lele

Pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dengan berbagai dosis yang berbeda dan senyawa fenol sebagai pembanding kontrol positif (K+). Kondisi jaringan hati kerusakan nekrosis diamati dengan penilaian skoring. Hasil perhitungan rerata skoring luasan pandang pada jaringan hati ikan lele dapat dilihat pada **Tabel 12**.



Tabel 12. Rerata luasan pandang skoring kerusakan nekrosis pada Jaringan hati Ikan Lele

Kelainan Patologi	Perlakuan	Rerata LP
Nekrosis	Kontrol negatif (K-)	1
	0,36 mg/kg (A)	2,6
	1,08 mg/kg (B)	2,8
	1,80 mg/kg (C)	3,2
	Kontrol positif (K+)	2,2

Berdasarkan Tabel 12 dapat dilihat pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 0,36 mg/kg (A) dan 1,08 mg/kg (B) menunjukkan nilai skoring yang terendah namun masuk dalam kriteria kerusakan jaringan yang mendekati berat.

Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan hati senilai 2,6 dan 2,8. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,80 mg/kg (C), menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang berat, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan hati yaitu 3,2. Pada kontrol positif (K+) yaitu penggunaan fenol dengan dosis 3,0 mg/kg, menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang sedang, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 2,2. Kondisi tersebut menjelaskan perlakuan kontrol positif (K+) penggunaan fenol sebanding dengan perlakuan A dan B, berdasarkan toksisitas terhadap tingkat kerusakan jaringan hati ikan lele dumbo (Lampiran 9).

Kondisi yang berbeda menjelaskan bahwa dosis polifenol *P. crocatum* yang diberikan memberikan dampak kerusakan yang cukup signifikan hingga berdampak terjadinya nekrosis pada hati ikan lele dumbo. Ibrahim, (2012) melaporkan dalam risetnya secara in vivo pada LD 20 dan 50% ikan *C. gariepinus* menunjukkan tanda-tanda yang abnormal seperti nekrosis pada hati setelah dipapar senyawa fenol. Subandiyono dan Hastuti (2010) menyatakan suatu toksikan dalam hati akan dihentikan (nonaktifkan) oleh enzim-enzim dalam



hati, namun apabila toksikan masuk secara terus menerus, besar kemungkinan hati akan jenuh terhadap toksikan (tidak mampu mendetoksifikasi toksik lagi), sehingga metabolisme dalam hati akan menurun. Apabila metabolisme terganggu, maka proses detoksifikasi menjadi kurang efektif dan menyebabkan senyawa metabolit bereaksi dengan unsur sel, sehingga memicu kematian sel (nekrosis).

Toksikan merupakan zat (berdiri sendiri atau dalam campuran zat, limbah, dan sebagainya) yang dapat menghasilkan efek negatif bagi semua atau sebagian dari tingkat organisasi biologis (populasi, individu, organ, jaringan, sel, biomolekul) dalam bentuk merusak struktur maupun fungsi biologis (Soemirat, 2003). Mekanisme toksik suatu senyawa sebagai contoh polifenol akan bekerja dengan merusak membran sitoplasma secara total dengan mengendapkan protein sel, Ah receptor (AhR) dapat mengikat ligan seperti senyawa polifenol, HK aromatik polisiklik atau dioksin (Madigan, 2005).

b. Kerusakan Hipertropi Pada Jaringan Hati Ikan Lele

Pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dengan berbagai dosis yang berbeda dan senyawa fenol sebagai pembanding kontrol positif (K+). Hasil perhitungan rerata skoring, luasan pandang pada jaringan hati ikan lele dapat dilihat pada

Tabel 13.

Tabel 13. Rerata luasan pandang skoring kerusakan hipertropi pada Jaringan hati Ikan Lele

Kelainan Patologi	Perlakuan	Rerata LP
Hipertropi	Kontrol negatif (K-)	1
	0,36 mg/kg (A)	2,4
	1,08mg/kg (B)	2,8
	1,80 mg/kg (C)	3,2
	Kontrol positif (K+)	3,2



Berdasarkan Tabel 13 dapat dilihat pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 0,36 mg/kg (A) dan dosis 1,08 mg/kg (B) menunjukkan nilai skoring yang terendah namun kondisi tersebut masuk dalam kriteria kerusakan jaringan yang sedang. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan hati senilai 2,4. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,08 mg/kg (B) menunjukkan nilai skoring dalam kriteria kerusakan jaringan yang mendekati berat. Kondisi tersebut diketahui dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan hati senilai 2,8. Pemberian polifenol *P. crocatum* dengan dosis 1,8 mg/kg (C) dan kontrol positif (K+) dosis fenol 3,0 mg/kg menunjukkan nilai skoring kerusakan jaringan yang berat, kondisi tersebut dapat dilihat dari nilai rerata skoring kerusakan jaringan ginjal yaitu 3,2. Kondisi tersebut menjelaskan perlakuan kontrol positif (K+) penggunaan fenol sebanding dengan perlakuan C, berdasarkan toksisitas terhadap tingkat kerusakan hipertropi jaringan hati ikan lele dumbo.

