

**EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN API-API (*Avicennia marina*) SEBAGAI ANTI
Aeromonas salmonicida PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*)
BERDASARKAN ANALISIS HISTOPATOLOGI**

TESIS



**Oleh :
MUHAMAD ZAKY ZAMANI
NIM. 176080100011004**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN API-API (*Avicennia marina*) SEBAGAI ANTI
Aeromonas salmonicida PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*)
BERDASARKAN ANALISIS HISTOPATOLOGI**

TESIS

Oleh :
MUHAMAD ZAKY ZAMANI
NIM. 176080100011004

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN**

**PROGAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

TESIS

EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN API-API (*Avicennia marina*) SEBAGAI ANTI
Aeromonas salmonicida PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) BERDASARKAN
ANALISIS HISTOPATOLOGI

Oleh :
MUHAMAD ZAKY ZAMANI
NIM. 176080100011004

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 19 Desember 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Ketua

Anggota



Prof. Dr. Ir. Arief Prailitno, MS
NIP. 19550213 198403 1 001

Tanggal : 23 DEC 2019



Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal : 23 DEC 2019

Mengetahui

Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Ketua
Program Magister



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal : 23 DEC 2019



Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal : 23 DEC 2019

JUDUL TESIS :

EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN API-API (*Avicennia marina*) SEBAGAI ANTI *Aeromonas salmonicida* PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) BERDASARKAN ANALISIS HISTOPATOLOGI

“Effectiveness of Api-api Leaves (*Avicennia marina*) Extract as Anti *Aeromonas salmonicida* in Koi (*Cyprinus carpio*) Fish Based on Histopatology Analysis”

Nama Mahasiswa : Muhamad Zaky Zamani
NIM : 176080100011004
Program Studi : Magister Budidaya Perairan
Minat : Penyakit dan Kesehatan Ikan

KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS
Anggota : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc

KOMISI PENGUJI :

Dosen Penguji 1 : Dr. Asus Maizar S, H., S.Pi, MP
Dosen Penguji 2 : Dr. Yunita Maimunah., S.Pi, M.Sc

Tanggal Ujian Kelayakan : 7 Mei 2019

Tanggal Seminar Proposal : 26 Juni 2019

Tanggal Seminar Hasil : 9 Desember 2019

Tanggal Ujian Tesis : 19 Desember 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa didalam naskah tesis yang saya tulis ini merupakan hasil penelitian atau karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya, tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali kutipan yang tertulis dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata pada kemudian hari terbukti naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai ketentuan yang berlaku.

Malang, 19 Desember 2019
Mahasiswa,

METERAI
TEMPEL

BCB9BAHF041776656

6000
ENAM RIBU RUPIAH

Muhamad Zaky Zamani
NIM. 176080100011004

RIWAYAT HIDUP



MUHAMAD ZAKY ZAMANI, lahir pada tanggal 27 April 1995 dikota Padang, Sumatera Barat. Putra dari bapak Ir. Chamim dan Ibu Fahriyatul Miskiyah Penulis merupakan anak ke-empat dari empat bersaudara. Penulis menempuh pendidikan taman kanak-kanak di TK ADZKIA pada tahun 2000-2001. Pendidikan sekolah dasar ditempuh di SD ADZKIA Padang pada tahun 2001-2007. Pendidikan sekolah menengah pertama ditempuh di SMP YIMI Gresik pada tahun 2007-2010. Pendidikan sekolah menengah atas ditempuh di SMAN 1 Kebomas Gresik pada tahun 2010-2013. Pendidikan Strata 1 (S1/Sarjana) ditempuh di Program studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2013-2017. Penulis melanjutkan studi S2 pada program studi Budidaya Perairan, Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang dan termasuk dalam angkatan 2017 semester genap.

Malang, 19 Desember 2019

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karunia, mengiringi dan memberikan petunjuk kepada penulis sehingga naskah tesis ini dapat terselesaikan dengan baik. Dalam penyusunan laporan penelitian tesis ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Orang Tua saya, Bapak Ir. Chamim dan Ibu Fahriyatul Miskiyah serta Kakak saya M. Kamal Varhi, M. Jamal Karami dan M. Shoful Ulum yang tiada henti-hentinya memberikan doa dan semangat.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc selaku komisi pembimbing yang telah meluangkan banyak waktu, serta atas segala arahan, saran bimbingan dan ilmu yang diberikan kepada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si., Dr. Agus Maizar S, H., S.Pi, MP dan Dr. Yunita Maimunah., S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji atas kritik dan saran sehingga penulis semakin baik dalam penyusunan laporan tesis.
4. Rekan tim penelitian *A. salmonicida* (Widya Tri El Wira, S.Pi dan Febby Hadi Setyawan, S.Pi) atas bantuan kepada penulis.
5. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan tesis ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.

Malang, 19 Desember 2019

Penulis

RINGKASAN

Muhamad Zaky Zamani, Efektifitas Ekstrak Daun Api-Api (*Avicennia marina*) Sebagai Anti *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Berdasarkan Analisis Histopatologi (Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS** dan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc**)

Budidaya Ikan *cyprinid* merupakan kegiatan yang digemari. Kegiatan budidaya ikan ini dapat meningkatkan pendapatan pembudidaya. Namun, terdapat faktor yang menghambat keberhasilan kegiatan budidaya tersebut yaitu akibat terjadinya infeksi bakterial dari genus *Aeromonas*. Salah satu spesies yang merugikan yaitu *Aeromonas salmonicida*. Bakteri tersebut merupakan bakteri HPIK golongan II yang perlu penanganan secara cepat dan tanggap (Muqsith, 2013). Bakteri ini dapat menyebabkan furunkulosis pada ikan yang terinfeksi dan ditandai dengan adanya hemoragik dan lesi nekrotik pada insang, usus dan otot (Burr *et al.*, 2002). Aplikasi antibakteri merupakan cara yang efektif dalam menangani kasus infeksi patogen.

Daun mangrove *A. marina* memiliki senyawa aktif alkaloid, steroid, fenolat dan terpenoid, serta terdapat senyawa lainnya yang juga berfungsi sebagai enzim inhibitor, prekursor zat beracun, antioksidan, anti-alergi, anti-inflamasi dan anti kanker (Dhayanithy, *et al.* 2015). Bioaktif yang terdapat dalam ekstrak berperan dalam menghambat pertumbuhan *A. salmonicida* yang bereaksi dengan Porin (protein membran trans) yang terdapat pada membran luar *A. salmonicida* serta akan membentuk ikatan polimer kuat sehingga akan menyebabkan kerusakan Porin (Ekawaty, *et al.* 2015) yang sesuai dengan hasil penelitian ini.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan kandungan bioaktif ekstrak daun *A. marina* dimana daun tua memiliki kandungan terbanyak daripada daun muda dan daun jatuh pada analisis skrining fitokimia (flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid dan fenol), dimana penembakan senyawa flavonoid yang dianggap paling berperan sebagai senyawa antibakteri dianggap tepat karena sesuai dengan hasil kualitatif menggunakan FTIR dan LC-MS. Dilihat dari kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan *A. salmonicida* pada uji MIC diperoleh hasil terbaik pada 150ppm, pada uji cakram 275ppm, sedangkan pada uji SEM diperoleh fakta bahwa pemberian ekstrak dapat menyebabkan dinding dan membran sel bakteri mengalami lisis (bentuk sel yang tidak normal dan terdapatnya kebocoran sel). Dilihat pada histopatologi menunjukkan bahwa konsentrasi 275 ppm memiliki nilai skoring kerusakan organ terendah dimana pada analisis insang terdapat tingkat kepengaruhan ekstrak terhadap perbaikan skoring nekrosis dan fusi sebesar 64%, pada ginjal sebesar 78% (kongesti) dan 82% (nekrosis), dan pada usus tingkat kepengaruhan sebesar 83% (nekrosis) dan 89% (edema) dimana parameter penunjang dalam penelitian ini masih termasuk dalam kondisi yang baik.

SUMMARY

Muhamad Zaky Zamani, Effectiveness of Api-Api Leaves (*Avicennia marina*) Extract as Anti *Aeromonas salmonicida* in Koi (*Cyprinus carpio*) Fish Based on Histopatological Analysis (Under the Guidance of Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS and Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc)

Cyprinid fish culture is a favored activity. Fish culture activity can increase farmers income. However, there are factors that hinder the aquaculture activities success due to *Aeromonas* bacterial infections. One of the harmful species is *Aeromonas salmonicida*. This bacteria are Class II HPIK that need to be handled quickly and responsively (Muqsith, 2013). This bacteria can cause furunculosis in infected fish and is characterized by hemorrhagic and necrotic lesions in the gills, intestines and muscles (Burr *et al.*, 2002). Antibacterial application is an effective way to deal with cases of pathogenic infection.

A. marina mangrove leaves have active compounds of alkaloids, steroids, phenolics and terpenoids, and there are other substance that also function as enzyme inhibitors, precursors of toxic substances, antioxidants, anti-allergic, anti-inflammation and anti-cancer (Dhayanithy, *et al.* 2015). The bioactives contained in the extract play a role in inhibiting the growth of *A. salmonicida* which reacts with Porin (trans membrane protein) contained in the outer membrane of *A. salmonicida* and will form strong polymeric bonds that will cause damage to Porin (Ekawaty, *et al.* 2015) accordingly as with the results of this study.

The results showed a difference in the bioactive content of *A. marina* leaf extract where old leaves had the most content than young leaves and the leaves fell on phytochemical screening analysis (flavonoids, alkaloids, tannins, triterpenoids and phenols), in which flavonoid compound shootings were considered to play the most role as antibacterial compounds is considered appropriate because it matches the qualitative results using FTIR and LC-MS. Judging from the ability of the extract to inhibit the growth of *A. salmonicida* in the MIC test the best results were obtained at 150ppm, in the disc test at 275ppm, whereas in SEM test the extract could cause bacterial cell walls and membranes to undergo lysis (abnormal cell shape and the presence cell leakage). The histopathology shows that the concentration of 275 ppm has the lowest scoring value of organ damage, where on gill analysis the extract influencing the improvement of necrosis and fusion scored 64%, in the kidney 78% (congestion) and 82% (necrosis), and in the intestine the severity rate is 83% (necrosis) and 89% (edema) where the supporting parameters in this study are still in good condition.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridlo-Nya penulis dapat menyelesaikan usulan proposal tesis dengan judul: "Efektifitas Ekstrak Daun Api-Api (*Avicennia marina*) Sebagai Anti *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Koi (*Cyprinus Carpio*) Berdasarkan Analisis Histopatologi. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing 1 dan Bapak Dr. Ir. M. Fadjar M.Sc selaku dosen pembimbing 2.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun. Kritik konstruktif dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua, demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, 19 Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN ORISINALITAS	v
RIWAYAT HIDUP	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Hipotesis Penelitian	5
 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Koi (<i>C. carpio</i> Koi)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Penyakit	8
2.2 Biologi Api-Api (<i>A. marina</i>)	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	9
2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	10
2.2.3 Kandungan dan Manfaat	11
2.2.4 Mekanisme Antimikroba	11
2.3 Bakteri <i>A. salmonicida</i>	15
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	15
2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	16
2.3.3 Infeksi dan Gejala Klinis	16
2.4 Ekstraksi dan Pelarut	17
2.5 Identifikasi Senyawa	19

2.5.1 Uji Fitokimia	19
2.5.2 Sprektrofotometer Inframerah (FT-IR)	19
2.5.3 Kromatografi Cair (LC-MS)	20
2.6 Uji Aktivitas Antibakteri secara <i>In Vitro</i>	21
2.7 <i>Scanning Electron Mircroscopy</i> (SEM)	22
2.8 Histopatologi	23
2.8.1 Pengertian Histopatologi dan Karakteristik Organ Target	23
2.8.2 Pengujian Histopatologi insang	24
2.8.3 Pengujian Histopatologi Ginjal	25
2.8.4 Pengujian Histopatologi Usus	26
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	
3.1 Landasan Teori	27
3.2 Kerangka Konsep	28
3.3 Kerangka Operasional	29
3.4 Penelitian Terdahulu	30
4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	33
4.2 Materi Penelitian	33
4.2.1 Bahan Penelitian	33
4.2.2 Alat Penelitian	34
4.3 Metode Penelitian	34
4.4 Rancangan Penelitian	34
4.5 Prosedure Penelitian	36
4.5.1 Penelitian Tahap 1	36
4.5.1.1 Pembuatan Ekstrak <i>A. marina</i>	36
4.5.1.2 Uji Fitokimia	37
4.5.1.3 Sprektrofotometer Inframerah (FT-IR)	38
4.5.1.4 Kromatografi Cair (LC-MS)	38
4.5.2 Penelitian Tahap 2 (<i>Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro</i>)	39
4.5.2.1 Uji SEM (<i>Scanning Elektron Microscopy</i>)	39
4.5.2.2 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiton Concentration</i>)	40
4.5.2.3 Uji Cakram	41
4.5.3 Penelitian Tahap 3 (<i>Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vivo</i>)	42
4.5.3.1 Persiapan Wadah dan Ikan Uji	42
4.5.3.2 Patogenitas <i>A. salmonicida</i> dengan LD50	43
4.5.3.3 Uji Toksisitas Ekstrak Daun <i>A. marina</i> dengan LC50	44
4.5.3.4 Infeksi <i>A. salmonicida</i> dan Perendaman Ekstrak	45
4.5.3.5 Kelulushidupan Ikan (SR)	45
4.5.3.6 Pengujian Histopatologi Insang, Ginjal dan Usus	46
4.6 Parameter Penunjang Penelitian	47
4.7 Analisis Data	48
5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Penelitian Tahap 1	50

5.1.1 Pembuatan Ekstrak <i>A. marina</i>	50
5.1.2 Uji Fitokimia	51
5.1.3 Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)	52
5.1.4 Kromatografi Cair (LC-MS)	54
5.2 Penelitian Tahap 2 (<i>Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro</i>)	60
5.2.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiton Concentration</i>)	60
5.2.2 Uji Cakram	62
5.2.3 Uji SEM (<i>Scanning Elektron Microscopy</i>)	67
5.3 Penelitian Tahap 3 (<i>Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vivo</i>)	68
5.3.1 Patogenitas <i>A. salmonicida</i> dengan LD50	68
5.3.2 Uji Toksisitas Ekstrak Daun <i>A. marina</i> dengan LC50	69
5.3.3 Pengujian Histopatologi Insang, Ginjal dan Usus.....	71
5.3.3.1 Insang	70
5.3.3.2 Ginjal	74
5.3.3.3 Usus	78
5.3.4 Gejala Klinis	82
5.3.5 Parameter Penunjang Penelitian	83
6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	84
6.2 Saran	84
DAFTAR PUSTAKA	85

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Morfologi Ikan Koi	7
2. Penyakit Ikan Koi Secara Umum	8
3. Morfologi daun mangrove <i>A. marina</i>	10
4. Morfologi <i>A. salmonicida</i>	15
5. Kurva Perumbuhan Bakteri	16
6. Ulser pada kulit ikan <i>C. carpio</i>	17
7. Kerangka Konsep	28
8. Kerangka Operasional	29
9. Morfologi Daun <i>A. marina</i> Muda (A), Tua (B) dan Jatuh (C).....	32
10. Denah Penelitian	34
11. Alur Skoring	48
12. FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Muda)	53
13. FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Tua)	53
14. FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Jatuh)	54
15. Hasil Deteksi LC-MS Daun Muda Mangrove <i>A. marina</i>	57
16. Hasil Deteksi LC-MS Daun Tua Mangrove <i>A. marina</i>	58
17. Hasil Deteksi LC-MS Daun Jatuh Mangrove <i>A. marina</i>	59
18. Hasil Inkubasi Bakteri dengan Konsentrasi 100-200ppm	60
19. Zona Hambat Uji Kertas Cakram dengan Ekstrak Daun Api-Api Tua	63
20. Hubungan Konsentrasi Ekstrak terhadap Daya Hambat Uji Cakram	66
21. Morfologi Bakteri Setelah Dilakukan Uji SEM	67
22. Histopatologi Insang Pada Sampel Perlakuan	70
23. Grafik Nilai Skoring Nekrosis pada Insang	71
24. Grafik Nilai Skoring Fusi pada Insang	73

25. Histopatologi Ginjal pada Sampel Perlakuan	74
26. Grafik Nilai Skoring Kongesti pada Ginjal	75
27. Grafik Nilai Skoring Nekrosis pada Ginjal	77
28. Histopatologi Usus pada sampel perlakuan	78
29. Grafik Regresi Nekrosis Usus Ikan Koi (<i>C. carpio</i>)	80
30. Grafik Regresi Edema Usus Ikan Koi (<i>C. carpio</i>)	81
31. Gejala Klinis Ikan koi	82
32. Morfologi Ikan Koi Diakhir Perawatan	83



DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Kategori Respon Hambat	21
2. Optimasi parameter massa analit	38
3. Klasifikasi Respon Daya Hambat Pertumbuhan	42
4. Nilai Skoring dan Presentase Kerusakan Jaringan	49
5. Hasil Ekstraksi Serbuk Daun Mangrove <i>A. marina</i>	50
6. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Serbuk Daun Mangrove <i>A. marina</i>	51
7. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Muda)	53
8. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Tua)	54
9. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove <i>A. marina</i> (Jatuh)	54
10. Hasil Uji MIC	62
11. Rerata Diameter Zona Hambat (mm)	66
12. Lethal Dossage 50% (LD 50%)	70
13. <i>Lethal Concentration</i> 50% (LC 50%)	70
14. Rerata Skoring Nekrosis Insang	71
15. Rerata Skoring Fusi Insang	72
16. Rerata Skoring Kongesti Ginjal	75
17. Rerata Skoring Nekrosis Ginjal	76
18. Rerata Skoring Nekrosis Usus	79
19. Rerata Skoring Edema Usus	81

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Alat Penelitian	99
2. Bahan Penelitian	105
3. Hasil Uji Identifikasi Daun Api-api (<i>A. marina</i>)	107
4. Hasil Uji Fitokimia Daun Api-Api (<i>A. marina</i>)	108
5. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>A. salmonicida</i>	110
6. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak	113
7. Hasil Uji Cakram dalam Penentuan Konsentrasi	114
8. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak untuk Pengobatan	115
9. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang	116
10. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Ginjal	117
11. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Usus	118
12. Perhitungan Kerusakan Jaringan Insang	119
13. Perhitungan Kerusakan Jaringan Ginjal	129
14. Perhitungan Kerusakan Jaringan Usus	139

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati Indonesia patut dibanggakan karena memiliki keragaman spesies ikan hias air tawar yang diperkirakan sekitar ± 400 spesies dari 1.100 spesies ikan hias di dunia. Salah satu komoditas yang sampai saat ini masih menjadi primadona yaitu ikan koi (*Cyprinus carpio*) karena termasuk ikan hias berekonomis tinggi serta harga yang relatif stabil (Kusrini, *et al.* 2015). Faktor penghambat keberhasilan dalam melakukan usaha budidaya yaitu adanya infeksi penyakit yang berdampak pada terganggunya kesehatan organisme budidaya. Penyakit yang terjadi pada organisme budidaya merupakan hasil dari infeksi yang disebabkan oleh patogen yang berada pada media budidaya. Patogen dapat berupa bakteri, jamur, virus, atau parasit, dan bahkan jika patogen tidak dibawa oleh ikan, bisa juga berasal dari lingkungan sekitar. Kualitas air yang menurun hingga di bawah atau di atas ambang batas akan meningkatkan populasi bakteri penyebab penyakit. Tingginya populasi bakteri akan dapat mengganggu kesehatan ikan karena akan meningkatkan interaksi antara patogen dan inangnya (Twigg, 2013).

Salah satu bakteri penyebab penyakit yaitu *Aeromonas salmonicida* yang dapat menyebabkan furunkulosis bahkan kematian. Bakteri tersebut sering menginfeksi ikan salmonid dan non salmonid seperti ikan koi, mas, patin dan lele (Sumino, *et al.* 2013). Wintoko, *et al.* (2013) melaporkan bahwa *A. salmonicida* berindikasi mampu menginfeksi semua ikan air tawar. Dimana pada golongan cyprinid (*C. carpio*) penyakit yang sering muncul yaitu *carp erythrodermatitis*. Sedangkan Burr, *et al.* (2002) menyatakan bahwa infeksi *A. Salmonicida* ditandai adanya hemoragik serta terdapat lesi nekrotik di insang, usus, dan otot. Erlangga (2011) menyatakan bahwa organisme patogen dan zat racun masuk ke dalam

tubuh melalui insang kemudian masuk ke aliran darah dan terakumulasi di ginjal ikan. Ikan yang terinfeksi *A. salmonicida* akut akan mengalami penyumbatan darah pada bagian sirip serta ikan tampak lesu, pendarahan kecil pada sirip berlangsung sekitar 2-3 hari dan ikan akan mati dalam jumlah besar. Infeksi bakteri ini dapat berkembang dari luka pada bagian organ ke otot dan bagian kulit (Austin and Austin, 2007).

Pengendalian penyakit bakterial hingga saat ini sebagian besar masih menggunakan antibiotik. Pemakaian antibiotik berdampak negatif terhadap kesehatan konsumen berupa residu antibiotik dan menimbulkan kontaminasi terhadap lingkungan perairan (Haditomo, *et al.* 2016). Penggunaan antibiotik sintesis yang terus-menerus dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten. Selain itu sangat dimungkinkan akan timbulnya residu atau akumulasi antibiotik di dalam tubuh ikan (Setyowati, *et al.* 2014).

Alternatif yang dapat diambil dari permasalahan diatas yaitu dengan penggunaan bagian dari tanaman mangrove yang memiliki senyawa antibakteri guna menghindari dampak negatif dari antibiotik tersebut. Salah satu obat yang dapat digunakan untuk menangani infeksi *A. salmonicida* yaitu dengan menggunakan bahan alami berupa daun pohon bakau api-api (*A. marina*) yang dijadikan ekstrak. Daun pohon bakau ini mengandung berbagai kandungan kimia dengan sifat obat potensial yang dapat digunakan dalam penyembuhan. Senyawa organiknya dapat berfungsi sebagai antioksidan maupun imunostimulan (Kumar, *et al.* 2018). Sedangkan penelitian lain melaporkan bahwa *A. marina* dapat digunakan sebagai anti bakteri *A. salmonicida* baik batang, daun maupun buahnya. Dimana secara umum, *A. marina* telah dilaporkan dapat berfungsi sebagai antibakteri, anti-jamur, antivirus, anti-plasmodial, anti-tumor dan bersifat anti-ulcer (Dhayanithy, *et al.* 2015).

Belum banyaknya penelitian tentang pengobatan ikan cyprinid dengan menggunakan daun mangrove api-api sebagai kandidat obat, sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut terhadap senyawa anti bakteri *A. salmonicida* melalui analisis histopatologi insang, ginjal dan usus.

1.2 Rumusan Masalah

Alternatif pengobatan yang efektif, murah dan aman terhadap manusia dan ramah lingkungan perlu dicari untuk menghindari dampak negatif dari penggunaan antibiotik (Sukenda *et al.* 2008). Ikan akan terbebas dari residu sekitar satu bulan setelah pengobatan (Slembrouck, *et al.* 2005). Dimana Weifu, *et al.* (2018) menyatakan bahwa tingginya permintaan produk antibiotik dan pemakaian yang berlebihan menyebabkan munculnya anggapan bahwa oxytetracycline merupakan polutan. Sebagai salah satu antibiotik spektrum luas yang penting, oxytetracycline telah memasuki tahap penyalahgunaan, dimana jumlah residu yang banyak dapat memperburuk resistensi antibiotik. Selain itu, sebagian dari perawatan tradisional tidak dapat menghilangkan oxytetracycline secara efisien karena stabilitas kimia yang tinggi. Selain itu, Alvarez, *et al.* (2016) menyatakan bahwa oxytetracycline hanya mampu menghambat pertumbuhan beberapa sub spesies salmonicida sehingga dianggap kurang optimal. Oleh karena itu, penggunaan chloramphenicol dapat menggantikan peran oxytetracycline. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Maftuch, *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa antibiotik yang dapat digunakan untuk melawan infeksi *A. salmonicida* yaitu *chloramphenicol*.

Berdasarkan tingkat infeksi, Muqsith (2013) menyatakan bahwa *A. salmonicida* merupakan bakteri kategori HPIK (hama dan penyakit ikan karantina) golongan II sehingga sangat diperlukan penanganan yang cepat. Dhayanithy, *et al.* (2015) menyatakan bahwa daun mangrove *A. marina* memiliki senyawa aktif alkaloid, steroid, fenolat dan terpenoid. Chen, *et al.* (2018) menyatakan bahwa

adanya perbedaan kadar bioaktif daun muda dan daun tua. Dimana Kumar, *et al.* (2018) melaporkan bahwa bahan aktif yang terdapat dalam daun mangrove *A. marina* dapat digunakan sebagai antibakteri dalam konsentrasi yang rendah, sehingga sangat hemat biaya dan ramah lingkungan. Dari beberapa literatur diatas, telah disebutkan akan adanya perbedaan kadar bioaktif berdasarkan usia dan banyaknya khasiat dari daun mangrove, sehingga perlu adanya penelitian untuk mengetahui dan menganalisis :

- a. Seberapa besar perbedaan kandungan bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun mangrove *A. marina* berdasarkan usia (muda, tua dan jatuh) yang dipanen berdasarkan parameter morfologi ?
- b. Pada konsentrasi berapakah ekstrak daun mangrove *A. marina* dapat menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri *A. salmonicida* ?
- c. Dampak pemberian ekstrak terhadap histopatologi insang, ginjal dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang telah diinfeksi *A. salmonicida* ?

1.3 Tujuan

Untuk mengatasi permasalahan diatas, perlu adanya pengobatan pada ikan koi yang telah terinfeksi *A. salmonicida* dengan menggunakan bahan alami yaitu dengan menggunakan ekstrak daun api-api. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui :

- a) Apasaja perbedaan kandungan bioaktif ekstrak daun mangrove *A. marina* berdasarkan usia daun (muda, tua dan jatuh) yang dipanen berdasarkan parameter morfologi.
- b) Konsentrasi ekstrak daun mangrove *A. marina* terbaik dalam menghambat atau membunuh bakteri *A. salmonicida* .

- c) Pengaruh pemberian ekstrak daun mangrove *A. marina* dalam membunuh bakteri *A. salmonicida* sehingga dapat menghentikan kerusakan jaringan insang, ginjal dan usus ikan koi (*C. carpio*) pasca diinfeksi.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu untuk memberikan informasi terhadap kemampuan ekstrak daun mangrove *A. marina* sebagai alternatif pengganti antibiotik pada pengobatan ikan koi (*C. carpio*) pasca diinfeksi *A. salmonicida*. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi dan berkontribusi besar dibidang budidaya air tawar terkhusus dalam hal penanganan penyakit bakterial.

1.5 Hipotesis Penelitian

- a) Diduga kandungan bioaktif ekstrak daun mangrove *A. marina* memiliki kandungan yang berbeda berdasarkan perbedaan usia (muda, tua dan jatuh) yang dipanen berdasarkan parameter morfologi.
- b) Diduga pemberian ekstrak daun mangrove *A. marina* memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*.
- c) Diduga pemberian ekstrak daun mangrove *A. marina* mampu membunuh bakteri *A. salmonicida* sehingga dapat menghentikan kerusakan jaringan insang, ginjal dan usus ikan koi (*C. carpio*) pasca diinfeksi.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Koi (*C. carpio* Koi)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari ikan koi (*C. carpio*) menurut Smartt (2001) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub-phylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Sub-class	: Actynopterigii
Infra-class	: Teleostei
Super-order	: Ostariophysi
Order	: Cypriniformes
Family	: Cyprinidae
Sub-family	: Cyprinidae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Species	: <i>Cyprinus carpio</i>

Ikan koi adalah ikan hias air tawar yang termasuk keluarga Cyprinidae, masih sekerabat dengan ikan mas (*C. carpio*) atau ikan mas Koki (*Carassius auratus*). Hal ini bisa dibuktikan dari sosoknya yang mirip. Hanya saja, penampilan ikan koi lebih cantik karena ditunjang oleh beragam warna yang sangat menawan. Jika dilihat dari samping, warna tubuhnya sangat variatif, mulai dari hitam, putih, merah, kuning, silver hingga keemasan. Keindahan ikan koi akan terlihat jika dilihat dari atas. Bentuk tubuh membulat, gerakan yang lincah, gemulai dan sangat dinamis (Susanto, 2008).

Prasetya, *et al.* (2013) menyatakan bahwa ikan koi mempunyai badan yang berbentuk torpedo dengan alat gerak berupa sirip. Sirip-sirip yang melengkapi bentuk morfologi ikan koi adalah sebuah sirip punggung (*dorsal fin*), sebuah sirip anus (*anal fin*), sebuah sirip ekor (*caudal fin*) dan sepasang sirip dada (*pectoral fin*), sepasang sirip perut (*ventral fin*). Sirip-sirip tersebut sangat penting bagi koi untuk berpindah tempat. Ikan koi memiliki warna khas yang menarik, serta memiliki variasi jenis yang beranekaragam. Secara garis besar ikan koi diklasifikasikan dalam 13 kategori yaitu Kohaku, Sanke, Showa, Bekko, Utsurimono, Asagi, Shusui, Tancho, Hikari, Koromo, Ogon, Kinginrin, dan Kawarimono (Triyanti dan Yulisti, 2012). Dimana morfologi ikan koi disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Ikan Koi (Kusrini, *et al.* 2015).

