



**TOKSISITAS BIOINSEKTISIDA GRANULA CAMPURAN EKSTRAK
DAUN SIRIH (*Piper betel*) DAN BIJI SRIKAYA (*Annona squamosa*)
TERHADAP MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) (SEBAGAI
ORGANISME NON-TARGET)**

TESIS

Oleh:

**Dia Qori Yaswinda
NIM 152520102030**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN MASYARAKAT
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**TOKSISITAS BIOINSEKTISIDA GRANULA CAMPURAN EKSTRAK
DAUN SIRIH (*Piper betel*) DAN BIJI SRIKAYA (*Annona squamosa*)
TERHADAP MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) (SEBAGAI
ORGANISME NON-TARGET)**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pasca Sarjana Ilmu Kesehatan Masyarakat (S2) dan mencapai gelar Magister Kesehatan

Oleh:

**Dia Qori Yaswinda
NIM 152520102030**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN MASYARAKAT
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Sujud syukur kupersembahkan kepada-Mu Allah SWT., dengan nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, kupersembahkan sebuah karya kecil ini untuk:

1. orang tua tercinta, Ayahanda Yasin dan Ibunda Ida yang telah memberikan doa restu, kasih sayang dan pengorbanan tiada henti;
2. suamiku tercinta, Alvian Afif Fadhullah, SP. sumber motivasi yang selalu memberikan doa, dukungan dan kasih sayang;
3. adikku tercinta, Jihan Nuri Yaswinda yang selalu memberikan semangat dan dukungan;
4. semua guru yang telah mendidik dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang engkau berikan;
5. Almamater Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”

(Surat Al Insyiraah, 6-8) *)

“.....Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan.”

(Surat Al Mujadalah, 11)**)

“Sampaikanlah ilmu dariku (Rasulullah SAW) walau hanya satu ayat.”

(HR Al-Bukhari 3/1275 no 3274)

*) Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsir Al Quran. 1971. *Al Quran dan Terjemahan*. Saudi Arabia.

***) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsiran Al Qur'an. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bogor: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Dia Qori Yaswinda

NIM : 152520102030

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Toksistas Bioinsektisida Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih (*Piper betel*) dan Biji Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap Morfologi dan Histopatologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Sebagai Organisme Non-Target)" adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Januari 2018

Yang Menyatakan,

Dia Qori Yaswinda

NIM 152520102030

TESIS

**TOKSISITAS BIOINSEKTISIDA GRANULA CAMPURAN EKSTRAK
DAUN SIRIH (*Piper betel*) DAN BIJI SRIKAYA (*Annona squamosa*)
TERHADAP MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) (SEBAGAI
ORGANISME NON-TARGET)**

Oleh

Dia Qori Yaswinda
NIM 152520102030

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes
NIP 196003091987022002

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. rer. biol. hum. dr. Erma S., M.Si
NIP 197702222002122001

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Tesis berjudul “Toksisitas Bioinsektisida Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih (*Piper betel*) dan Biji Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap Morfologi dan Histopatologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Sebagai Organisme Non-Target)”, telah disetujui pada:

hari, tanggal : Kamis, 25 Januari 2018

tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes.
NIP 196003091987022002

Dr. rer. biol. hum. dr. Erma S., M.Si.
NIP 197702222002122001

PENGESAHAN

Tesis berjudul “Toksistas Bioinsektisida Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih (*Piper betel*) dan Biji Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap Morfologi dan Histopatologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Sebagai Organisme Non-Target)” karya Dia Qori Yaswinda, NIM 152520102030 telah memenuhi persyaratan Keputusan Rektor Universitas Jember, nomor 16887/UN25/SP/2017, tanggal 01 November 2017, tentang Deteksi Dini Tindakan Plagiasi dan Pencegahan Plagiarisme Karya Ilmiah Dosen, Tenaga Kependidikan, dan Mahasiswa Universitas Jember dengan Submission ID 908036040 serta telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 25 Januari 2018

tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Tim Penguji,
Ketua,

Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu R.D., M.Si.
NIP 196705021997022001

Sekretaris,

Anggota I,

dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D.
NIP 197306012000032001

Dr. Isa Ma'rufi, S.KM., M.Kes.
NIP 197509142008121001

Anggota II,

Anggota III,

Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes.
NIP 196003091987022002

Dr.rer.biol.hum.dr. Erma S., M.Si.
NIP 197702222002122001

Mengesahkan
Direktur,

Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S.
NIP 195207061976031006

RINGKASAN

Toksisitas Bioinsektisida Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih (*Piper betel*) dan Biji Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap Morfologi dan Histopatologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Sebagai Organisme Non-Target); Dia Qori Yaswinda, 152520102030; 2018: 106 halaman; Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Jember.

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang dapat membunuh hama pengganggu berupa serangga yang merugikan. Insektisida dapat digunakan untuk menanggulangi peningkatan kejadian Demam berdarah dengue (DBD) dengan cara memutus mata rantai penyebaran nyamuk *Aedes aegypti* sebagai vektor penyakit DBD. DBD adalah penyakit virus yang berbahaya karena tingkat morbiditas dan mortalitasnya cukup tinggi. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue yang masuk ke peredaran darah manusia melalui gigitan nyamuk *A. aegypti*. Angka kejadian DBD di Jawa Timur mengalami peningkatan setiap tahunnya. Jember merupakan Kabupaten di Jawa Timur yang memiliki angka kejadian DBD cukup tinggi yaitu 923 kasus pada 2015 dan 148 kasus pada awal Januari 2016.

Insektisida yang umumnya digunakan adalah temepos (organofosfat) yang memiliki dampak negatif pada organisme non-target. WHO sejak 1985, menganjurkan untuk mencari insektisida berbahan alami yang tidak menimbulkan banyak dampak negatif terhadap organisme non-target. Insektisida berbahan alami ini disebut dengan bioinsektisida. Salah satu bioinsektisida untuk membunuh larva nyamuk *A. aegypti* adalah daun sirih dan biji srikaya. Granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terbukti dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dengan dosis 1 g/10 L air dalam waktu 105 menit. Pengujian toksisitas daun sirih dan biji srikaya terhadap organisme non-target digunakan untuk memonitor lingkungan perairan, salah satunya melalui pengamatan terhadap kondisi kesehatan ikan sebagai organisme non-target.

Penelitian ini dilaksanakan pada Juli sampai September 2017 di Balai Benih Ikan Kalisat, Jember; Laboratorium Parasitologi, Pendidikan Biologi, Universitas

Jember; dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Pengujian toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya dengan konsentrasi 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L dilakukan pada ikan mas berumur 3-4 bulan dengan berat rata-rata 20-25 gram selama 96 jam. Tahap pengujian, yaitu bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya dimasukkan ke dalam akuarium berisi air sumur dan ikan mas yang sudah diaklimatisasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 96 jam dan dicatat jumlah kematian ikan. Setelah 96 jam ikan dibedah dan diambil usus, hati, insang dan ginjal untuk pengamatan morfologi (perubahan warna, akumulasi granula, bintik-bintik hitam, perubahan ukuran, serta ada tidaknya rongga) dan histopatologi (nekrosis, hiperplasia, fusi lamela dan hemoragi).

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan cara pembuatan preparat histopatologi menggunakan metode parafin dan pewarnaan *haemotoxylin eosin*. Metode ini dilakukan dengan tahap sebagai berikut: 1) dehidrasi, fiksasi dan pembersihan organ; 2) infiltrasi dan penanaman organ pada parafin; 3) penyayatan dan perekatan organ pada gelas benda; 4) pewarnaan menggunakan pewarna *haemotoxylin eosin*; serta 5) penutupan preparat menggunakan gelas penutup dan pemberian entellan sebagai pengawet. Pengamatan preparat histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Hasil analisis menunjukkan bahwa toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya tergolong rendah dengan LC_{50} 1,14 g/10 L pada perlakuan 96 jam. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya pada konsentrasi 1 g/10 L sampai 48 jam perlakuan tidak menyebabkan kematian, serta tidak menimbulkan kelainan morfologi dan histopatologi. Kematian ikan setelah pemberian granula konsentrasi 1 g/10 L selama 96 jam sebesar 36 % (di bawah LC_{50}). Kelainan morfologi dan histopatologi mulai nampak setelah 96 jam perlakuan.

Pengamatan morfologi menunjukkan terjadinya perubahan warna pada usus, insang dan ginjal, bintik hitam pada usus, hati dan ginjal, serta akumulasi granula pada usus terjadi pada ikan mas setelah 96 jam perlakuan granula campuran

ekstrak daun sirih dan biji srikaya. Pengamatan histopatologi menunjukkan terjadinya nekrosis ringan pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas setelah pemberian granula konsentrasi 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L selama 96 jam, terjadi hiperplasia dan fusi lamela pada insang ikan mas setelah pemberian granula konsentrasi 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1g/10 L selama 96 jam, serta terjadi hemoragi pada ginjal ikan mas setelah pemberian granula konsentrasi 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L selama 96 jam.

Penggunaan granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya konsentrasi 1 g/10 L dapat menyebabkan 95% kematian pada larva selama 105 menit, serta menyebabkan kematian, perubahan morfologi dan histopatologi pada ikan mas sebagai organisme non target setelah 96 jam perlakuan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian untuk memperoleh konsentrasi granula yang dapat membunuh 50% larva nyamuk dan tidak menyebabkan kematian bagi organisme non target. Pada penelitian ini, spesifikasi suhu yang digunakan dalam pembuatan granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya adalah 45°C yang dapat menyebabkan kematian pada ikan setelah 96 jam perlakuan, sehingga perlu dilakukan pengujian dengan spesifikasi suhu yang berbeda untuk mengetahui pengaruhnya terhadap ikan sebagai organisme non target.

SUMMARY

Toxicity of Granular Bioinsecticide Mixture of Betel Leaf (*Piper betel*) and Srikaya Seed (*Annona squamosa*) Extract to Morphology and Histopathology of Carp (*Cyprinus carpio*) (As Non-Target Organism); Dia Qori Yaswinda, 152520102030; 2018: 106 pages; Magister Program of Public Health, University of Jember.

Insecticide is one type of pesticide that can kill insects pests. Insecticide can be used to overcome the increase of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) incidence by breaking the spreading chain of *Aedes aegypti* mosquito as a vector of dengue. DHF is a dangerous viral disease because of its high morbidity and mortality. It is caused by dengue virus that enter the human blood circulation through the bite of *A. Aegypti* mosquito. The incidence of dengue fever in East Java tends to increase every year. Jember is a district in East Java that has a high rate of DHF incidence with 923 cases in 2015 and 148 cases in early January 2016.

The commonly used insecticides are temepos (organophosphates) that can cause death in non-target organisms. WHO since 1985, recommended to investigate natural insecticides that do not cause negative impacts on non-target organisms. This natural insecticide is called bioinsecticide. One of bioinsecticides to kill *A. aegypti* mosquito larvae is betel leaf and srikaya seeds. The research has been done to produce granule of toxic compound mixture of betel leaf and srikaya seed extract to *A. aegypti* mosquito larva and proven to kill 95% larvae of *A. aegypti* mosquito with 1 g/10 L water dosage in 105 minutes. Toxicity testing of non-target organisms is used as a biomarker to monitor the aquatic environment through observation of the health condition of fish, as non-target organisms.

This research was conducted from July to September 2017, at Kalisat Fish Seed Center, Jember; Parasitology Laboratory, Biology Department, University of Jember; and Biomedical Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Jember. Testing of granular mixture toxicity of betel leaf and srikaya seed extract with concentrations of 0.25 g/10 L, 0.5 g/10 L, 0.75 g/10 L and 1 g/10 L were performed on 3-4 month old goldfish with an average weight of 20-25 grams for

96 hours. The test phase in goldfish was as follows: The mixed granules of betel leaf and srikaya seeds extract were subjected into an aquarium that contains well water and goldfish that have acclimatized for 24 hours. Testing was conducted for 96 hours and observation was made every 24 hours to record the number of death fish. At the end of the observation (96 hours), both live and dead fish were prepared to measure the changes on morphology (discoloration, granular accumulation, black spot, hyperplasia or hypoplasia and cavity) and histopathology (necrosis, hyperplasia, lamella fusion, and hemorrhage) at carp's intestinum, liver, gill and kidney.

Histopathological observation was made by making histopathological preparation used paraffin method and haemotoxylin eosin staining. This method phase was as follows: 1) dehydration, fixation, and organ clearing; 2) infiltration and organ embedding on paraffin; 3) sectioning and organ affixing on object glass; 4) staining using haemotoxylin eosin; and 5) preparation mounting using cover glass and giving entellan as preservative. Observation of histopathologic preparation using a microscope with 1000x magnification.

The result showed that LC_{50} of granular mixture of betel leaf extract and srikaya seeds extract was 1.14 g/10 L, can be classified as low toxicity. Granular bioinsecticide mixture of betel leaf and srikaya seeds extract at concentration of 1 g/10 L after 48 hours of treatment did not cause mortality in carp, and did not cause morphological and histopathological abnormalities. Bioinsecticides at concentration of 1 g/10 L can cause mortality in carp after 96 hours amount 36 % (below LC_{50}). Morphological and histopathological abnormalities occurred after 96 hours of treatment.

Morphological observation showed there were discoloration in carps intestinum, gill and kidney, black spot in carps intestinum, liver and kidney, and granular accumulation in carps intestinum after granular mixture of betel leaf extract and srikaya seeds extract treatment for 96 hours. Histopathological observation showed there were necrosis in carps intestinum, liver, gill and kidney after granular treatment at concentration of 0.75 g/10 L and 1 g/10 L for 96 hours, there were hyperplasia and lamella fusion in carp's gill after granular treatment at

concentration of 0.25 g/10 L, 0.5 g/10 L, 0.75 g/10 L and 1 g/10 L for 96 hours, and there were hemorrhage in carp's kidney after granular treatment at concentration of 0.75 g/10 L dan 1 g/10 L for 96 hours.

The use of granular mixture of betel leaf and srikaya seeds extract at concentration of 1 g/10 L can cause 95% mortality in larvae for 105 minutes, as well as causing mortality, morphological and histopathological changes in carp as non target organisms after 96 hours of treatment. Therefore, further study is required to obtain granular concentration that can kill 50% of mosquito larvae but does not cause death to non target organisms. In this research, the temperature specification used in the granular preparation was 45°C and can cause death in goldfish after 96 hours of treatment, so it is necessary to test with different temperature specification to determine the effect on the fish as non target organisms.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Toksistas Bioinsektisida Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih (*Piper betel*) dan Biji Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap Morfologi dan Histopatologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Sebagai Organisme Non-Target)” ini dengan baik.

Dalam penyusunan tesis ini penulis banyak menerima bantuan dari berbagai pihak yang bersifat materiil, bimbingan maupun semangat. Oleh karena itu, penulis mengucapkan rasa penghargaan dan terima kasih kepada :

1. Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik, serta Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyarningsih, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang banyak meluangkan waktu, bimbingan serta arahan sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini;
2. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si., dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D., dan Dr. Isa Ma'rufi, S.KM., M.Kes. selaku Dosen Penguji yang banyak memberikan bimbingan, kritik dan saran bagi penulis hingga selesai penulisan tesis ini;
3. Almarhum Dr. Thohirun, M.S., M.A. yang banyak memberikan bimbingan, dan saran dalam penulisan tesis ini;
4. orang tua, saudara dan keluarga besar yang telah memberikan motivasi dan mendoakan selama penulis mengerjakan tesis;
5. segenap civitas akademika Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Jember yang telah membantu selama masa perkuliahan;
6. teknisi Laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Ibu Wahyu yang banyak membantu serta membina selama penulis bekerja di laboratorium;
7. kepala bagian dan staf pegawai Balai Benih Ikan Kalisat, Jember yang banyak membantu serta membina selama penulis bekerja di balai benih ikan;
8. Alvian Afif Fadhullah atas kebersamaan, doa, dukungan dan semangatnya;

9. teman-teman seperjuangan di minat studi Kesehatan Tropis dan Agromedicine Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Jember Dhina Ayu Susanti, Firdha Novitasari dan Wike Rosalini atas kebersamaan, dukungan dan bantuannya;
10. teman-teman tercinta Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat Program Pascasarjana Universitas Jember angkatan 2015 yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan dalam penulisan tesis ini. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Jember, 25 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
PERSETUJUAN PEMBIMBING	vii
HALAMAN PENGESAHAN.....	viii
RINGKASAN	ix
SUMMARY.....	xii
PRAKATA.....	xv
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR.....	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Insektisida	6
2.2 Bioinsektisida	7
2.3 Biologi Tanaman Sirih Hijau (<i>Piper betel</i>).....	8
2.3.1 Morfologi Tanaman Sirih Hijau	8
2.3.2 Klasifikasi Tanaman Sirih Hijau	9

2.3.3	Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Sirih Hijau.....	10
2.4	Biologi Tanaman Srikaya (<i>Annona squamosa</i>).....	11
2.4.1	Morfologi Tanaman Srikaya.....	11
2.4.2	Klasifikasi Tanaman Srikaya.....	12
2.4.3	Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Srikaya	13
2.5	Granulasi	13
2.5.1	Metode Granulasi Basah.....	14
2.5.2	Metode Granulasi Kering	14
2.6	Biologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>) sebagai Organisme Non-Target	15
2.6.1	Morfologi Ikan Mas.....	15
2.6.2	Klasifikasi Ikan Mas.....	16
2.6.3	Habitat Ikan Mas	16
2.6.4	Makanan Ikan Mas	16
2.6.5	Anatomi dan Histologi Saluran Pencernaan Ikan Mas..	17
2.6.6	Anatomi dan Histologi Hati Ikan Mas.....	18
2.6.7	Anatomi dan Histologi Insang Ikan Mas.....	19
2.6.8	Anatomi dan Histologi Ginjal Ikan Mas	20
2.7	Cara Kerja Senyawa Aktif pada Daun Sirih (<i>P. betel</i>) dan Biji Srikaya (<i>A. squamosa</i>) terhadap Ikan.....	20
2.8	Kerangka Teori.....	23
2.9	Kerangka Konsep	25
2.10	Hipotesis	27
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	28
3.1	Desain Penelitian	28
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.3	Kriteria dan Jumlah Sampel	29
3.3.1	Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	29
3.3.2	Jumlah Sampel Penelitian.....	29
3.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	30
3.4.1	Variabel Penelitian	30

3.4.2 Definisi Operasional	31
3.5 Sumber Data	34
3.6 Alat dan Bahan	34
3.7 Prosedur Penelitian	34
3.7.1 Persiapan Ikan Mas sebagai Sampel	34
3.7.2 Pengujian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Organisme Non-target.....	34
3.7.3 Pengamatan Morfologi.....	36
3.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	36
3.7.5 Pengamatan Preparat Histopatologi	38
3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data	38
3.8.1 Teknik Penyajian Data	38
3.8.2 Analisis Data	39
3.9 Alur Penelitian	39
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1 Hasil Penelitian	41
4.1.1 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Jumlah Kematian, Persentase Kelulusan Hidup Ikan Mas dan Penentuan Nilai LC ₅₀	41
4.1.2 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Usus Ikan Mas.....	44
4.1.3 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Hati Ikan Mas.....	47
4.1.4 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Insang Ikan Mas	49
4.1.5 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi	