Kondisi skoring tersebut menjelaskan bahwa dosis polifenol *P. crocatum* dan fenol yang diberikan memberikan dampak kerusakan hingga berdampak terjadi hipertropi. Takashima dan Hibiya, (1995) menyatakan hipertropi yakni kerusakan jaringan yang ditandai dengan penambahan ukuran organ akibat bertambahnya ukuran sel sehingga sel yang satu dengan yang lainnya saling lepas. Karakteristik dari hipertropi ini dapat dilihat dengan mengecilnya lumen pada tubulus dan membesarnya sel-sel tubulus. Hipertropi glomerulus terjadi karena adanya penyumbatan senyawa yang bersifat toksik, walaupun konsentrasinya rendah namun terkontaminasi cukup lama dalam tubuh ikan. Lisis dan hipertropi merupakan gejala awal nekrosis.



5.2.3 Pengamatan Gejala Klinis Ikan

Pengukuran gejala klinis dilakukan selama masa paparan polifenol *P. crocatum* dan fenol yaitu selama 3 hari pra pengambilan darah dan jaringan. Gejala klinis ikan lele pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Pengamatan Gejala Klinis Ikan lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol.

Hari	Perlakuan	Gejala Klinis
1	Kontrol negative (K-)	1. Ikan bergerak normal 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen hitam 4. Nafsu makan baik
	Dosis A (polifenol 0,36 mg/kg)	1. Ikan bergerak cukup agresif 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen lebih pucat 4. Nafsu makan kurang baik
	Dosis B (polifenol 1,08 mg/kg)	1. Ikan bergerak agresif, naik dan turun kepermukaan 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen pucat 4. Nafsu makan kurang baik 5.
	Dosis C (polifenol 1,80 mg/kg)	1. Ikan bergerak agresif, naik dan turun kepermukaan 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen pucat 4. Nafsu makan kurang baik 5.
	Kontrol positif (K+) (fenol 3 mg/kg)	1. Ikan bergerak agresif, naik dan turun kepermukaan 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen pucat 4. Nafsu makan kurang baik
2	Kontrol negative (K-)	1. Ikan bergerak normal 2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh 3. Pigmen hitam



Dosis A (polifenol 0,36 mg/kg)	
Dosis B (polifenol 1,08 mg/kg)	
Dosis C (polifenol 1,80 mg/kg)	
Kontrol positif (K+) (fenol 3 mg/kg)	
Kontrol negative (K-)	
3	Dosis A (polifenol 0,36 mg/kg)
	Dosis B (polifenol 1,08 mg/kg)
	Dosis C (polifenol 1,80 mg/kg)
Kontrol positif (K+)	

4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak cenderung agresif, sesekali naik dan turun kepermukaan
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen lebih pucat
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak cenderung agresif, sesekali naik dan turun kepermukaan
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen lebih pucat
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal
2. Tidak ditemukan kerusakan pada bagian tubuh.
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik
1. Ikan bergerak normal



(fenol 3 mg/kg)

2. Tidak ditemukan kerusakan
3. Pigmen hitam
4. Nafsu makan baik

5.2.4. Pengamatan Kualitas Air

Kondisi kualitas air media pemeliharaan merupakan kunci penting terkait perubahan kondisi ikan, kondisi air yang baik dan memenuhi persyaratan dapat menekan terjadinya stress atau bahkan serangan penyakit. Selama penelitian berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan ikan lele dumbo pra dan pasca injeksi polifenol *P. crocatum* dan fenol

No	Parameter	Kisaran parameter pemeliharaan	Khairuman (2008)
1	Suhu	25 °C – 26 °C	20 °C – 30 °C
2	pH	7.2 – 7.5	6.5 – 8
3	Oksigen Terlarut	4.91 mg/l – 5.73 mg/l	> 3 mg/l

Pada tabel diatas dapat dilihat bahwa hasil nilai kualitas air media pemeliharaan selama pemeliharaan selama 10 hari menunjukkan nilai yang memenuhi syarat sehingga tidak mempengaruhi kondisi fisiologis ikan. Boyd (1979), menyatakan kandungan kualitas air hasil metabolisme yang meningkat cenderung menyebabkan gangguan yang bersifat fisiologis dan memicu stress pada ikan.



VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Daun segar sirih merah (*P. crocatum*) merupakan jenis daun yang paling terbaik secara kuantitas menghasilkan nilai total fenol sebesar 41,29 GAE/g.
2. Hasil KLT dengan eluen metanol : etil asetat (1:8 ; v/v) menghasilkan 2 isolat pada plat KLT dengan Rf 0,72 dan 0,51. Senyawa tannin terdapat pada Isolat 2 dengan nilai Rf 0,72. Hasil kolom terdapat 4 fraksi, berdasarkan uji UV-Vis dan FTIR fraksi satu (I) menunjukkan panjang gelombang dan bilangan pita yang sama dengan panjang gelombang standar tannin diduga senyawa gallotanin. Panjang gelombang tersebut 224, 227, 237 dan 275 nm dan bilangan pita 3440 (OH), 2929 (CH alifatik), 1637 (C=O), 800 (para dan meta) dan 972 (C-H).
3. Hasil uji biokimia darah menunjukkan perubahan terjadi dengan naiknya nilai hormone kortisol dan kadar urea nitrogen darah (BUN) sedangkan parameter yang lain seperti hemaglobin, hematokrit, kadar glukosa, dan alkali fosfatase (ALP) mengalami penurunan. Pada uji histopatologi ginjal dan hati menunjukkan adanya kerusakan pada ginjal berupa nekrosis, edema dan kongesti sedangkan pada hati terdapat kerusakan nekrosis dan hipertropi.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, maka disarankan sebagai berikut:



1. Dosis polifenol tanin *P. crocatum* 75% LC50 (1,80 mg/kg) dan fenol 75% LC50 (3 mg/kg) memberikan dampak toksik sedang dan berat sehingga dosis tersebut sangat berpengaruh terhadap kondisi biota perairan, sedangkan penggunaan tanin *P. corcatum* sebagai agen dalam pengobatan atau pencegahan penyakit harus dikaji terlebih dahulu dosis yang tepat dalam pemanfaatanya.
2. Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk dilakukan uji in-vivo dengan senyawa polifenol (tannin) pada ekstrak akar, batang dan daun jenis tumbuhan lain yang memiliki kandungan fenol yang tinggi.



DAFTAR PUSTAKA

Abel, P.D. 1996. Water pollution biology. Taylor and Francis.

Achmadi, S.S. 1992. Teknik Kimia Organik. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Agustini, T.W., S. Meiny, S. Danny, F.M. Widodo, dan Hadiyanto. 2014. Comparative study of bioactive substances extracted from Fresh and Dried *Spirulina* sp. *Procedia Environmental Sciences*, 23:282 – 289.

Ahmad, A., H. Asif, M. Mohd, A.K. Shah, A.A.A. Hani, and B. Anil. 2015. Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. *Asian Pac J Trop Biomed*; 5(2): 101-107.

Alamanda, I.E., S.H. Noor dan B. Agung. 2007. Penggunaan metode hematologi dan pengamatan endoparasit darah untuk penetapan kesehatan ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Biodiversitas*, 1:34-38.

Ali, S.M., S.Z. Sabae, M. Fayez, M. Monib, and N.A. Hegazi. 2011. The influence of agro-industrial effluents on River Nile pollution. *J Adv Res* (2):850–895.

Anderson, D.P., and A.K. Siwicki. 1993. Basic hematology and serology for fish health programs. *Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture Aquatic Animal Health and the Enviroment*. Phuket, Thailand. 25-29th October 1993.

Anderson, D.P. and A.K. Siwicki. 1994. Simplified Assays For Measuring Non Spesific Defense Mechanisms in Fish.

Amlacher, E. 1970. Textbook of Fish Disease. DA Conroy, RL Herman (Penerjemah). TFH Publ. Neptune. New York. 1:1-14

Apak, R., K. Guclu, B. Demirata, M. Ozyurek, C.S. Esin, B. Bektasoglu, B.K. Isil, and D. Ozyurt. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant



capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.

Apriyantono, A., F. Dedi, P. Ni Luh, Sedarnawati, dan B. Slamet. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. Bogor. IPB.

Awachie, J.B.E., and H.M.G. Ezenwaji. 1998. The importance of clarias species in the fishery development of Anambra River Basin. *CIFA Tech Paper* ;8:212-24.

Banks, W.J. 1986. Applied Veterinary Histology. 2. Baski, Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Bastaki, S. 2005. Review Diabetes Mellitus and Its Treatment. *International Journal Diabetes and Metabolisme*. (13) : 111-131

Bastiawan, D., Taukhid, M. Alifuddin, dan T.S. Dermawati. 1995. Perubahan hematologi dan jaringan kan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Yang diinfeksi Cendawan *Aphariomyces* sp. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*; 106-115.

Barton, B.A., C.B. Schreck, and L.D. Barton. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stresss responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*,(2):173-185.

Bigoniya, P and K. Singh. 2014. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. *Rev Bras Farma*; 24: 330-340.

Boyd, C.E., and F. Lichkoppler. 1979. Water quality management in pond fishculture. Auburn univ, Alabama, *International for aquaculture. Agric. EXP. Station Research and Development series*, 22: 30

Braithwaite, A., and F.J. Smith. 1995. Chromatographic Methods. Kluwer Academic Publishers, London.



Buikema, Jr. A. L., McGinniss MJ, and Jr. J. Cairns. Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature. *Mar Environ Res* (2):87–181.

Chaney, A.L., and E.P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem*, (8):130-132

Christian, G. D., 1994. Analytical Chemistry. Fifth Edition. University of Washington. John Wiley and Sons, USA.

Cowan, M. M. 1999. Plant Product as Microbial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.

Clark, J. 2006. The Acidity of Phenol. *ChemGuide*.

Craft, B. D., L. Adrian, Kerrihard, A. Ryszard, and B.P. Ronald. 2012. Phenol-based antioxidants and the *In Vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 11; 1541-4337.

Danyal, B. S. 2009. Inside methods in clinical chemistry - An accessory work to the 5th Edition of kaplan and pesce's clinical chemistry: *Theory, Analysis, and Correlation*. Page 90-100.