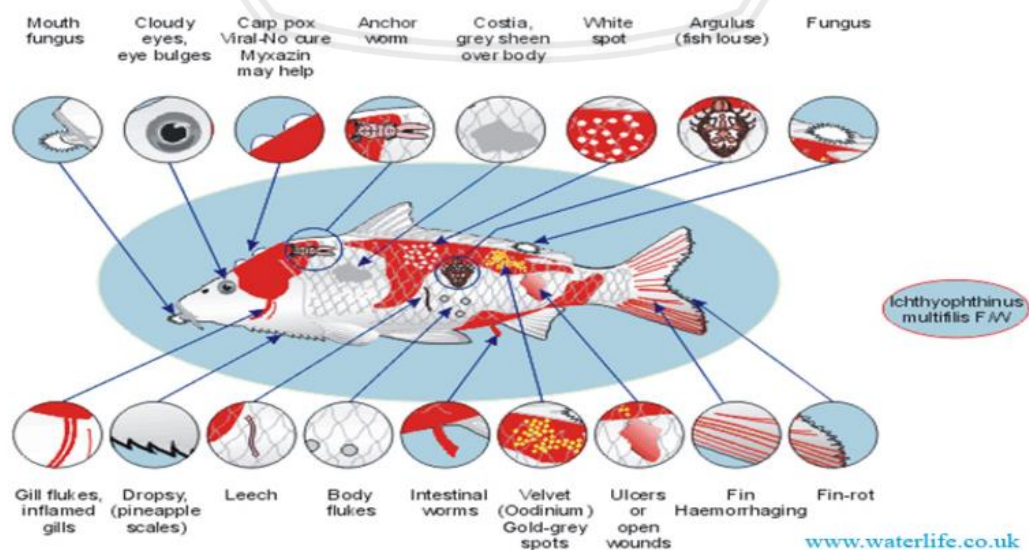
2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Ikan koi merupakan ikan hias ekonomis tinggi yang mampu hidup dan berkembang di Indonesia dengan batas toleransi suhu berkisar 10-32 °C dengan pH berkisar 6,5-9, dimana kadar kualitas air optimum untuk menunjang hidupnya yaitu dengan suhu berkisar 20-31 °C, pH 7-8,5 dan DO >4 ppm (Kordi, 2013). Potensi besar ikan koi di Indonesia sebagai komoditas ikan hias unggulan saat ini berkembang cukup pesat dan tersebar dipenjuru Indonesia seperti pada beberapa daerah yaitu Jakarta Barat, Sukabumi, Blitar, Cianjur, dan Makassar. perkembangan tersebut diduga akibat budidaya ikan koi di Jepang mulai

terkendala lahan sehingga menghasilkan peluang budidaya di Indonesia. Besarnya nilai transaksi dari perdagangan ikan koi di Indonesia, membuat KKP terdorong untuk mengembangkan potensi ikan hias nasional sehingga dapat meningkatkan kualitas ikan koi lokal dan dapat bersaing dengan ikan koi impor di skala domestik maupun skala internasional (Kusrini, *et al.* 2015).

2.1.3 Penyakit

Ulfiana, *et al.* (2012) menyatakan bahwa ciri-ciri ikan koi sehat yaitu memiliki daya tahan tubuh yang baik, sehingga lebih sulit terinfeksi bakteri yang terdapat di perairan. Ikan koi sangat mudah terinfeksi *Aeromonas* sp. jika pada bagian tubuhnya terdapat luka. Luka tersebut dapat dijadikan jalan masuk bagi bakteri *Aeromonas* sp. ke dalam tubuh ikan. Idowu, *et al.* (2017) menyatakan bahwa *A. salmonicida* mampu menginfeksi ikan secara tunggal dan berkembang biak dengan sangat cepat sehingga dapat membunuh ikan besar dalam beberapa hari atau minggu. Bakteri biasa menginfeksi secara internal maupun eksternal (akibat kesalahan penanganan atau efek infeksi parasit. Infeksi bakteri yang umum pada ikan yaitu : columnaris (*Flexibacter Columnaris*), furunkulosis (*A. salmonicida*), Piscine tuberkulosis (*Mycobacterium marinum*) dan Vibriosis (*Vibrio* sp). Dimana penyakit ikan koi secara umum disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Penyakit ikan koi secara umum (Idowu, *et al.* 2017).

Menurut Cipriano dan Bullock (2001), *A. salmonicida* penyebab carp erythrodermatitis dapat menyebabkan lesi eksternal. Indikasi klinis carp erythrodermatitis yaitu terdapatnya hemoragik meradang kecil pada kulit yang berkembang menjadi erosi putih yang dikelilingi oleh pigmentasi zona merah sempit dan gelap. Pendarahan yang luas di dermis kulit diikuti dengan nekrosis epidermis dengan infiltrasi kuat oleh leukosit polimorfonuklear. Edema di dermis akan menggantikan “knot” di epidermis sementara perdarahan terjadi di sekitar pembuluh darah menginduksi infiltrasi inflamasi persisten yang meluas ke compactum stratum, subdermis dan otot yang mendasarinya. Ikan dengan lesi yang luas akan menunjukkan exophthalmia, perdarahan di insang, distensi abdomen dan anemia, serta juga dapat hadir dalam rongga perut, dan organ-organ internal dapat menjadi edematous. Dimana penampakan akibat adanya infeksi dari bakteri *A. salmonicida* terhadap ikan *C. carpio* telah disajikan pada Gambar 6.

2.2 Biologi Api-Api (*A. marina*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi mangrove *A. marina* menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisio : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Sub Class : Asteridae

Order : Lamiales

Family : Acanthaceae

Genus : *Avicennia*

Species : *Avicennia marina*

Tanaman mangrove *A. marina* merupakan tumbuhan atau tanaman yang tumbuh tegak atau menyebar dan mampu tumbuh hingga tinggi 30 meter dengan sistem perakaran horizontal dan berbentuk pensil (atau asparagus) serta memiliki akar nafas tegak dengan sejumlah lentisel. Selain itu, ia memiliki kulit yang halus dengan burik hijau-abu dan terkelupas dalam bagian kecil. Ranting muda dan tangkai daun mangrove berwarna kuning serta tidak berbulu. Pada bagian bagian atas daun ditutupi bintik kelenjar cekung. Bagian bawah daun putih abu-abu muda. Daun berbentuk elips, bulat memanjang, bulat telur terbalik dengan ujung meruncing hingga membundar dengan ukuran 9 x 4,5 cm. Mangrove *A. marina* merupakan pionir lahan pantai yang terlindung, berkemampuan menempati dan tumbuh diberbagai habitat pasang-surut hingga di tempat asin. Akar berfungsi sebagai pengikat sedimen dan mempercepat pembentukan tanah timbul. Hidupnya cenderung membentuk kelompok pada habitat tertentu. Dimana ia tersebar di seluruh Indonesia serta juga terdapat di Afrika, Asia, Australia, Amerika Selatan, Polynesia dan Selandia Baru. Dimana morfologi daun mangrove api-api disajikan pada Gambar 3 (Noor dan Suryadiputra, 1999).



Gambar 3. Morfologi daun mangrove *A. marina* (Noor dan Suryadiputra, 1999)

2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Keberadaan mangrove *A. marina* berperan penting dalam pelestarian wilayah pesisir sebagai penahan abrasi dan tempat berkembang biaknya

organisme laut. Secara ekologis, mangrove berperan dalam mendukung eksistensi lingkungan baik fisik dan sebagai habitat biota di lingkungan. Dimana secara fisik berperan sebagai penahan ombak, pengendalian banjir, penahan angin, penahan intrusi air dan penetralisir pencemaran (Masugian, 2014). Menurut Sidabutar (2007), pertumbuhan mangrove dipengaruhi faktor seperti arus, gelombang, salinitas, pasang surut, kegiatan manusia dan endapan lumpur. Ratna (2014) menyatakan bahwa habitat mangrove sering ditemukan pada pertemuan muara sungai dan air laut serta menjadi pelindung daratan dari gelombang. Sungai akan mengalirkan air tawar untuk mangrove dan saat pasang pohon mangrove akan dialiri air payau atau air garam.

2.2.3 Kandungan dan Manfaat

Daun mangrove *A. marina* memiliki senyawa aktif alkaloid, steroid, fenolat dan terpenoid (Dhayanithy, *et al.* 2015). Ekstrak daun mangrove *A. marina* dengan analisis kromatografi dan massa teridentifikasi beberapa senyawa fitokimia besar yang dapat berfungsi sebagai enzim inhibitor, prekursor zat beracun, antioksidan, anti-alergi, anti-inflamasi, anti kanker (Dhayanithy, *et al.* 2015). Senyawa aktif yang termasuk dalam golongan fenolik yaitu flavonoid. Penentuan kadar flavonoid menunjukkan potensi sebagai senyawa antibiotik, antibakteri, anti kanker, dan antibiotik (Parubak, 2013).

2.2.4 Mekanisme Antimikroba

Antibakteri berfungsi untuk memberikan efek hambat atau menurunkan proses biokimia pada organisme terutama infeksi bakteri. Antibakteri berasal dari bahan sintesis maupun alami (Fatisa, 2013). Efek paparan antibakteri dibagi menjadi bakteriostatik (menghambat) dan bakteriosidal (membunuh) (Siregar, *et al.*, 2012). Inaktivasi bakteri tersebut merupakan hasil interaksi senyawa antibakteri dengan bagian dari sel bakteri. Kerusakan sel ini dapat terjadi akibat rusaknya permeabilitas membran dan bocornya sistem intraseluler, sehingga

mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Interaksi tersebut akan menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang berdampak pada terganggunya proses metabolisme dan pada tingkat kerusakan yang parah akan menyebabkan kematian bakteri (Asriani, *et al.*, 2007). Dimana senyawa yang paling dominan sebagai antimikroba pada daun *A. marina* dari beberapa sumber diantaranya :

a. Flavonoid

Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan untuk merespon terhadap infeksi mikroorganisme, sehingga senyawa ini efektif sebagai senyawa antimikroba. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki berbagai fungsi, diantaranya yaitu sebagai antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri dan anti virus (Parubak, 2013).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam dan merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol dan metanol. Flavonoid merupakan senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antioksidan, antibakteri, dan antiinflamasi karena mampu menghambat aktivitas bakteri penyebab penyakit. Fenol merupakan senyawa antioksidan yang dapat merusak lapisan dinding sel bakteri (Arum, *et al.* 2012). Dimana golongan polifenol ini bekerja melalui penghambatan enzim mikroorganisme oleh bagian senyawa yang teroksidasi melalui reaksi dengan gugus sulfhidril atau melalui interaksi yang non-spesifik dengan protein mikroorganisme. Selain itu, polifenol juga dapat menyebabkan denaturasi protein. Flavonoid bersifat antimikroba dengan protein ekstraseluler dan protein yang dapat larut dengan dinding sel bakteri (Ardananuridin, *et al.* 2004).

Noventi dan Carolina (2016), menyatakan bahwa senyawa flavonoid diduga memiliki mekanisme kerja mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi, sedangkan mekanisme fenol sebagai agen antibakteri yang berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan

menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Menurut Prajitno (2007), Pada kerusakan membran sitoplasma, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami kematian. Parwata dan Dewi (2008), menyatakan bahwa turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol kedalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis. Dewi, *et al.* (2012) Menyatakan bahwa membran sel yang terletak tepat di bagian dalam dinding sel dapat dirusak oleh flavonoid. Beberapa dari senyawa tersebut dapat menguraikan fosfolipid menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat sehingga membran tidak dapat mempertahankan bentuk, akibatnya membran bocor, zat-zat dapat keluar masuk sel tanpa kendali sehingga metabolisme terganggu dan bakteri lisis.

Kadar flavonoid dan senyawa fenolik lain di dalam tanaman berbeda-beda di antara setiap bagian, jaringan, dan umur tanaman, serta dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan. Faktor-faktor ini adalah temperatur, sinar ultraviolet dan tampak, nutrisi, ketersediaan air, dan kadar CO_2 pada atmosfer. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol. Spektrum khas flavonoid terdiri atas dua maksimal pada rentang 230-295 nm (pita II) dan 300-560 nm (pita I) (Neldawati, *et al.* 2013).

b. Terpenoid

Identifikasi terpenoid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan reagen semprot liebermanbuchard. Analisis menggunakan spektrofotometri Fourier Transform-Infra Red terhadap isolat menunjukkan adanya serapan gugus -OH ($3456,44$ dan $3410,15\text{ cm}^{-1}$), C-H alifatik ($2924,09$ dan $2862,36\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1712,79\text{ cm}^{-1}$), C=C aromatik ($1643,35$ dan $1512,19\text{ cm}^{-1}$), dan C-O ($1273,02$ dan $1226,73\text{ cm}^{-1}$) (Dwisari, *et al.* 2016). Terpenoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang ditemukan di sebagian kecil dari ekstrak daun mangrove *A. marina* yang juga berperan dalam menghambat pertumbuhan *A. salmonicida*. Mekanisme bioaktif ekstrak dalam menghambat *A. salmonicida* yaitu bereaksi dengan Porin (protein membran trans) yang terdapat pada membran luar *A. salmonicida* serta akan membentuk polimer ikatan yang kuat sehingga akan menyebabkan kerusakan Porin. Kerusakan Porin akan berdampak pada pengurangan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat (Ekawaty, *et al.* 2015).

2.3 Bakteri *A. salmonicida*

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Brenner dan Staley (2007) menyatakan bahwa klasifikasi *A. salmonicida* adalah sebagai berikut :

Famili	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Aeromonadales
Family	: Aeromonadaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>Aeromonas salmonicida</i>

Afrianto dan Liviawaty (1992) menyatakan bahwa ciri utama bakteri aeromonas gram negatif yaitu berbentuk batang dengan ukuran berkisar 1-4,4 x 0,4-1 um. Cipriano dan Bullock (2001) menyatakan bahwa bakteri *A. salmonicida* merupakan gram negatif, memiliki bentuk berupa batang dan ia tidak bergerak (*nonmotile*). Ikan yang terinfeksi *A. salmonicida* dapat ditandai dengan adanya ulserasi kulit dan patologi eksternal dengan maupun tanpa septicemia. Morfologi *A. salmonicida* disajikan pada Gambar 4.

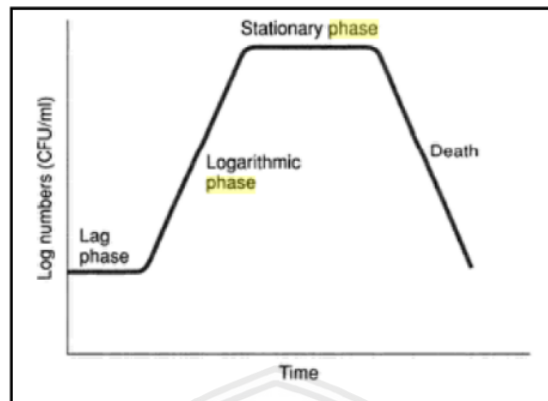


Gambar 4. Morfologi *A. salmonicida* dengan perbesaran (10 oc x 100 ob)
(Docan, et al., 2012)

2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Media yang optimal sangat dibutuhkan dalam pertumbuhan *A. salmonicida*. Pommerville (2010) menyatakan bahwa pertumbuhan merupakan peningkatan jumlah sel vegetatif yang terjadi pada suatu populasi. Pada pertumbuhan optimal, sangat diperlukan kesesuaian suhu, pH dan oksigen (aerobik). Kartz (2005) menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase, yaitu fase lag yang merupakan fase awal tanpa perubahan jumlah bakteri, dimana ia hanya menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya. Selanjutnya yaitu fase eksponensial / log yang merupakan fase pertumbuhan tercepat hingga masuk ke fase stasioner, pada fase ini, kandungan nutrient mulai habis dan terjadi penumpukan limbah. Fase stationer ini memiliki jumlah sel baru yang menyamai jumlah sel mati, dan tahap akhir yaitu fase kematian, pada fase ini pertumbuhan

sangat lambat terjadi, dimana jumlah sel mati sangat dominan. Kurva pertumbuhan disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva Perumbuhan Bakteri (Kartz, 2005)

2.3.3 Infeksi dan Gejala Klinis

Alvares, *et al.* (2016) melaporkan bahwa Bakteri *A. salmonicida* jika dibiarkan maka akan dapat menyebabkan *furunculosis*. Infeksi bakteri ini akan berdampak pada tingkat kematian yang tinggi yang dicirikan dengan terdapatnya luka pada kulit, septikemia, kerusakan jaringan, hemoragik, pembusukan sirip, insang rusak dan terdapatnya furunkel (bisul). Berdasar Long, *et al.* (2015), *A. salmonicida* merupakan penyebab *furunculosis*. Infeksi bakteri ini akan berdampak pada meningkatnya kematian hingga 89-90%. Amanu, *et al.* (2014) menjabarkan ciri-ciri ikan terinfeksi *A. salmonicida* ialah dengan melihat apakah terdapat leukopenia, nekrosis pada jaringan, hemoragi maupun degenerasi pada otot. Retnoningsih, *et al.* (2009) melaporkan bahwa gejala klinis yang dapat ditumbulkan *A. salmonicida* yaitu berupa luka, nekrosis dan terjadinya pembengkakan (furuncle), furuncle tersebut sering menjadi luka bernanah dan membentuk cekungan, jika infeksi akut, luka akan terdapat hampir diseluruh organ tubuh seperti pada pendarahan sirip, insang dan permukaan kulit. Dimana Bergh dan Frey (2013) menyatakan bahwa *A. salmonicida* adalah patogen penting yang bertanggung jawab terhadap penyakit khas *furunculosis*. Jenis tiga sistem sekresi

(T3SS) merupakan sistem virulensi utama. Dimana penampakan ulser disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Ulser pada kulit ikan *C. carpio* yang menunjukkan patologi (Erythrodermatitis), akibat *A. salmonicida* atipikal (Cipriano dan Bullock, 2001)

2.4 Ekstraksi dan Pelarut

Ekstraksi merupakan metode proses pemisahan berbagai komponen dalam larutan berdasar perbedaan tingkat kelarutan (solubilitas). Ekstraksi dilakukan pada suhu tertentu dimana pelarut akan menarik senyawa aktif yang terkandung didalam bahan akibat memiliki polaritas yang sama (Aziz, *et al.*, 2009). Metode ekstraksi sering digunakan untuk menentukan kandungan bahan aktif yang terdapat dalam obat herbal, dimana sangat perlu untuk memperhatikan sifat bahan serta senyawa yang diisolasi guna menentukan pilihan pelarut dalam metode ekstraksi. Proses ekstraksi dari bahan alami dengan menggunakan sampel kering dan penggunaan pelarut yang sesuai (Mukhrani, 2014).

Terdapat beberapa metode ekstraksi yang diantaranya ekstraksi ultrasonik, ekstraksi fluida, ekstraksi solven aselerasi serta ekstraksi microwave. Faktor penunjang proses ekstraksi ialah jenis pelarut yang digunakan. Senyawa polar akan larut pada pelarut polar dan senyawa non polar akan larut pada pelarut non polar (Sayuti, 2017).

Sifat fisikokimia suatu bahan dapat dipengaruhi oleh metode ekstraksi, dimana ekstraksi dapat dilakukan setahap maupun secara bertingkat. Prinsip

ekstraksi yaitu untuk memisahkan komponen pada suatu bahan dengan menggunakan pelarut dalam kurun waktu tertentu. Dalam proses ekstraksi, pelarut yang umum digunakan yaitu etanol, metanol, etil asetat, heksana dan air. Secara prinsip, senyawa aktif suatu bahan akan mudah terpisah jika memiliki polaritas yang sama dengan pelarutnya (Septiana dan Asnani, 2012). Pada umumnya, proses ekstraksi dapat menggunakan 3 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, diantaranya N heksan (nonpolar), etil asetat (pelarut semipolar) dan etanol/metanol (polar) (Hidayah, *et al.*, 2016). Daun mangrove *A. marina* dimaserasi dengan etanol 85% dan kemudian disaring (Dhayanithi, *et al.* 2015). Selanjutnya dilakukan evaporasi pada suhu dan waktu tertentu hingga diperoleh ekstrak berbentuk pasta dan kemudian disimpan pada suhu 4°C hingga ekstrak digunakan lebih lanjut (Kumar, *et al.* 2018).

Dalam ekstrak daun mangrove *A. marina* menunjukkan bahwa ekstrak etanol adalah yang paling efektif dalam menghambat *A. salmonicida*. Ekstrak etanol daun mangrove *A. marina* memperlihatkan aktivitas antibakteri maksimal yang diikuti ekstrak n-heksana dan etil asetat. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa bioaktif daun mangrove *A. marina* mengandung senyawa yang lebih polar dikarenakan komponen aktif yang berfungsi sebagai antibakteri lebih larut dalam etanol (pelarut polar) (Ekawaty, *et al.* 2015).

2.5 Identifikasi Senyawa

2.5.1 Uji Fitokimia

Fitokimia merupakan ilmu tentang aspek kimia pada bahan alami terutama pada tanaman. Analisis fitokimia tersebut dilakukan untuk mengetahui kandungan bahan aktif dalam ekstrak dan dapat digunakan dalam pengisolasian maupun pemisahan bahan aktif (Illing, *et al.*, 2017). Teknik analisisnya yaitu dengan cara mengencerkan ekstrak yang selanjutnya ditetesi reagen (menentukan kandungan

bahan aktif seperti flavonoid, steroid, saponin, alkaloid dan sebagainya) sesuai dengan kebutuhan pengujian senyawa yang terdapat pada ekstrak (Dewi, *et al.*, 2012).

Uji fitokimia (pengujian warna dengan suatu pereaksi) berguna untuk mengetahui gambaran senyawa dalam suatu bahan. Hal penting dalam uji ini yaitu pemilihan pelarut dan metode ekstraksi yang digunakan. Hasil dari skrinning fitokimia akan menunjukkan terjadinya perubahan warna sesuai indikator tiap senyawa (Susanti, *et al.*, 2003). Uji fitokimia sangat berguna untuk mengetahui apakah terdapat kandungan senyawa alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, glikosida, tanin dan steroid dalam ekstrak uji (Cepeda, *et al.*, 2018).

2.5.2 Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)

Fourier Transform Infrared (FT-IR) merupakan metode analisis spektroskopi dengan menggunakan inframerah yang telah dilengkapi *Fourier* (analisis hasil spektrum). Metode ini didasarkan atas perbedaan penyerapan radiasi inframerah. FT-IR sangat berguna dalam penentuan gugus fungsi dari suatu bahan uji (Anam, *et al.*, 2007).

Penentuan gugus fungsi dalam suatu senyawa dapat dengan melakukan pengukuran spektra FT-IR. Dalam pengoperasiannya, FT-IR menggunakan gelombang $300-4000\text{ cm}^{-1}$ dimana hasilnya berupa band (pita) dan akan muncul berupa puncak-puncak dengan gelombang tertentu. Gelombang kemudian dianalisis sehingga diperoleh gugus fungsinya (Mohadi, *et al.*, 2011).

2.5.3 Kromatografi Cair (LC-MS)

Salah satu teknik yang umum digunakan untuk analisis metabolit adalah kromatografi cair yang ditandem dengan spektroskopi massa (LC-MS). Tandem ini ditujukan untuk memudahkan dalam proses mengidentifikasi senyawa kimia dalam suatu tanaman, yang merupakan sistem kompleks dari puluhan hingga ratusan metabolit. LC-MS memiliki beberapa kelebihan, yaitu cocok untuk deteksi

kelas metabolit dalam kisaran yang luas, digunakan untuk kajian metabolomik tanaman non target, analisisnya cepat, sensitivitas tinggi, dapat memisahkan senyawa yang tidak atsiri, dapat memisahkan komponen dalam jumlah yang sedikit, memiliki daya pisah yang tinggi, kolom dapat digunakan kembali dan dapat menganalisis molekul besar (Nurmaida, 2016).

Analisa melamin dapat dilakukan dengan menggunakan LC-MS. Uji konfirmasi pada LC-MS dilakukan untuk mengetahui fragmentasi ion dari senyawa yang dianalisis. Uji konfirmasi merupakan uji kualitatif pada LC-MS dengan mengetahui fragmentasi ion dari senyawa yang dilakukan sebelum uji kesesuaian sistem untuk memperkuat identifikasi kualitatif dari melamin dengan melihat perbandingan massa terhadap muatan, senyawa melamin pada kromatogram dapat diketahui akibat terbentuknya fragmen-fragmen ion pada perbandingan massa terhadap muatan (Rachmawati dan Widiarti, 2013).

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Vitro*

Soleha (2015) menyatakan bahwa dalam mengukur kemampuan suatu bahan yang memiliki sifat sebagai antibakteri dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan metode dilusi dan difusi sebagai berikut :

a. Metode dilusi

Dilusi merupakan suatu teknik yang berguna untuk mengetahui konsentrasi atau kadar antibakteri minimal yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan teknik MIC. MIC (*minimum inhibiton concentration*) berguna dalam menentukan aktivitas antibakteri yang didasarkan pada tingkat kekeruhannya. Prinsip metode ini yaitu dengan menggunakan penurunan konsentrasi. Dosis MIC terbaik ditentukan dengan melihat tabung perlakuan yang memiliki kekeruhan mendekati perlakuan kontrol positif (antibiotik).

b. Metode difusi

Metode difusi dilakukan dengan cara menempelkan kertas cakram yang telah berisi antibakteri dipermukaan media agar pasca inokulasi bakteri. Indikatornya yaitu terdapat zona bening disekitar cakram akibat antibakteri berkonsentrasi tertentu akan menghambat pertumbuhan bakteri yang berdampak pada beningnya media disekitar kertas cakram tersebut. Diameter zona hambat selanjutnya diukur (mm) dan dicocokkan berdasarkan kategori respon hambat yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kategori Respon Hambat

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
<10-20 mm	Kuat
>20-30 mm	Sangat Kuat

2.7 Scanning Electron Mircroscopy (SEM)

SEM merupakan fasilitas analisis komposisi kimia berupa detektor sinar X yang terdiri dari 2 alat utama berupa alat coating dan mikroskop elektron. Komponen utama alat SEM ini yang pertama adalah tiga pasang lensa elektromagnetik yang berfungsi memfokuskan berkas elektron menjadi sebuah titik kecil, lalu oleh dua pasang scan coil discan dengan frekuensi variabel pada permukaan sampel. Semakin kecil berkas yang difokuskan, maka semakin besar resolusi lateral yang dicapai. Kesalahan fisika pada lensa-lensa elektromagnetik berupa astigmatismus yang dikoreksi oleh perangkat stigmator. Komponen kedua yaitu sumber electron yang berupa filamen dari bahan kawat tungsten atau berupa jarum dari paduan Lantanum Hexaboride LaB6 atau Cerium Hexaboride CeB6 yang dapat menyediakan berkas elektron teoretis yang memiliki energi tunggal (monokromatik), komponen ketiga yaitu imaging detector yang berfungsi

mengubah sinyal elektron menjadi gambar. Sesuai dengan jenis elektronnya, terdapat dua jenis detektor dalam SEM ini, yaitu detektor SE dan detektor BSE. Ketika berkas elektron discan pada permukaan sampel, terjadi interaksi elektron dengan atom-atom di permukaan maupun di bawah permukaan sampel. Akibat interaksi tersebut, sebagian besar berkas elektron berhasil keluar kembali, elektron-elektron itu disebut sebagai Backscattered Electrons (BSE), sedangkan sebagian kecil elektron yang masuk ke dalam bahan kemudian memindahkan sebagian besar energi pada elektron atom sehingga terpental ke luar permukaan bahan disebut Secondary Electrons (SE). Pembentukan elektron-elektron sekunder selalu diikuti proses munculnya X-ray yang karakteristik untuk setiap elemen, sehingga dapat digunakan untuk mengukur kandungan elemen yang ada di dalam bahan yang diteliti (Sujatno, *et al.* 2015).

SEM ialah metode yang biasa digunakan untuk mengamati kerusakan dinding sel bakteri akibat pemberian senyawa antibakteri. Hasil uji SEM berguna untuk mempelajari perubahan struktur, kerusakan dinding sel, morfologi dan membran sitoplasma (Asriani, *et al.*, 2007). Jika hendak melihat kerusakan bakteri pasca dipapar ekstrak atau fraksi, maka dapat menggunakan uji SEM. Penggunaan SEM sangat berguna untuk mengetahui pengukuran perlekatan sel, perubahan morfologi bakteri dan karakteristik permukaan struktur biomaterial. Bakteri pasca pemberian senyawa antibakteri akan mengalami kerusakan sel yang berdampak seperti sel mengerut, menggelembung dan lisisnya dinding sel bakteri tersebut (Nursidika, *et al.*, 2014).

2.8 Histopatologi

2.8.1 Pengertian Histopatologi dan Karakteristik Organ Target

Asniatih, *et al.* (2013) menyatakan bahwa histopatologi merupakan metode untuk menganalisis rusaknya jaringan yang terinfeksi penyakit. Agar diketahui

perubahan patologi pasca infeksi, maka selanjutnya dilakukan analisis histopatologi sehingga memberikan gambaran perubahan pada jaringan maupun organ target. Organ yang umum diuji histopatologi yaitu insang, usus, ginjal, hati dan otot.

Histopatologi merupakan biomarker pendeteksi kesehatan ikan melalui perubahan struktur organ yang terakumulasi bahan pencemar atau terinfeksi penyakit. Organ-organ tersebut antara lain insang, ginjal, lambung, hati, usus dan sebagainya. Hasil histopatologi diklasifikasikan berdasarkan kerusakan jaringan yang terinfeksi mulai dari kerusakan ringan, sedang hingga berat (Hadi dan Alwan, 2012).

