



Histopatologi limpa pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang di paparkan limbah cair kelapa sawit [Histopathology limpa of the spleen in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed palm oil liquid waste]

Nazariah Hayatun^{1*}, Yusrizal Akmal¹, Irfannur¹, Muliari²

¹Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian Universitas Almuslim. Jln. Almuslim Matangglumpangdua, Bireuen-Aceh

²Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Malikussaleh. Reuleut, Kec. Muara Batu, Kabupaten Aceh Utara

ABSTRACT | Palm oil liquid waste is waste from palm oil processing and its potential as an environmental polluter increases with the increasing number of palm oil processing industries. This study aimed to examine the impact of sublethal concentration of palm oil effluent on the histology of tilapia spleen. This test was conducted experimentally using a completely randomized design consisting of four treatments and five replications, consisting of: control (0 mg. L⁻¹), A (1.565 mg. L⁻¹), B (2.347 mg. L⁻¹), and C (3.130 mg. L⁻¹). The data obtained were analyzed descriptively. Preparation of spleen histology preparations using histotechnical method with staining. These results indicate that the hispatological picture of the spleen has changed in the form of an increase in the number of melanomacrophage centers (MMC), necrosis, vacuolization in treatment C after exposure to connective tissue proliferation was found. It was concluded that exposure to palm oil effluent on tilapia caused changes in the hispathological picture of the spleen which was characterized by an increase in the number of MMC, necrosis, and vacuolization.

Key words | Palm Oil Liquid Waste, Tilapia Fish, Histopathology limpa

ABSTRAK | Limbah cair kelapa sawit merupakan limbah hasil pengolahan kelapa sawit dan potensinya sebagai pencemar lingkungan meningkat dengan semakin banyaknya industri pengolahan kelapa sawit. Penelitian ini bertujuan untuk menguji dampak limbah cair kelapa sawit konsentrasi subletal terhadap hispatologi limpa ikan nila. Uji ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri dari empat perlakuan dan lima ulangan, terdiri dari: kontrol (0 mg. L⁻¹), A (1,565 mg. L⁻¹), B (2,347 mg. L⁻¹), dan C (3,130 mg. L⁻¹). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Pembuatan preparat histologi limpa menggunakan metode histoteknik dengan pewarnaan. Hasil ini menunjukkan gambaran hispatologis limpa mengalami perubahan berupa peningkatan jumlah melanomakrofag centres (MMC), nekrosis, vakuolisasi pada perlakuan C setelah pemaparan ditemukan proliferasi jaringan ikat. Disimpulkan bahwa paparan limbah cair kelapa sawit pada ikan nila menyebabkan perubahan gambaran hispatologi limpa yang ditandai dengan meningkatnya jumlah MMC, nekrosis, dan vakuolisasi.

Kata kunci | Limbah Cair Kelapa Sawit, Ikan Nila, Hispatologi Limpa

Received | 14 Oktober 2022, **Accepted** | 29 Oktober 2022, **Published** | 30 November 2022.

***Koresponden** | Nazariah Hayatun, Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian Universitas Almuslim. Jln. Almuslim Matangglumpangdua, Bireuen-Aceh. **Email:** nazariah.hayatun@gmail.com

Kutipan | Hayatun, N., Akmal, Y., Irfannur, I., Muliari, M. (2022). Histopatologi limpa pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang di paparkan limbah cair kelapa sawit. *Jurnal Ilmiah Program Studi Perairan*, 4(2), 94-99.

p-ISSN (Media Cetak) | 2657-0254

e-ISSN (Media Online) | 2797-3530



© 2022 Oleh authors. [Arwana: Jurnal Ilmiah Program Studi Perairan](#). Artikel ini bersifat open access yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](#).

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang populer dengan sebutan “tilapia” merupakan salah satu

jenis ikan yang dibudidayakan di dunia. Ikan nila cocok dipelihara di dataran rendah sampai dataran tinggi 500 m dari permukaan laut. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah

satu jenis ikan yang bernilai ekonomis tinggi. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan ikan terdiri atas faktor internal dan faktor eksternal. Salah satu faktor internal yang sangat penting bagi pertumbuhan ikan adalah genetik dari ikan tersebut, sedangkan faktor dari eksternal adalah pakan dan lingkungan. Ikan sangat sensitif terhadap perubahan di lingkungan perairan dan memainkan peran penting dalam menilai potensi risiko yang terkait dengan pencemaran di lingkungan hidupnya. Selain itu ikan nila memiliki sebaran yang luas serta pada dasarnya mempunyai kemampuan menghindarkan diri dari pengaruh bahan pencemar yang mencemari lingkungan perairan. Saat ini yang mencemari lingkungan adalah limbah cair kelapa sawit.