Dutta, H. M. 1996. A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. In: Munshi, J.S.D., Dutta, H.M. (Eds.), *Fish Morphology. Horizon of New Research, Lebanon. New Hampshire Science Publishers, Oxford IBH, India*, pp. 249–269.

Dyer, L.A., J. Richards and C.D. Dodson. 2004. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: *Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution. Kluwer Academic/Plenum Publisher New York*; 117-39.

Eduardo, J.B., Cavaco, V. Cecile, L.T. Vance, W.S. Rudiger, and J.T. Goos. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 275 (6):1793-1802.



Emrizal, A. F., Y. Riska, R. Kamal, R.I. Nola, S. Adriani, Y. Reni, A. Farediah, M.S. Hasnah, and A. Dayar. 2014. Cytotoxic activities of fractions and two isolated compounds from Sirih Merah (Indonesian red betel), *Piper crocatum* Ruiz & Pav. *Procedia Chemistry*, 13: 79 – 84.

EPA. 1992. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms 14th edition. Weber, C. I, Editor, USEPA: Ohio.

Erlangga, 2007. Efek pencemaran perairan Sungai Kampar di Propinsi Riau terhadap Ikan Baung (*Hemobagrus hemurus*). Thesis. Sekolah Pascasarjana IPB Bogor. 87 hal.

Ersa, I. M. 2008. Gambaran histopatologi insang, usus dan otot pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicu*) di Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Fitriyani, A., L. Winarti, S. Muslichah dan Nuri. 2011. Uji anti inflamasi ekstrak metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Pada Tikus Putih. *Majalah Obat Tradisional*, 16(1), 34 – 42.

Fessenden, R. J dan J.S Fesseden. 1997. Kimia Organik. Alih bahasa :A.H. Pudjaatmaka. Erlangga: Jakarta.

Foster, L.B., and R.T. Dunn. 1974. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. *Clin Chem* 20:365–368

Frandsen, R. D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. UGM Press. Yogyakarta

Ferguson, H. 1989. Systemic pathology of fish, a test and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts. Iowa State Univ. Pres. Ames. Iowa.

Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan. PT. Rineka Cipta. Jakarta.

Gaedcke, F., B. Steinhoff. and H. Blasius. 2003. Herbal medicine product. CRC Press. Stuttgart.



Gafur, M. A., I. Ishak, dan B. Nurhayati. 2013. Isolasi dan identifikasi Senyawa flavonoid dari Daun Jamblang (*Syzygium cumini*). Fakultas MIPA Universitas Negeri Gorontalo.

Gandjar, I. G., dan R. Abdul. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.

Ganong, W. 1999. Fisiologi Kedokteran. Jakarta : EGC

Gao, M., S. Bao, and Z. L. Chun. 2006. Dinamic microwave assisted extraction of flavonoid from *Saussurea medusa* Maxim Culture Cells. *Biochemical Engineering journal*, 79:83.

Gaspersz, V. 1991. Metode perancangan percobaan untuk ilmu-ilmu pertanian dan ilmu-ilmu teknik biologi. CV Armico, Bandung. 472 hlm

George. J. S., W. A. Bernard, R.A. Wayne, K. F. Stephen, and D.U. Michael. 1999. Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects. Edward Hines Jr Veterans Affairs Hospital, Loyola University Chicago Stritch School of Medicine, University of Michigan, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Mental Health Research Institute (6 ed.) (Lippincott-Raven). ISBN 0-397-51820-X

Ghavidel R. A., S. Zahra and A. Saeed. 2015. Optimization of extraction the red cabbage extract with ultrasound technology, assisted by response surface method. *International Journal of Biosciences*. 6(3):94-100.

Ginandjar, A., Hendrawan dan Y. Sonjaya. 2011. Kajian Termodinamika Interaksi Ligan Bioflukan DYT Terhadap Logam Kobalt (II) melalui analisis konduktivitas, Spektrofotometer UV-Vis dan TGA. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia* (1): 124-128

Gritter, R. J., M. B. James, and E.S. Arthur. 1991. Pengantar Kromatografi. Penerbit ITB. Bandung.

Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri Jilid I, Penerjemah Ketaren S., Cetakan I, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.

Hagerman, A.E. 2002. Tannin Chemistry. Miami (US); Miami University



Handojo, D.D., L.H. Forlina dan S. Endang. 1986. Usaha Budidaya Ikan Lele. CV. Simplek Anggota IKAPI. Jakarta.

Harbone, J. B. 1987. Metode Fitokima : Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. Terbitan ke-2, Penerbit ITB.

Harborne, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistry, Third edition. Academic press, New York, USA.

Harborne, J.B. 1996. Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. 354 hlm.

Harikrishnan, R., M. N. Rani, and C. Balasundaram, 2003. Haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophilla* infection. *Aquaculture*, 221. P 41-50.

Harikrishnan, R., M. Kim, J. Kim, Y. Han, I. Jang, and C. Balasundaram. 2011. Immunomodulatory effect of sodium alginate enriched diet in kelp grouper *Epinephelus bruneus* against *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol* 27: 508-515.