Organ target yang dibahas dalam tulisan ini yaitu organ insang, ginjal dan usus, dimana menurut Erlangga (2011), organisme patogen dan zat racun pertama kali masuk ke dalam tubuh ikan melalui insang yang menyaring organisme dan zat tersebut masuk ke dalam tubuh, selanjutnya diteruskan ke seluruh tubuh melalui aliran darah dan pada akhirnya akan terakumulasi di ginjal ikan. Peningkatan intensitas patogen dan zat racun yang masuk ke ginjal secara terus menerus akan merusak ginjal yang dikarenakan terbatasnya kemampuan ginjal untuk menyaring patogen dan zat racun.

2.8.2 Pengujian Histopatologi Insang

Analisis kerusakan jaringan insang pada penelitian ini yaitu fusi, edema dan nekrosis, dimana menurut Pratiwi dan Manan (2015) menyatakan bahwa pengujian histopatologi berawal dari persiapan sampel ikan kemudian dibedah dan diambil insangnya. Selanjutnya dilakukanlah fiksasi, dehidrasi (jaringan), pembuatan blok (jaringan), pengirisan dengan microtom rotary dan terakhir pewarnaan (jaringan) menggunakan Hematoksilin dan Eosin (HE).

Prosoeryanto, *et al.* (2010), menyatakan bahwa mikroba sangat mudah menginfeksi. Perubahan histopatologi insang biasa disebut telangiektasis.

Telangiectasis terdapat pada ujung maupun didasar lamela sekunder. Perubahan patologi lain yaitu hiperplasia (peningkatan jumlah sel lamela). Hiperplasia merupakan tanda iritasi dan berefek terjadinya penebalan jaringan epitel. Selain itu juga terjadi edema (bengkak), poliferasi, pendarahan, degenerasi, nekrosis hingga atropi. Telangeaktasi merupakan efek dari pembendungan lamella sekunder sehingga terjadi pembesaran menyerupai balon, nekrosis menunjukkan kerusakan dan perubahan bentuk lamela sekunder. Edema terjadi akibat adanya pembengkakan pada lamela. Hiperplasia adalah kerusakan dengan pertambahan ukuran sel lamella. Lamela sekunder yang berhimpitan terjadi akibat hiperplasi menerus sehingga menyebabkan poliferasi mukus. Selanjutnya fusi adalah jaringan insang akibat kerusakan epitel. Sedangkan hemoragi dicirikan dengan adanya spot (bintik) pada jaringan (Juanda dan Edo, 2018).

2.8.3 Pengujian Histopatologi Ginjal

Analisa histopatologi ginjal berguna sebagai marker biologi dalam mengetahui kesehatan ikan berdasarkan perubahan yang terjadi pada ginjal. Biomarker histopatologi ginjal digunakan dalam memonitor lingkungan dengan cara mengamati bagian-bagian yang berfungsi penting dan berguna dalam metabolisme tubuh ikan untuk memberikan diagnosa awal terhadap gangguan kesehatan (Tresnati, *et al.*, 2007).

Pratiwi dan Manan (2015) menyatakan bahwa persiapan pembuatan preparat histopatologi ginjal dapat melalui tahap fiksasi jaringan, memilih jaringan (Trimming), dehidrasi, pembentukan blok, pengirisan, dan pewarnaan jaringan yang dilakukan dengan 2 macam zat warna hematoksilin dan eosin. Hematoksilin berguna untuk memulas inti sel dan memberi warna biru, sedangkan eosin berguna untuk memulas sitoplasma, jaringan penyambung, dan memberi warna merah muda.

Setelah ikan terpapar dalam kurun waktu yang telah ditentukan, maka ginjal akan mengalami perubahan degeneratif sehingga akan tampak vakuolisasi yang terlihat di sebagian besar tubulus serta akan terjadi nekrosis. Dimana dengan meningkatnya durasi paparan juga akan terjadi peningkatan tingkat keakutan secara degeneratif (Singh, 2012). Asniatih, *et al.* (2013) menyatakan bahwa perubahan patologi ginjal ikan yang terinfeksi bakteri dapat dilihat dengan adanya degenerasi tubulus distal, sedangkan pada glomerulus dan jaringan hematopoetik akan mengalami nekrotik. Bentuk kerusakan ginjal yang umum ditemukan pada ikan yang terinfeksi bakteri diantaranya yaitu :

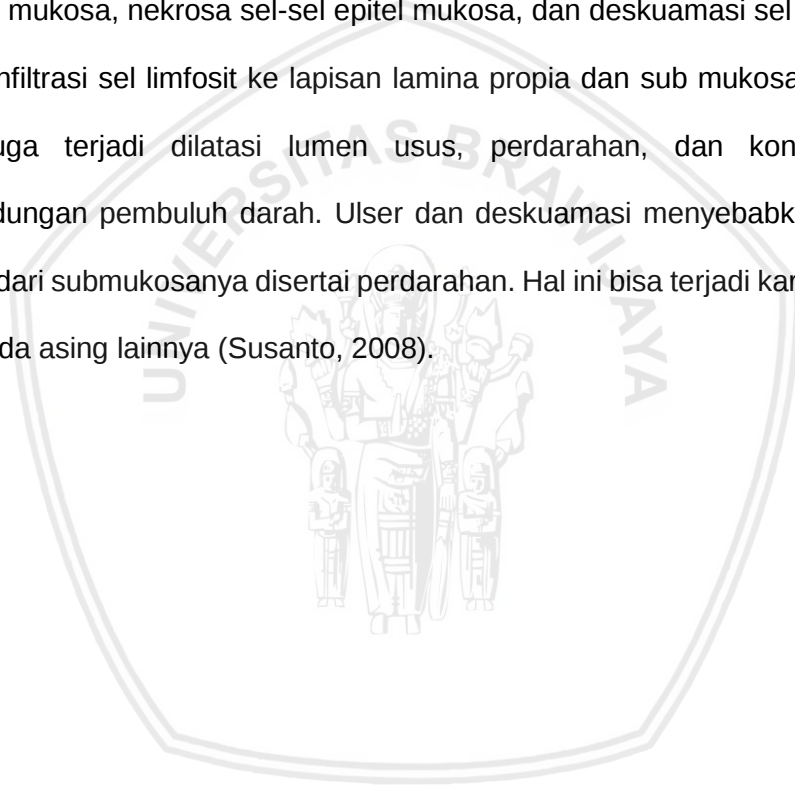
- Nekrosis : kematian atau kerusakan sel dengan karakteristik sel yang mengalami nekrosis berwarna pucat jika dibandingkan warna normalnya, jaringan lebih rapuh dan mudah rusak (Pratiwi dan Manan, 2015).
- Kongesti : kondisi adanya penggumpalan darah (eriterosit) pada organ tubuh. Kongesti juga terjadi pada ginjal yang disebabkan adanya gangguan sirkulasi yang dapat mengakibatkan kekurangan oksigen dan zat gizi (Parameswari, *et al.* 2013).

2.8.4 Pengujian Histopatologi Usus

Perubahan histopatologis jaringan akan meningkat seiring dengan lamanya durasi paparan, dimana organ akan mengalami kerusakan secara bertahap. Salah satu organ yang biasa terinfeksi bakteri *A. salmonicida* yaitu usus. Usus merupakan organ yang sering terpapar mikroba melalui oral, khususnya melalui bahan makanan yang tercemar. Apabila terjadi infeksi maka akan terjadi peradangan dan akan meningkat menjadi degenerasi, deskuamasi sel dan sekresi mukus ke dalam lumen, kemudian nekrosis menyebar ke bagian lamina propia dan jaringan otot licin. Pada epitel mukosa yang sensitif dapat terjadi peradangan yang

terlokalisir dan timbul ulcerasi. Pada kasus degenerasi berat, fungsi absorpsi akan terhenti dan dapat menyebabkan kematian (Ersa, 2008).

Penyakit yang diakibatkan oleh bakteri *A. Salmonicida* ditandai dengan adanya hemoragik dan lesi nekrotik di insang, usus, dan otot karena kematian yang tinggi serta sifatnya yang menular, dimana sebagian besar antibiotik digunakan untuk terapi *furunculosis* (Burr, et al., 2002). Perubahan degeneratif yang sering terjadi pada saluran pencernaan ikan terutama usus yaitu atropi sel-sel epitel mukosa, nekrosa sel-sel epitel mukosa, dan deskuamasi sel epitel yang disertai infiltrasi sel limfosit ke lapisan lamina propia dan sub mukosa. Selain itu dapat juga terjadi dilatasi lumen usus, perdarahan, dan kongesti atau pembendungan pembuluh darah. Ulser dan deskuamasi menyebabkan mukosa terlepas dari submukosanya disertai perdarahan. Hal ini bisa terjadi karena parasit atau benda asing lainnya (Susanto, 2008).



3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

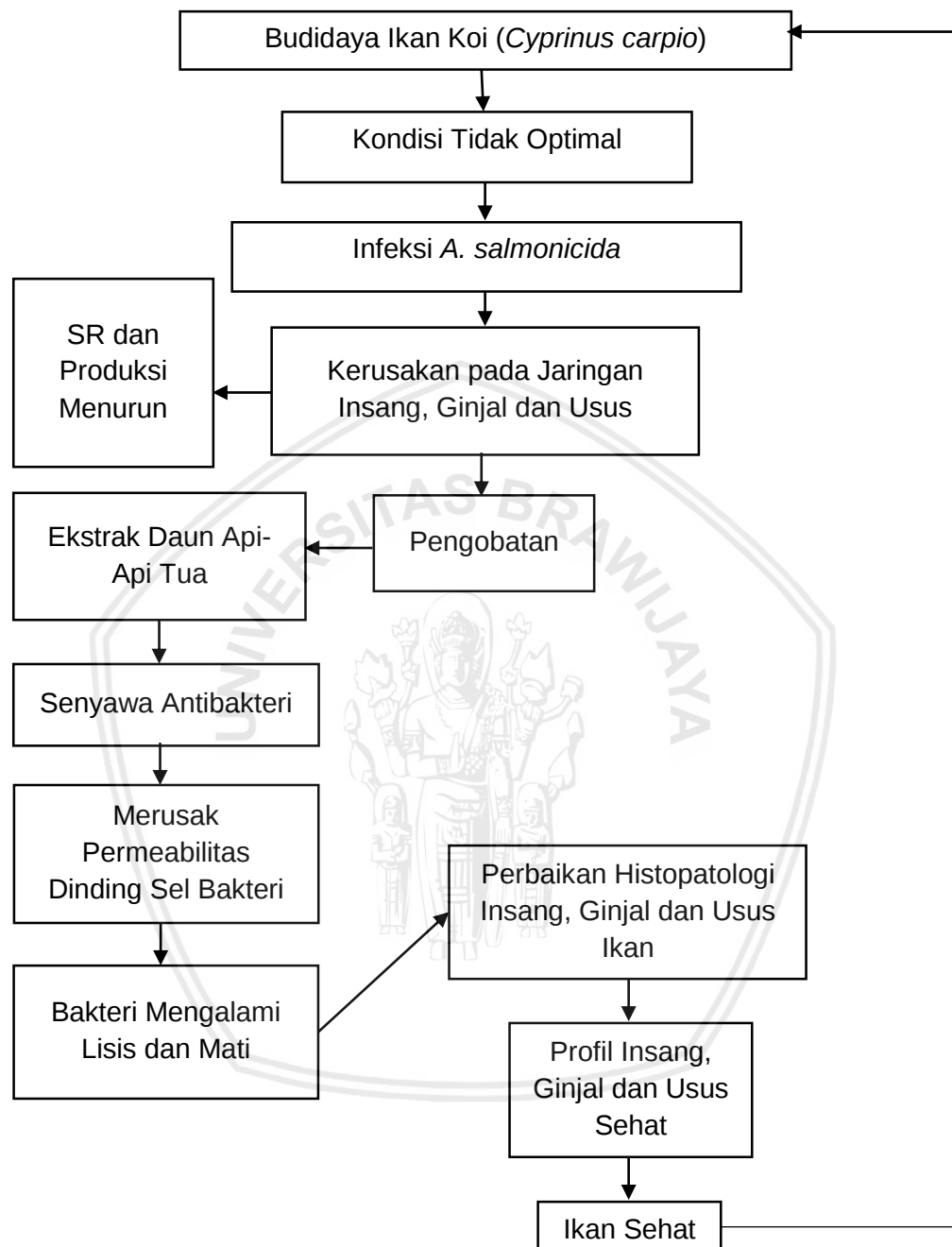
3.1 Landasan Teori

Berdasarkan data Kementrian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesian tahun 2015, Serangan bakteri *A. salmonicida* telah tersebar disebagian besar wilayah Indonesia. Bakteri *A. salmonicida* telah ditetapkan sebagai hama dan penyakit karantina (HPIK) golongan II yang perlu kewaspadaan tinggi. Menurut Muqsith (2013), *A. salmonicida* merupakan golongan bakteri yang membutuhkan penanganan lebih lanjut agar tidak tersebar. Menurut Wintoko, *et al.* (2013), bakteri *A. salmonicida* mampu menyerang semua spesies ikan air tawar tak terkecuali golongan cyprinid seperti ikan koi (*C. carpio*) yang akan menimbulkan penyakit yaitu *carp erythrodermatitis*.

Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut yaitu menggunakan ekstrak daun mangrove *A. marina*, dimana daun ini memiliki senyawa antibakteri yang dapat digunakan untuk mengobati ikan koi (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri. Ekawaty, *et al.* (2015) menyatakan bahwa senyawa yang terdapat dalam daun mangrove *A. marina* diantaranya yaitu terpenoid, flavonol, steroid dan senyawa glukosida yang berperan dalam menghambat pertumbuhan *A. salmonicida* dengan cara merusak porin yang akan berdampak pada pengurangan permeabilitas dinding sel bakteri yang berakibat terhambatnya pertumbuhan bakteri.

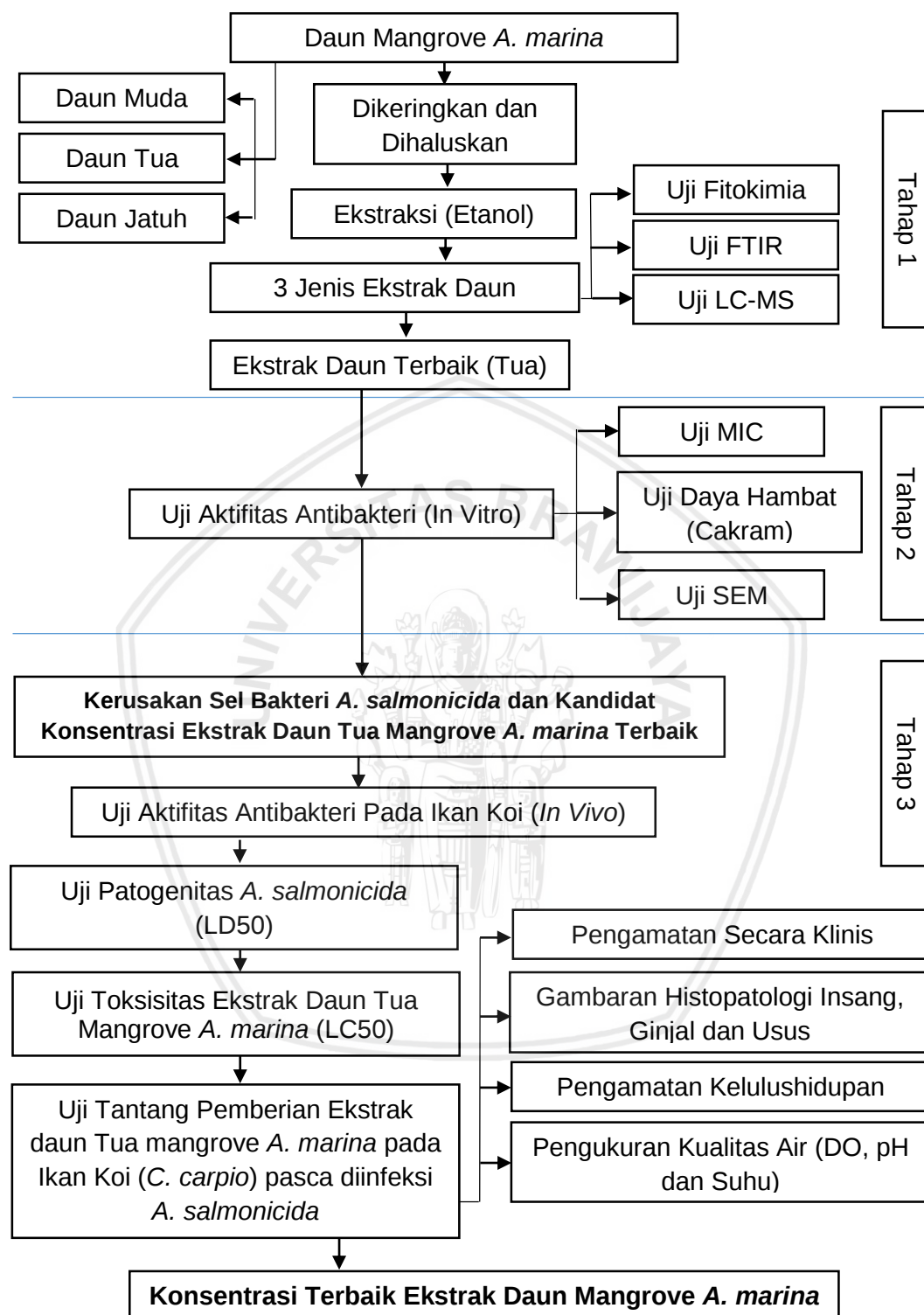
Berdasarkan penelitian Zahro dan Agustini (2013), antibakteri berperan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga mengalami kerusakan membran yang berdampak pada keluarnya komponen penting seperti asam nukleat, nukleotida dan protein. Pasca kerusakan, maka akan berdampak terhambatnya pertumbuhan atau matinya sel bakteri.

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka Konsep

3.3 Kerangka Operasional



Gambar 8. Kerangka Operasional

3.4 Penelitian Terdahulu

No.	Judul	Tahun	Peneliti
1.	Efektifitas perendaman benih ikan mas (<i>C. carpio</i> L.) dalam larutan perasan daun api-api (<i>A. marina</i>) terhadap penurunan jumlah <i>Trichodina</i> sp.	2014	Afifah, <i>et al.</i> Jurnal sains dan seni pomits. 3 (2) 2337-3520.
2.	Characterization of <i>A. marina</i> leaves fraction as antibacterial of <i>Aeromonas salmonicida</i>	2015	Ekawaty, <i>et al.</i> J. Life Sci. Biomed. 5 (5) : 149-152.
3.	Dietary Supplementation of <i>Avicennia marina</i> extract on immune protection and disease resistance in <i>Amphiprion sebae</i> against <i>V. alginoliticus</i>	2015	Dhayanithi, <i>et al.</i> Fish & Shelfish Immunology. 30 : 1-7.
4.	Stable carbon and nitrogen isotope compositions change with leaf age in two mangrove ferns	2015	Werth, <i>et al.</i> Flora. 210 : 80-86
5.	Antibacterial activity of mangrove <i>A. marina</i> leaves extract against <i>virgibacillus marismortui</i> and <i>Micrococcus luteus</i> bacteria	2017	Ulmursida, <i>et al.</i> AACL Bioflux. 10 (2) : 372-380.
6.	Effects of <i>A. marina</i> extract on <i>Labeo rohita</i> (Ham) challenged with <i>Pseudomonas fluorescens</i>	2018	Kumar, <i>et al.</i> Biotechnology research and innovation. 24 : 1-6.

Berdasarkan penelitian terdahulu mengenai mangrove *A. marina*, telah menunjukkan bahwa terdapat senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap infeksi bakteri patogen, salah satunya adalah *Aeromonas*. Namun belum ada publikasi tentang seberapa besar senyawa aktif daun mangrove *A. marina* berdasarkan umur daun secara *in vitro* terhadap bakteri *A. salmonicida* dan secara *invivo* yaitu pada efek pemberian ekstrak daun terbaik terhadap histopatologi insang ikan koi pasca infeksi *A. salmonicida*. Oleh karena itu, perlu dikaji lebih lanjut mengenai kandungan senyawa aktif terbaik berdasarkan umur daun beserta karakteristiknya dengan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak terhadap

bakteri secara *in vitro* maupun *in vivo*. Chen, et al. (2018) menyatakan bahwa daun muda dan daun tua memiliki kadar bioaktif yang berbeda berdasarkan hasil uji fitokimia. Werth, et al. (2015) menyatakan bahwa usia daun penting untuk dipelajari dikarenakan memiliki sifat fisiologis yang berbeda jika dibandingkan dengan daun tua, dimana tumbuhan bakau akan menggunakan konsentrasi garam dan gula untuk mentoleransi kondisi lingkungan dalam jaringannya. Selain itu, konsentrasi Na^+ dan Cl^- pada daun akan meningkat seiring pertambahan usia daun pada tanaman yang hidup pada daerah bergaram.



4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

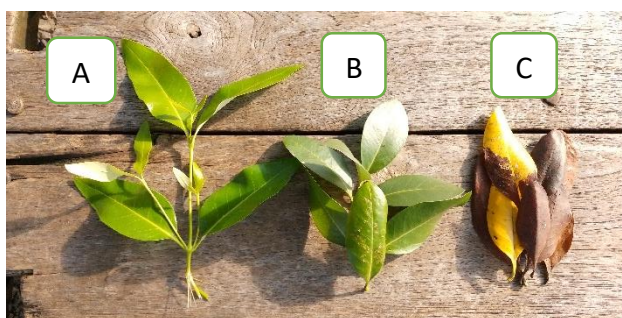
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret-Juni 2019 di Lab. Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Fakultas Kedokteran, dan Biosains Universitas Brawijaya Malang serta Lab. Politeknik Negeri Malang, Lab. Herbal UIN Malang dan Lab. Materia Medika Batu.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan uji dalam penelitian ini disajikan sebagai berikut: Ikan koi (*C. carpio*) dengan ukuran 7-10 cm dengan berat 8-15 gram berjumlah 270 ekor (Lampiran 2), Pakan yang diberikan berupa pelet ikushu 2mm yang diberikan pagi dan sore hari dengan FR 4%, daun mangrove *A. marina* yang diambil dari desa Betoyokauman, Manyar, Kabupaten Gresik, Jawa Timur, Indonesia dengan titik koordinat S 7°5'59.7876" E 112°33'47.412", isolat bakteri *A. salmonicida* yang berasal dari BUSKIPM Jakarta (Lampiran 5), kertas label, alkohol 70%, etanol 96%, kapas, tisu, spiritus, akuades, TSB (*Tryptone Soya Broth*), TSA (*Tryptone Soya Agar*), aluminium foil, benang kasur, kertas bekas, yellow tip, etanol 96%, blue tip, NaCl, plastik wrap, sampel insang ikan koi, kertas cakram, sarung tangan dan masker. Dimana perbedaan morfologi daun mangrove api-api disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Morfologi Daun *A. marina* Muda (A), Tua (B) dan Jatuh (C)

4.2.2 Alat Penelitian

Alat uji dalam penelitian ini disajikan sebagai berikut: toples plastik 10 liter, seser 15cm, pipet tetes, timbangan digital ketelitian 0.01 gr, mikroskop cahaya oregon, aerator set, cover glass, selang aerasi, batu aerasi, selang air, termometer, botol film, DO meter, pH meter, nampan, botol vial, hotplate, toples plastic 10lt, autoklaf, kulkas, jarum ose, sprayer, spatula, gunting, tabung reaksi, laminar air flow, mikropipet, inkubator, rak tabung reaksi, bunsen, gelas ukur 10 ml, 50 ml, 100 ml dan 500 ml, tube, lap basah, erlenmeyer, spuit 1 ml, vortex, washing bottle, spektrofotometer, toples kaca, corong kaca, blender, beaker glass 100 ml, FT-IR, SEM dan LC-MS, *rotary vacuum evaporator*.

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Wasis (2008) menyatakan bahwa penelitian metode eksperimen merupakan metode memanipulasi variabel dan menguji hipotesa yang berbentuk sebab-akibat serta menguji perubahan akibat pemanipulasian. Efek manipulasi disebut variabel dependen. Selama memanipulasi perlakuan, peneliti akan mengontrol variabel luar (*extraneous variables*) untuk mengetahui perubahan yang terjadi akibat hasil manipulasi dan bukan akibat variabel lainnya. Sehingga, penelitian eksperimen haruslah terdapat unsur kelompok kontrol, perlakuan dan interverensi perlakuan.

4.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pratisto (2004) menyatakan bahwa RAL merupakan rancangan percobaan paling sederhana. Sastrosupadi (2000) menyatakan bahwa RAL digunakan untuk percobaan dengan media atau tempat percobaan yang homogen, oleh karena itu, RAL banyak digunakan dalam percobaan di laboratorium, peternakan dan rumah kaca. Akibat media homogen, maka akan menyebabkan media atau tempat

percobaan tidak memberikan efek atau pengaruh pada objek yang diamati dimana model RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

μ : nilai rata-rata

T_i : pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini menggunakan 2 kontrol (positif dan negatif) sebagai pembanding. Kontrol positif dengan infeksi bakteri dan pemberian ekstrak murni, sedangkan kontrol negatif dengan perlakuan infeksi bakteri namun tanpa pemberian ekstrak, sehingga diperoleh 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan dimana konsentrasi ditentukan dari hasil pada Lampiran 7. Perlakuan dengan pemberian ekstrak daun tua mangrove *A. marina* dalam penelitian ini dirinci sebagai berikut :

Perlakuan A : perendaman pada ekstrak daun 75 ppm

Perlakuan B : perendaman pada ekstrak daun tua 125 ppm

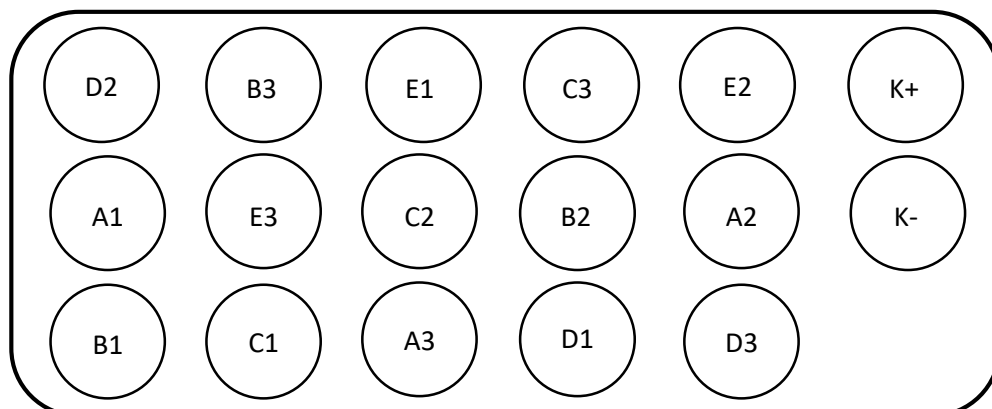
Perlakuan C : perendaman pada ekstrak daun tua 175 ppm

Perlakuan D : perendaman pada ekstrak daun tua 225 ppm

Perlakuan E : perendaman pada ekstrak daun tua 275 ppm

Perlakuan Kontrol (+) : infeksi bakteri dengan pemberian antibiotik 50 ppm

Perlakuan Kontrol (-) : infeksi bakteri namun tanpa pemberian ekstrak



Gambar 10. Denah Penelitian

Keterangan :

A-B-C = Perlakuan Penelitian

K(+) = Kontrol Positif

K(-) = Kontrol Negatif

1-2-3 = Perlakuan Ulangan

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Penelitian Tahap 1

4.5.1.1 Pembuatan Ekstrak Daun Mangrove *A. marina*

Uji antibakteri dengan menggunakan daun mangrove *A. marina* dilakukan dalam beberapa tahap, tahap awal yaitu daun diambil dari ekosistem mangrove sekitar tambak daerah Sembayat, Gresik, Jawa Timur, Indonesia. Sampel daun (daun muda, daun tua dan daun jatuh) kemudian dikumpulkan sebanyak 2kg tiap sampel dan dikeringkan, selanjutnya simplisia kering dihaluskan hingga menjadi serbuk menggunakan blender. Setiap sampel serbuk direndam dalam 1 liter pelarut etanol. Setelah direndam selama 24 jam, sampel dipisahkan dari ampas dengan proses penyaringan menggunakan kertas saring. Jika telah terpisah, filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak daun mangrove *A. marina* murni dan ekstrak dapat disimpan dalam kulkas.

Menurut Ulmursida, *et al.*, (2017) dan Ekawaty, *et al.* (2015) perbandingan pelarut dan bahan sampel yaitu minimal 1:3 dan selanjutnya direndam seluruhnya selama minimal 24 jam. Menurut Kumar, *et al.* (2018), daun mangrove setelah diambil, kemudian dicuci dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering, kemudian daun dihaluskan menggunakan blender. Bubuk daun hasil penggerusan ditarik senyawa aktifnya menggunakan etanol. Dimana senyawa aktif berupa ekstrak dapat disimpan pada suhu 4°C. Menurut Ekawaty, *et al.* (2015), proses evaporasi dilakukan pada suhu 40°C, sedangkan penarikan bahan aktif dari

beberapa pelarut dalam uji antibakteri berupa daya hambat menggunakan cakram mulai dari yang terbaik secara berurutan yaitu etanol, n-heksan dan etil asetat.