Limbah cair kelapa sawit merupakan salah satu polutan yang berpotensi menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan. Limbah industri ini diketahui dapat menyebabkan terjadinya pencemaran, khususnya pada badan perairan (Chan *et al.*, 2013). Limbah kelapa sawit adalah suatu buangan yang dihasilkan dari proses pengolahan kelapa sawit yang berbentuk cair, padat, dan gas yang berpotensi menyebabkan pencemaran lingkungan sekitar. Limbah cair industri minyak kelapa sawit mengandung bahan organik yang sangat tinggi yaitu Biological Oxygen Demand (BOD) 25.500 mg/L, Chemical Oxygen Demand (COD) 48.000 mg/L, Total Suspended Solid (TSS) 31.170 mL/L, N 41 mL/L, minyak dan lemak 3.075 mL/L dan pH 4.0 (Wong *et al.*, 2009). bahwa limbah cair kelapa sawit mempengaruhi hormon reproduksi ikan nila jantan. Limbah ini menjadi berbahaya bagi organism perairan apabila dibuang langsung keperairan tanpa proses pengolahan terlebih dahulu.

Kadar Hg tertinggi terdapat di dalam limpa dibandingkan organ lainnya, sebagaimana yang pernah diteliti oleh Paundanan *et al.*, (2015) pada ikan selar tetengkek (*Megalaspis cordyla* L) yang terdapat di teluk Palu Sulawesi Tengah. Penelitian yang dilakukan oleh Solakhayah (2015) menunjukkan bahwa paparan merkuri klorida (HgCl₂) pada limpa ikan mas (*Cyprinus carpio*) memberikan pengaruh terhadap jumlah dan ukuran MMC. Limpa merupakan organ hematopoiesis, sebagai tempat penyaringan darah, dan penghancuran sel, serta sebagai tempat penyimpanan eritrosit. Pada ikan limpa juga memiliki fungsi imunologi layaknya

limfonodus pada mamalia. Limpa terdiri atas pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah merupakan sistem yang luas dan merupakan interkoneksi korda limpa dan kapiler sinusoid, sedangkan pulpa putih, terdiri atas sel-sel limfoid biasanya mengelilingi arteri (Ostrander, 2000; Mumford *et al.*, 2007; Genten *et al.*, 2009). Gambaran histopatologis limpa ikan nila yang terpapar limbah cair kelapa sawit sejauh ini belum ada data yang kongkrit. Berdasarkan penjelasan di atas, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh paparan limbah cair kelapa terhadap gambaran histopatologis limpa ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

BAHAN DAN METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian direncanakan dilaksanakan pada Bulan Agustus-November tahun 2021. Tahap pemaparan Limbah Cair Kelapa Sawit terhadap ikan uji dilaksanakan di Laboratorium Lab Basah Aquakultur dan pengambilan limpa dilakukan di Lab MIPA Almuslim, Universitas Almuslim sedangkan preparat histologi limpa ikan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala.

Rancangan Penelitian dan Parameter Pengukuran

Penelitian dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari empat perlakuan dan lima ulangan. Konsentrasi sub kronik LCKS untuk tiap perlakuan didasari kepada nilai LC₅₀₋₉₆ jam limbah cair kelapa sawit terhadap ikan Nila yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 15,65 mg. L⁻¹.

Perlakuan K (0% LCKS),

Perlakuan A (10% dari nilai LC₅₀₋₉₆ jam: 1,565 mg. L⁻¹),

Perlakuan B (15% dari nilai LC₅₀₋₉₆ jam: 2,347 mg. L⁻¹),

Perlakuan C (20% dari nilai LC₅₀₋₉₆ jam: 3,130 mg. L⁻¹).