Hastuti, S., E. Supriyono, I. Mokoginta dan Subandiyono. 2003. Respon Glukosa Darah Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac.) terhadap Stres Perubahan Suhu Lingkungan. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 2(2): 73-77.

Heath. 1987. Water Pollution and Fish Physiology, Boston USA : CRC press inc.

Hernowo dan S.R. Suyanto. 2002. Pembenihan dan Pembesaran Lele di Pekarangan, Sawah, dan Longyam. Penebar Swadaya. Jakarta.

Hibiya, T dan T. Fumio. 1995. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Edisi kedua. Japan. Kodansha Ltd.

Hidayat, E. B. 1995. Anatomi Tumbuhan Berbiji. Bandung : ITB

Hoffbrand, A. V dan J. E. Pettit. 1987. Haematologi. Penerbit EGC. Jakarta

Hostettmann, K., A. Marston, dan M. Hostettmann. 1997. Preparative Chromatography Techniques: Application In Natural Product Isolation, Springer. Jerman.



Houghton, P. J., and Raman. 1998. Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extract. Chapman and Hall, London.

Ibrahim, M. D. 2012. Experimental exposure of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to phenol: Clinical evaluation, tissue alterations and residue assessment. *Journal of Advanced Research* (3):177–183

James, M.O., L.D. Stuchal, and B.A. Nyagode. 2008. Glucuronidation and sulfonation, in vitro, of the major endocrine-active metabolites of methoxychlor in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* and induction following treatment with 3-methylcholanthrene. *Aquat Toxicol* ; 86:227–38.

Kabata, Z. 1985. Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic. Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St.Phidelpia.318 p.

Kakkilaya, B.S. 2002. Peripheral Smear Examination for Malarial Parasite. Dr. B.S. Kakkilaya's Malaria Web Site.

Khairuman. 2008. Syarat Hidup lingkungan bagi lele dumbo. Agro Media Pustaka. Jakarta.

Khopkar, S. M. 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press Klesius,

Philipp. 1999. Susceptibility of hybrid striped bass (*Morone chrisops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* by nare and aye mode of inoculation, Aquaculture. Publ. USA

Kusumaningtyas, E., S. Lusi, dan A. Estie. 2008. Penentuan Golongan Bercak Senyawa Aktif Ekstrak n-heksan *Alpinia galanga* terhadap *Candida albicans* dengan Bioautografi dan Kromatografi Lapis Tipis. *JITV* 13(4).

Lee, K. W., Y.J. Kim, H.J. Lee, and C.Y. Lee. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemical And Higher Antioxidant Than Teas And Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 51(25): 249-252.

Madigan, M. 2005. Brock Biology of Microorganisme.. London: PrenticeHall, 753pp

Markham, K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London.



Michael, W.K. Medical Biochemistry . Diakses tanggal 2015-10-28.

Mukherjee, D., S. Bhattacharya, V. Kumar, and J. Moitra. 1990. Biological significance of [14C]phenol accumulation in different organs of a murrel, *Channa punctatus*, and the common carp, *Cyprinus carpio*. *Biomed. Environ. Sci.* (3):337–342.

Murhananto. 2002. Pembesaran Lele Dumbo di Pekarangan. Argo Media Pustaka. Jakarta.

Najiyati, S. 2003. Memelihara Lele Dumbo di Kolam Taman. Penebar Swadaya. Jakarta

Nazih, M., H.W. Abdel, H.S.A. Halim, and E.S. Abo. 2008. Pollution control and waste minimization of chemical products industry: a case study of polymers production industry. In: Twelfth international water technology conference (IWTC12), Alexandria, Egypt, p. 415–36.

Nazir, M. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Nugroho, A.E., 2006. Hewan Percobaan Diabetes Melitus : Pathology Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas*. 7(4) : 381

Ololade, I.A., and O. Oginni. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *J Environ Chem Ecotoxicol*; (2):14–16.

Panigoro, N., A. Indri, B. Meliya, Salifira, D.C. Prayudha, dan W. Kunika. 2007. Teknik Dasar Histologi dan Atlas Dasar – dasar Histopatologi Ikan. Balai Budidaya Air Tawar dan Japan International Coperation Agency (JICA). Jambi.

Pambayun R, M. Gardjito, S. Sudarmaji, dan K. Kuswanto. 2007. Kandungan fenol dan sifat anti bakteri dari berbagai jenis ekstrak produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb), *Majalah Farmasi Indonesia* 18(3):141-146.



Peters, M.M., T.W. Jones, T.J. Monks, and S.S. Lau. 1997. Cytotoxicity and cell-proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl) hydroquinone. *Carcinogenesis*, 18: 2393–2401.

Plumb, J.A. 1994. *Health Maintenance of Cultured Fishes, Principal Microbial Diseases*. CRC press. Amerika. 239 p.

Price, S. A dan L. M. Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi Keenam. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Prihmantoro. 1997. *Tanaman Hias Daun*. Jakarta: Penebar Swadaya

Piliang, W.G., dan Djojosoebagio. 2000. *Nutrisi Vitamin, Volume I*. Bogor: Institut Pertanian Bogor

Rahimah, E.S., dan J. Afgani. 2013. Karakterisasi Senyawa Flavonoid Hasil Isolat Dari Fraksi Etil Asetat Daun Matoa (*Pometia pinnata* J.R.Forst &G.Forst). *JKK*; (2):84-89.