Ginjal Ikan Mas.....	52
4.2 Pembahasan	56
4.2.1 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Jumlah Kematian, Persentase Kelulusan Hidup Ikan Mas dan Penentuan Nilai LC ₅₀	56
4.2.2 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Usus Ikan Mas.....	58
4.2.3 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Hati Ikan Mas.....	59
4.2.4 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Insang Ikan Mas	60
4.2.5 Pengaruh Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Morfologi dan Histopatologi Ginjal Ikan Mas.....	61
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
5.1 Kesimpulan	65
5.2 Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Definisi Operasional	31
3.2 Rancangan penelitian uji toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih (<i>P. betel</i>) dan biji srikaya (<i>A. squamosa</i>) terhadap Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).....	35
3.3 Kriteria tingkatan nilai toksisitas LC50-96 jam di lingkungan perairan.....	36
3.4 Skoring Kerusakan Jaringan pada Ikan.....	38
4.1 Rata-rata jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan.....	41
4.2 Pengamatan lingkungan perairan ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya.....	43
4.3 Pengamatan morfologi dan histopatologi organ usus ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya....	44
4.4 Pengamatan morfologi dan histopatologi organ hati ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya....	47
4.5 Pengamatan morfologi dan histopatologi organ insang ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya....	50
4.6 Pengamatan morfologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya....	53

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Daun Tanaman Sirih Hijau (<i>Piper betel</i>)	9
2.2 Biji Srikaya (<i>Annona squamosa</i>)	12
2.3 Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	15
2.4 Diagram Kerangka Teori Penelitian	23
2.3 Diagram Kerangka Konsep Penelitian	25
3.1 Alur Penelitian	40
4.1 Morfologi usus ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	45
4.2 Histopatologi usus ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	46
4.3 Morfologi hati ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	48
4.4 Histopatologi hati ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	49
4.5 Morfologi insang ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	51
4.6 Histopatologi insang ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	52
4.7 Morfologi ginjal ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	54
4.8 Histopatologi ginjal ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Usus Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya	72
B. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Hati Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya	74
C. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Insang Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya	76
D. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Ginjal Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya	78
E. Analisis Penentuan Nilai LC50 Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Kematian Ikan Mas	80
F. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Kematian dan Persentase Kelulusan Hidup Ikan Mas.....	81
G. Analisis Parameter Lingkungan	85
H. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Ukuran Organ Ikan Mas.....	90
I. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Histopatologi Ikan Mas	98
J. Foto Kegiatan Penelitian.....	103

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang dapat membunuh hama pengganggu berupa serangga yang merugikan (Supriyono, *et al.*, 2005). Insektisida dapat digunakan untuk menanggulangi peningkatan kejadian Demam Berdarah *Dengue* (DBD) dengan cara memutus mata rantai penyebaran nyamuk *Aedes aegypti* sebagai vektor penyakit DBD. DBD merupakan penyakit virus yang berbahaya karena tingkat morbiditas dan mortalitasnya cukup tinggi, serta terapi spesifiknya belum ditemukan. DBD ditularkan oleh virus *dengue* yang masuk ke peredaran darah manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* (Sembel, 2009). Pada tahun 2015, provinsi Jawa Timur menetapkan status Kejadian Luar Biasa (KLB) DBD (Dinkes Jawa Timur, 2013). KLB DBD terjadi di 37 Kabupaten/Kota, dengan total jumlah kasus sebanyak 3.136 kasus. Jember merupakan Kabupaten di Jawa Timur yang memiliki angka kejadian DBD cukup tinggi yaitu 904 kasus pada 2014, 923 kasus pada 2015 dan 148 kasus pada awal Januari 2016 (Dinkes Jember, 2016).

Insektisida yang umumnya digunakan oleh masyarakat untuk menanggulangi peningkatan kejadian DBD adalah insektisida kimia berupa temepos yang mengandung organofosfat (Zhu, 2008; Elena 2008). Organofosfat dapat menyebabkan keracunan pada manusia dalam dosis tinggi dan paparan secara terus-menerus, serta kematian pada organisme non-target di lingkungan sekitar larva hidup. Munculnya resistensi dari berbagai macam spesies nyamuk terhadap organofosfat, serta adanya residu dari bahan kimia dapat menyebabkan pencemaran di lingkungan perairan (Nugroho, 2011; Felix, 2008). Permasalahan tersebut, menyebabkan Organisasi kesehatan dunia (WHO) sejak 1985 menganjurkan untuk mencari insektisida berbahan alami yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan banyak dampak negatif terhadap organisme lain non-target. Insektisida berbahan alami ini disebut dengan bioinsektisida (Wahyuni, *et al.*, 2015).

Syarat suatu bahan alami dapat digunakan sebagai bioinsektisida, yaitu: memiliki toksisitas terhadap organisme target, toksisitas terhadap organisme non target rendah atau tidak ada, memiliki efikasi biologis yang optimum (takaran aplikasi rendah), tidak menimbulkan residu yang dapat mencemari lingkungan, selektif dan tidak cepat menimbulkan resistensi, formulasinya stabil, serta mudah diaplikasikan (Aulung, *et al.*, 2010).

Daun sirih dan biji srikaya memiliki kandungan senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida (Wahyuni, 2013 dan Kardinan, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun sirih mengandung zat kimia alami berupa fenol dan senyawa turunannya seperti kavikol dan eugenol, mengandung saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan minyak atsiri yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida (Wahyuni, 2013). Bioinsektisida dari daun sirih ini dapat membunuh larva sebagai racun perut (Kusumaningrum, 2007). Kandungan zat kimia alami dalam biji srikaya, antara lain: *acetogenin* seperti *squamocin*, *bullatacin*, *annonacin* dan *neonnonacin*, mengandung alkaloid, tanin, dan saponin yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida (Kardinan, 2000). Bioinsektisida dari biji srikaya ini dapat membunuh larva dengan cara sitotoksik dan neurotoksik (Indriyani, 2012).

Wahyuni (2016) telah melakukan penelitian dan dihasilkan granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap larva nyamuk *A. aegypti* dengan karakteristik bentuk amorf warna putih kecoklatan, suhu pemanasan 40-55°C, ukuran mesh 40-60 dan lama pemanasan 2-6 jam. Kelebihan penggunaan sediaan berupa granula dibandingkan dengan sediaan lain, seperti ekstrak adalah tidak merubah air menjadi keruh, formulasi granula lebih stabil dan lebih tahan lama (tidak mudah menguap), serta lebih tahan terhadap pengaruh udara (Mujumdar, 2006). Granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terbukti dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dengan dosis 1 g/10 L air dalam waktu 105 menit (Wahyuni, 2016). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya sangat menjanjikan untuk diangkat sebagai alternatif bioinsektisida baru.

Granula toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya telah diajukan untuk memperoleh HKI dan telah sampai pada tahap publikasi dengan nomor publikasi 2015/01902. Tahap selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan fisik dan uji keamanan terhadap lingkungan termasuk organisme non target, sehingga pada penelitian ini dilakukan pengujian toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap organisme non-target. Pengujian toksisitas terhadap organisme non-target ini digunakan sebagai biomarker untuk memonitor lingkungan perairan. Lingkungan perairan yang tercemar dapat mengakibatkan efek sublethal maupun lethal pada organisme non-target (Rahayu, *et al.*, 2013). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang penggunaan bioinsektisida granula campuran daun sirih dan biji srikaya terhadap organisme non-target.

Pada penelitian ini, organisme non-target yang digunakan adalah ikan mas (*Cyprinus carpio*). Ikan mas digunakan karena merupakan jenis ikan air tawar yang peka terhadap perubahan lingkungan perairan. Penelitian sebelumnya tentang pengujian toksisitas bioinsektisida pada ikan mas dilakukan oleh Kinasih, *et al.*, (2013) menggunakan bioinsektisida ekstrak daun babandotan (*Ageratum conyzoides*). Penelitian lain tentang uji toksisitas yang menggunakan ikan mas adalah penelitian Supriyono, *et al.*, (2013) untuk menguji toksisitas moluskisida niklosamida.

Pemeriksaan yang dilakukan pada uji toksisitas organisme non-target ini adalah pemeriksaan pada morfologi dan histopatologi yang meliputi, saluran pencernaan (usus), hati, insang dan ginjal ikan mas. Organ-organ tersebut berfungsi penting dalam metabolisme karena dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada ikan (Camargo, *et al.*, 2007). Diharapkan granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya ini tidak bersifat toksik terhadap ikan mas. Latar belakang ini menjadi dasar dari pelaksanaan penelitian pengaruh toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih hijau (*P. betel*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap morfologi dan histopatologi ikan mas (*C. carpio*) (sebagai organisme non-target).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan suatu rumusan masalah, yaitu:

1. Bagaimana toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target?
2. Bagaimana toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap morfologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target?
3. Bagaimana toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap histopatologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah menganalisis toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap morfologi dan histopatologi ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.
2. Menganalisis toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap morfologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.

3. Menganalisis toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap histopatologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi ilmiah tentang toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap organisme non-target, yaitu ikan mas (*C. carpio*).

2. Manfaat Praktis

Granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) diharapkan dapat digunakan sebagai bahan alami alternatif dalam upaya pemberantasan vektor penyakit demam berdarah, yaitu nyamuk *A. aegypti* yang tidak berbahaya bagi lingkungan dan organisme lain di sekitarnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Insektisida

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang dapat membunuh serangga dan menurut perundang-undangan insektisida mencakup bahan kimiawi yang dapat mempengaruhi perilaku serangga, pertumbuhan, perkembangan, sistem pencernaan, sistem hormon yang berujung pada kematian serangga (Kardinan, 2000). Istilah *mode of entry* dikenal sebagai cara masuk insektisida ke dalam tubuh serangga. *Mode of entry* dibagi menjadi 3 yaitu, melalui kutikula (racun kontak), alat pencernaan (racun perut), atau lubang pernafasan (racun pernafasan). Insektisida memiliki satu atau lebih cara masuk ke dalam tubuh serangga (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Penggolongan insektisida berdasarkan cara masuknya ke dalam serangga dibagi menjadi tiga yaitu, racun kontak, racun perut, dan racun pernafasan. Racun kontak adalah insektisida yang masuk ke dalam tubuh serangga melalui kulit, celah atau lubang alami pada tubuh atau langsung mengenai mulut serangga. Racun perut merupakan suatu insektisida yang membunuh serangga sasaran bila masuk ke dalam organ pencernaan serangga dan diserap oleh dinding saluran pencernaan. Insektisida dapat dikatakan sebagai racun pernafasan jika dapat membunuh serangga sasaran bila masuk ke dalam organ pernafasan serangga (Kardinan, 2000).

Istilah *mode of action* dikenal sebagai cara kerja insektisida dalam tubuh serangga. *Mode of action* insektisida berpengaruh terhadap tubuh serangga melalui titik tangkap (*target site*) yang berupa enzim atau protein. *Mode of action* insektisida yang digunakan dalam pengendalian vektor dibagi menjadi 5, yaitu: menghambat keseimbangan air, menghambat produksi kutikula, mempengaruhi sistem saraf, mempengaruhi sistem endokrin dan menghambat produksi energi (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Secara garis besar terdapat empat cara pengendalian vektor yakni secara kimiawi, biologi, radiasi dan mekanik. Pengendalian secara kimiawi dengan menggunakan insektisida dapat ditujukan terhadap nyamuk dewasa maupun larva.

Insektisida untuk nyamuk dewasa *A. aegypti*, antara lain: dari golongan *organochlorine*, *organophosphor*, *carbamate* dan *pyrethroid*. Insektisida tersebut dapat diaplikasikan dalam bentuk *spray* terhadap rumah-rumah penduduk atau dengan pengasapan (*fogging*). Sedangkan insektisida untuk larva *A. aegypti* yaitu dari golongan *organophosphor* (*Temephos*) dalam bentuk *sand granules*. Insektisida tersebut dapat mempengaruhi sistem saraf pusat larva sehingga larva mengalami kematian (Palgunadi, *et al.*, 2012).

Pemberantasan vektor penyakit dengan menggunakan zat kimia memang dapat menekan populasi larva dengan baik, namun dapat menimbulkan resistensi larva, pencemaran lingkungan dan keracunan. Organisasi kesehatan dunia (WHO) sejak 1985 menganjurkan untuk mencari terobosan baru, yaitu dengan pengendalian hayati atau pengendalian lingkungan. Salah satunya adalah penggunaan zat kimia alami yang berasal dari tumbuhan atau bioinsektisida. Bioinsektisida atau insektisida nabati merupakan senyawa beracun yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Penggunaan bioinsektisida dimasukkan sebagai alternatif dan meminimalkan penggunaan insektisida kimia sehingga kerusakan lingkungan dapat dikurangi (Wahyuni, *et al.*, 2015).

2.2 Bioinsektisida

Bioinsektisida merupakan salah satu jenis pestisida berbahan alami yang dapat membunuh hama berupa larva dan serangga pengganggu yang merugikan (Supriyono, *et al.*, 2005). Bioinsektisida dapat mempengaruhi serangga melalui berbagai macam cara, antara lain menghambat perkembangan telur, larva, pupa, menghambat pergantian kulit pada stadia larva, mengganggu kopulasi, komunikasi seksual serangga, penolak makan, mencegah betina untuk meletakkan telur, menghambat reproduksi atau membuat serangga mandul, meracuni larva dan mengurangi nafsu makan atau memblokir kemampuan makan serangga (Kardinan, 2000).

Syarat suatu bahan alami dapat digunakan sebagai bioinsektisida, yaitu: memiliki toksisitas terhadap organisme target, toksisitas terhadap organisme non target rendah atau tidak ada, memiliki efikasi biologis yang optimum (takaran

aplikasi rendah), tidak menimbulkan residu yang dapat mencemari lingkungan, selektif dan tidak cepat menimbulkan resistensi, formulasinya stabil, serta mudah diaplikasikan (Aulung, *et al.*, 2010). Famili tumbuhan yang dilaporkan memiliki aktivitas sebagai bioinsektisida terhadap serangga diantaranya adalah *Meliaceae*, *Annonaceae*, *Asteraceae*, dan *Piperaceae*. Spesies tumbuhan yang dapat digunakan sebagai bahan bioinsektisida contohnya daun sirih (Famili: *Piperaceae*) dan srikaya (Famili: *Annonaceae*).

2.3 Biologi Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle*)

2.3.1 Morfologi Tanaman Sirih Hijau

Sirih adalah tanaman rambat yang tumbuh dengan ketinggian mencapai 15 m. Umumnya, sirih akan merambat atau menjalar pada batang tanaman disekelilingnya. Sirih hidup subur di daerah tropis dengan ketinggian 300-1000 meter di atas permukaan laut terutama di tanah yang banyak mengandung bahan organik dan air (Sudewo, 2007).

Sirih memiliki ciri-ciri morfologi daun berbentuk pipih seperti jantung, tumbuh secara selang-seling, tangkai daunnya panjang, tulang daun menyirip, ujung daun meruncing, pangkal daun berlekuk, tepi daun rata, permukaan daunnya berwarna hijau dan licin, serta memiliki daun pelindung. Panjang daunnya berkisar antara 15-20 cm. Daun sirih akan mengeluarkan aroma sedap jika diremas (Sudewo, 2007).

Batang tanaman sirih berwarna coklat kehijauan, memiliki bentuk bulat dan kerucut yang bersulur dan beruas-ruas, panjang ruas batang sekitar 5-10 cm dan di setiap buku tumbuh bakal akar. Bunga bulir berada di ujung cabang dan berhadapan dengan daun. Buah bulat dan berbulu. Sedangkan akar pada tanaman sirih digolongkan sebagai akar tunggang, bentuknya bulat dan warnanya coklat dengan sedikit menjurus pada warna kuning khas akar lainnya (Sudewo, 2007).

Bunga tanaman sirih majemuk berbentuk bulir dan terdapat daun pelindung ± 1 mm berbentuk bulat panjang. Bulir tanaman jantan panjangnya sekitar 1,5-3 cm dan terdapat dua benang sari yang pendek sedang, pada bulir tanaman betina panjangnya sekitar 1,5-6 cm dimana terdapat kepala putik tiga sampai lima buah

berwarna putih dan hijau kekuningan. Buahnya buah buni berbentuk bulat berwarna hijau keabu-abuan. Akarnya tunggang, bulat dan berwarna coklat kekuningan. Sirih ini dapat diperbanyak secara vegetatif dengan penyetekan atau pencangkokan. Umumnya sirih dapat tumbuh tanpa pemupukan agar dapat tumbuh subur hanya butuh pengairan dan cahaya matahari 60-75% (Sudewo, 2007).

Jenis sirih di Indonesia, yaitu: 1) daun sirih dengan warna hijau tua dan rasa pedas jika dikunyah (terdapat di Jawa Tengah dan Jawa Timur), 2) daun sirih dengan warna kuning (terdapat di Sumatera dan Jawa Barat), 3) sirih kaki merpati, memiliki daun berwarna kuning dengan tulang daun merah, serta 4) sirih dengan warna hitam khusus untuk obat (Aini, 2012). Varietas yang banyak digemari dan sering dimanfaatkan adalah sirih Jawa.



Gambar 2.1 Daun Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle*) (Aulung, *et al.*, 2010)

2.3.2 Klasifikasi Tanaman Sirih Hijau

Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari tanaman sirih hijau menurut Plantamor (2012), sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Ordo : *Piperales*
Family : *Piperaceae*
Genus : *Piper*
Species : *Piper betle* L.

2.3.3 Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Sirih Hijau

Daun tanaman sirih memiliki rasa dan aroma yang khas yaitu rasa pedas, sengak dan tajam. Rasa dan aroma tersebut disebabkan oleh senyawa kavikol dan bethelphenol yang terkandung dalam minyak atsiri. Di samping itu, faktor lain yang mempengaruhi rasa dan aroma daun sirih adalah jenis, umur, jumlah sinar matahari yang sampai ke bagian daun dan kondisi daun tanaman sirih itu sendiri. Ditinjau dari komposisi kimianya, daun sirih mengandung saponin yang memiliki sifat anti serangga, minyak atsiri, *hidroksikavicol*, *kavicol*, *kavibetol*, *estragol*, *eugenol*, *metal eugenol*, *karvacol*, *terpena*, *phenil propane*, *tanin*, *falvonoid*, *enzim diastase*, *enzim katalase*, *gula*, *pati* dan *vitamin A, B dan C*. Secara keseluruhan, tanaman sirih mengandung minyak atsiri 1%-4,2%, *hidroksikavicol*, *kavicol* 7,2- 16,7%, *kavibetol* 2,7-6,2%, *allylpykatekol* 0-9,6%, *karvacol* 2,2-5,6%, *eugenol* 26,8-42,5%, *eugenol methyl ether* 4,2-15,8%, *p-cymene* 1,2-2,5%, *cyneole* 2,4- 4,8% *alkohol*, *caryophyllene* 3-9,8%, *cadinene* 2,4-15,8%, *estragol*, *terpennena*, *esquiterpena*, *phenil propana*, *tanin*, *diastese*, 0,8-1,8%, *gula*, dan *pati* (Wahyuni, 2013).