Wadah pemaparan ikan uji berupa akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 30 cm dengan volume air sebanyak 43 liter yang dilengkapi dengan aerasi. Jumlah ikan uji sebanyak sepuluh ekor per wadah uji. Selama masa pemaparan, ikan uji diberi pakan komersial secara atsiasi sebanyak dua kali sehari. Dan pengambilan limpa diambil setiap perlakuan. Pembuatan

preparat histologi limpa menggunakan metode histoteknik dengan pewarnaan

Persiapan Ikan Uji dan Limbah Cair Kelapa Sawit

Sebanyak 300 ekor ikan nila berjenis kelamin jantan dan betina dengan kisaran bobot total masing masing 9-10 gram dan panjang total 10-13 cm diperoleh dari Kolam Puspa Gading Umar Cot Gapu Kabupaten Bireuen. Ikan diangkut ke laboratorium dan kemudian dipelihara dalam wadah aklimatisasi selama 1 minggu. Setelah masa aklimatisasi selesai, ikan sehat dipilih untuk digunakan pada percobaan. Selama masa aklimatisasi, ikan diberi pakan buatan sebanyak dua kali sehari secara ad libitum. Kotoran ikan dan limbah pakan disipon 2 hari sekali untuk menjaga kondisi kualitas air media. Bahan polutan/toksikan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah cair kelapa sawit yang berasal dari Pabrik Kelapa Sawit PT. Syaikhath Sejahtera Kecamatan Grugok Kabupaten Bireuen. Larutan stok limbah cair kelapa sawit dipersiapkan 30 liter dan berkonsentrasi tinggi (100 ml/L^{-1}) yang siap untuk diencerkan kedalam konsentrasi yang diperlukan. Masa pemaparan limbah cair kelapa sawit berlangsung selama 45 hari.

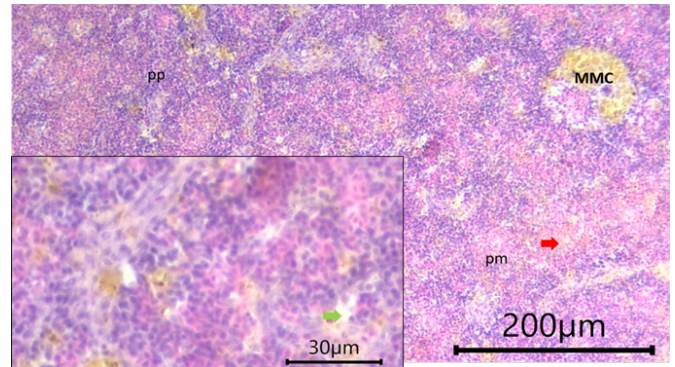
Analisis Statistik

Gambaran histopatologis limpa dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan limpa kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

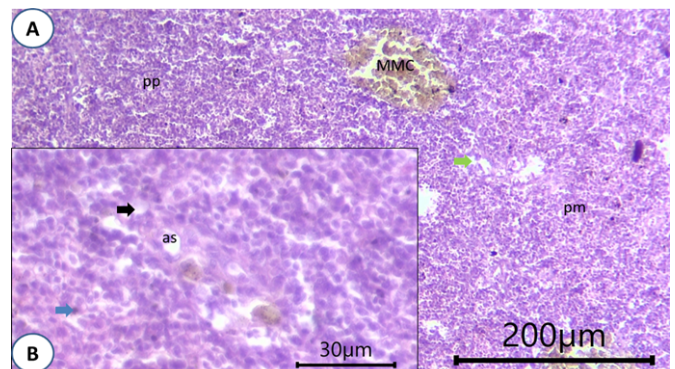
HASIL

Pada penelitian ini gambaran histopatologis limpa ikan nila pada perlakuan control memperlihatkan gambaran histologis limpa ikan yang normal, terdapat pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa putih terdiri atas sel-sel limfoid, terdapat arteri sentralis dan bergabung dengan pulpa merah. Pulpa merah terdiri atas jaringan sel retikuler dan sinusoid yang berisi sel darah merah.

Hasil histopatologis limpa ikan nila pada perlakuan kontrol memperlihatkan gambaran histologis limpa ikan yang normal. Hal ini terlihat dari struktur jaringan hati yang masih lengkap dan belum mengalami perubahan (Gambar 1).