Ricardi, D. 2008. *Molecular Physiology of Extracellular Calcium-Sensing, CaR*, School of Bioscience, Cardiff University

Roberts, R.J. 1978. *Fish Pathology*. Bailliere Tindal. London

Roche, H., and G. Boge. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors or chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.* 41;27–44.

Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.

Rukmana, H.R. 2003. *Budidaya dan Pascapanen Lele Dumbo*. CV. Aneka Ilmu Anggota IKAPI. Semarang

Sastrohamidjojo. 2007. *Spektroskopi*. Liberty. Yogyakarta.



Satiadarma, K. 2002. Asas Pengembangan Prosedur Analisis, Edisi Pertama. Universitas Airlangga. Surabaya.

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

Searcy, R.L., J.E. Reardon, and J.A. Foreman. 1967. A New photometric method for serum urea nitrogen determination. *Amer J Med Technol*, 33:15-20.

Singarimbun, M. dan S. Effendi. 1983. Metodologi Penelitian Survey. Jakarta: Edisi Kedua. LP3S.

Silverstein, R.M., F.X. Webster, and D.J. Kiemle. 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Seventh edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Sjostrom, E. 1981. Wood chemistry, fundamentals and applications. Academic Press, London, 293 pp

Soetrisho. 1987. Fisiologi Ternak. Fakultas Peternakan Unsoed, Purwokerto.

Skoog, D. A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. Fifth Edition. Brooks/cole-Thomson Learning, USA.

Soemirat, J. 2003. Toksikologi Lingkungan. Gadjah Mada University Press:Yogyakarta.

Stephen, N., and W. Saffron. 2001. Endocrinology: An Integrated Approach. St. George's Hospital Medical School, London, UK. (BIOS Scientific Publishers Ltd). p. Diagram showing the major actions of cortisol on metabolism. ISBN 1-85996-252-1.

Stich, H.F. 1991. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mut. Res.* 259:307–324.

Subana, M dan Sudrajat. 2005. Dasar-dasar Penelitian Ilmiah. Bandung: Pustaka Setia.



Subandiyono, S. Hastuti, E. Supriyono, dan I. Mokoginta. 2003. Respon Glukosa Darah Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*, LAC.) terhadap Stres Perubahan Suhu Lingkungan. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, (2): 73 -77.

Sudewo, B. 2005. Basmi Penyakit dengan Sirih Merah, PT Agromedia Pustaka, Jakarta.

Sudewo, B. 2010. Basmi Penyakit dengan Sirih Merah, Edisi Revisi, Agro Media, Jakarta, 6, 38, 48, 57, 67.

Sunardi, F., dan H. Chotimah. 2008. Pengaruh Pola Pengeringan Terhadap Rendeman dan Kualitas Minyak Atsiri Daun Nilam (*Pogostemon calbin* Benth). *Jurnal Hutan Tropis Borneo*, (22):7-16.

Sundang, M., S.N.S. Nasir, C.S. Sipaut, and H. Othman. 2012. Antioxidant Activity, Phenolic, Flavonoid and Tannin Content of *Piper betle* and *Leucosyke capitella*. *Malaysian Journal of Fundamental & Applied Sciences* ;8(1):1-6.

Susanto, W. H. 1999. Teknologi Lemak dan Minyak Makan. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.

Takashima and T. Hibiya. 1995. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features Fumio. Gustav Fischer Verlag. Stuggart. New York

Taysse, L., D. Troutaud, N.A. Khan, and P. Deschaux. 1995. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology*, 207-214.

Tilak, K.S., K. Veeraiah, and M.S. Butchiram. 2007. Effect of phenol on haematological components of Indian major carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. *J Environ Biol*;28:177-179.

Tyson, J.1988. Analysis-What Analytical Chemists Do. ISBN 0851864635



Tsuzuki, M.Y.; K. Ogawa, C.A. Strussmann. Physiological responses after stress and subsequent recovery at different salinities in adults pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*; 200:349-362.

Vasconcelos, P.C.P., M.A. Andreo, W. Vilegas, C.A. Hiruma-Lima, and C.H. Pellizzon. 2010. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*; 131:146–153.

Varadarajan, R., H. Sankar, J. Jose, and B. Philip. 2014. sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). *International Journal of Scientific and Research Publications*;(4):2250-3153.

Vogel, A. 1987. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Revisi oleh B.S. Fourniss dkk., Edisi Keempat, Longmans London, New York.

Volk, W. A dan M.F Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Alih bahasa : Markham. Edisi ke 5. Jilid 1. Erlangga. Jakarta. 390 Halaman.

Wahjuningrum, D., N. Ashry dan S. Suryati. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Daun Ketapang *Terminalia cattapa* untuk Pencegahan dan Pengobatan Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*) yang Terinfeksi (*Aeromonas hydrophila*). *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7(1): 82-88.