Kandungan daun sirih memiliki beberapa fungsi diantaranya senyawa fenol, tanin, alkaloid, pati yang berfungsi sebagai racun perut bagi larva (Marianti, 2014). Senyawa turunan fenol (*eugenol* dan *kavikol*) yang terkandung dalam daun sirih berkhasiat sebagai antiseptik, khususnya *kavikol* yang diketahui mempunyai daya pembunuh bakteri lima kali fenol (Sudewo, 2007). Minyak atsiri dari daun sirih juga dapat digunakan sebagai antijamur dan antioksidan, sedangkan flavonoid dalam daun sirih berfungsi sebagai imunostimulan (Aini, 2012).

Saponin adalah golongan senyawa glikosida yang mempunyai struktur steroid dan mempunyai sifat-sifat khas dapat membentuk larutan koloidal dalam air dan membusi jika dikocok. Saponin memiliki mekanisme kerja sebagai racun

kontak dan racun perut dimana sangat berpengaruh terhadap kematian larva. Adanya kerusakan traktus digestivus dapat menurunkan tegangan permukaan traktus digestivus larva sehingga dinding traktus digestivus menjadi korosif (Kusumaningrum, 2007). Tanin juga berfungsi sebagai racun perut yang berpengaruh terhadap kematian larva, dimana cara kerjanya sama dengan saponin yang dapat mengganggu aktifitas fisik, kehilangan banyak cairan sehingga dinding tractus digestivus korosif . Saponin pada daun sirih juga beracun untuk beberapa hewan berdarah dingin (Aini, 2012).

2.4 Biologi Tanaman Srikaya (*Annona squamosa*)

2.4.1 Morfologi Tanaman Srikaya

Tanaman srikaya adalah salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional dengan nama ilmiah *A. squamosa* L., tanaman ini berasal dari Amerika Latin yang sekarang banyak ditanam di Indonesia. Tanaman srikaya ini diberi nama *sugar apple* atau *custard apple* oleh pelaut Inggris yang berarti berasa seperti puding yang berbentuk seperti apel. Di Indonesia tanaman ini memiliki nama lokal srikaya, di Malaysia dengan nama nona srikaya, di Filipina terkenal dengan nama atis sedangkan di Arab terkenal dengan sebutan gishta. Nama tanaman srikaya di setiap daerah Indonesia juga berbeda-beda seperti di daerah Aceh (delima bintang), Lampung (seraikaya), Madura (Sarkaya), Jawa Tengah (srikaya) dan Bugis (sirikaya) (Taslimah, 2014).

Tanaman srikaya atau *A. squamosa* adalah tumbuhan yang memiliki batang dengan tinggi 3-7 meter berkayu dengan bentuk bulat (*teres*), permukaan batang memperlihatkan banyak lenti sel dan berwarna coklat muda. Pertumbuhan batang arah tegak lurus dan termasuk tumbuhan menahun atau tumbuhan keras. Helai daun srikaya berbentuk lanset atau lonjong lanset dengan panjang 6-17 x 3-6 cm, ujung dan pangkal daun runcing, dasar lengkung, tepi rata, dan berwarna hijau pucat pada kedua permukaannya (Orwa, 2009).

Bunga tanaman srikaya bergerombol pendek menyamping dengan panjang sekitar 2,5 cm dengan jumlah 2-4 kuntum berwarna kuning kehijauan yang saling berhadapan pada tangkai kecil panjang berambut dengan panjang 2 cm. Daun

bunga bagian luar berwarna hijau, ungu pada bagian bawah. Terdapat banyak serbuk sari bergerombol putih, putik berwarna hijau muda dan panjang putik 1,3-1,9 cm dan lebar 0,6-1,3 cm yang tumbuh menjadi kelompok-kelompok buah (Taslimah, 2014). Buah srikaya bila telah matang memiliki kulit yang mengkilap, sisiknya merenggang dan daging buah berwarna putih (Mulyani *et al.*, 2013). Buah srikaya termasuk buah majemuk berbentuk bola menyerupai jantung, permukaan yang berbenjol-benjol, warna hijau berbintik putih. Daging buah berwarna putih kekuningan dan terasa manis. Biji membujur disetiap karpel, berbentuk *ellipsoid* berwarna coklat tua hingga hitam dengan panjang 1,3-1,6 cm. Satu buah srikaya mengandung 10-50 biji dan dalam satu biji memiliki berat 5-18 gram. Biji srikaya mengandung banyak minyak yang digunakan sebagai insektisida (Taslimah, 2014).



Gambar 2.2 Biji Srikaya (*Annona squamosa*) (Adeniji, 2014)

2.4.2 Klasifikasi Tanaman Srikaya

Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari srikaya menurut Plantamor (2012) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Ordo : *Magnoliales*
Family : *Annonaceae*
Genus : *Annona*
Species : *Annona squamosa* L.

2.4.3 Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Srikaya

Tanaman srikaya mengandung squamosin, asimisin, aterospermidin, lanuginosin, alkaloid tipe asporfin (anonain) dan bisbenziltetrahidroisokinolin (retikulin) yang berfungsi sebagai insektisida (Taslimah, 2014). Alkaloid merupakan metabolit sekunder tanaman yang mampu menyebabkan kematian serangga melalui mekanisme racun kontak dan racun perut dan mudah mengalami penguraian jika disimpan dalam waktu lama. Daun srikaya mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, dan steroid/triterpenoid (Mulyani *et al.*, 2013). Daun srikaya terdapat kandungan senyawa alkaloid tetrahidroisokuinolin, phidroksibenzil-6-7-dihidroksi-1,2,3,4-tetrahidro isokinolin. Bunga mengandung asam kaur-1,6-ene-1,9-oat sebagai komponen aktif (Taslimah, 2014).

Biji srikaya mengandung senyawa alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, asetogenin (skuamosin A, skuamosin B, C, D, E, F, G, I, J, K, L, M, N, anonain, anonasin A, anonin I, IV, VI, VIII, IX, XVI, skuamostatin A, bulatasin, skuamon, neoanonin B, asimisin, sanonasin, anonastatin, neoanonin). Komposisi asam lemak penyusun minyak lemak biji srikaya terdiri dari metal palmitat, metal stearat, metil linoleat (Taslimah, 2014).

2.5 Granulasi

Granul merupakan sediaan multiunit berbentuk agglomerat dari partikel kecil serbuk. Granul merupakan hasil dari proses granulasi yang bertujuan untuk meningkatkan aliran serbuk dengan jalan membentuknya menjadi bulatan-bulatan atau agregat-agregat dalam bentuk yang beraturan. Proses granulasi dapat dilakukan dengan 2 metode, yaitu: metode granulasi kering dan granulasi basah (Syamsuni, 2006).

2.5.1 Metode Granulasi Basah

Zat berkhasiat, zat pengisi dan zat penghancur dihaluskan terlebih dahulu dalam mesin penghalus, kemudian zat yang sudah menjadi serbuk dicampur dalam alat pencampur sampai homogen dan dibasahi dengan larutan pengikat. Massa lembab diayak menjadi granul menggunakan ayakan 6 atau 8 mesh dan dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu 50-60°C. Setelah kering diayak kembali untuk memperoleh granul dengan ukuran sesuai yang diperlukan (umumnya menggunakan ayakan 12-20 mesh) (Syamsuni, 2006).

2.5.2 Metode Granulasi Kering

Zat berkhasiat, zat pengisi dan zat penghancur dicampurkan, jika perlu ditambahkan zat pengikat dan zat pelicin hingga menjadi massa serbuk yang homogen, kemudian dikempa cetak pada tekanan yang tinggi, sehingga menjadi tablet besar (*slug*) yang tidak berbentuk, kemudian digiling dan diayak hingga diperoleh granul dengan ukuran partikel yang diinginkan (Syamsuni, 2006).

Salah satu karakteristik granul yang lebih menguntungkan dari serbuk adalah kestabilan granul terhadap efek dari kelembaban udara, karena luas permukaan granul yang lebih kecil jika dibandingkan dengan serbuk. Sediaan granul (multiunit) memiliki beberapa keuntungan dan kerugian dibandingkan dengan sediaan tunggal. Keuntungannya, antara lain: lebih mudah diperkirakan waktu pengosongannya di lambung, pengosongannya di lambung tidak tergantung pada ada tidaknya makanan, variasi absorpsinya rendah dan memiliki resiko yang lebih rendah untuk terjadinya *dose dumping*. Sedangkan kerugiannya, antara lain: proses pembuatannya lebih sulit dan lebih mahal, serta proses pengisian ke kapsul gelatinsulit, terutama untuk partikel yang berbeda ukuran. Sediaan multiunit seperti granul, lebih cocok digunakan sebagai sediaan lepas terkendali dibandingkan sediaan tunggal karena dapat mengurangi variasi absorpsi dan resiko terjadinya *dose dumping* (Syamsuni, 2006).

Granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya memiliki karakteristik bentuk amorf warna putih kecoklatan, suhu pemanasan 40-55°C, ukuran mesh 40-60 dan lama pemanasan 2-6 jam. Kelebihan penggunaan

sediaan berupa granula dibandingkan dengan sediaan lain, seperti ekstrak adalah tidak merubah air menjadi keruh, formulasi granula lebih stabil dan lebih tahan lama (tidak mudah menguap), serta lebih tahan terhadap pengaruh udara (Mujumdar, 2006). Granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terbukti dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dengan dosis 1 g/10 L air dalam waktu 105 menit (Wahyuni, 2016).

2.6 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) sebagai Organisme Non-Target

2.6.1 Morfologi Ikan Mas

Ikan mas memiliki bentuk tubuh yang panjang dan pipih atau biasa disebut dengan *compressed*. Belahan mulutnya terdapat pada bagian depan kepala atau lebih tepatnya berada pada bagian ujung hidung. Gigi kerongkongannya terdapat pada ujung mulut bagian dalam. Terdapat dua pasang sungut pada wilayah anterior. Seluruh bagian tubuh diselubungi oleh sisik. Sisik ikan mas ini memiliki ukuran lebih besar, jika di bandingkan dengan sisik ikan yang lain. Ekor ikan mas memiliki bentuk yang berlekuk tunggal. Memiliki sirip punggung yang memanjang. Letak sirip punggung berseberangan dengan sirip perut. Letak sirip perut sangat dekat dengan sirip dada, terdapat operkulum dan properkulum pada sirip dada. Ikan mas menggunakan lambung palsu untuk menampung makanan. Insang ikan mas terdiri dari beberapa bagian seperti tulang lengkung insang, tapis insang, dan lembaran daun insang (Isnaeni, 2006).



Gambar 2.3 Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Dokumentasi Pribadi)

2.6.2 Klasifikasi Ikan Mas

Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari tanaman sirih hijau menurut Santoso (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*
Phylum : *Chordata*
Class : *Actinopterygii*
Ordo : *Cypriniformes*
Family : *Cyprinidae*
Genus : *Cyprinus*
Spesies : *Cyprinus carpio*

2.6.3 Habitat Ikan Mas

Ikan mas hidup pada perairan tertutup, seperti kolam-kolam air tawar dan perairan terbuka, seperti danau, sungai, rawa dan waduk. Ikan ini juga pernah ditemukan di muara sungai berair payau (Lingga, 2002). Ikan mas dapat dibudidayakan hampir pada semua jenis kolam baik kolam yang airnya mengalir deras atau kolam berair tenang. Ikan ini hidup pada tempat yang tidak terlalu dalam dan aliran air cenderung tidak terlalu deras. Ketinggian tempat optimal untuk ikan mas adalah 150-1000 m dpl pada suhu 25-30°C (Suseno, 2000). Ikan mas dapat hidup dengan kandungan oksigen air kurang dari 4mg/L, kandungan nitrit kurang dari 0,1mg/L, kandungan nitrat kurang dari 0,25 mg/L serta kandungan amonia kurang dari 0,6 mg/L (Suseno, 2000).

2.6.4 Makanan Ikan Mas

Ikan mas termasuk golongan ikan pemakan segala (omnivora). Pada ikan muda (ukuran 10 cm), ikan mas memakan jasad hewan atau tumbuhan yang tumbuh di dasar kolam seperti *Chironomidae*, *Oligochaeta*, *Tubificidae*, *Epimidae* dan *Trichoptera*. Beberapa protozoa dan zooplankton seperti *Copepoda* dan *Cladocera* juga biasa menjadi makanan ikan mas. Ikan mas biasa mencari makanan di sekeliling pematang dan mengaduk-aduk dasar kolam atau perairan agar sumber makanan di dasar kolam atau perairan terbuka dan dapat dimakan.

Makanan alami kebul (istilah untuk fase ikan mas setelah larva) adalah *zooplankton* seperti *Rotifera*, *Nauplii*, *Moina*, dan *Daphnia*. Pada ikan muda biasanya memakan invertebrata yang tinggal di dasar air. Setelah usia bertambah ikan jenis ini memakan *zooplankton*, antara lain *Rotifera*, *copepoda*, dan ganggang. Sedangkan ikan dewasa akan memakan banyak organisme seperti serangga, binatang berkulit keras, *anelida*, kerang-kerangan dan sisa ikan (Suseno, 2000).

2.6.5 Anatomi dan Histologi Saluran Pencernaan (Usus) Ikan

Sistem pencernaan ikan terdiri dari dua bagian yaitu, saluran pencernaan dan kelenjar pencernaan. Saluran pencernaan ikan terdiri dari: rongga mulut, pharing, esofagus, lambung dan usus. Pada ikan Cyprinidae lambung hanya berupa perluasan usus anterior. Struktur histologi saluran pencernaan ikan secara umum sama dengan struktur histologi vertebrata. Lapisan saluran pencernaan ikan terdiri dari: mukosa (epitel, lamina basalis, lamina propria, dan mukosa muskularis), sub mukosa (stratum kompakum dan stratum granulosum), muskularis atau lapisan otot (otot sirkuler dan otot memanjang), serta serosa (Isnaeni, 2006).

Lambung ikan umumnya berbentuk sigmoid yang melengkung dengan banyak lipatan pada dinding dalamnya. Lapisan otot lambung depan didominasi oleh otot bergaris melintang dan berganti otot licin pada bagian belakangnya. Terdapat sejumlah lapisan otot yang berbatas dengan suatu muskularis mukosa, dan lapisan-lapisan jaringan ikat, yang sering dipenuhi dengan sel-sel eosinofil. Mukosa lambung sangat berlendir yang dihasilkan oleh beberapa kelenjar pada bagian dasar dari lipatan-lipatan (Roberts, 2001).

Umumnya, usus ikan berbentuk tabung sederhana yang tidak dapat bertambah diameternya dan memiliki panjang berbeda-beda sesuai dengan makanannya. Bentuk usus sesuai dengan bentuk rongga perut ikan, yaitu lurus, melengkung atau bergulung-gulung. Usus memiliki sel epitel silindris sederhana yang menutup sub mukosa (mengandung eosinofil). Antara sel epitel dan sub mukosa dibatasi oleh muskularis mukosa yang bersifat fibroelastik dan rapat.

Rektum memiliki dinding lebih tebal dan jumlah lendir yang lebih banyak dibandingkan dengan usus (Hibiya, 1995 dalam Camargo, *et al.*, 2007).

2.6.6 Anatomi dan Histologi Hati Ikan Mas

Hati pada ikan terletak di bagian sisi perut, di dalam rongga peritoneal. Hati merupakan organ terbesar yang berwarna merah kecoklatan dan menjadi salah satu organ pertahanan utama terhadap mikroorganisme maupun senyawa toksik. Struktur utama hati adalah hepatosit (sel parenkim hati) yang berperan utama dalam proses metabolisme. Sel hepatosit terletak sinusoid yang berisi darah dan saluran empedu. Selain hepatosit, juga terdapat sel kupffer dalam hati yang merupakan monosit atau makrofag. Sel kupffer ini berfungsi untuk menelan bakteri dan benda asing dalam darah (Damayanti, 2010).

Hati memiliki fungsi untuk mensintesis dan menyimpan nutrien, memproduksi cairan empedu, serta sebagai tempat pembuangan limbah dari darah (Subandiyono, *et al.*, 2010). Berdasarkan fungsinya, hati menjadi organ yang paling banyak mengakumulasi zat toksik. Toksikan akan dihancurkan atau dinonaktifkan oleh enzim-enzim dalam hati, jika toksikan masuk secara terus menerus dan terakumulasi dalam jumlah banyak maka hati akan jenuh terhadap toksikan, sehingga hati tidak mampu lagi melakukan proses detoksifikasi. Akibatnya metabolisme dalam hati akan menurun atau terganggu, sehingga memicu kematian sel.

Selain fungsi yang telah disebutkan, hati memiliki fungsi lain, yaitu sintesis dan ekskresi empedu, sintesis protein, metabolisme garam empedu, metabolisme karbohidrat (glikogenesis, glikogenolisis dan glukoneogenesis), serta metabolisme dan penyimpanan lemak (Damayanti, 2010). Zat toksik dalam hati akan mengganggu kerja enzim-enzim biologis untuk metabolisme, sintesis maupun ekskresi, selain itu zat toksik juga akan mempengaruhi struktur histologi hati. Perubahan histologi hati yang umumnya terjadi pada ikan akibat zat toksik adalah *cloudy swelling* (sel hati agak keruh, stioplasma keruh dan bergranula) akibat adanya *hyaline eosinofil* dalam sitoplasma, atropi sel hati, nekrosis, degenerasi

vakuola, degenerasi lemak, stagnansi empedu, hepatitis, sirosis dan gangguan pada aliran darah sinusoid atau vena (Tresnati, *et al.*, 2007).

2.6.7 Anatomi dan Histologi Insang Ikan Mas

Insang merupakan organ respirasi yang utama dan vital pada ikan, terletak di dua sisi tubuh ikan bagian depan. Insang terdiri dari filamen terstruktur dan memiliki permukaan luas. Filamen dan lamela insang (*epithelium respiratorik*) yang sangat tipis berfungsi sebagai tempat pertukaran gas pernafasan (Erlangga, 2007). Proses pernafasan pada ikan dimulai dari membukanya mulut dan menutupnya operkulum sehingga air yang mengandung banyak oksigen terdorong masuk ke dalam mulut, kemudian melewati insang. Terjadi pertukaran gas di dalam *epithelium respiratorik* insang. Oksigen dalam *epithelium respiratorik* akan ditangkap oleh jaringan pembuluh darah dalam insang dan karbondioksida, serta gas buangan lainnya akan dilepaskan. Selanjutnya, ikan akan menutup mulut dan membuka operkulum untuk mengalirkan air yang mengandung banyak karbondioksida dan gas buangan lainnya (Isnaeni, 2006).