4.5.1.2 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji yang berguna untuk memberi gambaran senyawa dalam ekstrak uji yang mencakup pemeriksaan alkaloid, saponin, terpenoid, tanin, flavonoid dan polifenol (Simaremare, 2014). Langkah kerja uji fitokomia adalah sebagai berikut :

- Uji Alkaloid

5 ml ekstrak daun mangrove *A. marina* diberi H_2SO_4 2 ml kemudian dikocok hingga terbentuk 2 lapisan, lapisan asam teratas diambil dan selanjutnya ditetesi pereaksi Meyer (Wagner dan Dragendorf). Ekstrak yang positif yang mengandung alkaloid akan memiliki endapan putih, coklat dan merah jingga.

- Uji Flavonoid

3 ml ekstrak daun mangrove *A. marina* diberi 0,5 gr serbuk Mg, 1 ml HCL pekat dan dikocok kuat. Jika hasil positif mengandung flavonoid, maka akan muncul warna merah, kuning atau jingga.

- Uji Saponin

Air panas (5 ml) dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 0,5 gram ekstrak daun mangrove *A. marina* dan selanjutnya dihomogenkan serta dibiarkan selama 10 menit. Ekstrak akan positif mengandung saponin apabila terbentuk buih yang stabil.

- Uji Steroid

Ekstrak daun mangrove *A. marina* (3 ml) diberi 3 tetes asam asetat anhidrat serta 1 tetes asam sulfat pekat secara berurutan, kemudian dikocok secara perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika mengandung steroid maka akan terlihat warna hijau atau biru kehitaman.

- Uji Tanin

1 ml ekstrak daun mangrove *A. marina* ditambahkan 1 ml FeCl_3 1 %, apabila positif tanin, maka akan terbentuk warna hijau kehitaman.

- Uji Triterpenoid

3 ml ekstrak daun mangrove *A. marina* ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat serta 1 tetes asam sulfat pekat (berurutan), kemudian kocok secara perlahan dan biarkan beberapa menit. Jika mengandung triterpenoid maka akan terbentuk warna merah atau ungu.

4.5.1.3 Uji Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)

Proses analisa senyawa menggunakan FT-IR yaitu dengan mengambil sebanyak 0.5 mg sampel kemudian dicampurkan dengan 180 mg KBr dan dihomogenkan sampai membentuk pelet. Lalu dilakukan pengukuran dengan spektrum FT-IR dengan panjang gelombang $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ dan dianalisa hasilnya (Rohaeti, *et al.*, 2011). Sampel sebelum diuji FT-IR terlebih dahulu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit dan sampel kering dicampur dengan pellet KBr yang digunakan dalam pengukuran FT-IR. Spektrum direkam dalam kisaran $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ menggunakan spektrometer Thermo Nicolet Nexus 670 dalam mode reflektansi difus yang beroperasi pada resolusi 4 cm^{-1} (Mallikarjuna, *et al.*, 2011).

Untuk menghilangkan residu atau senyawa biomassa bebas yang bukan ligan penutup nanopartikel dapat dilakukan dengan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit dan suspensi yang dihasilkan disebarkan kembali dalam 10 ml air suling steril. Proses sentrifugasi dan redispersi diulangi tiga kali. Setelah itu, suspensi freeze dried untuk mendapatkan bubuk kering. Akhirnya, nanopartikel kering dianalisis oleh FTIR Nicolet Avatar 660 (Nicolet, USA) (Jain, *et al.*, 2009).

4.5.1.4 Uji Kromatografi Cair (LC-MS)

Uji sampel dilakukan dengan peralatan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi Hypersil Gold ($50\text{mm} \times 2.1\text{mm} \times 1.9\mu\text{m}$). UHPLC merk

ACCELLA type 1250 buatan Thermo Scientific yang terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampler termostatik dikendalikan personal computer melalui program x-calibur 2.1. Pelarut A = 0,1% asam format dalam Air dan B = 0,1% asam formiat dalam acetonitrile. Sebuah gradient fase gerak dengan kecepatan 300 $\mu\text{L}/\text{menit}$ dengan pengaturan 0.0-0.6 menit 10%B, 0.6-5.0 menit 55%B, 5.0-5.5 menit 55%B, 5.5-5.75 menit 10%B, 5.75-7.5 menit 10%B. Volume injeksi pada LC adalah 2 μL pada suhu 16°C. Kolom dikontrol pada 30°C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 16°C. Penggunaan MS/MS Triple Q (quadrupole) spektrometer massa TSQ quantum access max dari thermo finnigan dengan sumber ionisasi ESI (electrospray ionization) dikendalikan oleh software TSQ tune yang dioperasikan dengan mode negative. Penentuan kualitatif dengan metode SRM (selecterd reaction monitoring) diatur pada Tabel 2. Dimana Kondisi ionisasi ESI adalah sebagai berikut: tegangan spray 2.5 kV; Suhu penguapan 250°C; Suhu kapiler, 300°C; nitrogen sebagai sheath gas pressure 40 psi, dan Aux gas pressure 10 psi dengan gas argon.

Tabel 2. Optimasi parameter massa analit

Ion Molekul	Precursor Ion Q1 (m/z)	Product Ion Q2 (m/z)
Quercetin	301	179
Dihydroquercetin	303	286
Berberine	334	288
Papaverine	338	292
Quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside	433	300
Quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside	463	301
Isohametin-7-O-pentoside	477	301
Rutin	609	300

4.5.2 Penelitian Tahap 2 (*Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro*)

4.5.2.1 Uji SEM (*Scanning Elektron Microscopy*)

Metode preparasi SEM sampel bakteri *A. salmonicida* yang dilakukan di Biosains Universitas Brawijaya dilakukan dalam beberapa tahap, tahap pertama

yaitu mengkultur bakteri pada media cair (TSB) selama 18-24 jam hingga kepadatannya 10^{13} cfu/ml dengan mengukur OD, selanjutnya mengambil 1ml kultur dan disentrifuse sebanyak 1x (2000gr, 4°C) selama 10 menit. Langkah selanjutnya yaitu mencuci sampel sebanyak 2x menggunakan NaCl fisiologis dan disentrifuse (2000gr, 4°C) selama 10 menit. Setelah disentrifuse selanjutnya diinkubasi menggunakan glutaraldehyde 3% selama 30 menit dan diresuspendedkan. Setelah langkah tersebut selesai selanjutnya dicuci menggunakan PBS 3X dan disentrifuse 3x10 menit (2000gr, 4°C) dan diambil menggunakan pipet dan ditaruh pada *cover glass* yang kemudian dikeringanginkan diatas bunsen. Setelah kering, sampel didehidrasi menggunakan alkohol berseri (30, 50, 70, 80, 90, dan 96%), selanjutnya dicoating menggunakan emas dan sampel dapat diamati menggunakan mikroskop SEM TM 3000. Perlakuan yang diuji yaitu *A. salmonicida normal*, perlakuan kedua *A. salmonicida* diberi ekstrak daun mangrove *A. marina* berkonsentrasi 225ppm dan pemberian chloramphenicol berkonsentrasi 50ppm. Kemudian kerusakan sel *A. salmonicida* dianalisis dengan membandingkan foto hasil SEM (kondisi normal, pemberian antibiotik dan pasca bakteri diberi ekstrak daun mangrove *A. marina* sehingga tampak gambaran kerusakan dinding sel bakteri. Dari hasil analisis kerusakan tersebut kemudian dilanjutkan pada tahap uji antibakteri selanjutnya. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Nursidika, *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa dalam menentukan mekanisme antimikroba dapat dilakukan dengan metode SEM. Prinsip kerja dari SEM yaitu pembuatan gambar berdasarkan deteksi elektron baru (sekunder) atau pantul yang tampak atau muncul dari permukaan sampel ketika permukaan sampel tersebut dipindai dengan menggunakan sinar elektron. Elektron pantul yang terdeteksi kemudian akan diperkuat sinyalnya. Selanjutnya, besaran amplitudo ditampilkan dalam gradasi gelap terang di layar monitor CRT (*cathoderay tube*). Layar CRT tersebut akan menunjukkan struktur objek yang

sudah diperbesar sehingga tampak jelas. Ketika beroperasi, SEM tidak membutuhkan sampel yang ditipiskan, oleh karenanya ia dapat digunakan untuk melihat objek dengan sudut pandang 3 dimensi.

4.5.2.2 Uji MIC (*Minimum Inhibiton Concentration*)

MIC menggunakan TSB steril (4,5ml) yang selanjutnya dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ekstrak daun tua mangrove *A. marina* (0.5ml) ditambahkan pada setiap tabung reaksi berisi TSB dengan dosis yang telah ditentukan. Dosis pada uji MIC berdasarkan uji log (penelitian pendahuluan) dalam penentuan dosis awal, pasca uji log diperoleh hasil, maka hasil tersebut selanjutnya akan dibuat *range* yang lebih kecil untuk dilakukan uji MIC. Uji MIC ini menggunakan 2 kontrol (positif dan negatif), dimana kontrol positif dengan pemberian antibakteri sintetis (*Chloramphenicol*) sebanyak 50 ppm dengan volume 0,5ml dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak. selanjutnya tiap tabung reaksi diberi 0,1 ml isolat bakteri (10^8 CFU/ml) dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, media uji diperiksa tingkat kekeruhan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (panjang gelombang 570 nm).

Rinawati (2011) menyatakan bahwa MIC adalah untuk mengetahui konsentrasi ekstrak minimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Metode MIC dilakukan secara dilusi cair. Menurut Suciati, *et al.* (2012), pengujian MIC ekstrak mangrove dapat dilakukan dengan menggunakan media *broth* steril yang kemudian ditambahkan konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan serta diberi bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/ml yang selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Sebagai kontrol positif, Maftuch, *et al.* (2018) menyatakan bahwa penggunaan *chloramphenicol* dapat digunakan sebagai antibakteri *A. salmonicida* dengan dosis 5ppm. Apriyanto, *et al.* (2014) menyatakan bahwa langkah awal dalam uji MIC yaitu memasukkan media *broth* kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5ml kedalam tabung reaksi perlakuan serta menambahkan 0,5ml antibiotik (kontrol

positif) atau ekstrak sesuai dosis yang telah ditentukan dan menambahkan isolat bakteri sebanyak 0,1 ml.

4.5.2.3 Uji Cakram

Uji cakram berguna agar diketahui daya hambat dari pemberian ekstrak daun tua mangrove *A. marina* yang dilihat dari luasan zona bening disekeliling kertas cakram. Dimana prosedur kerja uji cakram adalah sebagai berikut:

- Cawan petri bermedia TSA steril disiapkan terlebih dahulu.
- *Paper disk (blank)* steril direndam dalam larutan daun mangrove *A. marina* dengan dosis yang telah ditentukan.
- Perlakuan dosis berdasar dari Uji MIC sehingga dosis telah sesuai untuk perlakuan. dimana konsentasi yang digunakan yaitu 75, 125, 175, 225 dan 275 ppm. .
- Bakteri dengan kepadatan yang telah ditentukan diambil sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan pada cawan ber-TSA serta disebar pada seluruh permukaan TSA menggunakan *triangle*.
- Setelah kertas cakram direndam, kertas cakram dapat diambil dan diletakkan pada bagian tengah media agar.
- Selanjutnya cakram diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 32°C.
- Pengamatan media dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (hambat) disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong digital.

Saptiani, *et al.* (2018) menyatakan bahwa dalam uji cakram, media yang digunakan sebagai nutrisi bakteri yaitu menggunakan media TSA steril. Menurut Suciati, *et al.* (2012), Uji antibakteri dapat dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,1 ml biakan bakteri (10^8 CFU/ml) dan dituangkan ke dalam cawan petri ber-TSA padat. Selanjutnya paper disk yang telah direndam dalam konsentrasi ekstrak (3 menit (Jampil, *et al.* 2017)) diletakkan pada permukaan media dalam cawan uji

dan diinkubasi selama 24 jam. Menurut Ulmursida, *et al.* (2017) dalam menguji seberapa besar dampak dari pemberian ekstrak dan apabila metode difusi tersebut menunjukkan hasil positif, maka hasil luas zona bening akan diperoleh dengan cara mengurangi diameter zona bening dikurangi diameter kertas cakram (6mm). Sari dan Hasibuan (2017) menyatakan bahwa aktifitas daya hambat dapat dilihat dari seberapa penampakan zona bening di sekitar kertas cakram. Dimana klasifikasi respon hambat pertumbuhan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Klasifikasi Respon Daya Hambat Pertumbuhan Menurut Pan, *et al.* (2009).

Diameter zona bening	Respon hambat pertumbuhan
0 - 3 mm	Lemah
3 - 6 mm	Sedang
>6 mm	Kuat

4.5.3 Penelitian Tahap 3 (Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Vivo*)

4.5.3.1 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Wadah pemeliharaan dan uji disterilkan terlebih dahulu dengan cara dicuci menggunakan sabun, direndam dalam kalium permanganat (KMnO_4), selanjutnya dibilas, direndam air steril selama 24 jam dan dikeringkan. Langkah selanjutnya yaitu menata wadah agar tidak ada pengaruh lingkungan yang signifikan dan mudah dalam proses pengamatan (Saptiani, *et al.* 2018). Ikan uji yang digunakan yaitu ikan koi (*C. carpio*) yang berasal dari Blitar dengan jumlah 258 ekor (LC50 24 ekor, LD50 24 ekor dan perlakuan 210 ekor) ukuran 5-8 cm selanjutnya diaklimatisasi selama 7 hari pada akuarium hingga ikan tampak sehat (lincah dan nafsu makan normal) dan siap digunakan.

Menurut Jampil, *et al.* (2017), dalam menguji seberapa efektif pemberian ekstrak mangrove terhadap ikan *C. carpio* yang terinfeksi *A. salmonicida* maka

dapat dilakukan dengan menggunakan ikan berukuran 5-8cm dengan perbandingan jumlah ikan dan volume air (L) pada setiap perlakuan yaitu 1:1. Widiastuti (2009) memaparkan bahwa selama penelitian, ikan diberi pakan dengan FR sebanyak 4% dengan frekuensi pemberian pakan pada pagi dan sore hari. Setelah diaklimatisasi, maka ikan siap digunakan. Persiapan alat perlu dilakukan guna mendukung kondisi optimal hidup ikan agar memperoleh hasil maksimal yang meliputi aerator set, DO meter, pH meter, serta penataan toples plastik sebagai tempat pemeliharaan.

4.5.3.2 Patogenitas *A. salmonicida* dengan LD50 (*Lethal Dossage 50*)

Pengujian LD50 (*Lethal Dossage 50*) dilakukan untuk menentukan waktu yang dibutuhkan bakteri agar dapat membunuh sebanyak 50% ikan uji (Jampil, *et al.* 2017). Pada awalnya, bakteri dikultur pada media TSB (*Tryptone Soya Broth*) dan diukur kepadatannya dengan menggunakan regresi. Selanjutnya dilakukan pengenceran sehingga diperoleh kepadatan 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 dan 10^4 CFU/ml. Kemudian ikan sehat disiapkan dengan perbandingan jumlah ikan dan volume media yang digunakan yaitu 1:1. Pengamatan kematian ikan selanjutnya dilakukan selama 96 jam karena merupakan waktu yang umum digunakan dalam bioassay berskala pendek (Wulandari, *et al.* 2014). Dimana pada uji LD50 ini menggunakan perbandingan ikan dan media air sebesar 1:1. Sedangkan untuk perhitungan suspensi bakteri dihitung menggunakan rumus berdasar Taufik dan Setiadi (2012) sebagai berikut :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan :

N1 : Kepadatan populasi di media TSB (CFU/ml)

N2 : Kepadatan populasi yang dikehendaki (CFU/ml)

V1 : Volume suspensi bakteri dalam media TSB yang dibutuhkan

V2 : Volume air dalam wadah pemeliharaan ikan

Uji LD50 dilakukan pada toples berkapasitas 10 liter dengan kepadatan bakteri yang diberikan adalah sebagai berikut :

A : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^0 CFU/ml

B : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^4 CFU/ml

C : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^5 CFU/ml

D : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^6 CFU/ml

E : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^7 CFU/ml

F : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^8 CFU/ml

G : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^9 CFU/ml

H : Ikan koi diinfeksi *A. salmonicida* dengan kepadatan sebesar 10^{10} CFU/ml

Selanjutnya, setelah data diperoleh maka dimasukkan dalam perhitungan

nilai LD50 menurut Assagaf, *et al.* (2013) sebagai berikut :

$$\text{Log LD50} = \text{Log D} + d (f + 1)$$

Keterangan :

D = dosis terkecil yang diberikan

d = Logaritma kelipatan dosis

f = Faktor (Tabel Weil)

4.5.3.3 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* dengan LC50

LC50 (*Lethal Concentration*) berguna untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun mangrove tua yang dapat menyebabkan 50% organisme uji mengalami kematian (Suciati, *et al.* 2012). Ikan (*C. carpio*) disiapkan sebanyak 24 ekor beserta wadah pengamatan bervolume media 4L dengan konsentrasi ekstrak daun yang telah ditentukan dengan menggunakan rumus pengenceran seperti pada LC50 dan diamati berturut-turut hingga 96 jam. Pengujian diulang apabila ikan pada perlakuan kontrol mengalami kematian diatas 10% (Taufik dan Setiadi, 2012). Uji toksisitas sampel yang hendak diuji menurut Puspitasari, *et al.* (2018) ekstrak akan bersifat toksik apabila diperoleh nilai LC50 <1000 ug/ml.

Uji LC50 dilakukan pada toples berkapasitas 4 liter dengan konsentrasi ekstrak yang diberikan adalah sebagai berikut :

- A : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 0 ppm
 B : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 75 ppm
 C : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 125 ppm
 D : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 175 ppm
 E : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 225 ppm
 F : Ikan koi dengan pemberian ekstrak daun tua *A. marina* sebanyak 275 ppm

4.5.3.4 Infeksi *A.salmonicida* dan Perendaman Ekstrak

Uji patogenitas dilakukan dengan metode perendaman dengan kepadatan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan. Penggunaan metode perendaman dipilih karena bersifat lebih aplikatif. Cara mengendalikan *Aeromonas* sp. dapat dilakukan dengan melalui perendaman, penyuntikan atau dicampur dengan pakan (Amanu, *et al.*, 2014). Penginfeksian ikan dilakukan dengan pemberian bakteri berkepadatan 10^8 cfu/ml karena pada dosis tersebut telah teruji mampu merusak sel (patogen) (Mangunwardoyo *et al.*, 2010) dimana ikan direndam selama 30 menit (Hardi, *et al.* 2014). Pengobatan dengan pemberian ekstrak *A. marina* diberikan dengan cara menambahkan ekstrak daun tua mangrove *A. marina* berkonsentrasi 75, 125, 175, 225 dan 275 sesuai perlakuan dengan tiga kali pengulangan selama 24 jam (Pratama, *et al.* 2017), kemudian dipindahkan pada media baru yang selanjutnya ikan dipelihara dan diamati hingga 168 jam (7 hari) (Hardi, *et al.* 2014).

Setelah pengobatan dan data telah didapatkan, kemudian data antar perlakuan dianalisis dan dibandingkan dengan perlakuan kontrol, Untuk melihat efek yang diberikan dapat dilakukan uji histopatologi, dimana organ diambil dan disimpan dalam botol dengan kadar formalin menurut Aminah, *et al.* (2014) sebesar 10% sebelum dilakukan pembedahan.

4.5.3.5 Kelulushidupan Ikan (SR)

SR ikan koi (*C. carpio*) dilihat pasca pemeliharaan dengan cara menghitung jumlah ikan mati dan hidup dari tiap perlakuan (kontrol maupun uji).

Jumlah ikan mati dan ikan hidup kemudian dimasukkan dalam rumus SR (*Survival Rate*) (Aniputri, *et al.*, 2014) sebagai berikut:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Kelulushidupan (%)

N_t : Jumlah ikan diakhir penelitian (ekor)

N_o : Jumlah ikan diawal penelitian (ekor)

4.5.3.6 Pengujian Histopatologi Insang, Ginjal dan Usus

Andayani, *et al.* (2018) menyatakan bahwa pengambilan organ dilakukan pada semua ikan uji. Jaringan tersebut kemudian dibersihkan menggunakan aquades dan dimasukkan dalam botol plastik telah berisi formalin 10%. Langkah selanjutnya yaitu membuat preparat histopatologi. Dimana langkah-langkah yang dilakukan sebagai berikut :

a. Tahap Fiksasi

Sampel insang ikan uji diambil kemudian direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.

b. Tahap Dehidrasi

Memasukkan sampel ke dalam botol beralkohol dengan kadar berbeda (alkohol 70%, 80%, 96% dan alkohol *absolute*).

c. Tahap *Clearing*

Tahap *clearing* berguna untuk mentransparankan dan menggantikan larutan alkohol dari jaringan insang yang dilakukan dengan cara mencelupkan insang ke dalam larutan xylol 1 selama 1 jam dan xylol 2 selama 1 jam.

d. Tahap Impregnasi

Tahap impregnasi merupakan tahap yang bertujuan agar keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (embedding) sama dan dapat dilakukan dengan cara mencelupkan bahan tersebut ke parafin cair pada suhu 56-60°C selama 2 jam, kemudian mencelupkannya kembali dalam paraffin cair pada suhu 56-60°C selama 2 jam.

e. Tahap Embedding (Pengeblokan)

Tahapan ini berguna agar penyayatan dengan menggunakan mikrotom menjadi lebih mudah. Setelah penyayatan (bahan sudah diblok selesai), selanjutnya hasil sayatan dimasukkan ke dalam waterbath (suhu 45°C), kemudian hasil sayatan yang terbaik dipilih dan siapkan obyek glass guna persiapan pewarnaan HE (Haematoxylin Eosin). Setelah itu, keringkan pada oven dengan suhu 45°C selama 24 jam.

f. Teknik Pewarnaan Jaringan HE (Haematoxylin Eosin)

Pewarnaan HE dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu deparafinisasi, hidrasi, cat utama, dehidrasi dan clearing.

g. Tahap Mounting

Merupakan prosedur terakhir dalam pembuatan preparat sebelum dapat diamati yang bertujuan untuk mempermudah proses pengamatan. Preparat selanjutnya dilem dengan entelen new, kemudian ditutup dengan cover glass namun jangan terdapat gelembung. Selanjutnya preparat dibiarkan dalam suhu ruang hingga lem mengering dan diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 400x.

4.6 Parameter Penunjang Penelitian

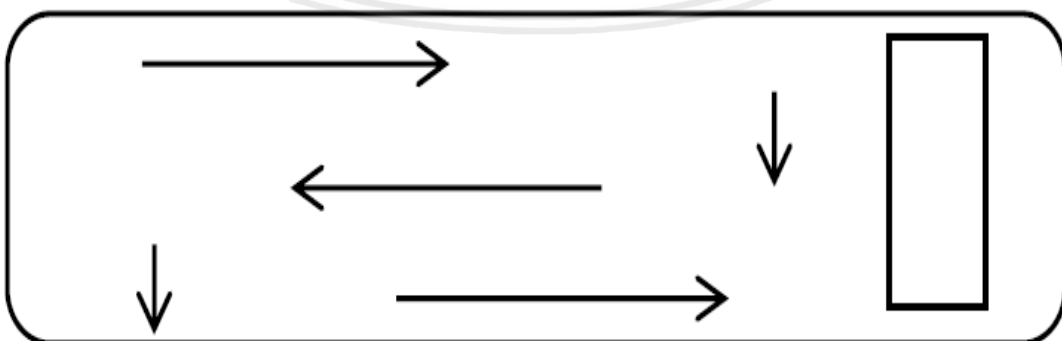
Paramater penunjang yang dapat mendukung data pada panelitian ini antara lain :

- Suhu dan DO yang diukur menggunakan DO meter
- pH air yang diukur dengan pH meter ATC
- Pengukuran dilakukan pada pukul 08.00 WIB dan 17.00 WIB.

Menurut Nasution, *et al.* (2014), pengukuran kualitas air seperti DO, pH dan suhu dapat dilakukan pada pagi dan sore hari. Hal serupa juga dinyatakan oleh Khalil, *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa dalam mengukur kualitas air (DO, pH dan suhu) dapat dilakukan pada pukul 08.00 WIB dan 17.00 WIB disetiap harinya.

4.7 Analisis Data

Data kemudian analisis secara statistik dengan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengujian dilakukan agar diketahui pengaruh perlakuan (variabel-variabel bebas) terhadap respon tiap parameter yang diukur (uji F). Apabila nilainya berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil) untuk menentukan perbedaan setiap perlakuan (Sastrosupadi, 2000). Sedangkan agar diketahui hubungan antara perlakuan dan jumlah kerusakan jaringan insang, dilakukanlah uji polynomial orthogonal. Data selanjutnya dihitung menggunakan Ms. Excel 2013.



Gambar 11. Alur Skoring (Gerak Zig-Zag) (Siswandari, 2005).

Analisis yang digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan insang ikan koi (*C. carpio*) pasca diberi perlakuan, maka selanjutnya dilakukanlah skoring

dengan menghitung area yang berwarna yang dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Pembacaan area dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala, selanjutnya turun ke bawah dan kembali bergeser ke arah ekor (gerak zig-zag). Dimana alur perhitungan skoring disajikan pada Gambar 11.

Menurut Maftuch, *et al.* (2015), presentase nilai skoring terhadap persentase tingkat kerusakan disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai Skoring dan Presentase Kerusakan Jaringan

Nilai Skoring	Presentase kerusakan (%)	Keterangan
0	0	Tidak Rusak
1	1-25	Sedikit
2	26-50	Sedang
3	51-75	Banyak
4	76-100	Sangat Banyak

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penelitian Tahap 1

5.1.1 Ekstraksi Daun Mangrove *A. marina*

Ekstraksi daun mangrove *A. marina* yang dipisahkan berdasarkan usia (muda, tua dan jatuh) menunjukkan adanya perbedaan warna dan jumlah rendemen. Hasil ekstraksi serbuk daun mangrove *A. marina* disajikan pada Tabel 5 dan selengkapnya disajikan pada Lampiran 4.

Tabel 5. Hasil Ekstraksi 150gr Daun Mangrove *A. marina*

Usia	Warna Ekstrak	Berat Ekstrak (gr)	Rendemen (%)
Muda	Hijau Tua	3.06	2.04
Tua	Hijau Tua	5	3
Jatuh	Kuning	4.29	2.86

Tabel 5 menunjukkan bahwa daun tua memiliki kadar rendemen tertinggi sebesar 3% dan terendah pada daun muda sebesar 2.04%. Salah satu penyebab utama daun tua memiliki rendemen tertinggi yang mencapai 3% dikarenakan daun tua memiliki akumulasi senyawa metabolit sebagai bentuk pertahanan dirinya terhadap kondisi lingkungan. Berdasarkan uji fenolik oleh Hanin dan Pratiwi (2017), daun dewasa memproduksi metabolit sekunder fenolik yang relatif tinggi serta didukung juga oleh Anwar, *et al.* (2017) dengan membandingkan kadar fenolik berdasarkan usia daun pada tanaman, dimana daun tua memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mensintesis metabolit sekunder yang menyebabkan kandungan fenolik dan flavonoid pada daun dewasa cenderung lebih tinggi. Menurut Thi dan Hwang (2014), daun tua memiliki kecenderungan untuk mempunyai kandungan bioaktif yang lebih banyak dibandingkan daun muda, dimana senyawa bioaktif tersebut merupakan hasil dari proses metabolit sekunder tanaman.

5.1.2 Uji Fitokimia

Hasil skrining fitokimia 6 senyawa di 3 usia daun (muda, tua dan jatuh) menunjukkan hasil yang berbeda dan memberikan informasi bahwa daun tua memiliki kadar bioaktif yang lebih beragam daripada daun jatuh dan daun muda. Dimana hasil skrining fitokimia disajikan pada Tabel 6 dan lebih lengkap disajikan pada Lampiran 4.

Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Serbuk Daun Mangrove *A. marina*

Sampel	Identifikasi Senyawa					
	Flavonoid	Alkaloid	Tanin	Triterpenoid	Steroid	Fenol
Muda	-	-	+	-	-	+
Tua	+	+	+	+	-	+
Jatuh	+	+	+	-	-	+

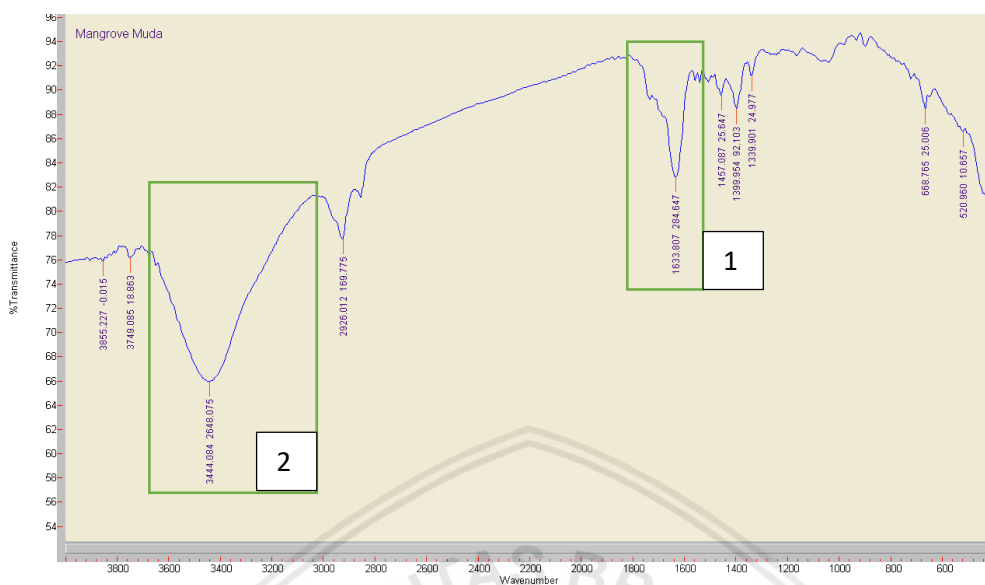
Menurut Permata dan Asben (2017), jumlah bioaktif pada daun dipengaruhi oleh perbedaan usia dimana dapat dicirikan dengan perbedaan warna daun. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Karimuna (2015) bahwa kadar bioaktif daun akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia bahkan kandungan pada tiap posisi daun dalam tangkai memiliki perbedaan yang sangat dipengaruhi oleh ketersediaan unsur hara pada daerah tersebut. Jones (1998) menyatakan bahwa daun tua juga merupakan masa dimana kekurangan unsur N dapat diketahui. Unsur hara N sangat berguna dalam pertumbuhan tanaman, dan apabila ia berkombinasi dengan unsur lain, maka akan menghasilkan senyawa bioaktif seperti basa purin, alkaloid dan sebagainya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Schimel dan Hattenschwiler (2007), menyatakan bahwa daun jatuh yang berada di permukaan tanah akan mengalami proses dekomposisi yang dapat menyebabkan berkurangnya kandungan dari daun tersebut, dimana daun yang memiliki kandungan N tinggi akan mentransfer N tersebut akibat adanya pergerakan nitrogen pada mikrosit

yang merupakan kontrol penting dalam kontrol siklus N. Pergerakan transfer ini akan menyebabkan dekomposisi seresah yang tidak merata. Hal tersebut merupakan hasil dari mineralisasi N oleh mikroba yang memiliki akses pertama ke N untuk mengontrol seberapa banyak N yang dipindahkan ke mikrosit lain dalam sistem. Karimuna (2015) menyatakan bahwa unsur hara dan perbedaan umur daun berkorelasi lurus pada jumlah bioaktif yang terkandung dalam daun tersebut, dimana daun tua memiliki kadar bioaktif yang lebih tinggi daripada daun muda. Sehingga dari pernyataan diatas mengindikasikan bahwa berkurangnya kadar senyawa pada daun jatuh merupakan efek dari adanya dekomposisi bahan organik dimana menurut Hanum dan Kuswytasari (2014), dekomposisi merubah bentuk fisik maupun kimia yang disebut sebagai mineralisasi dimana bakteri mengurai partikel-partikel organik yang dibantu dengan enzim sehingga dapat mengurangi kadar senyawa di dalam daun.

5.1.3 Fourier Transform Infrared (FT-IR)

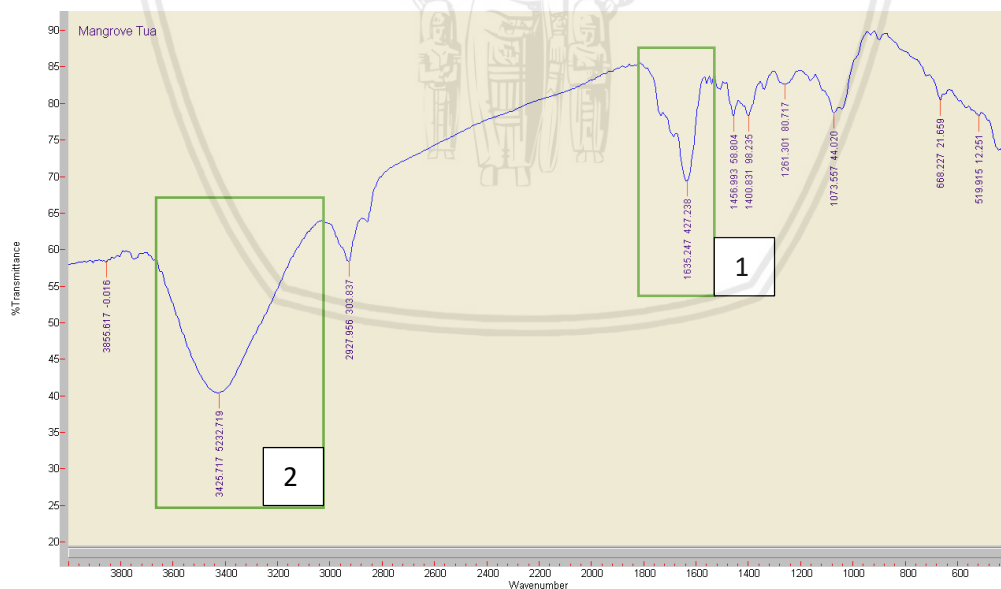
Hasil yang ditunjukkan pada uji FTIR menunjukkan perbedaan pada setiap umur daun, dimana daun tua memiliki berkas serapan terendah dan tertinggi yang selanjutnya diikuti oleh daun muda dan daun jatuh yang disajikan pada Gambar 12, 13 dan 14. Spektrum infra merah menunjukkan pita-pita serapan yang berasal dari gugus hidroksil, alifatik, ikatan rangkap terisolasi hingga eter (Harizon, *et al.* 2014). Spektrum inframerah yang menunjukkan gugus fungsi O-H, C=O, C=C, C-H, C-OH, dan C-O menandakan bahwa ekstrak positif mengandung senyawa flavonoid (Nugraha, *et al.* 2017). Dimana penamaan gugus fungsi berkas serapan berdasarkan Bruno, *et al.* (2010), Harizon, *et al.* (2014), Sopiah (2014), Jain, *et al.* (2016) dan Ningrum, *et al.* (2017) disajikan pada Tabel 7, 8 dan 9.



Gambar 12. FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Muda)

Tabel 7. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Muda)

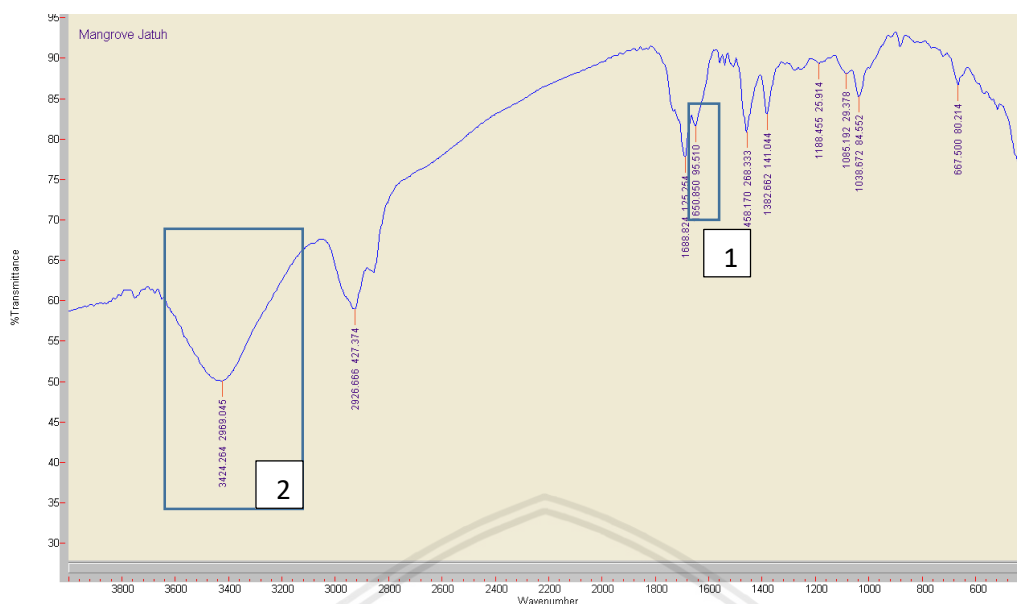
No.	Berkas Serapan	Gugus Fungsi
1.	1633.807	C=C Alkena, O-Quinone, Polyquercetin
2.	3444.084	O-H Fenol



Gambar 13. FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Tua)

Tabel 8. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Tua)

No.	Berkas Serapan	Gugus Fungsi
1.	1635.247	C=C Aroinatik, O-Quinone, Polyquercetin
2.	3425.717	O-H Alkohol, Fenol



Gambar 14. FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Jatuh)

Tabel 9. Uji FTIR Ekstrak Daun Mangrove *A. marina* (Jatuh)

No.	Berkas Serapan	Gugus Fungsi
1.	1650.850	C=C Aroinatik, Alkena, O-Quinone, Polyquercetin
2.	3424.264	O-H Alkohol, Fenol

5.1.4 Kromatografi Cair (LC-MS)

Kromatografi cair dengan kombinasi spektrometer massa bertujuan untuk mendeteksi ada atau tidaknya senyawa target pada ekstrak uji yang ditandai dengan adanya informasi sinyal berupa peak yang berlandaskan waktu yang dibutuhkan (*time*) dan kuat rendahnya sinyal yang diterima pada *relative abundance*. Dimana pada uji ini lebih difokuskan pada turunan flavonoid dan alkaloid akibat keterbatasan *databased* senyawa, namun sudah dapat mencirikan perbedaan kandungan atau turunan senyawa target. Turunan dari flavonoid yang terdeteksi berupa dihydroquercetin, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside, quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside, isohametin-7-O-pentoside dan rutin dapat digunakan sebagai agen antibakteri dimana aktifitasnya akan meningkat karena adanya substituen hidrofobik. Dimana hasil LC-MS disajikan pada Gambar 15, 16 dan 17.

Menurut Yixi, *et al.* (2015), Flavonoid merupakan agen antibakteri yang dapat digunakan pada berbagai mikroorganisme yang bersifat patogen. Flavonoid

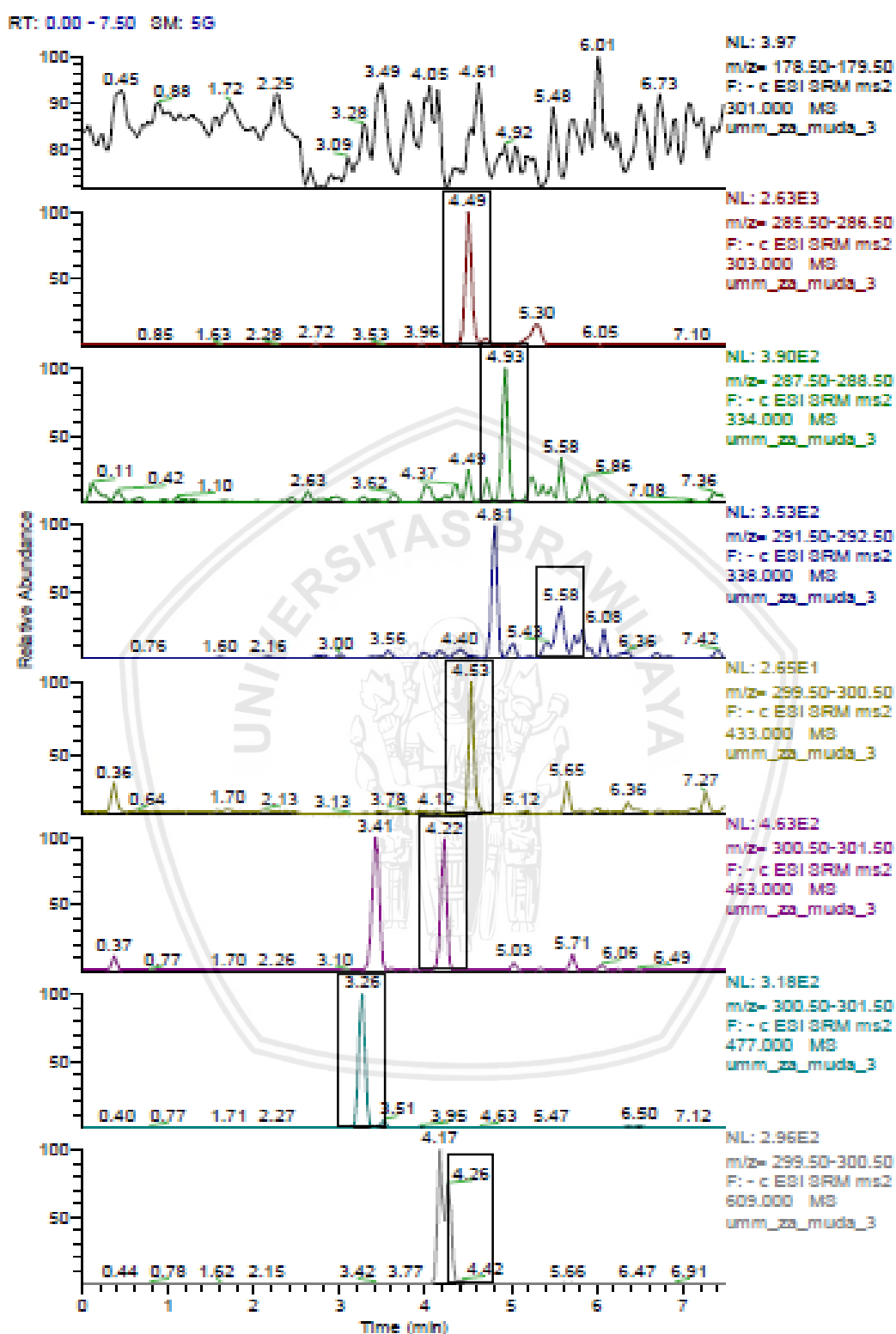
menarik perhatian karena berpotensi menjadi pengganti antibiotik. Kesimpulan bahwa hidroksil di tempat yang khusus pada cincin aromatik flavonoid dapat meningkatkan aktivitas. Namun, metilasi gugus hidroksil aktif justru dapat mengurangi aktivitas. Selain itu, lipofolitas cincin A sangat penting dalam mendukung aktivitas chalcone. Substituen hidrofobik seperti gugus prenil, rantai alkil, rantai alkilamino, dan oksigen atau nitrogen yang mengandung gugus heterosiklik pada umumnya dapat meningkatkan aktivitas semua turunan flavonoid. Mekanisme antibakteri flavonoid yaitu dapat berupa penghambatan sintesis asam nukleat, penghambatan metabolisme energi, penghambatan fungsi membran sitoplasma, penghambatan perlekatan dan pembentukan biofilm, penghambatan porin (membran sel), perubahan permeabilitas membran hingga pelemahan tingkat patogenisitas.

Turunan dari flavonoid berupa quercetin, menurut Jaisinghani, *et al.* (2017), quercetin merupakan flavonoid polifenolik potensial yang bersifat kemoprotektif dan dapat digunakan sebagai agen antibakteri dalam dosis yang relatif kecil. Quercetin termasuk kelompok flavonol flavonoid yang aman serta memiliki sifat antioksidan, antiartherogenik, antiinflamasi, sifat pelindung saraf, anti karsinogenik, antibakteri dan antivirus. Menurut Maalik, *et al.* (2014), kitosan biasa difungsikan oleh quercetin dalam aktivitas antimikroba terhadap spesies bakteri seperti *E. coli*, *Salmonellae enterica* dan *Listeria monocytogenes*. Selain itu, sifat bakteriostatik quercetin mampu menghambat ligasi D-Ala-D-Ala dalam sel bakteri, dengan cara menghambat D-alanin: Enzim ligase Dalanin dan mencegah pertumbuhan bakteri.

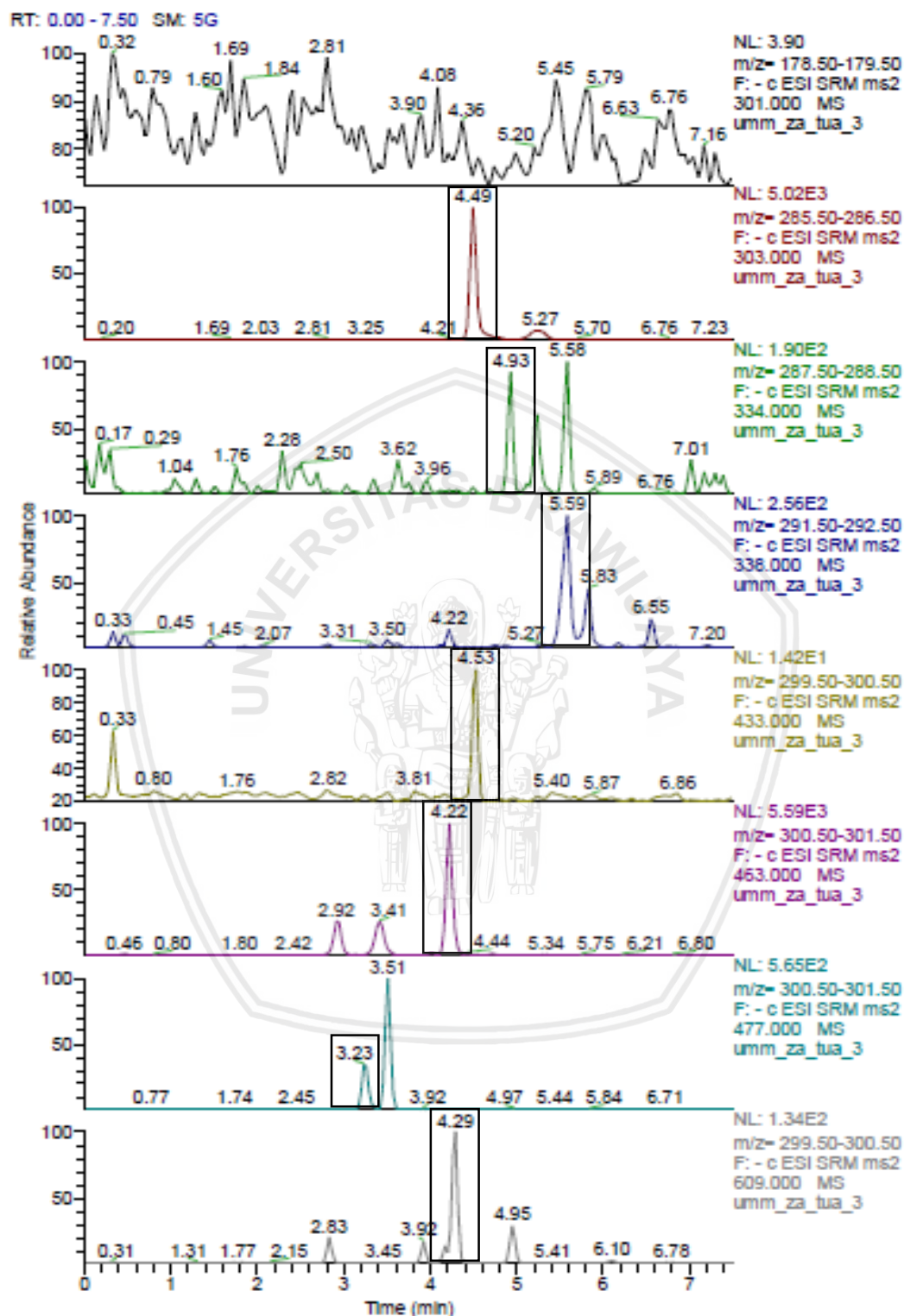
Sementara isohametin menurut Dabas, *et al.* (2019), merupakan polifenolat dari ekstrak tumbuhan yang berfungsi sebagai antioksidan serta memiliki karakteristik bakterisidal dan fungisida dimana dalam penelitian tersebut isohametin masih berikatan dengan unsur lain. Sementara menurut Arima, *et al.*

(2002), pencampuran rutin dengan quercetin akan dapat meningkatkan aktifitas antibakteri dengan menghambat sintesis DNA. Begitu pula dengan campuran quercetin dan morin yang juga akan meningkat dengan adanya rutin. Dimana aktivitas antibakteri berdasarkan nilai MIC, penggunaan kaempferol menurun tajam dengan adanya penambahan rutin.

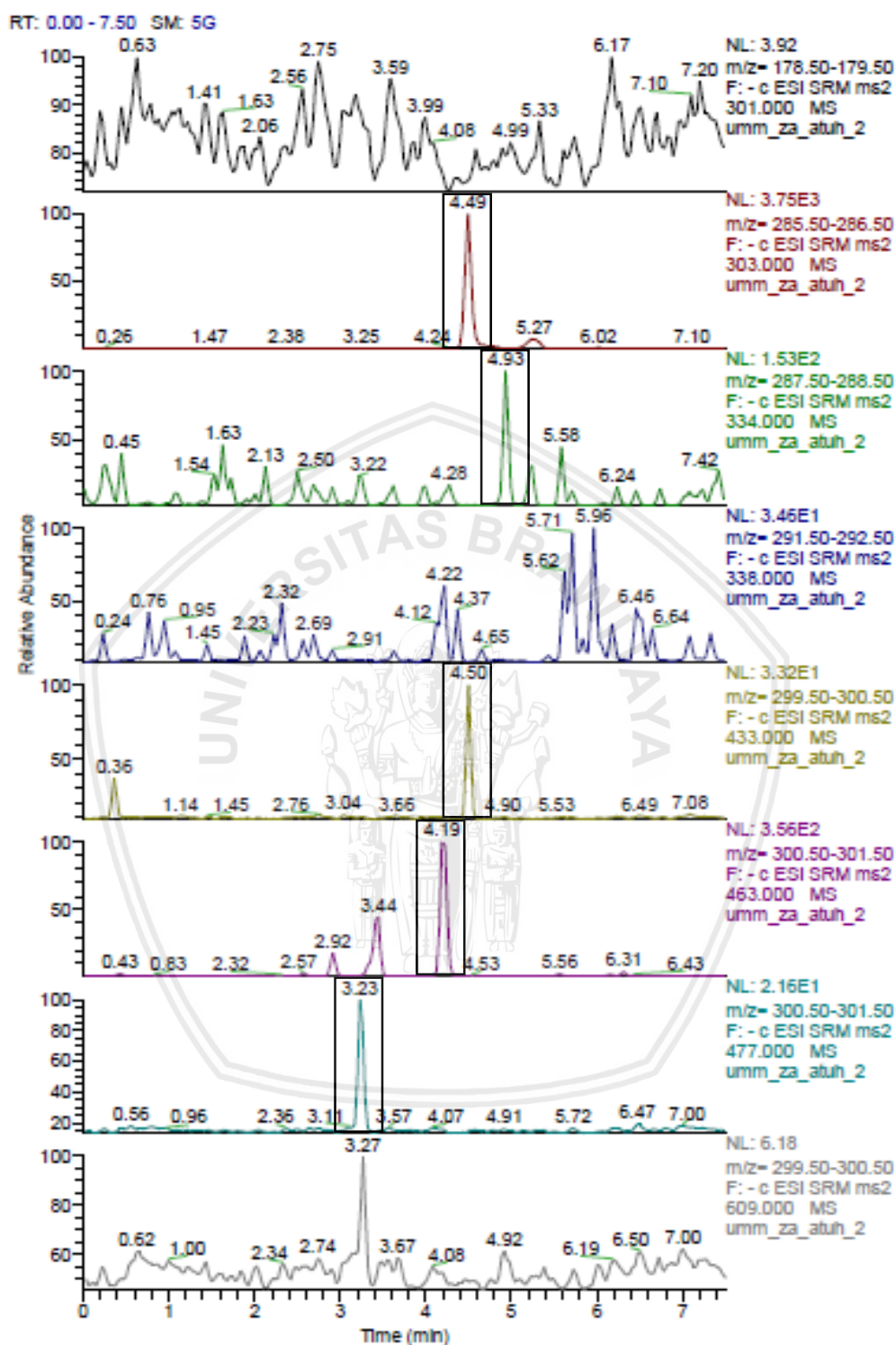
Setelah pemaparan fungsi dari turunan flavonoid, jika diteruskan dengan melihat turunan dari senyawa alkaloid yang terdeteksi berupa berberine dan papaverine ternyata juga dapat digunakan sebagai agen antibakteri, namun belum dapat dijadikan pengganti antibiotik sebelum dilakukannya modifikasi struktur. Dimana menurut Yao, *et al.* (2018), Berberine (BBR) merupakan turunan dari alkaloid isoquinoline yang terkenal memiliki efek signifikan yang berperan sebagai obat pada gastroenteritis dan disentri dalam sistem pengobatan Tiongkok dan Ayurvedic. Efek farmakologis lainnya dari BBR yaitu sebagai antimikroba, hepatoprotective, anti-hiperlipidemia, antikanker, anti-diabetes dan anti-inflamasi. bahkan menurut Bandyopadhyay, *et al.* (2013), BBR dapat memberikan kemanjuran terapeutik terhadap lingkungan yang resisten *multidrug*. Meskipun BBR berkapasitas dalam pengobatan infeksi mikroba, Battu, *et al.* (2010) menyatakan bahwa aktivitas antimikroba yang diuji secara *in vivo* tidak cukup efektif untuk menggantikan antibiotik yang biasa terdapat di toko obat. Menurut Castro dan Tafalla (2015), obat yang diberikan pada ikan tidak dapat langsung membunuh bakteri yang masuk, namun dapat mempercepat proses proliferasi sel T dan sel B sehingga kemampuan dalam membunuh patogen akan semakin cepat dan banyak yang berdampak pada pemulihan jaringan yang semakin cepat.



Gambar 15. Hasil deteksi LC-MS daun muda mangrove *A. marina* dari yang paling atas secara berurutan yaitu quercetin (-), dihydroquercetin (+), berberine (+), papaverine (+), quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside (+), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (+), isohametin-7-O-pentoside (+), rutin (+).



Gambar 16. Hasil deteksi LC-MS daun tua mangrove *A. marina* dari yang paling atas secara berurutan yaitu quercetin (-), dihydroquercetin (+), berberine (+), papaverine (+), quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside (+), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (+), isohametin-7-O-pentoside (+), rutin (+).

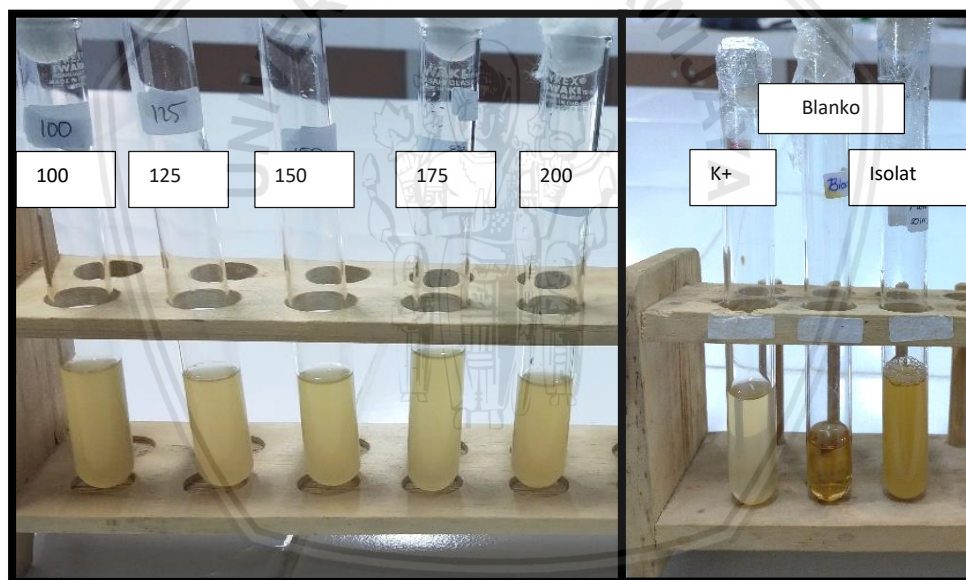


Gambar 17. Hasil deteksi LC-MS daun jatuh mangrove *A. marina* dari yang paling atas secara berurutan yaitu quercetin (-), dihydroquercetin (+), berberine (+), papaverine (-), quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside (+), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (+), isohametin-7-O-pentoside (+), rutin (-).