Wikiandy, N., Rosidah dan T. Herawati. 2013. Dampak Pencemaran Limbah Industri Tekstil Terhadap Kerusakan Struktur Organ Ikan Yang Hidup Di Daerah Aliran Sungai (DAS) Citarum Bagian Hulu. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 4(3): 215-225.

Weber, M., Weber, Markus, Kleine-Boymann, and Michael. 2004. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry ISBN 3527306730

Wedemeyer, G.A. and W.T. Yasutake. 1977. Clinical Methods for the Assessment of the Effects of Environmental Stress on Fish Health. Technical Paper of the U.S. Fish and Wildlife Service. Vol. 89. U.S.



Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., USA. 18 pp.

Well, R.M.G., J. Baldwin, R.S. Seymour, K. Christian, and T. Britain. 2005. Blood Cell Function and Haematology in Two Tropical Freshwater Fishes from Australia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141:87-93.

Williams. 2007. Eritrosit dan Hemoglobin. On line at <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/37522/4/Chapter%201.pdf>. diakses pada 19 April 2016. jam 11.13 WIB.

Writer, J.H., L.B. Barber, G.K. Brown, H.E. Taylor, R.L. Kiesling, and M.L. Ferrey. 2010. Anthropogenic tracers, endocrine disrupting chemicals and endocrine disruption in Minnesota lakes. *Sci Total Environ*; 409:100–11.

Yuniar, V. 2009. Toksisitas Merkuri (Hg) Terhadap Tingkat Kelangsungan Hidup, Pertumbuhan, Gambaran Darah Dan Kerusakan Organ Pada Ikan Nila *Oreochromis niloticus*. Departemen Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Budidaya Perairan Institut Pertanian Bogor. 89 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Fitokimia Daun Sirih Merah (*P. crocatum*)

Sampel	Senyawa	gambar	dugaan	keterangan
Sirih merah, metanol	Saponin		+	Terbentuk gelembung
	Flavonoid		+	Terbentuk warna merah atau jingga
	Alkaloid dragendroff		+	Endapan jingga
	Alkaloid meyer		-	Tdk terbentuk warna putih atau kekuning-kuningan
	Triterpen		-	Tidak terbentuk cincin kecoklatan maupun cincin jingga

116



Lampiran 2. Analisa Statistik Total fenol beberapa jenis daun sirih merah *P. crocatum*

a. Data Total Fenol

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
Daun Kering	33.57	34.29	32.14	100.00	33.33	1.09
Daun Layu	38.57	37.14	37.86	113.57	37.86	0.71
Daun Segar	41.71	40.71	41.43	123.86	41.29	0.52
Total				337.43		

Faktor Koreksi 12650.89

b. Uji ANOVA

SK	db	JK	KT	F hit	F tab 5%	kesimpulan
Perlakuan	2	95.46	47.73	72.83	5.14	Tolak
Galat	6	3.93	0.66			
Total	8	99.39				

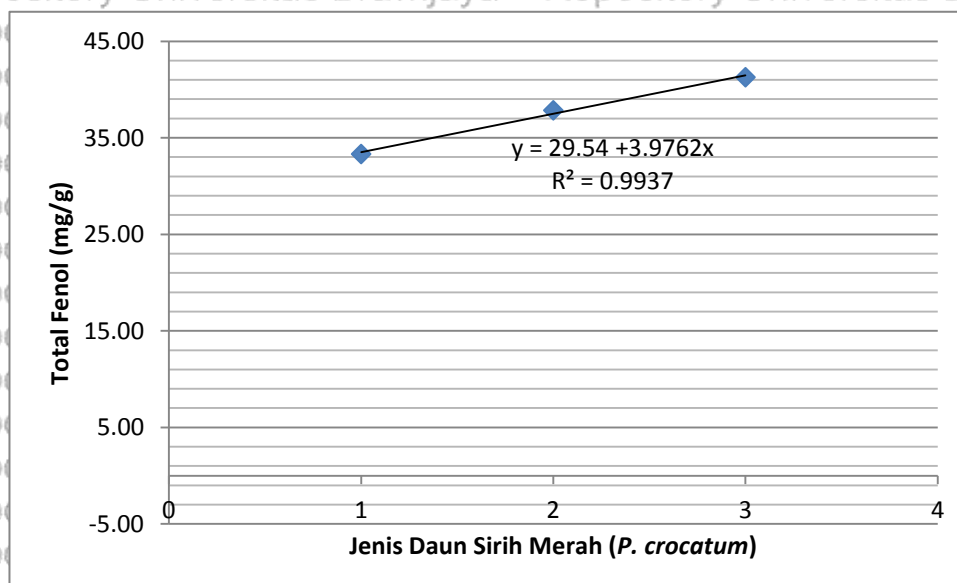
c. BNT

$$2KTG/n = 0.436886 \quad \begin{matrix} \text{BNT 5\%} \\ = \\ 1.62 \end{matrix}$$

$$sd = 0.660973 \quad \begin{matrix} \text{BNT 1\%} \\ = \\ 2.45 \end{matrix}$$

Perlakuan	33.33	37.86	41.29	Notasi
Daun Kering	33.33			a
Daun Layu	37.86	4.52		b
Daun Segar	41.29	7.95	3.43	c

d. Regresi



[illegible][illegible][illegible]