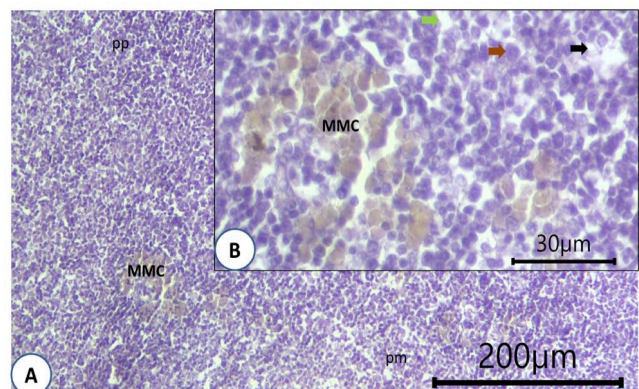


Gambar 1. Histopologi limpa ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada perlakuan kontrol (0 mg/L) limbah cair kelapa sawit. Pulpa putih (PP), Pulpa merah (PM), *Melanomacrophage centres* (MMC), Arteri sentralis (AS), vakuolisasi (panah hitam), Degenerasi hidropik (panah hijau). HE 100x (A), 400x (B).



Gambar 2. Histopologi limpa ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada perlakuan A (1,565 mg/L) limbah cair kelapa sawit. Pulpa putih (PP), Pulpa merah (PM), *Melanomacrophage centres* (MMC), Arteri sentralis (AS), vakuolisasi (panah hitam), Degenerasi hidropik (panah hijau). HE 100x (A), 400x (B).

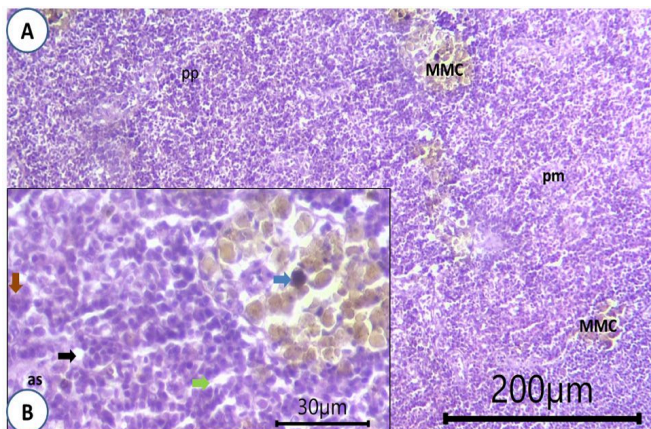
Berdasarkan hasil pengamatan gambaran histopatologis limpa ikan nila pada perlakuan A setelah pemaparan dengan limbah mulai terlihat perubahan berupa MMC, nekrosis dan degenerasi hidropik. (Gambar 2).



Gambar 3. Histopologi limpa ikan nila pada perlakuan B (2,347 mg/L) limbah cair kelapa sawit. Pulpa putih (PP), Pulpa merah (PM),

Melanomagrophage centres (MMC), Arteri sentralis (AS), vakuolisasi (panah hitam), Degenerasi hidropik (panah hijau), Hiperplasia (panah coklat). HE 100x (A), 400x (B).

Semakin bertambah dengan meningkatnya konsentrasi limbah cair kelapa sawit pada media pemeliharaan. Dari pengamatan gambar ini analisis histologi pada preparat perlakuan B menunjukkan bahwa *Melanomagrophage centres*, vakuolisasi, degenerasi hidropik dan hiperlasia pada jaringan limpa semakin membesar. Di dalam limpa, limbah yang mengandung zat racun sangat tinggi yaitu Biological Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), Total Suspended Solid (TSS), minyak dan lemak dapat mengalami fagositosis oleh MMC, vakuolisasi, degenerasi hidropik dan hiperlasia karena yang diduga akibat toksisitas limbah pada ikan (Gambar 3).



Gambar 4. Histopologi limpa ikan nila pada perlakuan C (3,130 mg/L) limbah cair kelapa sawit. Pulpa putih (PP), Pulpa merah (PM), Melanomagrophage centres (MMC), Arteri sentralis (AS), nekrosis (panah biru), vakuolisasi (panah hitam), Degenerasi hidropik (panah hijau), Hiperplasia (panah coklat). HE 100x (A), 400x (B).

Kerusakan jaringan limpa pada analisis hispatologi preparat perlakuan C menunjukkan bahwa terjadi adanya jumlah kematian sel limpa (nekrosis) yang semakin meningkat nya limbah cair kelapa sawit yang dipapar. Perubahan ini dapat terjadi kerusakan irreversible karena sel tidak mampu lagi beradaptasi atau memperbaiki diri dan tidak dapat melangsungkan metabolisme, perubahan-perubahan pada jaringan nekrotik menyebabkan hilangnya fungsi daerah yang mati (Gambar 4).