Insang merupakan organ pernapasan ikan yang berhubungan langsung dengan lingkungan luar. Permukaan insang yang luas dan terbuka, mengakibatkan insang sangat rentan tercemar oleh bahan toksik yang ada di lingkungan perairan (Widayanti, *et al.*, 2010). Selain sebagai alat pernapasan, insang juga digunakan sebagai pengatur tekanan cairan dalam tubuh ikan (osmoregulasi). Oleh sebab itu, insang merupakan organ yang penting pada ikan dan sangat peka terhadap pengaruh toksikan. Faktor yang menyebabkan terjadinya respon histopatologi pada insang ikan adalah adanya zat toksik yang dapat menyebabkan iritasi. Zat ini masuk secara terus menerus ke dalam sel atau jaringan insang dan selanjutnya akan berpengaruh pada kehidupan ikan (Isnaeni, 2006).

Epithelium respiratorik insang merupakan bagian vital dari insang karena selain untuk pertukaran gas, *epithelium respiratorik* insang juga berfungsi untuk menjaga keseimbangan asam basa, regulasi ion dan ekskresi nitrogen. Oleh karena itu, jika ikan tercemar oleh polutan lingkungan seperti pestisida dan logam berat,

maka akan membahayakan tubuh ikan karena dapat menghalangi penerimaan oksigen (Ersa, 2008).

2.6.8 Anatomi dan Histologi Ginjal Ikan Mas

Ginjal ikan terletak pada posisi retroperitoneal dibagian ventral dari tulang punggung, di bawah kolum vertebrae (Damayanti, 2010). Secara mikroskopis, ginjal terlihat berwarna coklat muda atau tua, bentuknya bervariasi menurut spesies. Ginjal terbagi atas bagian anterior dan posterior. Bagian anterior berfungsi sebagai organ limphomeiloid, sedangkan bagian posterior berfungsi sebagai organ ekskretori.

Ginjal mempunyai peran utama dalam ekskresi metabolisme, pencernaan dan tempat penyimpanan berbagai unsur. Ginjal berfungsi untuk filtrasi dan mengekskresi bahan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh, termasuk toksik (Erlangga, 2007). Hal ini, menyebabkan ginjal sering mengalami kerusakan akibat daya toksik. Pada ginjal terdapat lisosom yang merupakan tempat akumulasi endoproduk dari lipid peroksida yang disebut lipofuschim. Di ginjal, lipofuschim akan berikatan dengan logam dengan cara; logam diikat tidak kuat oleh grup asam di luar granula dan mempunyai kemampuan menjaga keseimbangan kation-kation dalam sitoplasma atau dengan cara logam diperangkap dalam bentuk tidak beracun dipusat perkembangan granula. Jaringan ginjal ikan lebih rapuh dan konsistensinya lebih lunak dibandingkan vertebrata lainya (Damayanti, 2010).

2.7 Cara Kerja Senyawa Aktif pada Daun Sirih (*P. betel*) dan Biji Srikaya (*A. squamosa*) terhadap Ikan

Daun sirih mengandung beberapa senyawa aktif, yaitu: saponin, minyak atsiri, hidroksikovikol, kovikol, kavibetol, estragol, eugenol, metal eugenol, karvakrol, terpena, fenil propane, flavonoid dan tanin (Wahyuni, 2013). Kandungan daun sirih memiliki beberapa fungsi diantaranya senyawa fenol, tanindan alkaloid yang berfungsi sebagai racun perut pada larva (Marianti, 2014). Tanin pada organisme tingkat tinggi dapat menghambat inhibisi enzim protease, sehingga protein tidak dapat diubah menjadi asam amino. Saponin bersifat menghancurkan butir darah merah melalui reaksi hemolisis bagi hewan berdarah

dingin (Wahyuni, 2010). Saponin juga menyebabkan gangguan aktivitas fisik dan kehilangan banyak cairan sehingga dinding *tractus digestivus* korosif (Aini, 2012). Selain tanin dan saponin yang berpotensi sebagai racun bagi ikan, daun sirih juga mengandung flavonoid yang bersifat imunostimulan. Flavonoid yang terkandung dalam daun sirih berfungsi untuk meningkatkan imunitas tubuh dengan cara menstimulasi perkembangan dan pertumbuhan leukosit sebagai pertahanan non spesifik pada ikan (Syahida, *et al.*, 2013).

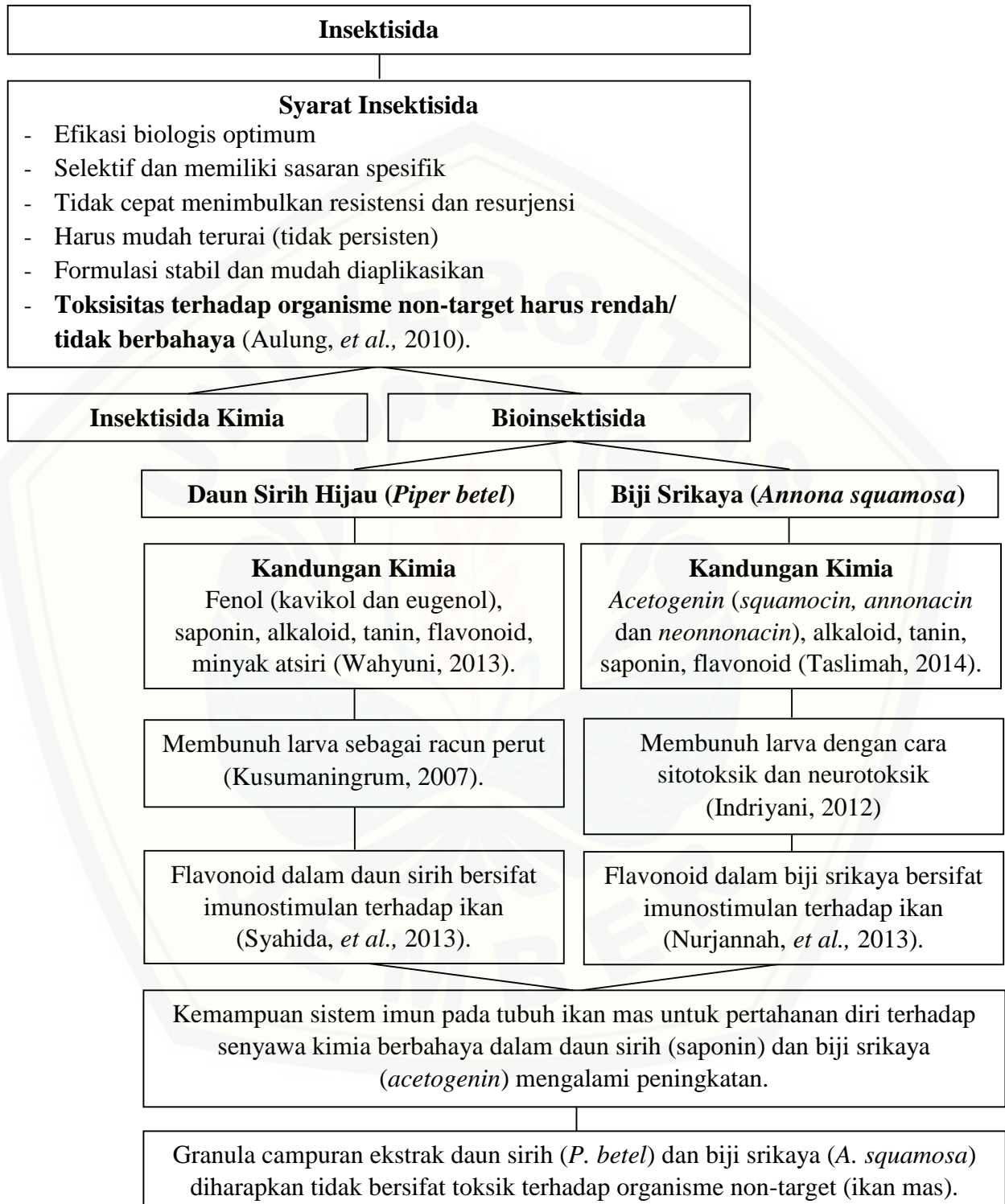
Biji srikaya mengandung senyawa alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, asetogenin (skuamosin A, skuamosin B, C, D, E, F, G, I, J, K, L, M, N, anonain, anonasin A, anonin I, IV, VI, VIII, IX, XVI, skuamostatin A, bulatasin, skuamon, neoanonin B, asimisin, sanonasin, anonastatin, neoanonin) (Taslimah, 2014). Asetogenin merupakan senyawa dengan gugus furanon yang berfungsi sebagai racun perut. Asetogenin masuk ke dalam sel usus dengan bantuan reseptor channel C1. Gugus furanon pada asetogenin akan berikatan dengan vakuola ATPase yang berfungsi untuk transpor intra dan ekstra sel, sehingga aktivitasnya terganggu. Gangguan pada proses transpor sel menyebabkan nutrisi yang keluar masuk sel menjadi terhambat. Kondisi selanjutnya akan menyebabkan malnutrisi pada sel-sel usus. Asetogenin juga menyebabkan kerusakan dinding sel usus melalui proses oksidasi dan penurunan tegangan permukaan. Proses tersebut menyebabkan kerusakan pada sel sehingga terjadi nekrosis sel (Pohan, *et al.*, 2016). Biji srikaya juga mengandung flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan imunostimulan untuk meningkatkan imunitas tubuh pada ikan. Kandungan flavonoid pada srikaya lebih tinggi jika dibandingkan dengan flavonoid pada daun sirih (Nurjannah, *et al.*, 2013).

Daun sirih dan biji srikaya memiliki kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai racun ikan, selain itu daun sirih dan biji srikaya juga memiliki kandungan senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan imunostimulan, sehingga ikan dapat mempertahankan diri dari kerusakan jaringan akibat senyawa aktif yang bersifat racun. Pada umumnya, bahan alami tidak berbahaya jika pemakaian sesuai dosis. Toksisitas senyawa aktif yang terkandung pada daun sirih dan biji srikaya dapat terjadi apabila paparan berlangsung dalam dosis tinggi secara terus

menerus (Pohan, *et al.*, 2016). Penelitian-penelitian yang sudah dilakukan dapat dijadikan sebagai referensi dosis aman daun sirih maupun biji srikaya yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida.



2.8 Kerangka Teori



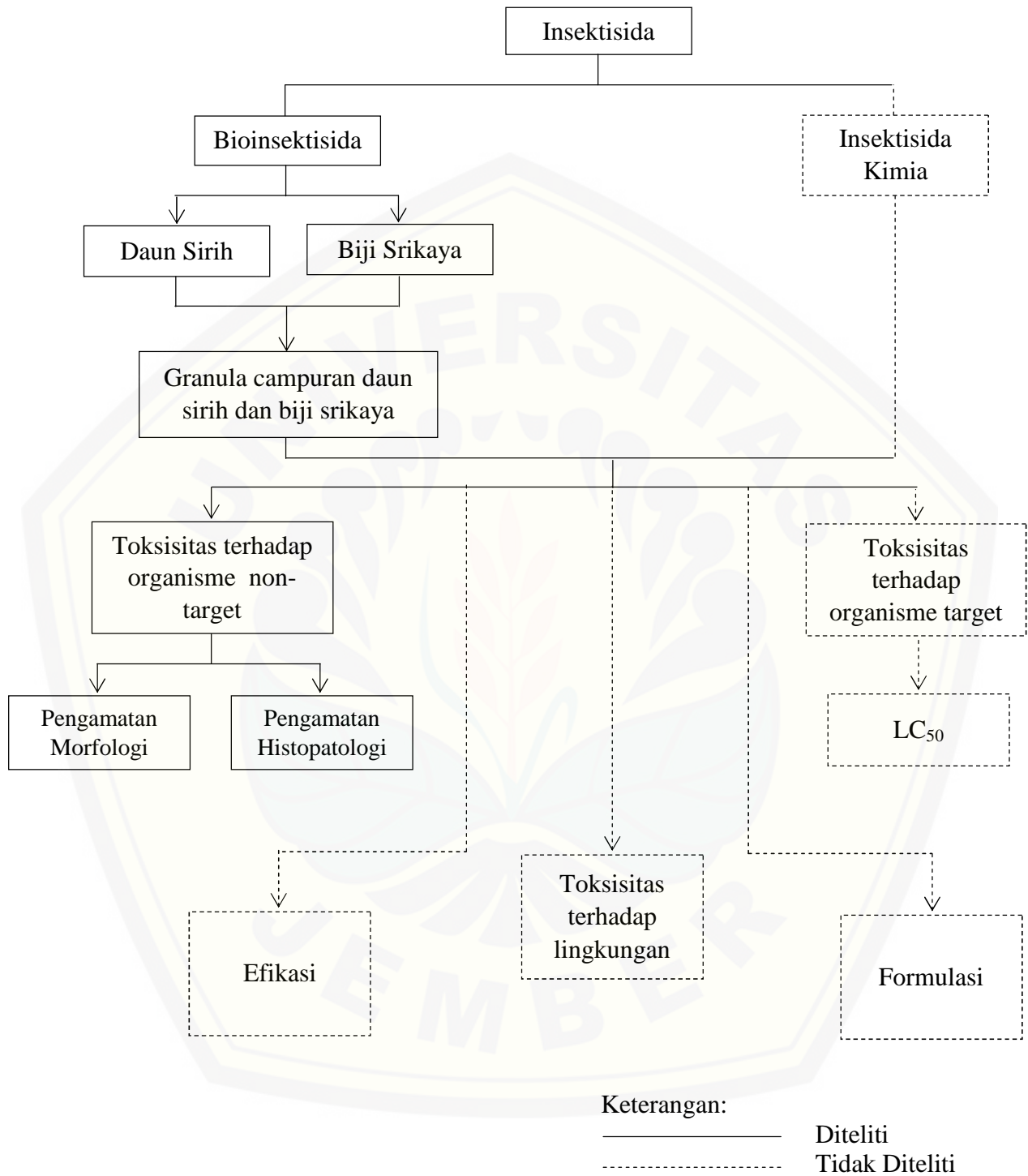
Gambar 2.4 Diagram Kerangka Teori Penelitian

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang dapat membunuh hama pengganggu berupa serangga yang merugikan. Syarat suatu bahan dapat digunakan sebagai insektisida yaitu: memiliki toksisitas terhadap organisme target, toksisitas terhadap organisme non target rendah atau tidak ada, memiliki efikasi biologis yang optimum (takaran aplikasi rendah), tidak menimbulkan residu yang dapat mencemari lingkungan, selektif dan tidak cepat menimbulkan resistensi, formulasinya stabil, serta mudah diaplikasikan. Insektisida dibedakan menjadi insektisida kimia dan bioinsektisida. Bioinsektisida adalah insektisida berbahan alami yang umumnya lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan banyak dampak negatif terhadap organisme non-target. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida adalah daun sirih dan biji srikaya.

Daun sirih dan biji srikaya memiliki kandungan senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida karena bersifat toksik terhadap larva. Daun sirih mengandung zat kimia alami berupa fenol dan senyawa turunannya seperti kavikol dan eugenol, mengandung saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan minyak atsiri yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida (Wahyuni, 2013). Sedangkan kandungan zat kimia alami dalam biji srikaya, antara lain: *acetogenin* seperti *squamocin*, *bullatacin*, *annonacin* dan *neonnonacin*, mengandung alkaloid, tanin, dan saponin yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida (Taslimah, 2014). Selain itu, daun sirih dan biji srikaya juga memiliki kandungan senyawa flavonoid yang bersifat imunostimulan terhadap hewan berdarah dingin terutama ikan.

Flavonoid dapat meningkatkan imunitas tubuh dengan cara menstimulasi perkembangan dan pertumbuhan leukosit sebagai pertahanan non spesifik pada ikan (Syahida, *et al.*, 2013). Leukosit akan melindungi tubuh dari senyawa asing berbahaya termasuk saponin dan tanin dari daun sirih dan asetogenin dari biji srikaya yang berpotensi sebagai racun ikan. Sehingga diharapkan granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya ini tidak bersifat toksik terhadap organisme non target (ikan mas).

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Diagram Kerangka Konsep Penelitian

Insektisida merupakan salah satu jenis pestisida yang dapat membunuh hama pengganggu berupa serangga yang merugikan. Insektisida dibedakan menjadi insektisida kimia dan bioinsektisida. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida adalah daun sirih dan biji srikaya. Penelitian yang dilakukan Wahyuni (2016), menghasilkan granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap larva nyamuk *A. Aegypti* dengan karakteristik bentuk amorf warna putih kecoklatan, suhu pemanasan 40-55°C, ukuran mesh 40-60 dan lama pemanasan 2-6 jam. Granula senyawa toksik campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terbukti dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dengan dosis 1 g/10 L air dalam waktu 105 menit.

Syarat suatu bahan dapat digunakan sebagai bioinsektisida harus dilakukan pengujian toksisitas terhadap organisme non target, organisme target dan lingkungan, serta dilakukan pengujian fisik berupa efikasi dan formulasi. Berdasarkan penelitian Wahyuni (2016), granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terbukti bersifat toksik terhadap organisme target, sehingga pada penelitian ini dilakukan pengujian toksisitas terhadap organisme non target dengan pengamatan terhadap morfologi dan histopatologi organ.

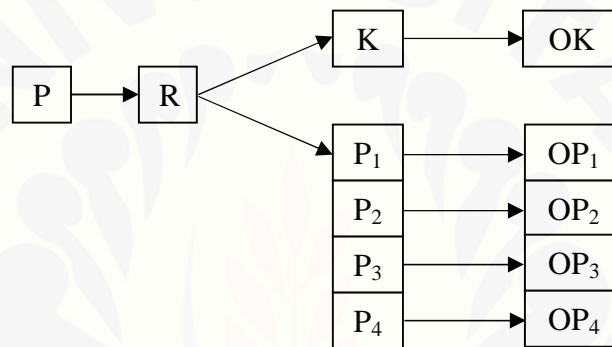
2.10 Hipotesis

1. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) tidak menyebabkan kematian, sehingga kelulusan hidup pada ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target maksimal.
2. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) tidak bersifat toksik terhadap morfologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.
3. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) tidak bersifat toksik terhadap histopatologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) sebagai organisme non-target.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true-experimental (Posttest Only Control Group Design)* yang dilakukan di laboratorium dengan tujuan untuk menguji pengaruh perlakuan terhadap kelompok eksperimen dengan cara membandingkan dengan kontrol. Berdasarkan hasil penelitian, penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif (Sugiyono, 2010).



Keterangan:

P : Populasi

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol negatif (hanya menggunakan air sumur)

P₁ : Kelompok perlakuan 1, diberi 0,25 g/10 L granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

P₂ : Kelompok perlakuan 2, diberi 0,5 g/10 L granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

P₃ : Kelompok perlakuan 3, diberi 0,75 g/10 L granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

P₄ : Kelompok perlakuan 4, diberi 1 g/10 L granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

OK : Pengamatan pada kelompok kontrol negatif

OP₁ : Pengamatan pada kelompok perlakuan 1.

OP₂ : Pengamatan pada kelompok perlakuan 2.

OP₃ : Pengamatan pada kelompok perlakuan 3.