Lampiran 3. Analisa Statistik Hemaglobin Lele dumbo pasca injeksi polifenol *P. crocatum*

a. Data Hemaglobin

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
Kontrol (-)	14	16	14	44	14.67	1.15
A	11	10	11	32	10.67	0.58
B	11	10	9	30	10.00	1.00
C	9	8	8	25	8.33	0.58
Kontrol (+)	7	6	7	20	6.67	0.58
Total				151		

Keterangan

K (-) = Tanpa Perlakuan

A = Polifenol (tannin) *P. crocatum* dosis 0.36 mg/kg

B = Polifenol (tannin) *P. crocatum* dosis 1.08 mg/kg

C = Polifenol (tannin) *P. crocatum* dosis 1.80 mg/kg

K(+) = Fenol sintetis 3 mg/kg

FAKTOR KOREKSI 1520.0667

b. ANOVA

SK	db	JK	KT	F hit	F tab 5%	kesimpulan
Perlakuan	4	108.27	27.07	40.60	3.48	Tolak
Galat	10	6.67	0.67			
Total	14	114.93				

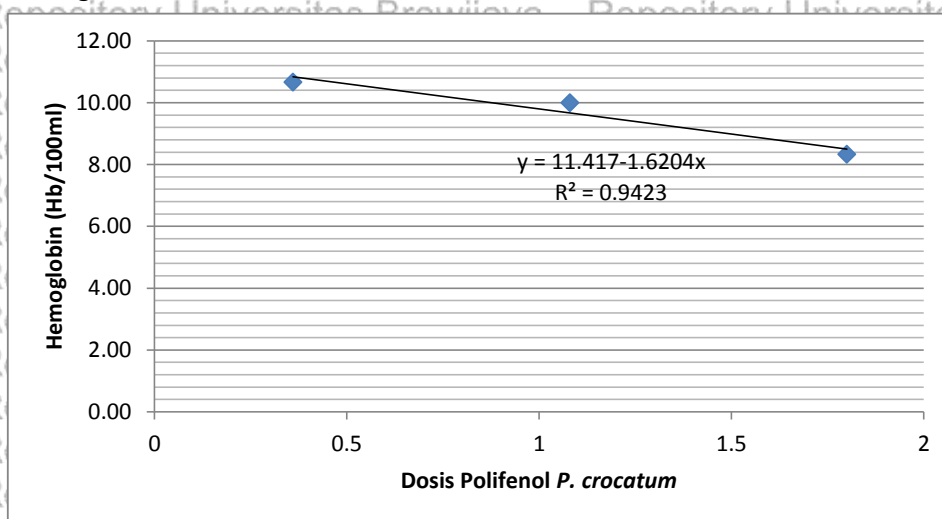
c. BNT

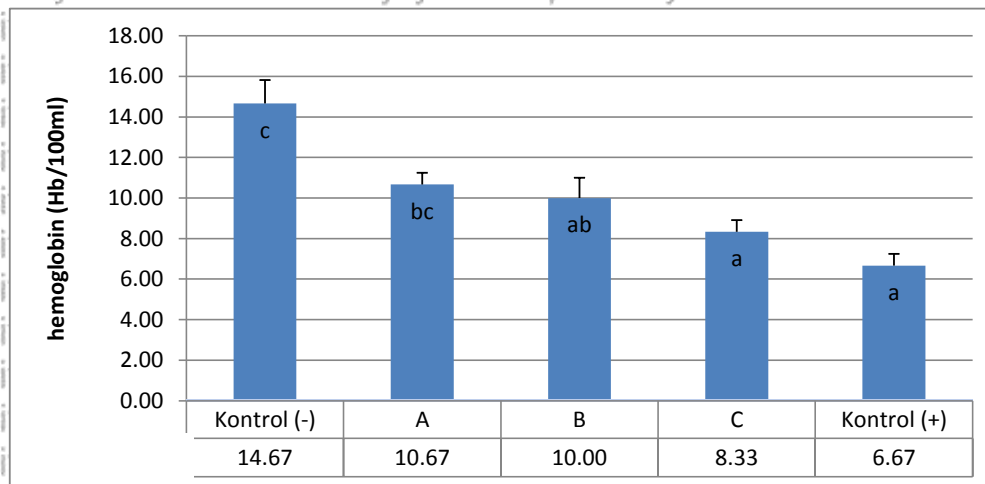
2KTG/n = 0.444444 BNT 5% = 1.49

sd = 0.666667 BNT 1% = 2.11

Perlakuan		6.67	8.33	10.00	10.67	14.67	Notasi
kontrol (+)	6.67						a
C	8.33	1.67					a
B	10.00	3.33	1.67				ab
A	10.67	4.00	2.33	0.67			bc
Kontrol (-)	14.67	8.00	6.33	4.67	4.00		c

d. Regresi





kontrol (+)	6.67	8.15 a
C	8.33	9.82 a
B	10.00	11.49 a
A	10.67	12.15
Kontrol (-)	14.67	16.15

0.36	10.67
1.08	10.00
1.8	8.33