PEMBAHASAN

Limbah cair kelapa sawit memiliki dampak yang dapat mengganggu kualitas perairan. Muliari dan Zulfahmi (2016) menyebutkan bahwa paparan limbah cair kelapa sawit telah menimbulkan efek negatif terhadap komunitas fitoplankton. Selain dari pada itu, limbah cair kelapa sawit juga memiliki tingkat toksisitas yang lebih tinggi terhadap ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dibandingkan dengan paparan limbah minyak mentah dan nitrit (Zulfahmi et al., 2017). Pada penelitian ini gambaran histopatologis limpa ikan nila (*Oreochromis niloticus*) terdapat pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa putih terdiri atas sel-sel limfoid, terdapat arteri sentralis dan bergabung dengan pulpa merah. Pulpa merah terdiri atas jaringan sel retikuler dan sinusoid yang berisi sel darah merah. Pada parenkim limpa dapat ditemukan MMC (Rebok et al., 2011). Semakin tinggi konsentrasi limbah cair kelapa sawit yang diberikan maka akan terjadi peningkatan pada jaringan limpa ikan nila.

Dari hasil analisis pengamatan hispatologi limpa menunjukkan adanya peningkatan pada perlakuan B dan C adanya perubahan berupa MMC, vakuolisasi, hiperlasia dan nekrosis. Terjadi peningkatan MMC karena adanya limbah yang masuk kedalam tubuh ikan melalui insang dan beredar ke seluruh tubuh kemudian masuk ke limpa. Seperti yang dinyatakan oleh Pratiwi dan Manan (2015) darah dan substansi asing yang melewati pembuluh kapiler masuk ke limpa melalui arteri. Substansi asing tersebut digumpalkan atau difagosit oleh MMC yang berada disekitar selaput arteri. Melanomagrofag centers akan meningkat jumlah dan ukurannya apabila ikan berada pada dalam kondisi stress. Peningkatan MMC juga dapat terjagi karena keterlibatan dalam proses detoksifikasi, imunitas bawaan dan adaptif (Haraez dan Zapata. 1991; Aguis dan Robert, 2003). Menurut Manrique et al., (2014) MMC berfungsi untuk menghancurkan dan detoksifikasi endogen ataupun eksogen seperti zat racun dan aktifitas metabolik sel.

Dan pada pengamatan peningkatan degenerasi hidropik terjadi disebabkan membesarnya sel-sel pada jaringan limpa. Hal ini disebabkan meningkatnya kadar limbah yang dipapar. Degenerasi hidropik yang terjadi menyebabkan inti sel menjadi tertekan. Tekanan yang

diberikan akan menyebabkan berdampak pada kematian sel. Zulfahmi et al. (2015) juga menyatakan bahwa semakin tinggi polutan berakibat pada semakin meningkatnya proses vakuolisasi. Pada pengamatan hasil analisis menunjukkan adanya perubahan berupa vakuolisasi. Vakuolisasi dapat terjadi karena adanya toksin, malnutrisi protein, dan anoksia. Vakuolisasi terjadi pada perlakuan Kontrol, A, B, dan perlakuan C. Vakuolisasi terjadi karena adanya nekrosis suatu sel atau sekelompok sel sehingga menimbulkan ruang-ruang kosong (Sukarni *et al.*, 2012); (Mulyono et al., 2013). Perubahan nekrosis dan vakuolisasi juga pernah dilaporkan oleh David dan Kartheek (2015) pada limpa ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dipaparkan asam sianida.

Efek negatif lain dari limbah cair kelapa sawit juga berpotensi mengganggu kinerja hormon reproduksi terjadinya kerusakan gonad, kadar lipid serta hati selain itu dapat terjadi gangguan reproduksi jantan (Nisak *et al.*, 2020; Zulfahmi *et al.*, 2018; Muliari *et al.*, 2020). Menurut Muliari et al. (2020) limbah kepala sawit dapat mempengaruhi perkembangan larva ikan nila. Kandungan limbah cair kelapa sawit dapat mengganggu metabolisme sel lambung, usus serta hati (Akmal *et al.*, 2021). Muliari *et al.*, 2019b menambahkan bahwa limbah cair kelapa sawit mempengaruhi hormon reproduksi ikan nila. Zat toksik yang ada di perairan dapat menyebabkan pembendungan aliran darah sehingga terjadi pembengkakan sel atau edema pada lamela sekunder (Maftuch *et al.*, 2015). Hiperplasia merupakan suatu respon fisiologis untuk melindungi jaringan dari zat toksik dengan cara menstimulasi pertumbuhan sel epitel insang dengan sangat cepat (Sudaryatma *et al.*, 2013). Pertumbuhan sel yang sangat cepat dan banyak menyebabkan fusi lamela sekunder. Kejadian hiperplasia selalu disertai dengan fusi lamela. Fusi lamela yang terjadi akibat hiperplasia sel lamela secara terus menerus mengisi ruang antar lamela sekunder dengan sel baru sehingga menyebabkan perlekatan antar lamela sekunder (Sipahutar et al., 2013).