5.2 Penelitian Tahap 2 (*Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro*)

5.2.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiton Concentration*)

Tahapan pertama pada penelitian ini yaitu melakukan uji MIC dengan menggunakan ekstrak daun api-api sebagai antibakteri dalam beberapa konsentrasi (ppm) yang bertujuan agar diketahui konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan *A. salmonicida*. Menurut Samsundari (2006), uji MIC merupakan cara untuk mengetahui konsentrasi terkecil bahan obat-obatan (ekstrak daun api-api) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopis. Berdasarkan hasil pengamatan pasca inkubasi terlihat adanya perubahan warna tingkat kekeruhan yang disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Hasil inkubasi bakteri dengan beberapa konsentrasi (ppm)

Hasil uji MIC pasca inkubasi menunjukkan adanya perubahan tingkat kekeruhan yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *A. salmonicida* dengan tingkat kekeruhan yang rendah pada konsentrasi ppm. Pernyataan tersebut didukung oleh Kusumawardani *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa apabila media tumbuh bakteri tampak keruh berarti bakteri masih dapat tumbuh sehingga antimikroba dikatakan kurang efektif, sedangkan

apabila media memiliki tingkat kekeruhan yang rendah berarti obat tersebut efektif dalam upaya menghambat pertumbuhan bakteri. Selain analisis secara visual, keakuratan uji MIC yang paling utama dilihat dari nilai absorbansinya dengan menggunakan alat spektrofotometer. Sesuai dengan pernyataan Astutiningsih, *et al.* (2014), pasca inkubasi, setiap tabung diamati seksama dan diukur nilai absorbansinya pada spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm. Menurut Rachmawati, *et al.* (2016), satuan hasil spektrofotometer yaitu AU (Astronomi Unit). Dimana nilai spektrofotometer diukur berdasarkan tingkat kekekeruhannya. Semakin rendah tingkat kekeruhan suspensinya maka nilai yang tertera pada spektrofotometer juga akan semakin rendah dan sebaliknya apabila tingkat kekeruhan suspensi semakin tinggi, maka semakin besar pula nilai yang tertera pada spektrofotometer. Hasil uji MIC dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuan setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam. Hasil uji MIC disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji MIC

No.	Konsentrasi	Absorbansi	Kekeruhan
1.	K+	0,533	Sedang
2.	K-	1,471	Tinggi
3.	100	1,302	Tinggi
4.	125	1,274	Tinggi
5.	150	1,181	Tinggi
6.	175	1,245	Tinggi
7.	200	1,353	Tinggi

Keterangan :

Tabung reaksi No. 5 : Perlakuan dengan ekstrak daun api-api berkonsentrasi 150 ppm merupakan konsentrasi optimal yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*

Kontrol (+) : Perlakuan dengan pemberian *chloramphenicol* 50 ppm

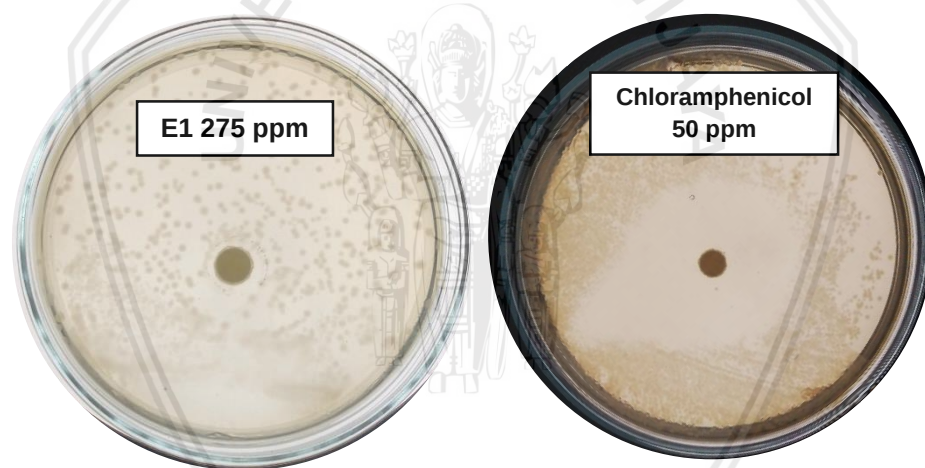
Kontrol (-) : Perlakuan tanpa pemberian ekstrak daun api-api

Hasil uji MIC menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm menunjukkan bahwa nilai absorbansi pada konsentrasi 150 ppm merupakan yang paling mendekati nilai absorbansi kontrol positif namun tidak sepenuhnya membuktikan seberapa efektif konsentrasi ekstrak tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri karena hasil tersebut juga termasuk adanya nilai absorbansi ekstrak yang larut dan sel bakteri yang mati. Menurut Kusumawardani, *et al.* (2008), dari hasil tersebut diperoleh nilai *optical density* (OD) yang mendekati kontrol positif adalah konsentrasi yang dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri target. Pada hasil uji MIC yang telah dilakukan tidak semua nilai absorbansinya sesuai dengan kekeruhan bakteri karena kekeruhan juga dapat disebabkan oleh konsentrasi ekstrak terhadap perlakuan yang dilakukan. Hal ini sesuai dengan pendapat Putri, *et al.* (2008), spektrofotometer tidak mampu membedakan tingkat kekeruhan warna pigmen dari ekstrak dengan kekeruhan dari sel bakteri sehingga nilai OD yang diperoleh merupakan gabungan dari keduanya. Pada konsentrasi 150 ppm merupakan konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan *A. salmonicida* dan selanjutnya konsentrasi tersebut diujikan pada uji kertas cakram untuk menentukan tingkat kesesuaian hasil.

5.2.2 Uji Cakram

Tahapan kedua dalam penelitian ini yaitu uji kertas cakram. Zona hambat terbaik dengan menggunakan ekstrak daun api-api terhadap bakteri *A. salmonicida* yaitu yang paling mendekati kontrol positif. Konsentrasi ekstrak yang diberikan pada kertas cakram akan memberikan zona hambat pada sekitar kertas cakram tersebut sehingga bakteri tidak mengalami pertumbuhan. Konsentrasi hasil pengenceran ekstrak murni dengan beberapa konsentrasi belum tentu akan memberikan diameter zona bening yang semakin besar dengan lebih tingginya konsentrasi ekstrak. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Yuhana, *et*

al. (2008) yang menyatakan bahwa terbentuknya area bening di sekitar kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Kecilnya zona hambat menunjukkan aktivitas antibakteri yang rendah, sedangkan besarnya zona hambat menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi. Besarnya aktivitas tersebut akibat adanya senyawa aktif dalam ekstrak. Bahan antibakteri merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Kualitas atau kemampuan antibakteri tersebut ditentukan oleh aktivitas dan spektrum zat terhadap bakteri. Kemampuan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan dipengaruhi oleh : (1) konsentrasi antibakteri, (2) durasi kontak dengan antibakteri, (3) suhu lingkungan, (4) sifat bakteri (umur, jenis, konsentrasi dan keadaan bakteri), (5) sifat fisik dan kimia dan jenis senyawa lain di dalamnya.



Gambar 19. Zona hambat yang terbentuk dari uji kertas cakram dengan pemberian ekstrak daun api-api tua terhadap bakteri *A. salmonicida* dalam inkubasi 24 jam.

Hasil pengamatan terbentuknya zona hambat terbaik terdapat pada perlakuan E (275 ppm) sebesar 5,48 mm jika dibandingkan dengan kontrol positif (50 ppm) sebesar 34,74 mm yang dapat dilihat pada Gambar 19. Sementara pada perlakuan lainnya diperoleh diperoleh sebesar 1,65 mm pada perlakuan A (75 ppm), perlakuan B (125 ppm) sebesar 2,73 mm, perlakuan C (175 ppm) sebesar 3,11 mm, dan pada perlakuan perlakuan D (225 ppm) diperoleh sebesar 5,1 mm.

Perlakuan A dan B tergolong kategori lemah karena memiliki zona hambat kurang dari 3 mm. Sedangkan perlakuan C, D dan E tergolong kategori sedang karena berada pada kisaran 3-6 mm. Penentuan kategori golongan tersebut sesuai dengan pernyataan Pan, *et al.* (2009), bahwa aktivitas antibakteri akan tergolong lemah apabila memiliki zona hambat kurang dari 3 mm, tergolong sedang 3-6 mm dan tergolong kuat apabila lebih dari 6 mm.

Pada pengamatan 48 jam didapatkan hasil bahwa diameter zona bening mengalami penurunan diameter zona bening. Kemampuan ekstrak daun api-api terhadap pertumbuhan bakteri *A. salmonicida* bersifat bakteristatik (menghambat) karena pada zona bening yang telah terbentuk pada usia 24 jam mengalami penumbuhan kembali pada usia 48 jam yang ditandai dengan penurunan transparansi dan penurunan diameter zona bening. Penentuan tersebut sesuai dengan pernyataan Anita *et al.* (2014) bahwa sifat antibakteri ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri pada inkubasi 48 jam akan menunjukkan sifat bakteristatik yang dapat dilihat dari adanya penurunan diameter zona bening. Menurut Utami (2012), obat dapat dikatakan bakteristatik jika bahan tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan bersifat bakterisidal apabila dapat mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri. Pembagian bakteristatik dan bakterisidal tidak absolut yang tergantung konsentrasi obat, spesies bakteri dan fase perkembangannya.

Muqsith (2013) menyatakan bahwa faktor virulensi *Aeromonas* sp. ditentukan oleh *Extracellular Products Produced* (ECP) dengan adanya lapisan tambahan (*A-layer*) pada permukaan luar membran sel. Pada pengamatan uji cakram setelah inkubasi 48 jam terdapat pertumbuhan bakteri pada zona bening yang terbentuk yang menyebabkan berkurangnya diameter zona hambat. Hal tersebut dikarenakan dinding sel bakteri *Aeromonas* yang termasuk ke dalam Gram negatif lebih kompleks daripada Gram positif. Pernyataan tersebut sesuai

dengan pendapat Pradana, *et al.* (2014), adanya perbedaan tingkat sensitivitas juga disebabkan oleh perbedaan dinding sel bakteri. Dimana bakteri gram negatif sedikit peptidoglikan, lebih banyak mengandung lipid dan membran luar berupa bilayer. Membran luar terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam), dan lipopolisakarida (lapisan luar) yang tersusun atas lipid A (nonpolar). Hal tersebut menyebabkan senyawa antibakteri lebih sulit masuk ke dalam sel sehingga aktivitas antibakteri menjadi lebih lemah jika dibandingkan pada bakteri Gram positif. Berdasarkan hal tersebut maka zona keruh yang terbentuk pada cawan berbakteri *A. salmonicida* dengan pemberian ekstrak daun api-api dapat dikarenakan senyawa polar lain yang terkandung di dalam ekstrak memiliki sifat lipofilik dan hanya merusak membran luar *A. salmonicida* (lapisan lipopolisakarida) yang tersusun atas lipid A yang bersifat nonpolar. Keadaan tersebut menyebabkan bakteri mampu memperbaiki kerusakan membran luar dan kembali tumbuh, sehingga menimbulkan zona keruh pada pengujian tersebut.

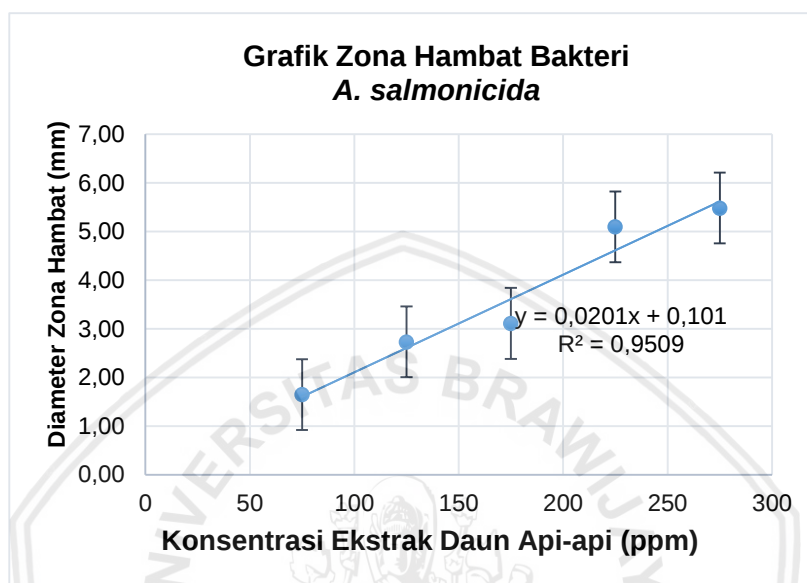
Nilai dari pengukuran zona bening yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengolahan data secara lengkap. Berikut data rerata hasil diameter zona bening pada uji cakram dengan ekstrak daun mangrove api-api dengan konsentrasi 75 ppm, 125 ppm, 175 ppm, 225 ppm dan 275 ppm (Tabel 11).

Tabel 11. Rerata Diameter Zona Hambat (mm)

Perlakuan	Zona Bening			Total	Rerata $\pm$ Standar Deviasi
	1	2	3		
A (75 ppm)	0,95	2,35	1,64	4,94	1,65 $\pm$ 0,7 ^a
B (125 ppm)	3,26	2,68	2,25	8,19	2,73 $\pm$ 0,51 ^a
C (175 ppm)	2,15	3,93	3,25	9,33	3,11 $\pm$ 0,9 ^b
D (225 ppm)	5,75	4,22	5,32	15,29	5,10 $\pm$ 0,79 ^c
E (275 ppm)	4,65	6,32	5,47	16,44	5,48 $\pm$ 0,84 ^d

Berdasarkan perhitungan rerata pada Tabel 11 dapat diketahui bahwa rerata zona bening ekstrak daun mangrove api-api terhadap pertumbuhan bakteri

A. salmonicida terbesar yaitu sebesar 5,48 mm pada perlakuan E (275 ppm) sedangkan hasil rerata zona hambat terkecil yaitu sebesar 1,65 mm pada perlakuan A (75 ppm). Berikut grafik regresi diameter zona bening dengan beberapa konsentrasi perlakuan yang disajikan pada Gambar 20.



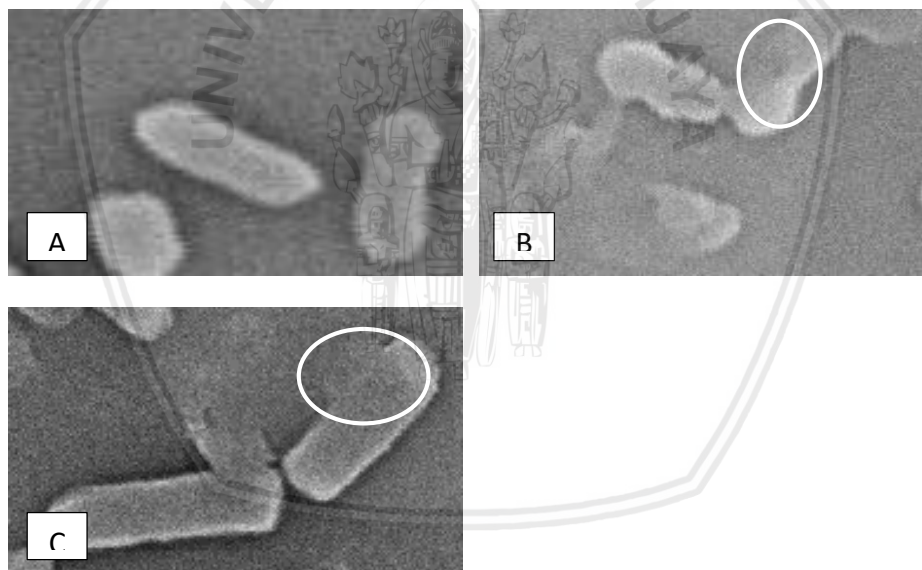
Gambar 20. Hubungan konsentrasi ekstrak daun mangrove api-api terhadap daya hambat *A. salmonicida* pada uji cakram.

Berdasarkan Gambar 20, pengaruh antara perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak mangrove api-api yang berbeda dengan diameter zona hambat yang dihasilkan menunjukkan pola stasioner dengan persamaan $y = 0,0201x + 0,101$ dan koefisien $R^2 = 0,9509$. Hubungan antara kinerja antibakteri dengan perlakuan konsentrasi menunjukkan pola kuadratik yang memiliki arti bahwa ekstrak api-api memberikan pengaruh sebesar 95%, dimana pada konsentrasi yang rendah sudah mampu untuk menghambat pertumbuhan *A. salmonicida* secara optimal akibat adanya kemampuan antibakteri yang mendekati ekstrak murni. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Roslizawaty, *et al.* (2013), bahwa efektivitas zat antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasi zat tersebut. Umumnya, konsentrasi suatu zat akan menyebabkan peningkatan kemampuan senyawa aktif antibakteri, sehingga penghambatan pertumbuhan bakteri semakin

besar. Menurut Oktavia, *et al.* (2013), tingkat efektifitas daya hambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak. Cara kerja ekstrak untuk menghambat pertumbuhan bakteri yaitu dengan merusak atau merubah dinding sel, permeabilitas sel, molekul protein, asam nukleat, kerja enzim, serta dapat menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Berdasarkan hasil penelitian uji efektifitas ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) terhadap aktivitas bakteri *A. salmonicida* maka dapat dikatakan bahwa ekstrak daun ini efektif digunakan sebagai obat antibakteri.

5.2.3 Uji SEM (*Scanning Elektron Microscopy*)

Hasil SEM menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap perubahan dari struktur sel bakteri yang disajikan pada Gambar 21.



Gambar 21. Morfologi bakteri setelah dilakukan uji SEM (Lisis) (A) Tanpa perlakuan, (B) Pemberian *chloramphenicol* 50ppm, (C) Pemberian ekstrak *A. marina* 275ppm.

Hasil pada gambar A menunjukkan morfologi bakteri yang simetris tanpa adanya kerusakan dinding sel, sedangkan pada gambar B dan C telah terjadi lisis pada bakteri akibat ketidakstabilan dinding sel yang membuat metabolisme bakteri terganggu, cadangan ATP berkurang dan kadar keasaman sel akan menurun.

Pernyataan tersebut sesuai dengan beberapa literatur yang menyatakan bahwa Struktur protein, kestabilan dinding sel dan membran plasma bakteri akan mengalami perubahan (lisis) yang dikarenakan adanya senyawa antibakteri flavonoid yang berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen. Senyawa flavonoid mampu menginaktivasi protein (enzim) membran sel bakteri sehingga struktur protein menjadi rusak dan terjadi ketidakstabilan dinding sel, kemudian sel bakteri kehilangan bentuk dan mengalami lisis (Rinawati, 2011). Selain flavonoid, adanya kandungan senyawa terpen yang bersifat hidrofob dapat mengganggu integritas sel bakteri dengan menurunkan cadangan ATP intrasel dan pH sel, terabsorpsi dan terpenetrasi kedalam sel, kemudian bakteri mengalami presipitasi serta denaturasi protein sehingga akan melisiskan membran sel bakteri (Alexander 2015). Selanjutnya, adanya tanin sebagai antibakteri bekerja dengan cara mempresipitasi protein yang secara umum adanya inaktivasi enzim, reaksi dengan membran sel dan inaktivasi fungsi materi genetik (Aminah, *et al.* 2014).

5.3 Penelitian Tahap 3 (Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Vivo*)

5.3.1 Patogenitas *A. salmonicida* dengan LD50

Berdasarkan hasil uji LD 50 menggunakan bakteri *A. salmonicida* yang digunakan pada proses ujiantang pada ikan koi (*C. carpio*) diperoleh kematian hanya pada perlakuan 10^9 - 10^{10} cfu/ml hingga waktu pengamatan 96 jam, dimana kematian 50% terjadi pada jam ke 30 dengan posisi ikan mengambang. Sedangkan mengapa hanya pada dosis perlakuan tertinggi terjadi kematian dapat dikarenakan faktor patogenesitas yang berkemampuan untuk menghasilkan toksin, plasmid, enzim dan mengatasi ketahanan inang, serta seberapa cepat berkembang biaknya. Selain itu, infeksi *Aeromonas* juga dapat menyebabkan perut ikan uji akan mengalami pengembangan yang berisi cairan (pembengkakan) (Indriani, *et al.* 2014). Pembengkakan disebabkan karena adanya kerusakan

jaringan pada organ ikan akibat semakin tingginya koloni bakteri yang berbanding lurus dengan tingkat virulensi. Dimana bakteri dapat bertahan (replikasi) dari mekanisme pertahanan ikan akibat adanya A-layer dan gen virulensi (Hamed, *et al.* 2018). Paparan hasil pengamatan disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Lethal Dossage 50% (LD 50%) Uji Tantang Bakteri *A. salmonicida*

Jam ke	Jumlah Ikan Koi pada Kepadatan <i>A. salmonicida</i> (cfu/ml)						
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰
24	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	0	2	2
36	0	0	0	0	0	0	1
42	0	0	0	0	0	1	0
48	0	0	0	0	0	0	0
LD 50%	0%	0%	0%	0%	0%	75%	100%

5.3.2 Uji Toksisitas Ekstrak Kasar *A. marina* dengan LC50

Berdasarkan hasil uji LC 50 menggunakan ekstrak daun tua *A. marina* yang digunakan pada proses uji tantang terhadap ikan koi (*C. carpio*) diperoleh kematian terjadi pada perlakuan berkonsentrasi 225 ppm dan 275 hingga waktu pengamatan 96 jam, dimana kematian 50%-nya terjadi pada jam ke 48 dengan posisi ikan di dasar, sehingga dapat dikatakan ekstrak mulai bersifat toksik pada konsentrasi 225ppm selama 48jam. Pratama, *et al.* (2017) Uji LC50 perendaman ekstrak dilakukan agar diperoleh konsentrasi dengan mortalitas ikan uji sebanyak 50%, dimana hasil pengamatan disajikan pada Tabel 13.

Tabel 13. Lethal Concentration 50% (LC 50%)

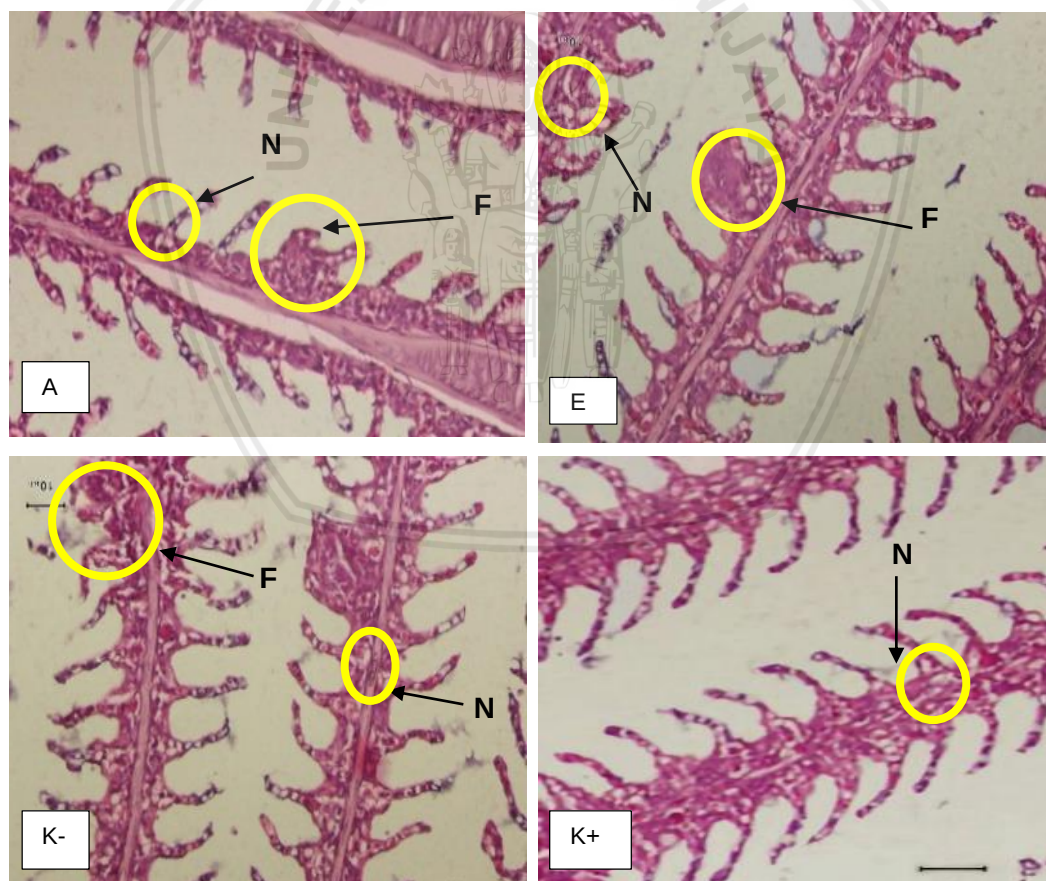
Jam ke	Konsentrasi (ppm)				
	75	125	175	225	275
36	0	0	0	1	0
42	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	0
54	0	0	0	0	0
60	0	0	0	1	1
LC 50%	0%	0%	0%	75%	25%

5.3.3 Pengujian Histopatologi Insang, Ginjal dan Usus

Pengobatan ikan koi menunjukkan kelulushidupan sampai dengan hari ke 7 pemeliharaan pada angka 16% (-) dan 91,2% (+) dengan SR ke-5 perlakuan berada pada 42% (A), 46% (B), 54% (C dan D) dan 67% (E). Menurut Mulyani, *et al.*, (2013), *Aeromonas* merupakan bakteri gram negatif yang menyebabkan penyakit sistemik yang mengakibatkan kematian pada ikan. Nilai skoring disajikan pada Lampiran 9, 10 dan 11 serta analisis organ disajikan sebagai berikut :

5.3.3.1 Insang

Analisis kerusakan histopatologi jaringan insang setelah pengobatan menggunakan ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) adalah sebagai berikut dan perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 11.



Gambar 22. Histopatologi insang pada sampel perlakuan (A) 75 ppm, (E) 275 ppm, (K-) setelah infeksi dan (K+) ikan sehat. (N) Nekrosis (F) Fusi. Pengamatan perbesaran 400x dengan pewarnaan HE.

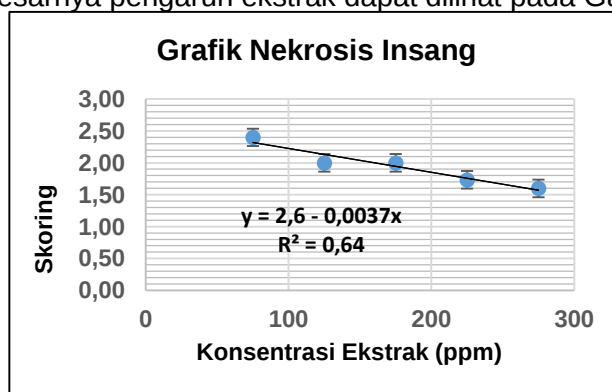
a. Nekrosis

Nekrosis adalah kematian sel yang terjadi karena hiperplasia dan fusi lamela sekunder yang berlebihan, sehingga jaringan insang tidak berbentuk utuh lagi atau dengan kata lain nekrosis terjadi diiringi dengan kematian suatu biota. Dimana pada konsentrasi 225 ppm memiliki jumlah kerusakan terbaik. Hasil skoring kemudian diolah menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh rerata skoring nekrosis pada jaringan insang ikan koi (*C. carpio*) disajikan pada Tabel 14.

Tabel 14. Rerata Skoring Nekrosis Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	2,4	2,6	2,2	7,2	$2,40 \pm 0,2^a$
B (125 ppm)	2,2	2,2	1,6	6	$2,00 \pm 0,35^a$
C (175 ppm)	2	1,8	2,2	6	$2,00 \pm 0,2^a$
D (225 ppm)	1,6	2	1,6	5,2	$1,73 \pm 0,23^a$
E (275 ppm)	1,4	1,6	1,8	4,8	$1,60 \pm 0,2^b$

Nekrosis merupakan kerusakan sel yang terjadi dengan ditandai inti sel memudar, mengecil maupun menjadi besar serta bentuk selnya tidak beraturan (Supriyono, *et al.* 2013). Pada Gambar 22 dapat dilihat pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+. Besarnya pengaruh ekstrak dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Grafik nekrosis insang

Grafik diatas menjelaskan bahwa konsentrasi ekstrak berbanding terbalik dengan kerusakan jaringan, dimana apabila semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka nilai skoring kerusakan semakin rendah. Dari hasil analisis didapatkan hasil persamaan yaitu $y = 2,6 - 0,0037x$ yang memiliki nilai $R^2 = 0,64$ sumbu y dipengaruhi sumbu x, menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak daun api-api (*A. marina*) berpengaruh sebesar 64% dan sisanya dipengaruhi dari faktor lain.

b. Fusi Lamela

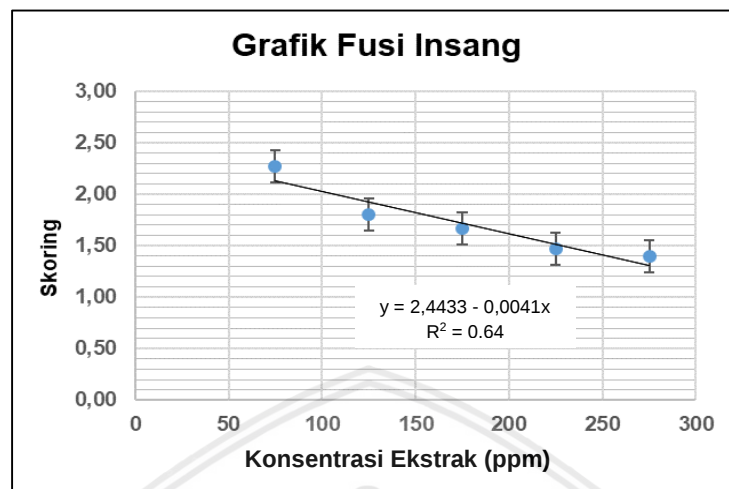
Fusi lamela merupakan hasil akhir dari hiperplasia lamela secara besar-besaran yang mengakibatkan berkurangnya luas permukaan insang (Rahayu, *et al.*, 2013). Pada Gambar 22 dapat dilihat pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+ sebagai gambaran kontrol jaringan ikan sehat.

Perlakuan yang dilakukan selama penelitian pada ikan koi (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. salmonicida* dan diberikan ekstrak kasar daun api-api (*A. marina*) memperoleh hasil rata-rata yang berbeda terhadap kerusakan akibat fusi yang terjadi pada insang ikan koi (*C. carpio*). Setelah dilakukan skoring maka data diolah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan data rerata nilai skoring fusi yang disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15. Rerata Skoring Fusi Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	2,6	2	2,2	6,8	$2,27 \pm 0,12^a$
B (125 ppm)	2	2	1,4	5,4	$1,80 \pm 0,35^a$
C (175 ppm)	1,6	1,6	1,8	5	$1,67 \pm 0,12^a$
D (225 ppm)	1,8	1,2	1,4	4,4	$1,47 \pm 0,31^a$
E (275 ppm)	1,4	1,6	1,2	4,2	$1,40 \pm 0,20^b$

Grafik hubungan konsentrasi ekstrak kasar daun api-api (*A. marina*) dengan nilai skoring fusi disajikan pada Gambar 24.