OP₄ : Pengamatan pada kelompok perlakuan 4.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Benih Ikan Kalisat, Jember untuk pelaksanaan uji toksisitas pada ikan mas, di Laboratorium Parasitologi Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember untuk pembedahan dan pengamatan morfologi organ ikan mas, serta di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember untuk pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi. Penelitian ini dimulai pada bulan Juli sampai September 2017.

3.3 Kriteria dan Jumlah Sampel Penelitian

3.3.1 Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan mas (*C. carpio*). Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan cara homogen dari ikan mas yang berumur 3-4 bulan dengan berat rata-rata 20-25 gram dan panjang rata-rata 8-12 cm karena pada rentang umur tersebut ikan mas sangat peka terhadap faktor lingkungan (Chahaya, 2003).

3.3.2 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah ikan mas yang digunakan sebagai sampel penelitian ditentukan dengan rumus menurut Frederer dalam Sugiyono (2010), sebagai berikut:

$$(t-1) (n-1) = 15$$

t = kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan

Kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian adalah 5 kelompok. Sehingga jumlah ulangan yang diperoleh adalah:

$$(5-1) (n-1) = 15$$

$$n = 4,75$$

$$n = 5$$

Untuk menentukan besar sampel yang digunakan, jumlah sampel dikalikan dengan kelompok perlakuan

$$N = t \times n$$

$$N = 5 \times 5$$

$$N = 25$$

N = besar sampel

Sehingga besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 25 ekor dengan masing-masing kelompok perlakuan 5 kali pengulangan, jadi jumlah total ikan mas yang digunakan dalam penelitian ini adalah 125 ekor. Konsentrasi ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya dari Wahyuni (2016), yang menyatakan bahwa granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya dengan konsentrasi 1 g/10 L dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dalam waktu 105 menit. Sehingga seri konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seri konsentrasi granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betle*) dan biji srikaya (*A. squamosa*), yaitu 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan, serta perubahan morfologi dan histopatologi (kerusakan jaringan) pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas (*C. carpio*) dalam waktu dedah 96 jam, serta parameter lingkungan perairan (suhu, DO, pH dan CO₂ bebas).

c. Variabel Kontrol

Variabel yang disamakan dalam penelitian ini, yaitu: jenis, ukuran dan umur ikan mas, media tumbuh, tempat pemeliharaan, serta pakan.

3.4.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Hasil Pengukuran	Skala Data
1	Variabel bebas: Konsentrasi granula campuran ekstrak daun sirih (<i>P. betel</i>) dan biji srikaya (<i>A. squamosa</i>)	Granula merupakan sediaan bentuk padat yang berupa gumpalan-gumpalan dari partikel yang lebih kecil dengan diameter 2-4 mikrometer (Mujumdar, 2006). Granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya memiliki karakteristik bentuk amorf warna putih kecoklatan, suhu pemanasan 40-55°C, ukuran mesh 40-60 dan lama pemanasan 2-6 jam (Wahyuni, 2016).	Perhitungan dengan persen berat per volume $\% \frac{W}{V} = \frac{\text{gram zat terlarut}}{\text{mL larutan}} \times 100 \times 100$	Konsentrasi granula dalam persen	Rasio
2.	Variabel terikat: Jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan mas (<i>C. carpio</i>) sebagai organisme non-target	Kematian ikan adalah keadaan hilangnya semua tanda-tanda kehidupan secara permanen pada ikan. Persentase kelulusan hidup ikan adalah perbandingan antara jumlah ikan yang masih hidup di akhir penelitian dengan jumlah total ikan yang digunakan pada penelitian. Pada penelitian ini, kematian ikan dapat disebabkan oleh toksisitas bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih (<i>P. betel</i>) dan biji srikaya (<i>A. squamosa</i>)	Perhitungan persentase kelulusan hidup ikan sebagai hewan uji: $SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$ - SR : kelulusan hidup hewan uji (%) - Nt : Jumlah ikan uji pada akhir penelitian (ekor) - No : Jumlah ikan uji pada awal penelitian (Effendi, 2003).	Jumlah kematian dan persentase kelulusan hidup ikan mas sebagai organisme non-target .	Rasio

(Supriyono, <i>et al.</i> , 2013)					
3.	Variabel terikat: Morfologi ikan mas (<i>C. carpio</i>) sebagai organisme non-target	Morfologi merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari tentang bentuk dan bagian-bagian organisme. Pada penelitian ini, pengamatan morfologi dilakukan pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas sebagai organisme non-target (Camargo, <i>et al.</i> , 2007).	Pengamatan makroskopis pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas sebagai organisme non-target setelah pemberian granula campuran ekstrak daun sirih (<i>P. betel</i>) dan biji srikaya (<i>A. squamosa</i>) yang meliputi ada tidaknya perubahan warna, akumulasi granula, bintik-bintik hitam, perubahan ukuran (hiperplasia atau hipoplasia), serta ada tidaknya rongga. Perubahan yang terjadi pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.	Deskripsi ada tidaknya perubahan warna, akumulasi granula, bintik-bintik hitam, perubahan ukuran (hiperplasia atau hipoplasia) melalui pengukuran berat organ, serta ada tidaknya rongga pada usus, hati dan insang ikan mas.	Rasio untuk ukuran organ Nominal untuk parameter lain
4.	Variabel terikat: Histopatologi ikan mas (<i>C. carpio</i>) sebagai organisme non-target	Histopatologi merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari tentang kelainan kondisi dan fungsi jaringan dalam hubungannya dengan penyakit. Pada penelitian ini, pengamatan histopatologi dilakukan pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas sebagai organisme non-target (Rahayu, <i>et al.</i> , 2013).	Pengamatan mikroskopis pada jaringan usus, hati, insang dan ginjal ikan mas sebagai organisme non-target setelah pemberian granula campuran ekstrak daun sirih (<i>P. betel</i>) dan biji srikaya (<i>A. squamosa</i>). Perubahan yang terjadi pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pengamatan usus meliputi: - Nekrosis Pengamatan hati meliputi: - Nekrosis Pengamatan insang meliputi:	Skoring ditentukan dari nilai median grading parameter kerusakan pada masing-masing organ. Kriteria skoring: (-) Tidak ada kerusakan jaringan 0% (+) Kerusakan jaringan ringan <25% (++) Kerusakan jaringan sedang 25-	Ordinal

		<ul style="list-style-type: none"> - Hiperplasia - Nekrosis - Fusi lamela <p>Pengamatan ginjal meliputi:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hemoragi - Nekrosis <p>Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x</p>	<p>50%</p> <p>(+++) Kerusakan jaringan berat >50%</p>		
5.	<p>Variabel terikat:</p> <p>Parameter lingkungan perairan</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suhu adalah besaran yang dipengaruhi oleh intensitas cahaya matahari, pertukaran panas antara air dan udara, ketinggian geografis, kanopi dan limbah (Manson, 2002). 2. DO (<i>Disolved Oxigent</i>) adalah jumlah oksigen yang terlarut dalam air (Manson, 2002). 3. pH adalah ukuran tingkat asam atau basa suatu larutan dengan cara menghitung konsentrasi ion hidrogen dari larutan (Manson, 2002). 4. CO₂ bebas adalah kadar gas karbon dioksida bebas yang digunakan untuk proses fotosintesis dan tidak terikat senyawa lain (Manson, 2002). 	<p>Alat untuk pengukuran parameter lingkungan perairan, yaitu:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Suhu : Termometer 2. DO : DO meter 3. pH : pH meter 4. CO₂ bebas : metode micro-winkler 	<p>Kondisi lingkungan perairan yang baik menurut Manson (2002):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Suhu air 25-27°C 2. DO 4-8 ppm 3. pH 6-7,5 4. CO₂ bebas 3-15 ppm 	<p>Rasio</p>

3.5 Sumber Data

Peneliti menggunakan data primer yang diperoleh secara langsung dari objek penelitian. Data primer diperoleh dari hasil uji toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap jumlah kematian, morfologi dan histopatologi ikan mas sebagai organisme non target.

3.6 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aquarium ukuran 175x100x50 cm, aerator (*Lion*), penggaris, kertas milimeter, pH meter, DO meter, termometer, timbangan analitik (*Pioneer*), papan dan alat bedah (*One Med*), mikroskop cahaya (XSZ 107BN), optilab, gelas benda dan gelas penutup (*One Med*), rotary microtome, oven (*memmert*), serta *hot plate*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan mas umur 3-4 bulan dengan ukuran sama sebanyak 125 ekor, pelet ikan (Takari), media hidup ikan (air sumur), granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya (BioAe) produk bioinsektisida PT. Agaricus Sido Makmur Sentosa, NaCl 0,9%, PBS Formalin, parafin, xylol, alkohol bertingkat dari 20% sampai alkohol absolut, aquades, perekat gliserin dan albumin, entellan, serta pewarna *Haemotoxylin Eosin* (HE).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Ikan Mas sebagai Sampel

Ikan mas berumur 3-4 bulan dengan berat rata-rata 20-25 gram dan panjang rata-rata 8-12 cm dipilih secara homogen kemudian dilakukan aklimatisasi selama 24 jam pada media berupa air sumur yang sudah didiamkan semalam. Ikan mas yang sudah diaklimatisasi siap digunakan untuk uji toksisitas.

3.7.2 Pengujian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Organisme Non-target

Pengujian dilakukan pada ikan mas sebagai organisme non target. Konsentrasi ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya dari Wahyuni (2016), yang menyatakan bahwa granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

dengan konsentrasi 1 g/10 L dapat membunuh 95% larva nyamuk *A. aegypti* dalam waktu 105 menit. Tahap uji pada ikan mas adalah sebagai berikut:

- a. 25 buah Akuarium masing-masing diisi dengan 20 L air sumur sebagai media dan diberi aerator sebagai pemasok oksigen selama pengujian berlangsung pada masing-masing media uji.
- b. Ikan mas yang akan digunakan sebagai organisme uji dimasukkan ke dalam akuarium masing-masing sebanyak 5 ekor, kemudian diaklimatisasi selama 24 jam.
- c. Granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya (Produk BioAe) dengan karakteristik bentuk amorf, warna putih kecoklatan, suhu pemanasan 45°C, ukuran mesh 40-60 mesh dan lama pemanasan 2-6 jam, dimasukkan ke dalam akuarium yang sudah berisi ikan mas dengan konsentrasi 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L, sedangkan kontrol negatif tanpa pemberian granula.
- d. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 96 jam. Pada saat pengamatan, dicatat jumlah kematian hewan uji, suhu, DO, pH dan CO₂ bebas dengan metode *micro-winkler*. Pada akhir pengamatan (jam ke-96) dilakukan pembedahan pada ikan baik yang hidup maupun mati untuk mengetahui perubahan morfologi dan histologi usus, hati, insang dan ginjal ikan mas.

Tabel 3.2 Rancangan penelitian uji toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betel*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) terhadap ikan mas (*C. carpio*)

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5
K	K.U1	K.U2	K.U3	K.U4	K.U5
P1	P1.U1	P1.U2	P1.U3	P1.U4	P1.U5
P2	P2.U1	P2.U2	P2.U3	P2.U4	P2.U5
P3	P3.U1	P3.U2	P3.U3	P3.U4	P3.U5
P4	P4.U1	P4.U2	P4.U3	P4.U4	P4.U5

Keterangan:

K : Kontrol negatif

P1 : Perlakuan granul dengan konsentrasi 0,25 g/10 L

P2 : Perlakuan granul dengan konsentrasi 0,5 g/10 L

P3 : Perlakuan granul dengan konsentrasi 0,75 g/10 L

P4 : Perlakuan granul dengan konsentrasi 1,0 g/10 L

Presentase kematian ikan dihitung berdasarkan rumus, sebagai berikut:

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

SR : Kelulusan hidup hewan uji (%)

Nt : Jumlah ikan uji pada akhir penelitian (ekor)

No : Jumlah ikan uji pada awal penelitian (Effendi, 2003).

Tingkat toksisitas dari granula campuran ekstrak daun sirih (*P. betel*) dan biji srikaya (*A. squamosa*) ditentukan dengan kriteria berdasarkan EPA (*Environmental Protection Agency*). Berikut ini kriteria tingkatan nilai toksisitas LC₅₀-96 jam pada lingkungan perairan:

Tabel 3.3 Kriteria tingkatan nilai toksisitas LC₅₀-96 jam di lingkungan perairan

No.	Kategori	Satuan
1.	Rendah	>100 mg/ L
2.	Sedang	10-100 mg/L
3.	Tinggi	1-10 mg/L
4.	Sangat Toksik	< 1 mg/L

Sumber: EPA, 1999 dalam Kinasih, *et al.*, 2013.

3.7.3 Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan setelah pembedahan. Morfologi yang diamati, yaitu: ada tidaknya perubahan warna, akumulasi granula, bintik-bintik hitam, perubahan ukuran (hiperplasia atau hipoplasia) yang diketahui dari pengukuran berat organ dibandingkan dengan kontrol, serta ada tidaknya rongga pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas.

3.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan pembuatan preparat histopatologi. Pengambilan sampel dilakukan dengan pembedahan untuk mengambil organ usus, hati, insang dan ginjal. Metode yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi adalah metode parafin dan pewarnaan *Haemotoxylin Eosin*. Metode parafin dilakukan dengan urutan sebagai berikut:

a. Fiksasi, Dehidrasi dan *Clearing*

Organ yang telah diambil dicuci dengan NaCl 0,9%, kemudian dimasukkan dalam flakon berisi larutan fiksatif PBS formalin selama 3 jam kemudian dicuci alkohol 70 %. Proses dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80% dan 95% masing-masing 1,5 jam. Selanjutnya digunakan alkohol absolut dan *xylol* dengan perbandingan 3:1, 1:1 dan 1:3 selama 30 menit. Proses selanjutnya adalah *clearing*, organ dibersihkan dengan *xylol* selama 4-6 jam (Humason,1967 dalam Ersa, 2008).

b. Infiltrasi dan Penanaman (*Embedding*)

Infiltrasi parafin dilakukan pada suhu 50-56°C , menggunakan parafin I,II,III selama 1 jam. Organ ditanam dalam blok parafin yang telah dicairkan. Selanjutnya *embedding* dilakukan secara bertingkat menggunakan *xylol* : parafin selama 30 menit (Humason,1967 dalam Ersa, 2008).

c. Penyayatan (*Sectioning*) dan Perekatan (*Affixing*)

Organ yang akan disayat direkatkan pada *holder* dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Organ disayat melintang menggunakan *rotary microtome* dengan ketebalan 8-10 μ m, selanjutnya sayatan direkatkan (*Affixing*) pada gelas benda yang telah dilapisi perekat gliserin dan albumin, kemudian disimpan dalam inkubator 4°C selama 24 jam. Sediaan diwarnai dengan *Haematoxylin* dan *Eosin* (Humason,1967 dalam Ersa, 2008).

d. Pewarnaan (*Staining*)

Preparat organ dideparafinisasi menggunakan *xylol* I dan II masing-masing 15-30 menit, kemudian dilakukan hidrasi bertingkat mulai dari alkohol absolut, 95%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan aquades masing-masing 2 menit. Dilakukan pewarnaan pada preparat dengan *Haematoxylin* selama 2-3 menit, kemudian dicuci air mengalir. Preparat dimasukkan kembali dalam alkohol bertingkat dari 20% hingga 70%. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Eosin selama 10 menit, dilanjutkan alkohol bertingkat hingga *Xylol* I dan II selama 2 menit (Humason,1967 dalam Ersa, 2008).

e. Penutupan (*Mounting*)

Irisan diberi *entellan* terlebih dahulu kemudian ditutup dengan gelas penutup, dikeringkan di atas *hot plate* agar terbebas dari gelembung udara dan dapat diamati pada mikroskop (Humason, 1967 dalam Ersa, 2008).

3.7.5 Pengamatan Preparat Histopatologi

Pengamatan preparat dilakukan untuk melihat kerusakan jaringan pada usus, yaitu nekrosis. Kerusakan jaringan pada hati, yaitu nekrosis. Kerusakan jaringan pada insang yang meliputi: hiperplasia, nekrosis dan fusi lamela sekunder. Kerusakan jaringan pada ginjal yang meliputi: hemoragi dan nekrosis. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Tingkat kerusakan dianalisis dengan menggunakan skoring yang dapat dilihat pada tabel 3.4. Skoring diperoleh dari nilai median grading parameter kerusakan jaringan pada masing-masing organ (Rahayu, *et al.*, 2013).

Tabel 3.4 Skoring Kerusakan Jaringan pada Ikan

-	Tidak ada kerusakan jaringan	0 %
+	Kerusakan jaringan ringan	<25%
++	Kerusakan jaringan sedang	25-50%
+++	Kerusakan jaringan berat	>50%

Sumber: Rahayu, *et al.*, 2013.

3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data

3.8.1 Teknik Penyajian Data

Pengolahan data hasil penelitian dilakukan dengan cara:

a. Editing

Memeriksa data hasil penelitian yang telah dikumpulkan. Pemeriksaan ini bertujuan agar tidak terjadi kesalahan pada data yang diperoleh.

b. Entri Data

Memasukkan data hasil penelitian yang sudah melalui tahap editing ke dalam komputer.

c. Tabulasi

Data dikelompokkan ke dalam tabel untuk memudahkan analisis data.