Dan semakin meningkatnya konsentrasi dan lama paparan terhadap ikan nila menyebabkan sel-sel mengalami penurunan fungsi hingga mengakibatkan nekrosis. Limposit pada limpa yang mengalami nekrosis terjadi pada perlakuan C karena tidak mampu beradaptasi dengan paparan limbah. Nekrosis adalah

kematian patologis sebagian jaringan atau organ yang dihasilkan dari kerusakan irreversible karena sel tidak mampu lagi beradaptasi atau memperbaiki diri dan tidak dapat melangsungkan metabolisme, perubahan-perubahan pada jaringan nekrotik menyebabkan hilangnya fungsi daerah yang mati (Azmiyah et al., 2013).

KESIMPULAN

Hasil ini menunjukkan bahwa gambaran histopatologis limpa mengalami perubahan berupa peningkatan jumlah melanomakrofag centres (MMC), nekrosis, hiperlasia dan vakuolisasi pada perlakuan C setelah pemaparan ditemukan proliferasi jaringan ikat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agius, C., and R. J. Roberts. "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." *Journal of fish diseases* 26.9 (2003): 499-509.
- Akmal, Y., Devi, C. M. S., Muliari, M., Humairani, R., & Zulfahmi, I. (2021). Morfometrik sistem pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dipapar limbah cair kelapa sawit. *Jurnal galung tropika*, 10(1), 68-81.
- Azmiyah, A., R. Darsono, Arimbi D., T.V. Widiyatno, H. Plumeriastuti, dan D. Legowo. (2013). *Buku Ajar Patologi Umum Veteriner*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Chan YJ, Mei-Fong C, Chung-Lim L. 2013. Optimization of palm oil mill effluent.
- David, M. and R.M Kartheek. (2015). *Histopathological alterations in spleen of freshwater fish Cyprinus carpio exposed to sublethal concentration of sodium cyanide*. *J. Open veterinary*. 5(1):1-5.
- Genten, E., E. Terwinghe, and A. Danguy. (2009). *Atlas of Fish Histology*. CRC Press, Florida.
- Chan YJ, Mei-Fong C, Chung-Lim L. 2013. Optimization of palm oil mill effluent.
- Haraez, M.P. dan A.G. Zapata. (1991). *Structural characterization of the melano-macrophage centres (MMC) of goldfish (Carassius auratus)*. *J. European of Morphology*. 29(2):89-102.
- Maftuch, M, V.D Putri, M.H Lulloh dan F.K.H Wibisono. 2015. Studi Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) yang Dibudidayakan di Tambak Tercemar Limbah Kadmium (Cd) dan Timbal (Pb) Di Kalanganyar, Sidoarjo, Jawa Timur Terhadap Histologi Hati, Ginjal dan Insang. *Journal Of Environmental Engineering and Sustainable Technology*. 2(2): 114-122.
- Manrique W.G., G.S. Claudiano, T.R. Perillo, M.P. Castro, M.A.P. Figueiredo, M.A.A. Belo, J.R.E.