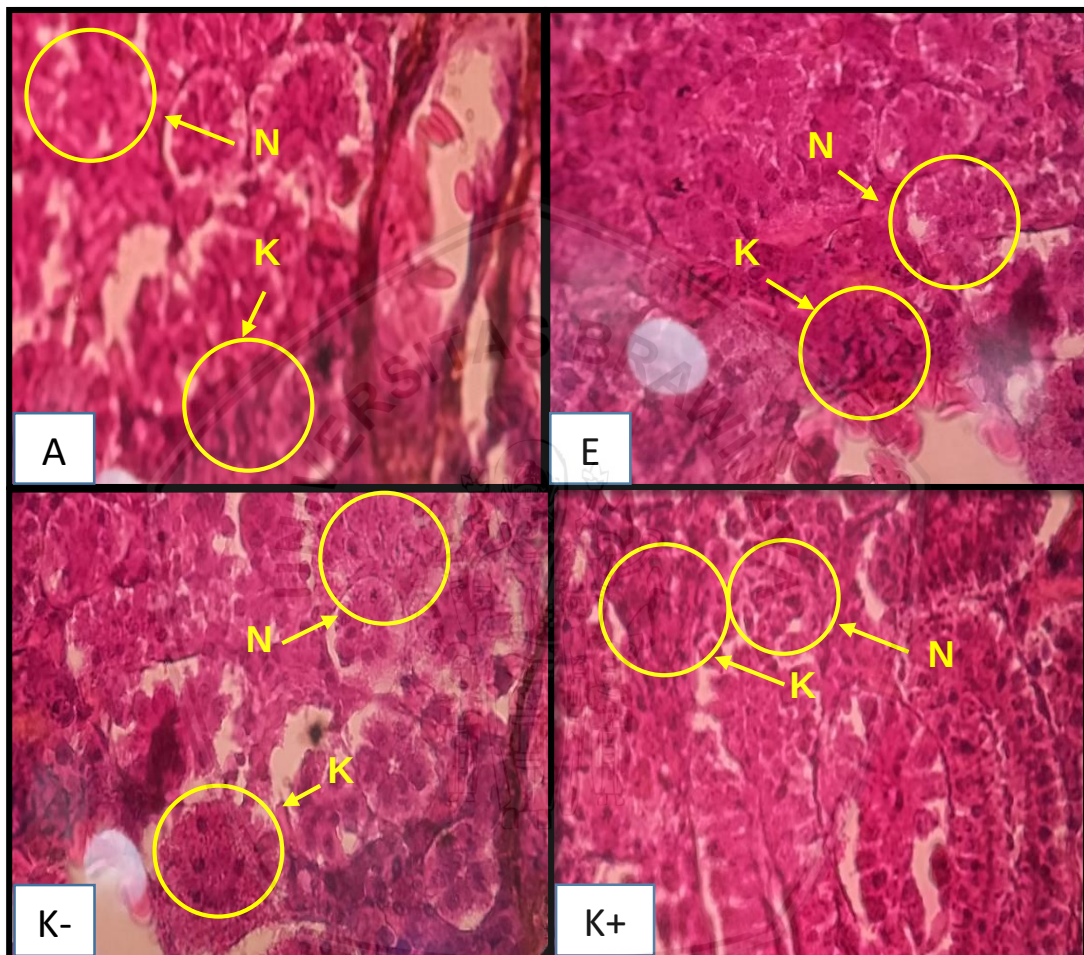
Gambar 24. Grafik Nilai Skoring Fusi pada Insang

Grafik diatas dapat diketahui bahwa dosis ekstrak berbanding terbalik dengan kerusakan jaringan, dimana apabila semakin tinggi dosis ekstrak maka nilai skoring kerusakan semakin rendah. Didapatkan hasil persamaan yaitu $y = 2,4433 - 0,0041x$ yang berarti berpengaruh sebesar 64% sumbu y dipengaruhi sumbu x, menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak daun api-api (*A. marina*) berpengaruh.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin banyak kandungan bahan aktif antibakterinya. Sehingga kemampuan suatu bahan untuk membunuh bakteri semakin besar (Lingga, *et al.*, 2015). Kerusakan struktur pada insang ikan sangat berpengaruh terhadap pengaturan osmosis sehingga proses pernafasan dan osmoregulasi ikan terganggu. Kerusakan insang ini dapat dipicu dari bakteri *Aeromonas* (Sukarni, *et al.*, 2012).

5.3.3.2 Ginjal

Analisis kerusakan histopatologi jaringan ginjal setelah pengobatan menggunakan ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) adalah sebagai berikut dan perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 12.



Gambar 25. Histopatologi Ginjal pada sampel perlakuan (A) 75 ppm, (E) 275 ppm, (K-) setelah infeksi dan (K+) ikan sehat. Gejala kerusakan timbul (K) Kongesti dan (N) Nekrosis. Pengamatan dengan menggunakan pembesarn 400x (pewarnaan HE).

a. Kongesti

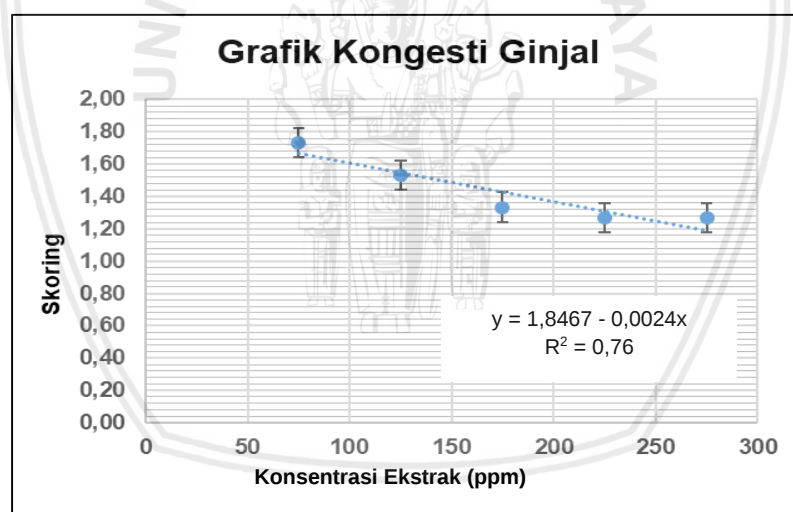
Kongesti terjadi ditandai dengan munculnya warna merah pada sel, hal ini terjadi karena adanya peningkatan darah yang menggumpal didalam pembuluh darah (Parameswari, *et al.* 2013). Pada Gambar 25 dapat dilihat pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai

hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+ sebagai gambaran kontrol jaringan ikan sehat. Rerata nilai skoring kongesti disajikan pada Tabel 16.

Tabel 16. Rerata Skoring Kongesti Ginjal

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	1,8	1,8	1,6	5,2	1,73 ± 0,12 ^a
B (125 ppm)	1,4	1,6	1,6	4,6	1,53 ± 0,12 ^a
C (175 ppm)	1,4	1,4	1,2	4	1,33 ± 0,12 ^a
D (225 ppm)	1,2	1,4	1,2	3,8	1,27 ± 0,12 ^b
E (275 ppm)	1,4	1,2	1,2	3,8	1,27 ± 0,12 ^c

Grafik hubungan dosis ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) dengan nilai skoring sel disajikan pada Gambar 26.



Gambar 26. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak mangrove dengan nilai skoring kongesti pada ginjal

Berdasarkan grafik diatas dapat diketahui bahwa dosis ekstrak berbanding terbalik dengan kerusakan jaringan, sehingga semakin tinggi dosis ekstrak maka nilai skoring kerusakan semakin rendah. Didapatkan hasil persamaan yaitu $y = 1,8467 - 0,0024x$ yang memiliki nilai koefisien yakni 0,76% sumbu y dipengaruhi sumbu x. Nilai koefisien determinasi kecil disebabkan oleh faktor luar seperti lingkungan kualitas air penelitian yang kurang optimal.

b. Nekrosis

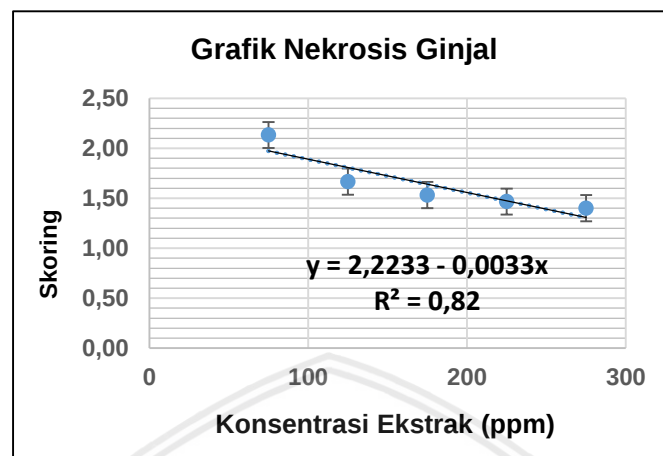
Nekrosis merupakan kematian sel jaringan, perubahan inti sel, inti tampak lebih padat serta warna inti gelap (*piknosis*). Nekrosis koagulatif ditandai dengan sel-sel protoplasma yang padat dan terfiksasi dan masih bisa diamati menggunakan mikroskop (Adinata, *et al.* 2012). Pada Gambar 25 dapat dilihat pada semua perlakuan terjadi nekrosis koagualatif dengan adanya inti sel yang memudar, bentuk sel yang tidak beraturan dimana pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+ sebagai gambaran kontrol jaringan ikan sehat..

Hasil skoring kemudian diolah menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh rerata skoring nekrosis pada jaringan ginjal ikan koi (*C. carpio*) yang disajikan pada Tabel 17.

Tabel 17. Rerata Skoring Nekrosis Ginjal

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	2	2,2	2,2	6,4	2,13 ± 0,12 ^a
B (125 ppm)	1,8	1,6	1,6	5	1,67 ± 0,12 ^a
C (175 ppm)	1,4	1,6	1,6	4,6	1,53 ± 0,12 ^a
D (225 ppm)	1,6	1,4	1,4	4,4	1,47 ± 0,12 ^b
E (275 ppm)	1,4	1,6	1,2	4,2	1,4 ± 0,2 ^c

Grafik hubungan konsentrasi ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) dengan nilai skoring sel disajikan pada Gambar 27.

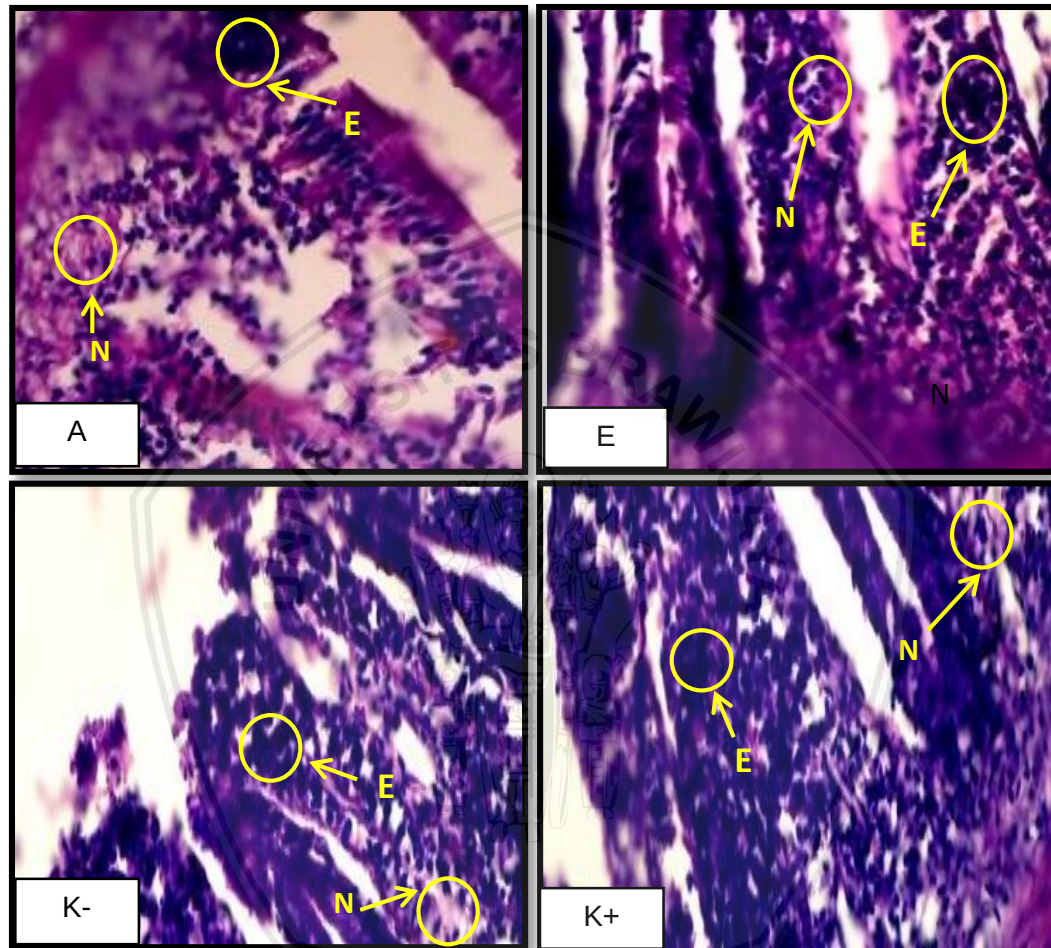


Gambar 27. Grafik Hubungan antara Ekstrak Mangrove dengan Nilai Skoring Nekrosis pada Ginjal

Berdasarkan grafik diatas dapat diketahui bahwa dosis ekstrak berbanding terbalik dengan kerusakan jaringan, dimana apabila semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka nilai skoring kerusakan semakin rendah. Didapatkan hasil persamaan yaitu $y = 2,2233 - 0,0033x$ yang memiliki nilai koefisien determinasi yakni 82% sumbu y dipengaruhi sumbu x. Nilai koefisien determinasi kecil disebabkan oleh faktor luar seperti lingkungan kualitas air penelitian yang kurang optimal.

5.3.3.3 Usus

Analisis kerusakan histopatologi jaringan usus setelah pengobatan menggunakan ekstrak daun mangrove api-api (*A. marina*) adalah sebagai berikut dan perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 13.



Gambar 28. Histopatologi Usus pada sampel perlakuan (A) 75 ppm, (B) 125 ppm, (C) 175 ppm, 225 ppm dan 275 ppm. Gejala kerusakan timbul (E) Edema dan (N) Nekrosis. Pengamatan dengan menggunakan pembesaran 400x (pewarnaan HE).

a. Nekrosis

Nekrosis adalah kerusakan berupa kematian sel-sel atau jaringan yang menyertai degenerasi sel pada setiap kehidupan hewan dan merupakan tahap akhir dari proses degenerasi yang irreversibel. Karakteristik dari jaringan nekrotik, yaitu memiliki warna yang lebih pucat jika dibandingkan dengan warna normal,

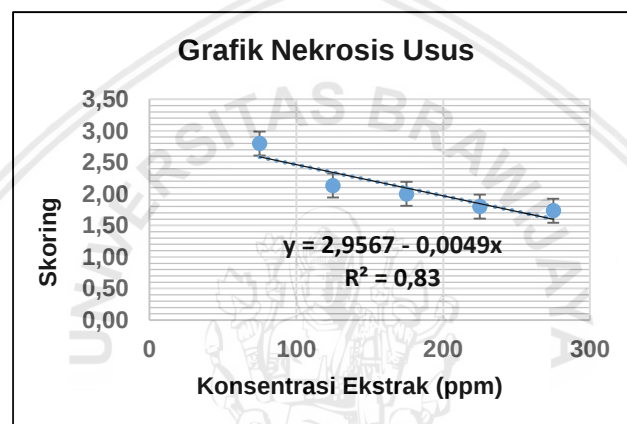
hilangnya daya rentang (jaringan menjadi rapuh dan mudah terkoyak), atau memiliki konsistensi yang buruk atau pucat (seperti bubur), dan kadang-kadang menimbulkan bau yang tidak enak serta kalsifikasi. Nekrosis dapat disebabkan oleh trauma, agen-agen biologis (virus, bakteri, jamur dan parasit), agen-agen kimia atau terjadinya gangguan terhadap penyediaan darah pada suatu daerah khusus. Enzim-enzim di dalam sel akan menghancurkan sel dan jika hal ini terjadi pada epitelium atau otot ikan, maka jaringan yang nekrosa akan terkelupas (Plumb, 1994). Gambaran kerusakan jaringan organ usus akibat infeksi *A. salmonicida* dapat dilihat pada Gambar 28 dimana pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+ sebagai gambaran kontrol jaringan ikan sehat. dan rerata nilai skoring dari kerusakan usus disajikan pada Tabel 18.

Tabel 18. Rerata Skoring Nekrosis Usus

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	2,6	3	2,8	8,4	$2,80 \pm 0,2^a$
B (125 ppm)	2,2	2,4	1,8	6,4	$2,13 \pm 0,31^a$
C (175 ppm)	2	2	2	6	$2,00 \pm 0,0^a$
D (225 ppm)	1,8	1,6	2	5,4	$1,80 \pm 0,2^b$
E (275 ppm)	1,8	1,6	1,8	5,2	$1,73 \pm 0,12^c$

Kandungan terpenoid mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Kandungan terpen mampu sebagai antibakteri sehingga semakin tinggi konsentrasi ekstrak mampu memberikan pengaruh baik terhadap tingkat kerusakan nekrosis pada organ usus. Steroid merupakan salah satu senyawa terpen yang mudah larut dalam lemak. Kemudahannya larut dalam lemak menjadi salah satu faktor mudahnya senyawa ini dalam merusak membran sel bakteri. Sifat antibakteri steroid adalah mengganggu proses translasi pada ribosom yang

berakibat pada kacaunya pembacaan komponen penyusun sel bakteri. Hal ini berdampak pada proses sintesis protein bakteri (Rosyidah, *et al.* 2010). Untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak *A. marina* terhadap nilai skoring kerusakan nekrosis maka dilakukan analisa regresi dan uji *polynomial orthogonal* yang dapat dilihat pada Gambar 29, didapatkan pola hubungan linear dengan persamaan garis yaitu $y = 2,9567 - 0,0049x$ dan $R^2 = 0,83$ yang berarti ekstrak tersebut mampu memberikan pengaruh terhadap persentase kerusakan usus akibat kongesti sebesar 83% dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain.



Gambar 29. Grafik Regresi Nekrosis Usus Ikan Koi (*C. carpio*)

b. Edema

Edema adalah suatu akumulasi cairan yang abnormal di dalam rongga-rongga tubuh atau di dalam ruang-ruang interstisial. Edema ditandai oleh adanya cairan kuning di dalam rongga abdominal atau material encer/berair, seperti gelatin di dalam jaringan (Hibiya and Fumio 1995). Menurut Priyatna, *et al.* (2011), bahwa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi berupa penyakit *furunculosis* yaitu bakteri *A. salmonicida*. Salah satu akibat dari infeksi bakteri ini yaitu mampu memberikan kerusakan berupa edema hingga menyebabkan nekrosa pada tubuh ikan mas (*C. carpio*). Suatu antibakteri merupakan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri tertentu. Gambar 28 dapat dilihat pada perlakuan A merupakan gambaran tingkat kerusakan tertinggi setelah perlakuan K- sebagai

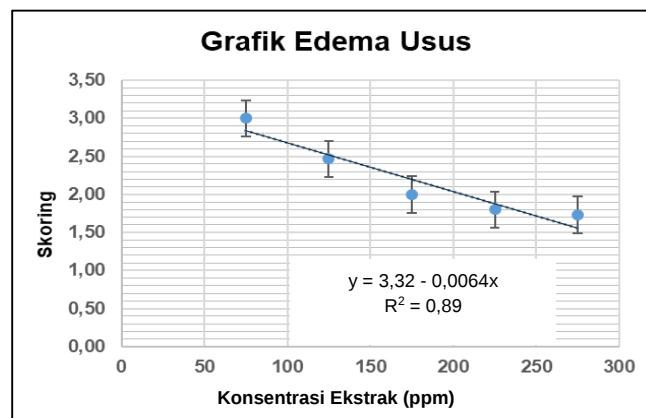
hasil gambaran kerusakan jaringan setelah diinfeksi, sementara pada perlakuan E merupakan perlakuan dengan tingkat kerusakan jaringan terendah yang paling mendekati K+ sebagai gambaran kontrol jaringan ikan sehat..

Organ usus diberi pewarnaan dengan pewarna HE selanjutnya dilakukan pengamatan dengan melakukan skoring. Hal ini memberikan hasil rata – rata yang berbeda terhadap kerusakan edema yang terjadi pada jaringan usus ikan mas (*C. carpio*). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan data rerata nilai skoring edema dari kerusakan usus yang disajikan pada Tabel 19.

Tabel 19. Rerata Skoring Edema Usus

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75 ppm)	3,2	3	2,8	9	3,00 ± 0,2 ^a
B (125 ppm)	2,2	2,4	2,8	7,4	2,47 ± 0,31 ^a
C (175 ppm)	2	2	2	6	2,00 ± 0,0 ^a
D (225 ppm)	1,8	1,6	2	5,4	1,80 ± 0,2 ^b
E (275 ppm)	1,8	1,6	1,8	5,2	1,73 ± 0,12 ^c

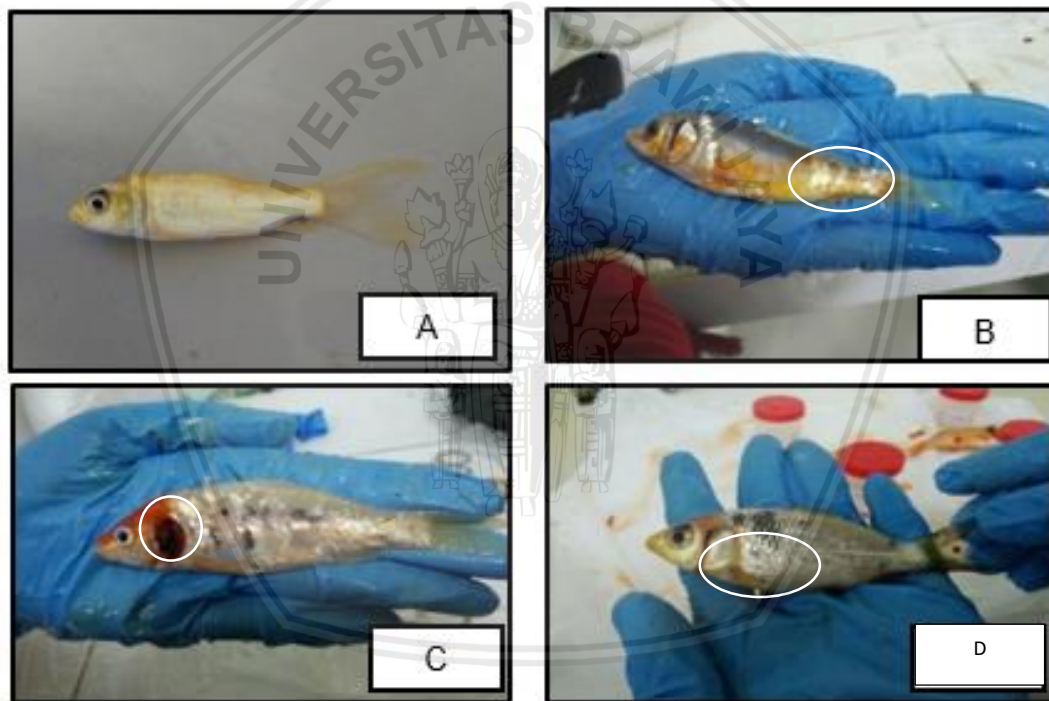
Hubungan antara pemberian ekstrak *A. marina* terhadap nilai skoring kerusakan nekrosis maka dilakukan analisa regresi dan uji *polynomial orthogonal* yang dapat dilihat pada Gambar 30, didapatkan pola hubungan linear dengan persamaan garis yaitu $y = 3,32 - 0,0064x$ dan $R^2 = 0,89$ yang berarti ekstrak tersebut mampu memberikan pengaruh terhadap persentase kerusakan usus akibat kongesti sebesar 89% dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain.



Gambar 30. Grafik Regresi Edema Usus Ikan Koi (*C. carpio*)

5.3.4 Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis memperlihatkan ikan terlihat gelisah dan berenang di atas permukaan air. Selain ikan berenang tidak beraturan dan sering menabrak dinding toples pemeliharaan. Ikan juga terlihat mengalami kerusakan pada bagian ekor, perut ikan membesar dan sisik yang mulai mengelupas seperti yang disajikan pada Gambar 31. Ikan koi (*C. carpio*) sebelum diinfeksi bakteri menunjukkan kondisi seperti berenang dengan normal tidak sering menabrak dinding toples, sirip tidak ada yang lepas, perut ikan yang tidak membesar dan kondisi insang yang masih merah.



Gambar 31. Gejala Klinis Ikan koi (*C. carpio*) (A) Ikan Sehat (B) sisik mulai lepas, (C) insang menghitam dan timbul bercak putih, (D) perut ikan membesar.

Pada ikan koi (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas* sering ditemukan tanda klinis seperti pembengkakan pada perut dan berisi cairan yang diikuti dengan kematian (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010). Penyebaran bakteri tersebut menyebabkan perubahan pola berenang, gerakan operculum lemah, nafsu makan berkurang, ikan berenang *gasping* (ikan berenang tegak dengan

posisi mulut tepat dibawah permukaan air), ikan diam di dasar, sisik lepas, sirip gripis (Hardi, *et al.*, 2014).

Gejala yang muncul ketika ikan terkena bakteri yaitu tubuh menjadi gelap, kemampuan berenang ikan mulai menurun, sering ke permukaan air karena insangnya rusak sehingga menyebabkan kesulitan bernafas. Terlihat juga bagian perut agak kembung atau membengkak. Jika sudah terlalu parah maka sirip dapat rusak dan insangnya berwarna keputihan. Bagian mata juga agak menonjol keluar (Mudlofar, *et al.*, 2013). Setelah dilakukan pengobatan perut ikan masih tampak sedikit pembesaran, namun pembuluh darah pada bagian kulit sudah mulai tidak tampak yang mencirikan pembuluh darah sudah mulai normal yang disajikan pada Gambar 32.



Gambar 32. Morfologi ikan koi diakhir perawatan

5.3.5 Parameter Penunjang Penelitian

Suhu pada media uji berada pada kisaran 24,5-28,7 °C dimana menurut Noviana, *et al.* (2016), setiap jenis ikan mempunyai batas toleran yang berbeda-beda dimana ikan Koi dapat hidup pada kisaran suhu 14-38°C. Nilai pH pada masa pemeliharaan diperoleh nilai 6,54-8,17 sehingga masih termasuk normal yang sesuai dengan pernyataan Sulmartiwi, *et al.* (2014) bahwa ikan koi bertahan hidup pada pH optimal yaitu 6,5-8. Nilai oksigen terlarut yang diperoleh berada pada kisaran 5,7-8,9 ppm yang sesuai dengan pernyataan Solichin, *et al.* (2013), bahwa oksigen sangat diperlukan untuk pernafasan dan metabolisme ikan di air, dimana kadar optimal DO lebih dari 5ppm.

6. PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun api-api (*A. marina*) terbaik berada pada fase tua dengan kandungan antibakteri yang lebih beragam berdasarkan analisis fitokimia tampak adanya kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid dan fenol. Pada uji fitokimia ini belum dapat dijadikan penentu akan keberadaan senyawa target secara kualitatif dikarenakan uji ini hanya menampilkan hasil secara kuantitatif yang menyebabkan jika kandungan senyawa target sangat sedikit maka dimungkinkan senyawa target tersebut tidak terdeteksi. Dilihat dari hasil FTIR mengindikasikan bahwa adanya dominansi senyawa flavonoid karena terdapatnya gugus C=C dan O-H dari grafik yang ditampilkan, berdasarkan hal tersebut maka dilanjutkan dengan uji LCMS untuk memperkuat prakiraan akan benar adanya turunan flavonoid dan alkaloid. Konsentrasi ekstrak terbaik pada uji in vitro dan in vivo yaitu 275ppm karena memiliki zona hambat (baktriostatik) tertinggi serta tingkat kerusakan organ yang minimal yang didukung oleh tingkat kelulushidupan terbaik (67%) sehingga dianggap sebagai konsentrasi yang paling efektif setelah perlakuan dengan pemberian antibiotik (91,67%).