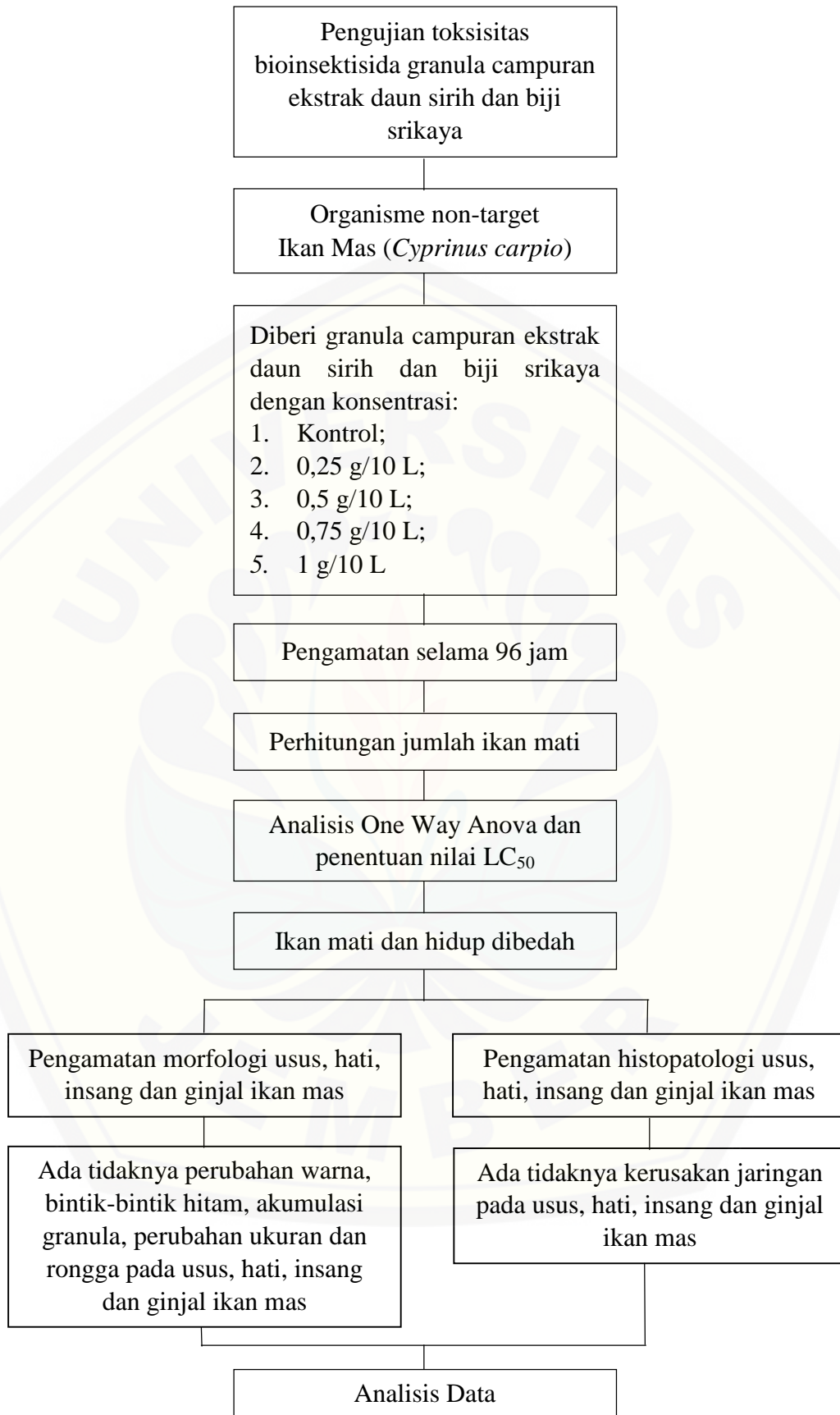
3.8.2 Analisis Data

Analisis statistik digunakan untuk menganalisis data jumlah kematian ikan mas setelah pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya dan menentukan nilai LC_{50} . Data yang diperoleh dari penelitian terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitas, kemudian dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA *one way* dengan taraf kepercayaan 99% atau $\alpha = 0,01$, dilanjutkan dengan analisis lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT), sedangkan untuk menentukan nilai LC_{50} menggunakan analisis regresi probit. Hasil uji dapat diterima apabila 90% hewan uji pada kontrol di akhir pengamatan masih hidup (EPA, 1999 dalam Kinasih, *et al.*, 2013).

Data perubahan morfologi yang berupa perubahan warna, akumulasi granula, bintik hitam dan adanya rongga pada ikan mas dianalisis menggunakan analisis deskriptif, sedangkan untuk perubahan ukuran organ di analisis menggunakan uji ANOVA *one way* dengan taraf kepercayaan 99% atau $\alpha = 0,01$, dilanjutkan dengan analisis lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Data perubahan histopatologi dianalisis menggunakan analisis non parametrik (data ordinal), yaitu *Kruskall-wallis* dengan taraf kepercayaan 99% atau $\alpha = 0,01$ (Sugiyono, 2010). Hasil data yang dianalisis digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap ikan mas sebagai organisme non-target.

3.9 Alur Penelitian

Secara keseluruhan rangkaian kegiatan penelitian uji toksisitas granula ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap saluran pencernaan (usus), hati, insang dan ginjal ikan mas yang dilaksanakan, dapat dilihat pada Gambar 3.1:



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

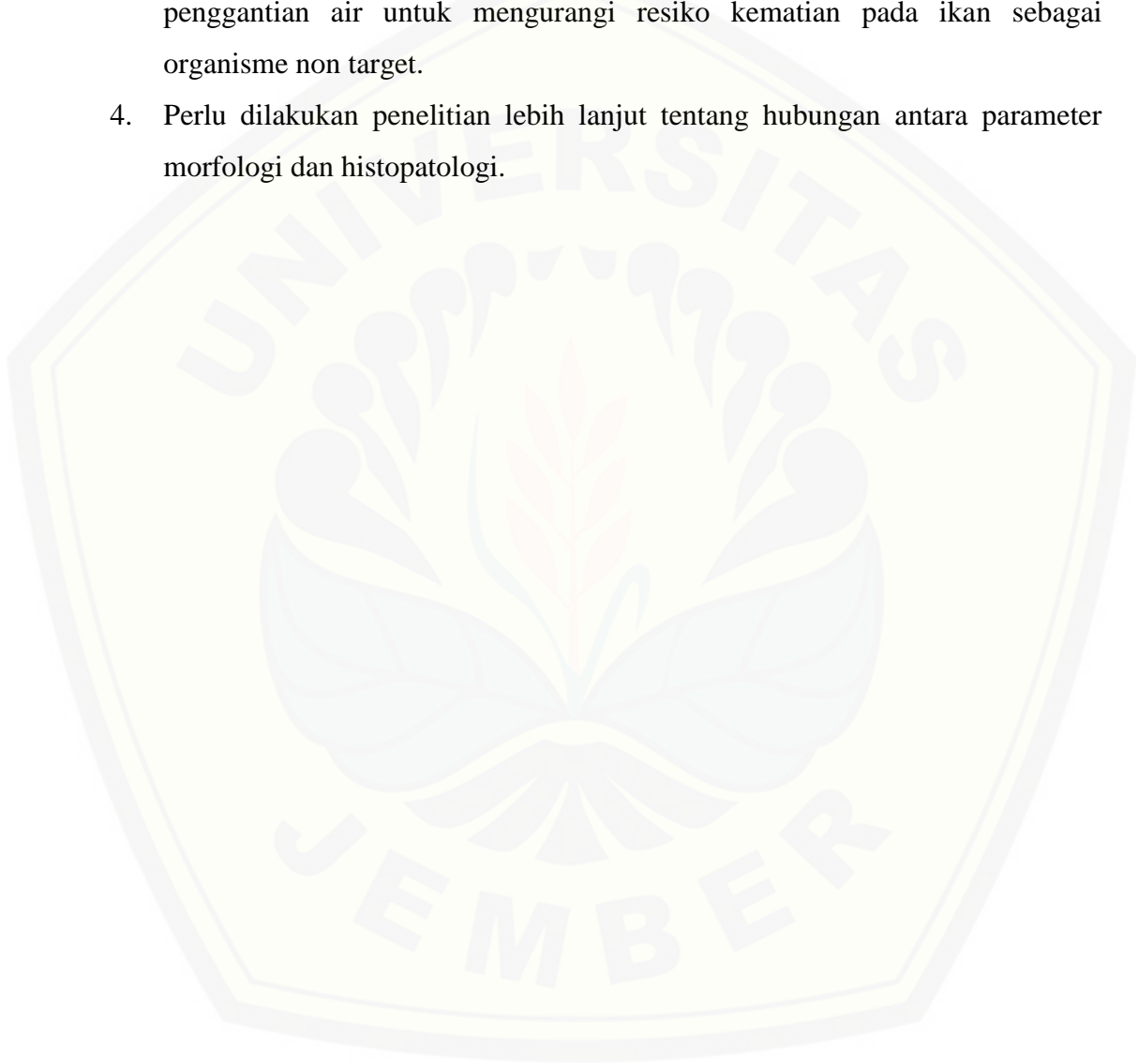
1. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya pada konsentrasi 1 g/10 L tidak menyebabkan kematian pada ikan mas sampai 48 jam (2.880 menit) perlakuan, sehingga kelulusan hidup pada ikan mas maksimal. LC_{50} baru diperoleh pada konsentrasi 1,14 g/10 L setelah 96 jam perlakuan.
2. Secara morfologi, tidak terjadi perubahan pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas setelah pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya konsentrasi 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L selama 48 jam (2.880 menit). Perubahan morfologi terjadi setelah pemberian granula selama 96 jam, yaitu perubahan warna pada usus, insang dan ginjal, bintik hitam pada usus, hati dan ginjal, serta akumulasi granula pada usus ikan mas.
3. Secara histopatologi, tidak terjadi perubahan pada usus, hati, insang dan ginjal ikan mas setelah pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya konsentrasi 0,25 g/10 L, 0,5 g/10 L, 0,75 g/10 L dan 1 g/10 L selama 48 jam (2.880 menit). Perubahan histopatologi terjadi setelah pemberian granula selama 96 jam, yaitu nekrosis ringan pada usus, hati, insang dan ginjal, hiperplasia dan fusi lamela pada insang, serta hemoragi pada ginjal ikan.

3.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diperoleh saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh konsentrasi yang tidak menyebabkan kematian serta kerusakan morfologi dan histopatologi pada ikan mas lebih dari 96 jam perlakuan.

2. Perlu dilakukan pengujian kemanan terhadap hewan non target selain ikan untuk mengetahui pengaruh bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya terhadap organisme non target.
3. Pemakaian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya sebagai pembasmi larva nyamuk *A. aegypti* setiap 3 hari (72 jam) sekali dilakukan penggantian air untuk mengurangi resiko kematian pada ikan sebagai organisme non target.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan antara parameter morfologi dan histopatologi.



DAFTAR PUSTAKA

- Adeniji I.T. 2014. Pre-Treatment of Seeds of *Annona squamosa* (Sugar Apple) A Non Timber Forest Product. *Research in Plant Sciences*, 2(3): 50-52.
- Aini, Q. 2012. *Efek Pemberian Ekstrak Daun Sirih (Piper betelL.) terhadap Perubahan Hitung Jenis Leukosit Darah Tepi Tikus Wistar Jantan yang Dipapari Candida albicans secara Intrakutan*. Jember: Universitas Jember.
- Andini, NS. 2015. *Gambaran Histopatologi Insang, Hepatopankreas dan Ginjal Ikan Butini (Glossogobius matanensis) di Danau Matano Luwu Timur Sulawesi Selatan yang Tercemar Logam Berat Nikel (Ni) dan Besi (Fe)*. Sulawesi Selatan: Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin.
- Aulung, A., Christian, dan Ciptaningsih. 2010. Daya Larvasida Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*) Terhadap Mortalitas Larva *Aedes aegypti*. *Majalah Kedokteran FK UKI*, 28(1).
- Camargo, M.M.P. dan C.B.R. Martinez. 2007. Histopathology of gills, kidney, and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 327-336.
- Chahaya, I. 2003. *Ikan sebagai Alat Monitoring Pencemaran*. Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Sumatra Utara, Medan: USU Digital Library.
- Connell, D.W., and Miller, G.J. 1995. *Chemistry and ecotoxicology of pollution*. New York: A Willey IntersciencePubl.
- Damayanti, FN. 2010. *Pengaruh Pencemaran Logam Berat terhadap Kondisi Histologi Ikan Nila (Oreochromis niloticus Linn) dalam Karamba Jaring Apung di Blok Jangari Waduk Cirata*. Semarang: Universitas Padjadjaran.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. 2013. *Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur*. Surabaya: Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur.
- Dinas Kesehatan Jember. 2016. <http://www.jemberpost.com/kesehatan/dinkes-jember-wapadai-demam-berdarah/>. Diakses pada 21 Januari 2017.
- Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Elena, AY., Nanik, HS., Jafron, WH. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Teklan (*Eupatorium riparium*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. 11(1): 11-17.

- Erlangga. 2007. *Efek Pencemaran Perairan Sungai Kampar Di Provinsi Riau Terhadap Ikan Baung (Hemibagrus nemurus)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ersa, IM. 2008. *Gambaran Histopatologi Insang, Usus Dan Otot Pada Ikan Mujair (Oreochromis mossambicus) di Daerah Ciampea Bogor*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Felix. 2008. Ketika Larva dan Nyamuk Dewasa sudah Kebal terhadap Insektisida. *FARMACIA*, 7(7).
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan: Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Geten, F., Terwinge, E., and Danguy, A. 2009. *Atlas of fish histology*. USA: Science Publishers.
- Grasso, P. 2002. *Essentials of pathology for toxicologists*. New York: Taylor & Francis Inc.
- Hoole, D., Bucke, D., Burgerss, Wellby. 2001. *Diseases of carp ad other cyprinid fishes*. USA: Blackwell Science.
- Irianto, A. 2005. *Patologi ikan Teleostei*. Yogyakarta: Gadjah Mada Press.
- Isnaeni, W. 2006. *Fisiologi Hewan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Kardinan, A. 2000. *Pestisida Nabati: Ramuan dan Aplikasi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2012. (www.depkes.go.id) diakses pada 10 Februari 2017.
- Kinasih, I., Supriyatna, A., dan Nugraha, R. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Babandotan (*Ageratum conyzoides* Linn) terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) sebagai Organisme Non-Target. *Jurnal UIN SGD Ilmu Saintek*, (2): 121-132.
- Kusumaningrum, V. 2007. *Perbedaan Toksisitas Ekstrak Daun Serai Wangi (Andropogon nardus) dengan Ekstrak Daun Sirih (Piper betel) terhadap Mortalitas Larva Nyamuk Aedes aegypti*. Jember: FKIP Universitas Jember.
- Lingga P. 2002. *Ikan Mas Kolam Air Deras*. Depok: Penebar Swadaya.
- Mahyuddin, K. 2010. *Panduan Lengkap Agribisnis Patin*. Jakarta: Penerbit Swadaya.

- Marianti. 2014. *Pengaruh Granul Ekstrak Daun Sirih (P. betel Linn.) terhadap Mortalitas Larva A. aegypti Linn.* Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.
- Mujumdar, AS. 2006. *Handbook of Industrial Drying*. Singapore: CRC Press Online National University of Singapore.
- Mulyani, M., Arifin, B., dan Nurdin, H. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* Linn.). *Jurnal Kimia Unand*, 2(1): 1-7.
- Nandan, S.B., and Nimila, P.J. 2012. Lindane toxicity: histopathological, behavioral and biochemical changes in *Entroplus maculatus*. *Marine Environmental Research*, 76: 63-70.
- Nugroho, AD. 2011. Kematian Larva *Aedes aegypti* setelah Pemberian ABATE dibandingkan dengan Pemberian Serbuk Serai. *Jurnal Kesmas*, 7(1): 91-96.
- Nurjannah, R.D.D., Prayitno, S.B., Sarjito dan Lusiastuti, A. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) terhadap Profil Darah dan Kelulusan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(4): 72-83.
- Orwa. 2009. *Annona squamosa*. *Agroforestry Database*, 4: 1-5.
- Palgunadi, BU., dan Rahayu, A. 2012. *A. aegypti* sebagai Vektor Penyakit Demam Berdarah Dengue. *J of UWKS*: 23-25.
- Plantamor. 2012. *Informasi Spesies* (<http://www.plantamor.com/index.php?plant=106>). Diakses pada 10 Februari 2017.
- Pohan, SD., Prastowo, P., dan Lubis, K. 2016. Uji Toksisitas Ekstrak Srikaya (*Annona squamosa* Linn.) pada Hewan Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Biosains*, 2(2): 75-81.
- Priosoeryanto, BP., Ersa, Tiuria, dan Handayani. 2010. Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang Berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Indonesian Journal of Veterinary Science & Medicine*, 2(1): 1-8.
- Rahayu, SD., Zulfatin, ZL., dan Nuriliani, A. 2013. Efek Histopatologis Insektisida -Cyhalothrin terhadap Insang, Hati dan Usus Halus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* L., 1758). *Biosfera*, 30(2): 52-65.

- Rizki, M., Rostiana, T., dan Damanik, B. 2015. Uji Histopatologi Organ Insang, Ginjal, Intestinum dan Hepar Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Semarang: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran.
- Roberts, RJ. 2001. *Fish Pathology*. London: W.B.Saunders, Edinburgh, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- Santoso B. 2000. *Ikan Mas: Mengungkap Teknik Pemeliharaan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sarjito, Rusydina, QS., dan Slamet. 2014. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Mortalitas dan Histologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas caviniae*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(3): 43-50.
- Sembel, DT. 2009. *Entomologi Kedokteran*. Yogyakarta: ANDI.
- Subandiyono dan Hastuti, S. 2010. *Nutrisi Ikan*. Yogyakarta: Universitas Diponegoro.
- Sudewo, B. 2007. *Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Sugiyono. 2010. *Statistika untuk Penelitian*. Bandung: Alfabeta.
- Supriyono, E., Pong-Masak, P., dan Naiborhu, PE. 2005. Studi Toksisitas Insektisida Triklorfon terhadap Ikan Nila, *Oreochromis* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 4(2): 163-170.
- Supriyono, E., Yosmaniar, Nirmala, K., dan Sukenda. 2013. Toksisitas Moluskisida Niklosamida terhadap Pertumbuhan dan Kondisi Histopatologi Juana Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 13(1): 77-84.
- Suseno D. 2000. *Pengelolaan Usaha Pembenihan ikan Mas*. Depok: Penebar Swadaya.
- Syahida, I.E.A., Sarjito, Prayitno, S. dan Mariana, A. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Profil Darah dan Kelulusan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(4): 94-107.
- Syamsuni, A. 2006. *Farmasetika Dasar dan Hitungan Farmasi*. Jakarta: EGC Kedokteran.

- Taslimah. 2014. *Uji Efikasi Ekstrak Biji Srikaya (Annona squamosa L.) sebagai Bioinsektisida dalam Upaya Integrated Vektor Management terhadap Aedes aegypti*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Tresnati, J., Djawad dan AS. Bulqish. 2007. Kerusakan Ginjal Ikan Pari Kembang (*Dasyatis kuhlii*) yang Diakibatkan oleh Logam Berat Timbal (Pb). *J. Sains dan Teknologi*, 7(3): 153–160.
- Wahyuni, D. 2010. *Larvacidal activity of extracted P. betle from the Indonesian plant against A. aegypti L.* International of Biology KBI Congress 62-75.
- Wahyuni, D. 2013 Uji Laboratorium senyawa toksik dari ekstrak daun sirih. *Spirulina*, 1(18).
- Wahyuni, D. dan Loren, I. 2015. *Toksisitas Campuran Ekstrak Daun Sirih (Piper betel L.) dan Ekstrak Biji Srikaya (Annona squamosa L.) terhadap Mortalitas Larva Nyamuk Aedes aegypti L.* Jember: Pendidikan Biologi Universitas Jember.
- Wahyuni, D. 2016. *Granulasi Senyawa Toksik untuk Memberantas Larva Nyamuk Aedes aegypti (Abstrak dan Executive Summary)*. Jember: Universitas Jember.
- Widayanti, DE., Aunurrohmah dan N. Abdulgani. 2010. *Studi Histopatologi Insang Ikan Mujair (Oreochromis mossambicus) pada Konsentrasi Sublethal Air Lumpur Sidoarjo*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Zhu, J. 2008. Mosquito Larvacidal Activity of Botanical-Based Mosquito Repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1): 161-168.