- Moraes, and F.R. Moraes. (2014). *Response of splenic melanomacrophage centers of Oreochromis niloticus (Linnaeus 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. J. Applied Ichthyology*. 30(5):1001-1006.
- Muliari, M., & Zulfahmi, I. 2016. Impact of palm oil mill effluent towards phytoplankton community in Krueng Mane River, North Aceh. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 6(2), 137-146.
- Muliari, M., Akmal, Y., Zulfahmi, I., Karja, N. W., Nisa, C., Mahyana, M., & Humairani, R. (2020). Effect of exposure to palm oil mill effluent on reproductive impairment of male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). In *E3S Web of Conferences* (Vol. 151, p. 01022). EDP Sciences.
- Muliari, M., et al. "Effects of palm oil mill effluent on reproductive hormone of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758)." *Adv. Anim. Vet. Sci* 7. 11 2019: 1035-1041.
- Muliari, M., dan Zulfahmi, I. (2016). Impact of palm oil mill effluent towards phytoplankton community in Krueng Mane River, North Aceh. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 6(2), 137-146.
- Muliari, M., Zulfahmi, I., Akmal, Y., Karja, N. W. K., Nisa, C., & Sumon, K. A. (2019). Effects of palm oil mill effluent on reproductive hormone of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). *Adv. Anim. Vet. Sci*, 7(11), 1035-1041.
- Muliari, M., Zulfahmi, I., Akmal, Y., Karja, N. W. K., Nisa, C., Sumon, K. A., & Rahman, M. M. (2020). Toxicity of palm oil mill effluent on the early life stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(24), 30592-30599.
- Mulyono, A., D.H. Farida, N.S. Handajani. 2013. Histopatologi hepar tikus rumah (*Rattus tanezum*) infeksi patogenik *Leptospira* spp. *J. Vektora*. 5(1):7-11.
- Mumford, S., J. Heidel, C. Smith, J. Morrison, B. MaccConnell, and V. Blazer. (2007). *Fish Histology and Histopathology. USFWS-NCTC, Virginia. Ostrander, G.K. 2000. The Laboratory Fish*. Academic Press, California.
- Nisak, K., Akmal, Y., Muliari, M., & Zulfahmi, I. (2020). Kandungan lipid dan hormon reproduksi ikan nila (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) yang dipapar limbah cair kelapa sawit. *Arwana: Jurnal Ilmiah Program Studi Perairan*, 2(2), 90-96.
- Ostrander, G.K. 2000. *The Laboratory Fish*. Academic Press, California.
- Paundan, M., E. Riani, dan S. Anwar. (2015). *Kontaminasi logam berat merkuri (Hg) dan timbal (Pb) pada air, sedimen dan ikan selar tetengek (Megalaspis Cordyla L) di Teluk Palu, Sulawesi Tengah. J. Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 5(2):161-168.
- Pratiwi, H.C. dan A. Manan. (2015). Teknik dasar histologi pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *J. Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 7(2):153-158.
- Rebok K., M. Jordanovadan I. Tavciovska-V. (2011). *Spleen histology in the female ohrid trout, Salmo letnica (kar.) (teleostei, salmonidae) during the reproductive cycle. J. Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 63(4):10231030. Siregar, T.H., N.
- Sipahutar, H.F., Aritonang, E.Y. dan Siregar. A., 2013. Gambaran Pengetahuan Gizi Ibu Hamil Trimester Pertama Dan Pola Makan Dalam Pemenuhan Gizi Di Wilayah Kerja Puskesmas Parsoburan Kecamatan Habinsaran Kabupaten Toba Samosir Tahun 2013, pp.1-7.
- Solakhayah, T.N. (2015). *Pengaruh Merkuri Klorida (HgCl2) pada Melano-makrofag Limpa Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sudaryatma, P.E., N.N. Eriawati., I.F. Panjaitan, dan L.N. Sunarsih. 2013. Histopatologi Insang Ikan Lele (*Clarias bathracus*) yang Terinfeksi *Dactylogyrus* sp. *Jurnal Sains Veteriner*. 1(2): 78-83.
- Sukarni, Maftuch, dan H. Nursyam. 2012. Kajian penggunaan ciprofloxacin terhadap histologi insang dan hati ikan botia (*Botiamacracanthus, bleeker*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J. Exp. Life Sci*. 2(1):6-12.
- Wong FPS, Nandong J, Samyudia Y. (2009). Optimised treatment of palm oil mill effluent. *International Journal of Environment and Waste Management*, 3(3/4):265-277.
- Zulfahmi, I., Muliari, Akmal, Y., Batubara AS. (2018). Reproductive performance and gonad histopathology of female Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758). Exposed to palm oil mill effluent. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 44: 327-332.
- Zulfahmi, I., Affandi, R., dan Batu, D. T. L. (2015). Perubahan struktur histologis insang dan hati ikan nila (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) yang terpapar merkuri. *JESBIO: Jurnal Edukasi dan Sains Biologi*, 4(1).
- Zulfahmi, I., Muliari, M., Akmal, Y., dan Batubara, A. S. (2018). Reproductive performance and gonad histopathology of female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) exposed to palm oil mill effluent. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(4), 327-332.