LAMPIRAN

A. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Usus Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya

Tabel 1. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ usus ikan mas setelah 24 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	3,51	-
K1	-	-	-	-	3,50	-
K2	-	-	-	-	3,54	-
K3	-	-	-	-	3,53	-
K4	-	-	-	-	3,56	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 2. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ usus ikan mas setelah 48 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	3,52	-
K1	-	-	-	-	3,52	-
K2	-	-	-	-	3,50	-
K3	-	-	-	-	3,53	-
K4	-	-	-	-	3,53	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

- K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,
 K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan
 K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.
 (-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,
 (+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,
 (++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 3. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ usus ikan mas setelah 72 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	3,50	-
K1	-	-	-	-	3,50	-
K2	-	-	-	-	3,53	-
K3	-	-	-	-	3,53	-
K4	+	+	-	-	3,55	-

Keterangan:

- K⁻ : Kelompok kontrol negatif,
 K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,
 K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,
 K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan
 K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.
 (-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,
 (+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,
 (++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

B. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Hati Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya

Tabel 4. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ hati ikan mas setelah 24 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	1,29	-
K1	-	-	-	-	1,29	-
K2	-	-	-	-	1,31	-
K3	-	-	-	-	1,30	-
K4	-	-	-	-	1,30	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 5. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ hati ikan mas setelah 48 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	1,32	-
K1	-	-	-	-	1,28	-
K2	-	-	-	-	1,28	-
K3	-	-	-	-	1,29	-
K4	-	-	-	-	1,30	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

- (+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,
 (++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 6. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ hati ikan mas setelah 72 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi	
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	1,30	-
K1	-	-	-	-	1,32	-
K2	-	-	-	-	1,32	-
K3	-	-	-	-	1,32	-
K4	-	-	+	-	1,31	+

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

C. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Insang Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya

Tabel 7. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ insang ikan mas setelah 24 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi			
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hiperplasia	Nekrosis	Fusi Lamela
K ⁻	-	-	-	-	2,59	-	-	-
K1	-	-	-	-	2,60	-	-	-
K2	-	-	-	-	2,63	-	-	-
K3	-	-	-	-	2,63	-	-	-
K4	-	-	-	-	2,63	-	-	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 8. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ insang ikan mas setelah 48 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi			
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hiperplasia	Nekrosis	Fusi Lamela
K ⁻	-	-	-	-	2,61	-	-	-
K1	-	-	-	-	2,61	-	-	-
K2	-	-	-	-	2,64	-	-	-
K3	-	-	-	-	2,63	-	-	-
K4	-	-	-	-	2,64	-	-	-

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 9. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ insang ikan mas setelah 72 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi			
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hiperplasia	Nekrosis	Fusi Lamela
K ⁻	-	-	-	-	2,64	-	-	-
K1	-	-	-	-	2,63	-	-	-
K2	-	-	-	-	2,66	-	-	-
K3	+	-	-	-	2,65	+	-	-
K4	+	-	-	-	2,66	+	+	+

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

D. Hasil Pengamatan Morfologi dan Histopatologi Organ Ginjal Ikan Mas setelah 24 Jam, 48 Jam dan 72 Jam Pemberian Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya

Tabel 10. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas setelah 24 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi		
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hemoragi	Nekrosis
K	-	-	-	-	2,00	-	-
K1	-	-	-	-	2,01	-	-
K2	-	-	-	-	2,01	-	-
K3	-	-	-	-	2,04	-	-
K4	-	-	-	-	2,06	-	-

Keterangan:

K : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 11. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas setelah 48 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi		
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hemoragi	Nekrosis
K	-	-	-	-	2,01	-	-
K1	-	-	-	-	2,01	-	-
K2	-	-	-	-	2,03	-	-
K3	-	-	-	-	2,03	-	-
K4	-	-	-	-	2,04	-	-

Keterangan:

K : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 12. Pengamatan morfologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas setelah 72 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya

Kelompok	Morfologi				Histopatologi		
	Perubahan warna	Akumulasi granula	Bintik hitam	Rongga	Ukuran organ	Hemoragi	Nekrosis
K ⁻	-	-	-	-	2,03	-	-
K1	-	-	-	-	2,02	-	-
K2	-	-	-	-	2,05	-	-
K3	-	-	-	-	2,06	-	-
K4	+	-	+	-	2,06	+	+

Keterangan:

K⁻ : Kelompok kontrol negatif,

K1 : Kelompok konsentrasi 0,25 g/10 L,

K2 : Kelompok konsentrasi 0,5 g/10 L,

K3 : Kelompok konsentrasi 0,75 g/10 L dan

K4 : Kelompok konsentrasi 1 g/10 L.

(-) : tidak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(+) : terdapat sedikit perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol,

(++) : terdapat banyak perbedaan jika dibandingkan dengan kontrol.

E. Analisis Penentuan Nilai LC50 Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Kematian Ikan Mas

Analisis Probit

	Probability	Confidence Limits					
		95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	.277	.012	.501	-.558	-1.906	-.300
	0.02	.327	.022	.558	-.486	-1.666	-.254
	0.03	.363	.031	.598	-.440	-1.514	-.224
	0.04	.393	.040	.630	-.406	-1.401	-.200
	0.05	.419	.049	.659	-.378	-1.309	-.181
	0.06	.442	.059	.685	-.354	-1.231	-.164
	0.07	.464	.069	.709	-.333	-1.162	-.149
	0.08	.484	.079	.731	-.315	-1.102	-.136
	0.09	.504	.090	.753	-.298	-1.047	-.123
	0.1	.522	.101	.774	-.282	-.996	-.111
	0.15	.606	.162	.874	-.218	-.791	-.059
	0.2	.682	.233	.975	-.166	-.634	-.011
	0.25	.755	.313	1.087	-.122	-.505	.036
	0.3	.827	.400	1.221	-.083	-.398	.087
	0.35	.900	.493	1.389	-.046	-.307	.143
	0.4	.975	.586	1.608	-.011	-.232	.206
	0.45	1.053	.677	1.896	.022	-.169	.278
	0.5	1.137	.764	2.280	.056	-.117	.358
	0.55	1.227	.846	2.790	.089	-.073	.446
	0.6	1.325	.925	3.475	.122	-.034	.541
	0.65	1.436	1.004	4.408	.157	.002	.644
	0.7	1.562	1.085	5.714	.194	.036	.757
	0.75	1.711	1.172	7.614	.233	.069	.882
	0.8	1.894	1.268	10.545	.277	.103	1.023
	0.85	2.132	1.383	15.498	.329	.141	1.190
	0.9	2.474	1.534	25.303	.393	.186	1.403
	0.91	2.564	1.572	28.503	.409	.196	1.455
	0.92	2.666	1.614	32.447	.426	.208	1.511
	0.93	2.783	1.660	37.427	.445	.220	1.573
	0.94	2.920	1.714	43.910	.465	.234	1.643
	0.95	3.084	1.776	52.702	.489	.249	1.722
	0.96	3.289	1.851	65.333	.517	.267	1.815
	0.97	3.559	1.947	85.123	.551	.289	1.930
	0.98	3.953	2.081	121.094	.597	.318	2.083
	0.99	4.664	2.308	211.328	.669	.363	2.325

a. Logarithm base = 10.

F. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Kematian dan Persentase Kelulusan Hidup Ikan Mas

1. Analisis Jumlah Kematian Ikan Mas

Uji Normalitas

		Tests of Normality ^{b,c}					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Konsentrasi	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kematian_Ikan	Kontrol	.367	5	.026	.684	5	.006
	0.25 g/10 L	.367	5	.026	.684	5	.006
	0.5 g/10 L	.367	5	.026	.684	5	.006
	0.75 g/10 L	.367	5	.026	.684	5	.006
	1 g/10 L	.473	5	.010	.552	5	.000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova

Descriptives

Kematian_Ikan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
0.25 g/10 L	5	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
0.5 g/10 L	5	.40	.548	.245	-.28	1.08	0	1
0.75 g/10 L	5	1.60	.548	.245	.92	2.28	1	2
1 g/10 L	5	1.80	.447	.200	1.24	2.36	1	2
Total	25	.76	.879	.176	.40	1.12	0	2

Test of Homogeneity of Variances

Kematian_Ikan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
15.333	4	20	.000

ANOVA

Kematian_Ikan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.360	4	3.840	24.000	.000
Within Groups	3.200	20	.160		
Total	18.560	24			

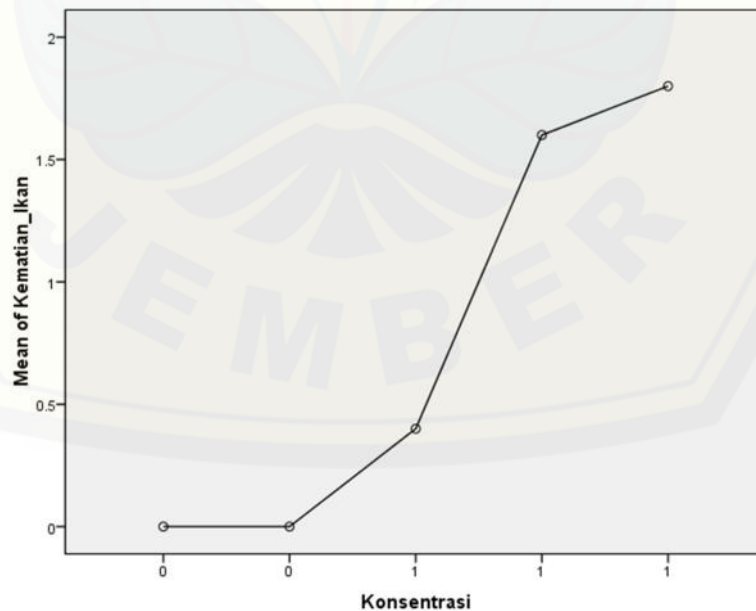
Analisis Duncan

Kematian_Ikan

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	2
Kontrol	5	.00	
0.25 g/10 L	5	.00	
0.5 g/10 L	5	.40	
0.75 g/10 L	5		1.60
1 g/10 L	5		1.80
Sig.		.149	.438

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



2. Analisis Persentase Kelulusan Hidup Ikan Mas

Uji Normalitas

Tests of Normality^{b,c}

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SR	0,5 g/10 L	.136	5	.200*	.987	5	.967
	0,75 g/10 L	.184	5	.200*	.944	5	.692
	1	.127	5	.200*	.999	5	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

b. SR is constant when Konsentrasi = Kontrol. It has been omitted.

c. SR is constant when Konsentrasi = 0,25 g/10 L. It has been omitted.

Analisis One Way Anova

Descriptives

SR

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	100.00	.000	.000	100.00	100.00	100	100
0.25 g/10 L	5	100.00	.000	.000	100.00	100.00	100	100
0.5 g/10 L	5	92.00	3.162	1.414	88.07	95.93	88	96
0.75 g/10 L	5	68.00	5.099	2.280	61.67	74.33	62	74
1 g/10 L	5	64.00	4.472	2.000	58.45	69.55	58	70
Total	25	84.80	16.289	3.258	78.08	91.52	58	100

Test of Homogeneity of Variances

SR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.300	4	20	.004

ANOVA

SR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6144.000	4	1536.000	137.143	.000
Within Groups	224.000	20	11.200		
Total	6368.000	24			

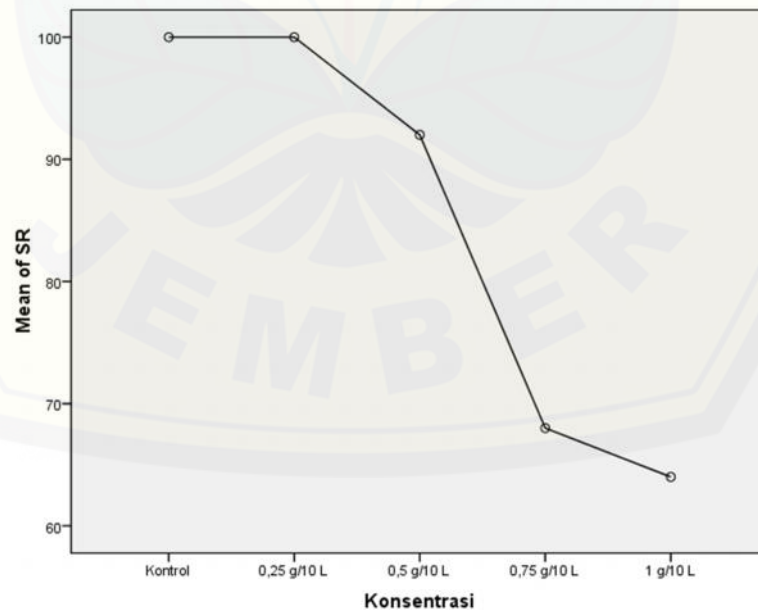
Analisis Duncan

SR

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Kontrol	5	64.00		
0.25 g/10 L	5	68.00		
0.5 g/10 L	5		92.00	
0.75 g/10 L	5			100.00
1 g/10 L	5			100.00
Sig.		.073	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



G. Analisis Parameter Lingkungan

Uji Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Konsentrasi	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Suhu_Udara	Kontrol	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	0,25 g/10 L	.241	5	.200 [*]	.821	5	.119
	0,5 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,75 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	1 g/10 L	.400	5	.009	.625	5	.001
Suhu_Air	Kontrol	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	0,25 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	0,5 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	0,75 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	1 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
DO	Kontrol	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,25 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	0,5 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,75 g/10 L	.127	5	.200 [*]	.999	5	1.000
	1 g/10 L	.404	5	.008	.768	5	.044
pH	Kontrol	.191	5	.200 [*]	.977	5	.920
	0,25 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,5 g/10 L	.184	5	.200 [*]	.944	5	.692
	0,75 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	1 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
CO2_Bebas	Kontrol	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,25 g/10 L	.184	5	.200 [*]	.944	5	.692
	0,5 g/10 L	.191	5	.200 [*]	.977	5	.920
	0,75 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967
	1 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Suhu_Udara	Kontrol	5	25.500	.1581	.0707	25.304	25.696	25.3	25.7
	0,25 g/10 L	5	25.500	.1000	.0447	25.376	25.624	25.4	25.6
	0,5 g/10 L	5	25.500	.1414	.0632	25.324	25.676	25.3	25.7
	0,75 g/10 L	5	25.500	.0707	.0316	25.412	25.588	25.4	25.6
	1 g/10 L	5	25.300	.3937	.1761	24.811	25.789	24.6	25.5
	Total	25	25.460	.2062	.0412	25.375	25.545	24.6	25.7
Suhu_Air	Kontrol	5	25.800	.1581	.0707	25.604	25.996	25.6	26.0
	0,25 g/10 L	5	26.500	.1581	.0707	26.304	26.696	26.3	26.7
	0,5 g/10 L	5	26.800	.1581	.0707	26.604	26.996	26.6	27.0
	0,75 g/10 L	5	26.900	.1581	.0707	26.704	27.096	26.7	27.1
	1 g/10 L	5	27.200	.1581	.0707	27.004	27.396	27.0	27.4
	Total	25	26.640	.5066	.1013	26.431	26.849	25.6	27.4
DO	Kontrol	5	5.500	.0707	.0316	5.412	5.588	5.4	5.6
	0,25 g/10 L	5	4.200	.1581	.0707	4.004	4.396	4.0	4.4
	0,5 g/10 L	5	3.700	.2121	.0949	3.437	3.963	3.4	4.0
	0,75 g/10 L	5	3.300	.2236	.1000	3.022	3.578	3.0	3.6
	1 g/10 L	5	3.140	.1517	.0678	2.952	3.328	3.0	3.4
	Total	25	3.968	.8807	.1761	3.604	4.332	3.0	5.6
pH	Kontrol	5	6.500	.3606	.1612	6.052	6.948	6.0	7.0
	0,25 g/10 L	5	6.200	.1414	.0632	6.024	6.376	6.0	6.4
	0,5 g/10 L	5	5.700	.2550	.1140	5.383	6.017	5.4	6.0
	0,75 g/10 L	5	5.700	.2121	.0949	5.437	5.963	5.4	6.0
	1 g/10 L	5	5.600	.1581	.0707	5.404	5.796	5.4	5.8
	Total	25	5.940	.4183	.0837	5.767	6.113	5.4	7.0
CO2_Bebas	Kontrol	5	12.100	.0707	.0316	12.012	12.188	12.0	12.2
	0,25 g/10 L	5	14.800	.2550	.1140	14.483	15.117	14.5	15.1
	0,5 g/10 L	5	16.500	.3606	.1612	16.052	16.948	16.0	17.0
	0,75 g/10 L	5	16.800	.1581	.0707	16.604	16.996	16.6	17.0
	1 g/10 L	5	17.500	.0707	.0316	17.412	17.588	17.4	17.6
	Total	25	15.540	1.9852	.3970	14.721	16.359	12.0	17.6

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Suhu_Udara	2.716	4	20	.059
Suhu_Air	.000	4	20	1.000
DO	.739	4	20	.576
pH	.908	4	20	.478
CO2_Bebas	2.419	4	20	.082

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Suhu_Udara	Between Groups	.160	4	.040	.930	.466
	Within Groups	.860	20	.043		
	Total	1.020	24			
Suhu_Air	Between Groups	5.660	4	1.415	56.600	.000
	Within Groups	.500	20	.025		
	Total	6.160	24			
DO	Between Groups	18.022	4	4.506	152.216	.000
	Within Groups	.592	20	.030		
	Total	18.614	24			
pH	Between Groups	3.060	4	.765	13.421	.000
	Within Groups	1.140	20	.057		
	Total	4.200	24			
CO2_Bebas	Between Groups	93.660	4	23.415	509.022	.000
	Within Groups	.920	20	.046		
	Total	94.580	24			

Analisis Duncan

Suhu_Udara

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
1 g/10 L	5	25.300	
0,25 g/10 L	5	25.500	
0,5 g/10 L	5	25.500	
0,75 g/10 L	5	25.500	
Kontrol	5	25.500	
Sig.			.185

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Suhu_Air

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Kontrol	5	25.800			
0,25 g/10 L	5		26.500		
0,5 g/10 L	5			26.800	
0,75 g/10 L	5			26.900	
1 g/10 L	5				27.200
Sig.		1.000	1.000	.329	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

DO

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
1 g/10 L	5	3.140			
0,75 g/10 L	5	3.300			
0,5 g/10 L	5		3.700		
0,25 g/10 L	5			4.200	
Kontrol	5				5.500
Sig.		.157	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

pH

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	2
1 g/10 L	5	5.600	
0,5 g/10 L	5	5.700	
0,75 g/10 L	5	5.700	
0,25 g/10 L	5		6.200
Kontrol	5		6.500
Sig.		.539	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

CO2_Bebas

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Kontrol	5	12.100			
0,25 g/10 L	5		14.800		
0,5 g/10 L	5			16.500	
0,75 g/10 L	5			16.800	
1 g/10 L	5				17.500
Sig.		1.000	1.000	.039	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

H. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Ukuran Organ Ikan Mas

1. Organ Usus Ikan Mas

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Usus	Kontrol	.246	5	.200 [*]	.956	5	.777
	0,25 g/10 L	.408	5	.070	.618	5	.010
	0,5 g/10 L	.254	5	.200 [*]	.914	5	.492
	0,75 g/10 L	.257	5	.200 [*]	.792	5	.069
	1 g/10 L	.136	5	.200 [*]	.987	5	.967

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova

Descriptives

Usus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	3.5320	.01483	.00663	3.5136	3.5504	3.51	3.55
0,25 g/10 L	5	3.5320	.04382	.01960	3.4776	3.5864	3.51	3.61
0,5 g/10 L	5	3.5340	.01517	.00678	3.5152	3.5528	3.51	3.55
0,75 g/10 L	5	3.5720	.03564	.01594	3.5278	3.6162	3.54	3.61
1 g/10 L	5	3.5900	.03162	.01414	3.5507	3.6293	3.55	3.63
Total	25	3.5520	.03731	.00746	3.5366	3.5674	3.51	3.63

Test of Homogeneity of Variances

Usus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.034	4	20	.128

ANOVA

Usus

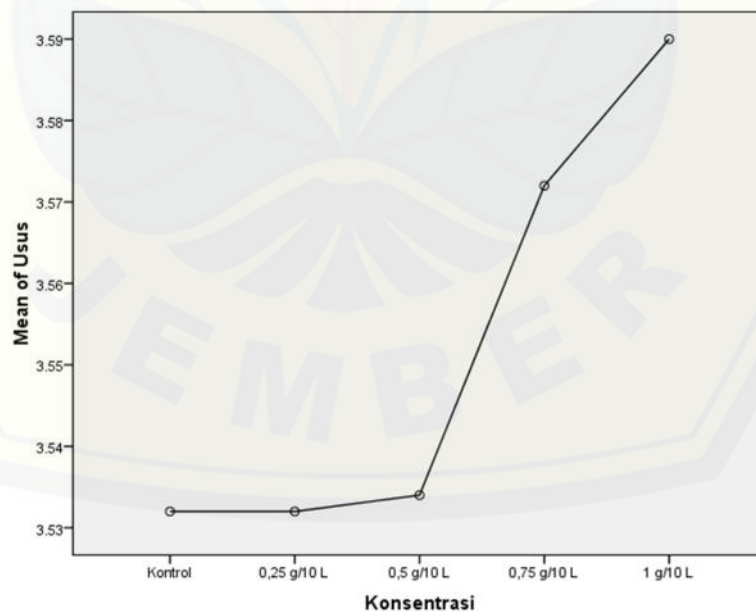
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.015	4	.004	3.998	.015
Within Groups	.019	20	.001		
Total	.033	24			

Analisis Duncan

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
Kontrol	5	3.5320	
0,25 g/10 L	5	3.5320	
0,5 g/10 L	5	3.5340	
0,75 g/10 L	5	3.5720	
1 g/10 L	5	3.5900	
Sig.			.012

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



2. Organ Hati Ikan Mas

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hati	Kontrol	.231	5	.200*	.881	5	.314
	0,25 g/10 L	.221	5	.200*	.902	5	.421
	0,5 g/10 L	.241	5	.200*	.821	5	.119
	0,75 g/10 L	.221	5	.200*	.902	5	.421
	1 g/10 L	.237	5	.200*	.961	5	.814

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova

Descriptives

Hati

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	1.3080	.00837	.00374	1.2976	1.3184	1.30	1.32
0,25 g/10 L	5	1.2980	.01304	.00583	1.2818	1.3142	1.28	1.31
0,5 g/10 L	5	1.3100	.01000	.00447	1.2976	1.3224	1.30	1.32
0,75 g/10 L	5	1.3180	.01304	.00583	1.3018	1.3342	1.30	1.33
1 g/10 L	5	1.3160	.01140	.00510	1.3018	1.3302	1.30	1.33
Total	25	1.3100	.01258	.00252	1.3048	1.3152	1.28	1.33

Test of Homogeneity of Variances

Hati

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.508	4	20	.730

ANOVA

Hati

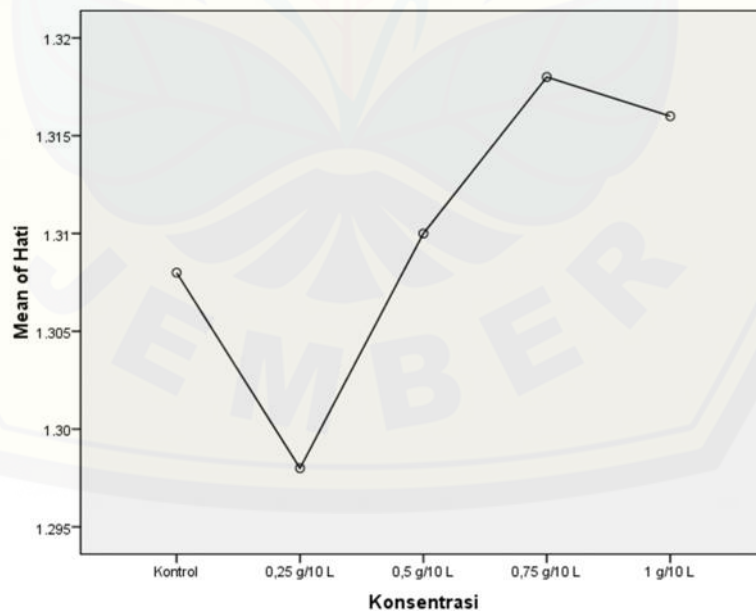
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	2.422	.082
Within Groups	.003	20	.000		
Total	.004	24			

Analisis Duncan

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
0,25 g/10 L	5	1.2980	
Kontrol	5	1.3080	
0,5 g/10 L	5	1.3100	
1 g/10 L	5	1.3160	
0,75 g/10 L	5	1.3180	
Sig.			.019

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



3. Organ Insang Ikan Mas

Uji Normalitas**Tests of Normality**

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Insang	Kontrol	.241	5	.200*	.821	5	.119
	0,25 g/10 L	.300	5	.161	.883	5	.325
	0,5 g/10 L	.348	5	.047	.779	5	.054
	0,75 g/10 L	.243	5	.200*	.856	5	.216
	1 g/10 L	.329	5	.081	.775	5	.050

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova**Descriptives**

Insang

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	2.6200	.01000	.00447	2.6076	2.6324	2.61	2.63
0,25 g/10 L	5	2.6300	.02828	.01265	2.5949	2.6651	2.59	2.67
0,5 g/10 L	5	2.6540	.03286	.01470	2.6132	2.6948	2.63	2.71
0,75 g/10 L	5	2.6580	.04764	.02131	2.5988	2.7172	2.61	2.71
1 g/10 L	5	2.6720	.02950	.01319	2.6354	2.7086	2.64	2.70
Total	25	2.6468	.03509	.00702	2.6323	2.6613	2.59	2.71

Test of Homogeneity of Variances

Insang

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.246	4	20	.100

ANOVA

Insang

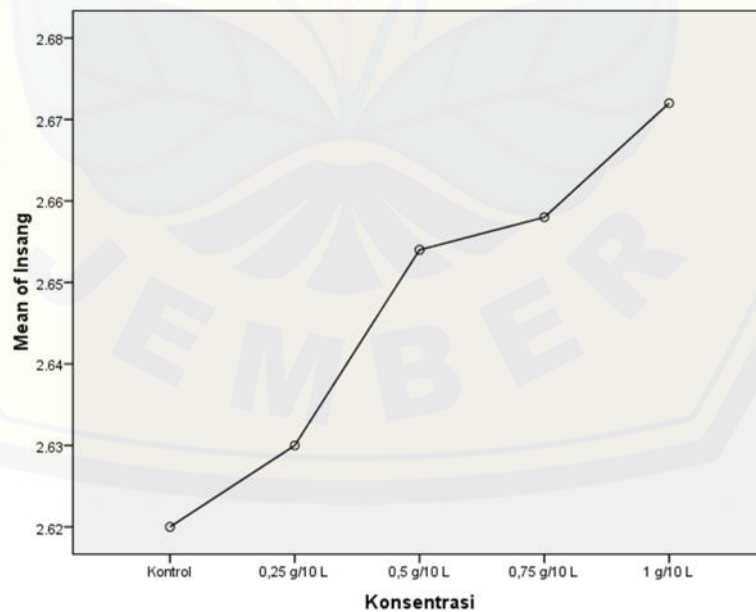
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.009	4	.002	2.213	.104
Within Groups	.020	20	.001		
Total	.030	24			

Analisis Duncan

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
Kontrol	5	2.6200	
0,25 g/10 L	5	2.6300	
0,5 g/10 L	5	2.6540	
0,75 g/10 L	5	2.6580	
1 g/10 L	5	2.6720	
Sig.		.030	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



4. Organ Ginjal Ikan Mas

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ginjal	Kontrol	.241	5	.200*	.821	5	.119
	0,25 g/10 L	.407	5	.007	.688	5	.007
	0,5 g/10 L	.263	5	.200*	.941	5	.673
	0,75 g/10 L	.246	5	.200*	.819	5	.116
	1 g/10 L	.181	5	.200*	.940	5	.665

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis One Way Anova

Descriptives

Ginjal

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	1.9900	.01000	.00447	1.9776	2.0024	1.98	2.00
0,25 g/10 L	5	2.0180	.02950	.01319	1.9814	2.0546	2.00	2.07
0,5 g/10 L	5	2.0520	.04266	.01908	1.9990	2.1050	1.99	2.10
0,75 g/10 L	5	2.0440	.05505	.02462	1.9757	2.1123	1.99	2.10
1 g/10 L	5	2.0560	.04393	.01965	2.0015	2.1105	1.99	2.10
Total	25	2.0320	.04397	.00879	2.0139	2.0501	1.98	2.10

Test of Homogeneity of Variances

Ginjal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.643	4	20	.064

ANOVA

Ginjal

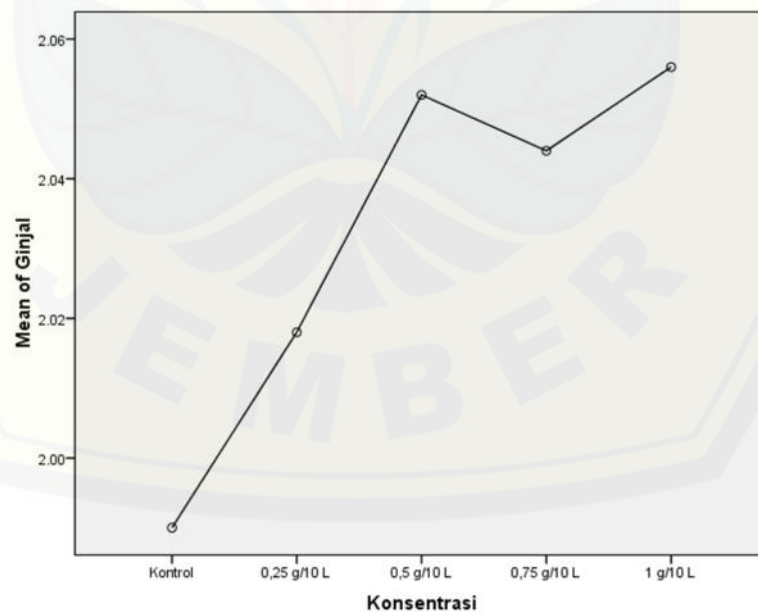
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.015	4	.004	2.484	.077
Within Groups	.031	20	.002		
Total	.046	24			

Analisis Duncan

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
Kontrol	5	1.9900	
0,25 g/10 L	5	2.0180	
0,75 g/10 L	5	2.0440	
0,5 g/10 L	5	2.0520	
1 g/10 L	5	2.0560	
Sig.		.026	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



I. Analisis Toksisitas Granula Campuran Ekstrak Daun Sirih dan Biji Srikaya terhadap Histopatologi Ikan Mas

1. Histopatologi Usus Ikan Mas

a. Nekrosis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Nekrosis	25	7.80	10.809	0	30
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Nekrosis	Kontrol	5	8.00
	0,25 g/10 L	5	8.00
	0,5 g/10 L	5	8.00
	0,75 g/10 L	5	18.00
	1 g/10 L	5	23.00
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Nekrosis
Chi-Square	23.692
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

2. Histopatologi Hati Ikan Mas

a. Nekrosis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Nekrosis	25	7.80	11.372	0	30
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Nekrosis	Kontrol	5	8.00
	0,25 g/10 L	5	8.00
	0,5 g/10 L	5	8.00
	0,75 g/10 L	5	18.00
	1 g/10 L	5	23.00
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Nekrosis
Chi-Square	23.610
Df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

3. Histopatologi Insang Ikan Mas

a. Hiperplasia

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Hiperplasia	25	17.40	10.396	0	30
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Hiperplasia	Kontrol	5	3.00
	0,25 g/10 L	5	9.20
	0,5 g/10 L	5	11.80
	0,75 g/10 L	5	19.50
	1 g/10 L	5	21.50
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Hiperplasia
Chi-Square	21.932
Df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

b. Nekrosis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Nekrosis	25	21.00	20.361	0	50
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Nekrosis	Kontrol	5	5.50
	0,25 g/10 L	5	5.50
	0,5 g/10 L	5	13.00
	0,75 g/10 L	5	19.60
	1 g/10 L	5	21.40
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Nekrosis
Chi-Square	22.587
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

c. Fusi Lamela

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Fusi_Lamela	25	15.00	10.104	0	30
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Fusi_Lamela	Kontrol	5	3.00
	0,25 g/10 L	5	12.90
	0,5 g/10 L	5	13.00
	0,75 g/10 L	5	18.40
	1 g/10 L	5	17.70
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Fusi_Lamela
Chi-Square	14.411
df	4
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

4. Histopatologi Ginjal Ikan Mas

a. Hemoragi

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Hemoragi	25	6.40	8.602	0	25
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Hemoragi	Kontrol	5	8.00
	0,25 g/10 L	5	8.00
	0,5 g/10 L	5	8.00
	0,75 g/10 L	5	19.40
	1 g/10 L	5	21.60
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Hemoragi
Chi-Square	22.476
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

b. Nekrosis

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Nekrosis	25	6.40	9.301	0	25
Perlakuan	25	3.00	1.443	1	5

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Nekrosis	Kontrol	5	8.00
	0,25 g/10 L	5	8.00
	0,5 g/10 L	5	8.00
	0,75 g/10 L	5	19.70
	1 g/10 L	5	21.30
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	Nekrosis
Chi-Square	22.374
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

J. Foto Kegiatan Penelitian



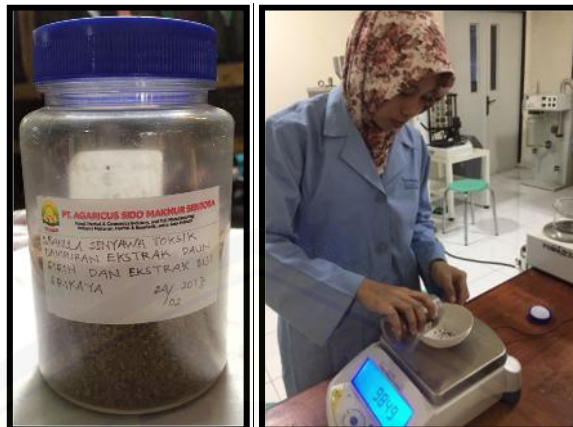
Gambar 1. Lingkungan tempat pemeliharaan ikan mas



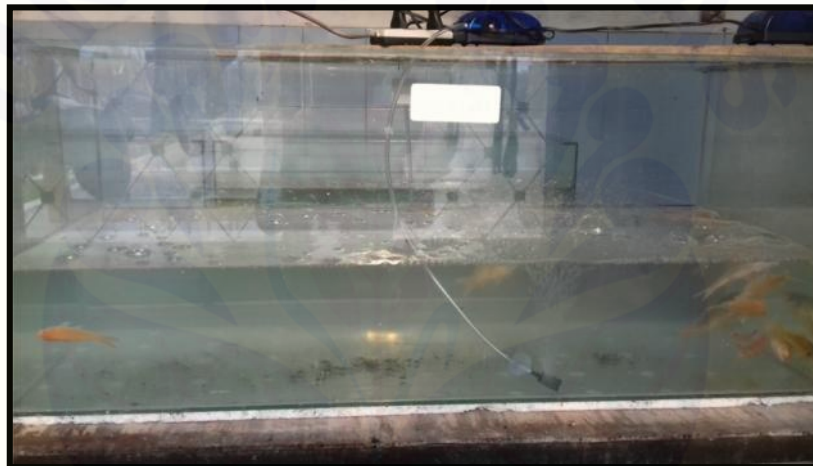
Gambar 2. Akuarium dan aerator untuk pemeliharaan ikan mas



Gambar 3. Pengukuran berat dan panjang ikan mas



Gambar 4. Bioinsektisida granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya (BioAe), serta proses penimbangan granula untuk aplikasi terhadap organisme non-target



Gambar 5. Kondisi ikan mas setelah 96 jam pemberian granula campuran ekstrak daun sirih dan biji srikaya



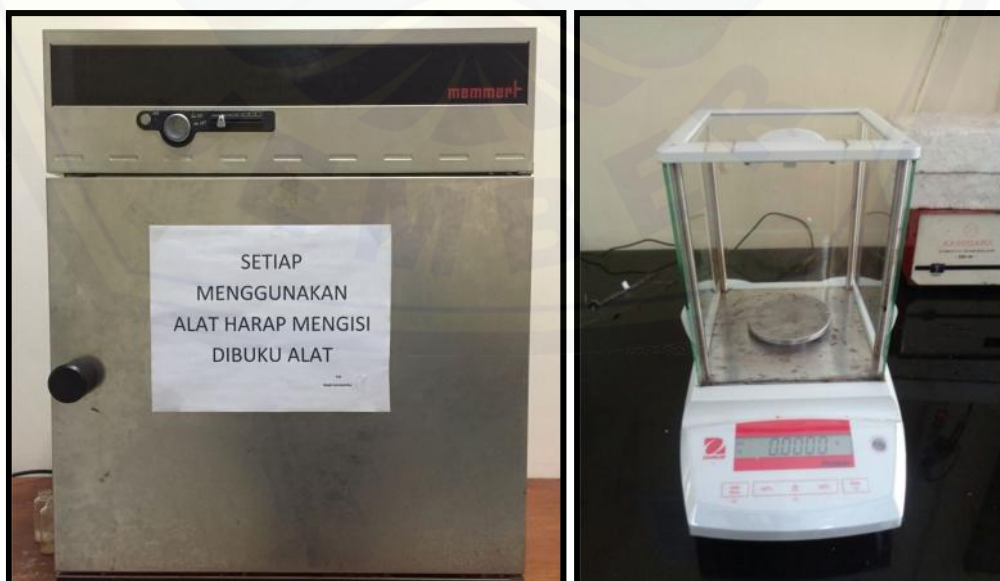
Gambar 6. Pembedahan ikan mas setelah 96 jam perlakuan untuk pengamatan morfologi



Gambar 7. Alat bedah untuk pengamatan morfologi dan histopatologi ikan mas



Gambar 8. Rotary microtome dan hot plate



Gambar 9. Oven dan timbangan analitik



Gambar 10. Mikroskop cahaya dan pengamatan histopatologi organ ikan mas