6.2 Saran

Hasil penelitian ini dapat dijadikan rujukan penelitian berikutnya, dimana konsentrasi 275ppm merupakan konsentrasi terbaik dalam proses pengobatan ikan koi terhadap infeksi *A. salmonicida*, penggunaan konsentrasi jauh diatas nilai tersebut tidak disarankan karena berdasarkan hasil LC 50% menunjukkan bahwa ekstrak telah bersifat toksik pada 48 jam perendaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinata, M. O., I. W. Sudira dan I. K. Berata. 2012. Efek ekstrak ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) jantan. *Buletin Veteriner Udayana*. **4** (2) : 55-62.
- Affuso, Flora., V. Mercurio., V. Fazio and S. Fazio. 2010. Cardiovascular and metabolic effects of berberine. *World Journal of Cardiology*. **2** (4) : 71-77.
- Afifah, Bidayatul., N. Abdulgani dan G. Mahasri. 2014. Efektifitas perendaman benih ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dalam larutan perasan daun api-api (*Avicennia marina*) terhadap penurunan jumlah *Trichodina* sp. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **3** (2) : 2337-3520.
- Afrianto dan Liviawaty, 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 89 hlm.
- Alexander, D. K. N. 2015. Efek ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* roxb) terhadap resisten *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Majority*. **4** (8) : 177-184.
- Álvarez, Clara Fernández., D. Gijónb., M. Álvarez and Y. S. Santos. 2016. First isolation of *Aeromonas salmonicida* sub species *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. *Aquaculture Reports*. **4** : 36–41.
- Amanu, S., Kurniasih dan S. Indaryulianto. 2014. Idenifikasi Penyakit pada Budidaya Ikan Air Tawar di Bali. *Jurnal Veteriner*. **15** (4) : 474-486.
- Aminah., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Pengaruh perendaman ekstrak daun ketapang (*Terminalia cattapa*) terhadap kelulushidupan dan histologi hati ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (4) : 118-125.
- Anam, C., Sirojudin dan K. S. Firdausi. 2007. Analisis gugus fungsi pada sampel uji, bensin dan spiritus menggunakan metode spektroskopi FTIR. *Berkala Fisika*. **10** (1) : 79-85.
- Andayani, S., H. Suprastyani dan I. Masfiah. 2018. Pengaruh pemberian ekstrak kasar kulit buah naga (*Hylocereus costaricensis*) terhadap histopatologi hati ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *JFMRI*. **3** (2) : 149-159.
- Aniputri, F. D., J. Hutabarat dan Subandiyono. 2014. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap tingkat pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan kelulushidupan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2) : 1-10.

- Anita, A., S. Khotimah dan A. H. Yanti. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak daun benalu jambu air (*Dendrophoe pentandra* (L.) Miq) terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Protobiont*. **3** (2) : 268-272.
- Anwar, K., Fadlillaturrahmah dan D. P. Sari. 2017. Analisis kandungan flavonoid ekstrak etanol daun binjai (*Mangifera caesia* jack.) dan pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah tikus yang diinduksi fruktosa lemak tinggi. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. **2** (1) : 20-30.
- Apriyanto, Herman., E. Harpeni., A. Setyawan dan Tarsim. 2014. Pemanfaatan ekstrak buah *Rhizopora* sp. sebagai anti bakteri terhadap bakteri patogen ikan air tawar. *e-JTRBP*. **3** (1) : 289-296.
- Ardananuridin, A., S. Winarsih dan M. Widayat. 2004. Uji Efektifitas Dekok Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* Secara *In Vitro*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **20** (1) : 30-34.
- Arima, Hidetoshi., H. Ashida and G. Danno. 2002. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. **66** (5) : 1009–1014.
- Arum, Y.P., Supartono dan Sudarmin. 2012. Isolasi dan Uji Daya Anti Mikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal MIPA*. **35** (2) :165-174.
- Asniatih, M. Idris dan K. Sabilu. 2013. Studi histopatologi pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. **3** (12) : 13-21.
- Asriani, B. S. Laksmi, S. Yasni dan I. Sudirman. 2007. Mekanisme antibakteri metabolit Lb. plantarum dan monoasilgliserol minyak kelapa terhadap bakteri patogen pangan. *Jurnal Teknik dan Industri Pangan*. **18** (2) : 126-133.
- Assagaf, Fadhila., A. Wullur dan A. Yudistira. 2013. Uji toksisitas akut (Lethal Dose 50) ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.) terhadap tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus* L.). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. **2** (1) : 23-27.
- Astutiningsih, C., W. Setyani, dan H. Hindratna. 2014. Uji daya antibakteri dan identifikasi isolat senyawa katekin dari daun teh (*Camellia sinensis* L. var Assamica). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. **11** (2) : 50-57.
- Austin, B. dan D. A. Austin. 2007. Bacterial Fish Pathogens : Disease of Farmed and Wild Fish. Praxis Publication : Springer Science and Business Media. United Kingdom. 552 p.
- Aziz T, N Ratih CK, Fresca A. 2009. Pengaruh pelarut heksana dan etanol, volume pelarut, dan waktu ekstraksi terhadap hasil ekstraksi minyak kopi. *Jurnal Teknik Kimia*. **16** (1) : 1–8.
- Bandyopadhyay, Samiran., P. H. Patra., A. Mahanti, D. K. Mondal., P. Dandapat, S. Bandyopadhyay., I. Samanta., C. Lodh., A. K. Bera., D. Bhattacharyya.,

- M. Sarkar., K. K. Baruah. 2013. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhea. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **6** (4) : 315-319.
- Battu, S. Kumar., M. A. Repka., S. Maddineni., A. G. Chittiboyina., M. A. Avery and S. Majumdar. 2010. Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the de-velopment of a solution dosage form for oral delivery. *Aaps Pharmscitech*. **11** (3) : 1466-1475.
- Bergh, P. V. and J. Frey. 2013. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microbial Biotechnology*. **7** : 381–400.
- Brenner, J. D., N. R. Krieg and J. R. Staley. 2007. Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology. *Springer Science & Business Media*. New York. 1106 p.
- Bruno, Ferdinando, F., A. Trotta., S. Fossey., S. Nagarajan., R. Nagarajan., L. A Samuelson and J. Kumar. 2010. Enzymatic synthetic and characterization of polyquercetin. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. **47** : 1191-1196.
- Burr, S. E., K. Stuber, T. Wahli, J. Frey. 2002. Evidence for a Type III Secretion System in *Aeromonas salmonicida* sp. *Salmonicida*. *Journal Of Bacteriology*. **184** (21) : 5966-5970.
- Castro, Rosario and C. Tafalla. 2015. Overview of fish immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*. 3-54.
- Cepeda, G. N., B. B.i Santoso, M. M. Lisangan dan I. Silamba. 2018. Penapisan fitokimia akway (*Drimys piperita* Hook f.). *Agrotek*. 29-33.
- Chen, Xiu-Min., Zhili Ma and David D. Kitts. 2018. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chemistry*. **249** : 143–153.
- Cipriano, R C. and G. L. Bullock. 2001. Furunculosis and Other Diseases Caused by *Aeromonas salmonicida*. Leewton Science Center. West Virginia. 33 p.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press. 477 p.
- Dabas, Deepti., R. J. Elias., G. R. Ziegler and J. D. Lambert. 2019. In vitro antioxidant and cancer inhibitory activity of a colored avocado seed extract. *International Journal of Food Science*. 1-7.
- Dewi, C. S. U., D. Soedharma dan M. Kawaroe. 2012. Komponen fitokimia dan toksisitas senyawa bioaktif dari lamun *Enhalus acoroides* dan *Thalassia aemprichii* dari pulau pramuka, DKI Jakarta. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan*. **3** (2) : 23-27.
- Dhayanithi, N. Balachandran., T. T. A. Kumar, J. Arockiaraj, C. Balasundaram, R. Harikrishnan. 2015. Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract

on immune protection and disease resistance in *Amphiprion sebae* against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. **45** : 52-58.

- Docan, A., V. Cristea, L. Dediu and A. Nica. 2012. Control of *Aeromonas salmonicida* infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in recirculating aquaculture system. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. **57** : 159-163.
- Dwisari, Fath., Harlia dan A. H. Alimuddin. 2016. Isolasi dan karakterisasi senyawa terpenoid ekstrak metanol akar pohon kayu buta-buta (*Excoecaria agallocha* L.). *JKK*. **5** (3) : 25-30.
- Ekawaty, Johanna Mei, H. Nursyam dan Hardoko. 2015. Karakterisasi *Avicennia marina* daun fraksi sebagai antibakteri *Aeromonas salmonicida*. *J. Hidup Sci. Biomed*. **5** (5) : 149-152.
- Erlangga. 2011. Analisis Histologi Ginjal Ikan Baung (*Hemibagrus nemurus*) Yang Terindikasi Pencemaran Di Perairan Sungai Kampar Provinsi Riau. *Berkala Perikanan Terubuk*. **39** (1) : 1-14.
- Ersa, I. M. 2008. Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Daerah Ciempea Bogor. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. 49 hlm.
- Fatisa, Y. 2013. Daya antibakteri estrak kulit dan biji buah pulasan (*Nephelium mutabile*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara in vitro. *Jurnal Peternakan*. **10** (1) : 31–38.
- Fernández-Álvarez, C., D. Gijónb, M. Álvarezb and Y. Santosa. 2016. First isolation of *Aeromonas salmonicida* sub species *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. *Aquaculture Reports*. (36-41) : 1-6.
- Hadi, A. A., dan S. F. Alwan. 2012. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. *IJPLS*. **3** (11) : 2071-2081.
- Haditomo, A. H. C., A. M. Lusiastuti dan Widanarni. 2016. Studi *Bacillus firmus* Sebagai Kandidat Probiotik dalam Menghadapi *Aeromonas hydrophila* Pada Media Budidaya. *Jurnal Saintek Perikanan*. **11** (2) : 111-114.
- Hamed, S. Ben., M. J. T. Ranzani-Paiva., L. Tachibana., D. de C. Dias., C. M. Ishikawa and M. A. Esteban. 2018. Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunology*. **80** : 550–562.
- Hanin, N. N. F dan R. Pratiwi. 2017. Kandungan fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun paku laut (*Acrostichum aureum* L.) fertil dan steril. *J. Trop. Biodiv. Biotech*. **2** : 51—56.
- Hanum, A. M dan N. D. Kuswyasari. 2014. Laju dekomposisi serasah daun trembesi (*Samanea saman*) dengan penambahan inokulum kapang. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **3** (1) : 2337-3520.

- Hardi, E. H., C. A. Pebrianto, T. Hidayanti dan R. T. Handayani. 2014. Infeksi *Aeromonas hydrophila* melalui jalur yang berbeda pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. **8** (2) : 130-133.
- Harizon., Pujiastuti, B., Kurnia, D., Sumiarsa, D dan Shiono, Y. 2014. Triterpenoid lupan dari kulit batang *Sonneratia alba* (lythraceae). *Bionatura Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. **16** (1) : 25 - 29.
- Hibiya T dan Fumio T. 1995. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Edisi kedua. Japan. Kodansha Ltd.
- Hidayah, Nikmatul., A. K. Hisan., A. Solikin., Irawati dan D. Mustikaningtyas. 2016. Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Creativity Students*. **1** (1) : 1-9.
- Idowu, TA., H.A. Adedeji and O.A. Sogbesan. 2017. Fish disease and health management in aquaculture production. *International Journal of Environment & Agricultural Science*. **1** (1) : 1-6.
- Illing, I., W. Safitri dan Erfiana. 2017. Uji fitokimia ekstrak buah dengan. *Jurnal Dinamika*. **8** (1) : 66-84.
- Indriani, A. Dwi., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Penggunaan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) sebagai alternatif pengobatan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (3) : 58-65.
- Jain, P. K., A. Soni, P. Jain and J. Bhawsar. 2016. Phytochemical analysis of *Mentha spicata* plant extract using UV-VIS, FTIR and GC/MS technique. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **8** (2) : 1-6.
- Jain. D., H. K. Daima., S. Kachhwaha and S. L. Kothari. 2009. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. **4** (3) : 557 - 563.
- Jaisinghani, R. Narendra. 2017. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology Research*. **8** (6877) : 13-14.
- Jampil, Tirta H., H. Syawal dan M. Riyauwaty. 2017. Sensitivitas ekstrak kulit batang mangrove *Rhizopus* sp. terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida*. 1-12.
- Jones JB. 1998. Plant nutrition manual. Florida (US): CRC Press. 149 p.
- Juanda, S. J. dan S. I. Edo. 2018. Histopatologi insang, hati dan usus ikan lele (*Clarias gariepinus*) di Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur. *Saintek Perikanan*. **14** (1) : 23-29.
- Karimuna, Siti rahmah. 2015. Uji korelasi konsentrasi hara n, p, dan k daun dengan produksi senyawa bioaktif kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) akibat

aplikasi pupuk kandang ayam. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. 57 hlm.

- Kartz, R. 2005. *Microbiology the Easy Way*. Barron's Educational Series. New York. 536 p.
- Khalil, Munawar., A. Mardhiah dan R. Rusydi. 2015. Pengaruh penurunan salinitas terhadap laju konsumsi oksigen dan pertumbuhan ikan kerapu lumpur (*Epinephelus tauvina*). *Acta Aquatica*. **2** (2) : 114-121.
- Kordi, K.M.G.H. 2013. *Budidaya Ikan Nila Di Kolam Terpal*. Lily Publisher. Yogyakarta. 112 hlm.
- Kumar, G. Dinesh., M. Karthika, R. Rajakumara and K. Baskar. 2018. Effects of *Avicennia marina* extracts on *Labeo rohita* (Ham) challenged with *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology Research and Innovation*. 1-6.
- Kusrini, Eni., S. Cindelas dan A. B. Prasetyo. 2015. Pengembangan budidaya ikan hias koi (*Cyprinus carpio*) lokal di Balai Penelitian Dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias Depok. *Media Akuakultur*. **10** (2) : 71-78.
- Kusumawardani, I. R., R. Kusdarwati, dan D. Handijatno. 2008. Daya anti bakteri ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *In Vitro*. *Berkala Ilmiah Perikanan*. **1** (1) : 75-82.
- Li, Feng-lan., lei yang., qi-jie zanc, paul-k.s. shin., siu-gin cheung., yuk-shan wong., nora fung-yee tam and an-ping lei. 2017. Does energetic cost for leaf construction in *Sonneratia* change after introduce to another mangrove wetland and differ from native mangrove plants in South China?. *Marine Pollution Bulletin*. **124** : 1071–1077.
- Lingga, R.H., T. Sudiarti dan M. Wulandari. 2015. Sintesis *cu(II)-imprinted polymers* untuk ekstraksi fasa padat dan prakonsentrasi ion tembaga(ii) dengan ligan pengkhelat 4-(2-pyridylazo) recorcinol. *al Kimiya*. **2** (1) :30-39.
- Long, M., J. Zhaoc, T. Lia, C. Tafallad, Q. Zhanga, X. Wang, X. Gong, Z. Shenc and A. Lia. 2015. Transcriptomic and proteomic analyses of splenic immune mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. *Journal Of Proteomics*. 122 : 41–54.
- Maalik, Aneela., F. A. Khan., A. Mumtaz., A. Mehmood., S. Azhar., M. Atif., S. Karim., Y. Altaf and I. Tariq. 2014. Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **13** (9) : 1561-1566.
- Maftuch., F. H. Setyawan dan H. Suprastyani. 2018. Uji daya hambat ekstrak *Chaetoceros calcitrans* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida*. *JFMR*. **2** (1) : 39-46.
- Maftuch., Marsoedi., V. D. Putri., M. H. Lulloh., 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 Histopatologi Hati, Ginjal dan Insang. *JEEST*. **2** (2) : 114-122.

- Mallikarjunaa, K., G. Narasimhab., G. R. Dillipa., B. Praveenb., B. Shreedharc, C. Sree Lakshmic., B. V. S. Reddyc and B. Deva Prasad Raju. 2011. Green synthesis of silver nanoparticles using *ocimum* leaf extract and their characterization. *Digest Journal Of Nanomaterials And Biostructures*. **6** (1) : 181-186.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji patogenitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin,) melalui postulat koch. *J. Ristek Akuakultur*. **5** (2) : 245 – 255.
- Masugian. E. 2014 Struktur Komunitas Mangrove Di Desa Sungai Alam Kecamatan Bengkalis Kabupaten Bengkalis Provinsi Riau. Skripsi Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Pekanbaru. 74 hlm.
- Mohadi, R., A. Lesbani dan Y. Susie. 2011. Preparasi dan karakterisasi kalsium oksida (CaO) dari tulang ayam. *Chem. Prog.* **6** (2) : 77-80.
- Mudlofar, F., E. Yurisinthae dan A Santoso. 2013. Analisis usaha pembesaran ikan Mas (*Cyprinus carpio*) pada keramba jaring apung di kelurahan parit mayor kecamatan pontianak timur. *Jurnal Eksos*. **9** (3) : 153-175.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. **7** (2) : 361-367.
- Mulyani, Y., E. Bachtiar dan M.U. Kurnia. 2013. Peranan senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*. **1** (1) :1-9.
- Muqsith, A. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak fenol *Gracillaria verrucosa* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* secara in vitro. *Samkia*. **3** (1) : 69-75.
- Nasution, A. S. I., F. Basuki dan S. Hastuti. 2014. Analisis kelulushidupan dan pertumbuhan benih ikan nila saline strain pandu (*Oreochromis niloticus*) yang dipelihara di tambak Tugu, Semarang dengan kepadatan berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2) : 25-32.
- Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. Analisis nilai absorbansi dalam penentuan kadar flavonoid untuk berbagai jenis daun tanaman obat. *Pillar of Physics*. **2** : 76-83.
- Ningrum, D. W., D. Kusriani dan E. Fachriyah. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Senna siamea* Lamk). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **20** (3) : 123 – 129.
- Noer IS & Leni N. 2006. Bioaktivitas *Ulva reticulate* forsskal. Asal Gili Kondo Lombok Timur terhadap bakteri. *Jurnal Biotika*. **5** (1) : 45-60.
- Noor, R, Y., M. Khazali, dan I N.N. Suryadiputra. 1999. Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia. PHKAWI-IP, Bogor. 220 hlm.

- Noventi, wulan dan N. Carolina. 2016. Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) sebagai Alternatif Terapi *Acne vulgaris*. *Majority*. **5** (1) : 140-145.
- Noviana V.R.L, H. Pranggono dan M.B. Syakirin. 2016. Pengaruh penggunaan pasir malang sebagai filter dalam media air limbah batik terhadap kelangsungan hidup ikan koi (*Cyprinus carpio linn*). *PENA Akuatika*. **14** (1): 68-75.
- Nugraha, Aditya Cahya., A. T. Prasetya dan S. Mursiti. 2017. Isolasi, identifikasi, uji aktivitas senyawa flavonoid sebagai antibakteri dari daun mangga. *Indo. J. Chem. Sci*. **6** (2) : 91-96.
- Nurmaida. 2016. Pemrofilan metabolit tabat barito (*Ficus deltoidea*) menggunakan UPLC-QTOF-MS/MS. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor Bogor. 34 hlm.
- Nursidika, Perdina., O. Saptarini dan N. Rafiqua. 2014. Aktivitas antimikrob fraksi ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu* L.) pada bakteri *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*. *MKB*. **46** (2) : 94-99.
- Oktavia, G. A. E., M. Ibrahim, dan L. Lisdiana. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap penghambatan pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram. *LenteraBio*. **2** (3) : 239-243.
- Pan, X., F. Chen., T. Wu., H. Tang dan Z. Zhao. 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Jurnal Food Control*. **1** (20) : 598-602.
- Pantung, Nuntiya, K. G. Helander, H. F. Helander and V. Cheevaporn. 2008. Histopathological Alterations of Hybrid Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) in Acute and Subacute Cadmium Exposure. *Environment Asia*. **1** : 22-27.
- Parameswari, W., A. D. Sasanti dan Muslim. 2013. Populasi bakteri, histopatologi, kelangsungan hidup dan pertumbuhan benih ikan gabus (*Channa striata*) yang dipelihara dalam media dengan penambahan probiotik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **1**(1) : 76-89.
- Parubak, A. S. 2013. Senyawa Flavonoid Yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys beccariana*. Gibbs). *Chem. Prog*. **6** (1) : 34-37.
- Parwata, I. M. O. A dan P. F. S. Dewi. 2008. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Dari Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*). *Jurnal Kimia*. **2** (2) : 100-104.
- Permata, D. Andhika dan Alfi Asben. 2017. Karakteristik dan senyawa bioaktif ekstrak kering daun kluwih dari posisi daun yang berbeda. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. **21** (2) : 79-85.
- Plumb, J.A. 1994. Health Maintenance of Cultured Fishes: Principal Microbial Diseases. CRC Press Inc. USA. 254 p.

- Pommerville, J. C. 2010. Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology. Jones Bartlett Publishers. Canada. 352 p.
- Pradana, D., D. Suryanto dan Yunasfi. 2014. Uji daya hambat ekstrak kulit batang *Rhizophora mucronata* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* dan jamur *Saprolegnia* sp. secara in vitro. *Jurnal Aquacoastmarine*. **2** (1) : 78-92.
- Pradina, E. Lia. 2012. Aplikasi Metode Gc-MS Untuk Penetapan Kadar Residu Profenofos Pada Buah Stroberi (*Fragaria* sp.) Setelah Pencucian. Naskah Publikasi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta. 14 hlm.
- Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan-Udang: Bakteri. UM Press : Malang. 106 hlm.
- Prasetya, N., Sri S dan Kismiyanti. 2013. Prevalensi Ektoparasit yang Menyerang Benih Ikan Koi (*Cyprinus Carpio*) Di Bursa Ikan Hias Surabaya. **5** (1) : 113-116.
- Pratama, R. C., Rosidah., Sriati dan I. Rustikawati. 2017. Efektivitas ekstrak biji rambutan dalam mengobati benih ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **8** (1) : 130-138.
- Pratisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12.PT. Elex Media Komputindo. Jakarta. 281 hlm.
- Pratiwi, H. C. dan A. Manan. 2015. Teknik dasar histologi pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **7** (2) : 153-158.
- Priyatna, R., S. Indarjulianto dan Kurniasih. 2011. Infeksi *Aeromonas salmonicida* dari Berbagai Wilayah di Indonesia pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Biota*. **16** (2).
- Prosoeryanto, B.P., I. M. Ersa, R. Tiura dan S. U. Handayani. 2010. Gambaran histopatologi insang, usus dan otot ikan mujait (*Oreochromis mossambicus*) yang berasal dari daerah Ciampea, Bogor. *Indonesian Journal of Veterinary Science dan Medicine*. **2** (1) : 1-8.
- Puspitasari, Elsy., Rozirwan dan M. Hendri. 2018. Uji toksisitas dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt) pada ekstrak mangrove (*Avicennia marina*, *Rhizophora mucronata*, *Sonneratia alba* dan *Wylocarpus granatum*) yang berasal dari Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Biologi Tropis*. **18** (1) : 91-103.
- Putri, R. W., W. Tjahjaningsih, dan D. Handijatno. 2008. Daya antibakterial pigmen pyocyanin dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* terhadap *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. *Berkala Ilmiah Perikanan*. **3** (1) : 65-73.
- Rachmawati S dan Widiyanti PM. 2013. Kadar melamin pada produk berbahan susu dan susu bubuk yang dianalisis secara liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *JITV*. **18** (1) : 63-69.

- Rachmawati, D., Sumarno dan A. W. N. Cahyani. 2016. Efek Antibakteri Supernatan Jus Anggur Merah Yang Diisolasi Dengan Kecepatan Sentrifugasi 12.000 rpm Terhadap Pertumbuhan *S. mutans*. *Odonto Dental Journal*. **3** (2) : 81-87.
- Rahayu, S.D., Z.L. Zulfatin dan A. Nuriliani. 2013. Efek histopatologis insektisida λ -cyhalothrin terhadap insang, hati, dan usus halus ikan nila. *Biosfera*. **30** (2) : 52-65.
- Ramadani, Fitri. 2018. Aktivitas antioksidan, total tanin ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan identifikasi dengan LC-MS. Departemen Biokimia FMIPA, IPB, Bogor. 44 hlm.
- Ratna. S. 2014. Studi Zonasi Dan Kerapatan Hutan Mangrove Di Kelurahan moro Timur Kecamatan moro Kabupaten Karimun Provinsi Riau. Skripsi. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Pekanbaru. 82 hlm.
- Retnoningsih, S., K.H. Nitimulyo., K. Lanadimulya., Suprayogi., Supardi., D. Darmantani., I.P. Panca, Hasnah, Soefaad dan Milis. 2009. Efektivitas kanamycin terhadap furunculosis pada karper, *Cyprinus carpio*. *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci.)*. **11** (2) : 192-200.
- Revathi P., Jeyaseelansenthinath T and Thirumalaikolundhusubramaian P. 2014. Preliminary phytochemical screening and GC-MS analysis of ethanolic extract of mangrove plant-*Bruguiera cylindrica* (Rhizho) L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. **6** (4) : 729-740.
- Rinawati, N. D. 2011. Daya antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. Fak. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. ITS Surabaya. 13 hlm.
- Rohaeti, E., r. Heryanto., M. Rafi., A. Wahyuningrum dan L. K. Darusman. 2011. Prediksi kadar flavonoid total tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) menggunakan kombinasi spektroskopi IR dengan regresi kuadrat terkecil parsial. *Jurnal Kimia*. **5** (2) : 101-108.
- Roslizawaty, N. Y. Ramadani., Fakhurrazi, dan Herrialfian. 2013. Aktivitas antibakterial ekstrak etanol dan rebusan sarang semut (*Myrmecodia* sp.) terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika Veterinaria*. **7** (2) : 91-94.
- Rosyidah, K., Nurmuhaimina, S. A, Komari N, Astuti MD. 2010. Aktivitas antibakteri fraksi saponin dari kulit batang tumbuhan kasturi (*Mangifera casturi*). *Jurnal Bioscientiae*. **7** (2) : 25-31.
- Salikin, R. Q., Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Pengaruh perendaman ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap mortalitas dan histologi hati ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas caviae*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (3) : 43-50.
- Saptiani, Gina., A. N. Asikin., F. Ardhani dan EE. H. Hardi. 2018. Tanaman bakau api-api putih (*Avicenia marina*) berpotensi menghambat mikrob patogen dan melindungi post larva udang windu. *Jurnal Veteriner*. **19** (1) : 45-54.

- Sari, R. Permana dan Molani P. Hasibuan. 2017. Uji potensi antimikroba biji tumbuhan mangrove (*Avicennia marina*) sebagai upaya pemberantasan penyakit kepiting bakau (*Scylla serrata*). *JIPi*. **1** (2) : 113-120.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*Isis Hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*. **1** (3) : 166-174.
- Schimmel, Joshua P and S. Hattenschwiler. 2007. Nitrogen transfer between decomposing leaves of different N status. *Soil Biology & Biochemistry*. **39** : 1428–1436.
- Septiana, A. T dan A. Asnani. 2012. Kajian sifat fisikokimia ekstrak rumput laut coklat sargassum duplicatum menggunakan berbagai pelarut dan metode ekstraksi. *Agrointek*. **6** (1) : 22-28.
- Setyowati, E., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Pengaruh perendaman ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava*. L) terhadap kelulushidupan dan histologi hati ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) yang diinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (4) : 174-182.
- Sidabutar K.S.O. 2007. Pertumbuhan Semaian Rhizophora Apiculata pada Zona Berbeda Di Kawasan Hutan Mangrove Stasiun Kelautan Dumai. Pekanbaru: Program Sarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. 29 hlm.
- Simaremare, E, S. 2014. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy*. **11** (1) : 1-10.
- Singh, R. Nayan. 2012. Histopathological alterations in the kidney of *Cyprinus carpio* after exposure to dimethoate (ec 30%). *Indian J.Sci.Res*. **3** (1) : 127-131.
- Siregar, A. F., A. Sabdono dan D. Pringgienies. 2012. Potensi antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal Of Marine Research*. **1** (2) : 152-160.
- Siswandari, W. 2005. Nilai Diagnostik Pemeriksaan Imunositokimia Limfosit Sediaan Apus Darah Tepi Dibandingkan Analisis Kromosom pada Penderita dengan Dugaan Sindrome fragile X. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang. 57 hlm.
- Slembrouck, J., O. Komarudin., Maskur dan M. Legendre. 2005. Petunjuk Teknis Pembenihan Ikan Patin Indonesia, *Pangasius djambal*. IRD : Jakarta. 132 hlm.
- Smartt, J. 2001. Goldfish Varieties and Genetics. Library of Congress. Australia. 3 p.

- Soleha, T. U. 2015. Uji kepekaan terhadap antibiotik. Juke Unila. **5** (9) : 119-123.
- Solichin, A., N. Widyorini, D.S.M. Wijayanto. 2013. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dengan dosis yang berbeda terhadaplepasnya suckers kutu ikan (*Argulus* sp) pada ikan koi (*Cyprinus carpio*). *Journal Of Management Of Aquatic Resources*. **2** (2) : 46-53.
- Sopiah, Nida. 2014. Aktivasi jerami padi sebagai oil sorbent menggunakan asam asetat. *Jurnal teknologi lingkungan*. **16** (1) : 27-30.
- Suciati, Anisa., Wardiyanto dan Sumino. 2012. Efektifitas ekstrak daun Rhizopora mucronata dalam menghambat pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* dan *Vibrio harveyi*. *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **1** (1) : 1-8.
- Sujatno, Agus., R. Salam., Bandriyana., A. Dimyati. 2015. Studi scanning electron microscopy (SEM) untuk karakterisasi proses oksidasi paduan zirkonium. *Jurnal forum nuklir (jfn)*,. **9** (2) : 44- 50.
- Sukarni, Maftuch dan H. Nursyam. 2012. Kajian penggunaan ciprofloxacin terhadap histologi insang dan hati ikan botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*. *J.Exp. Life Sci*. **2** (1) : 6-12.
- Sukenda., L. Jamal., D. Wahjuningrum dan A. Hasan. 2008. Penggunaan Kitosan Untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **7** (2) : 159-169.
- Sulmartiwi, L., I.B.P.O. Dantika dan J. Triastuti. 2014. Pengaruh pemberian minyak atsiri daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) dalam transportasi tertutup benih ikan koi (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **6** (2): 215-221.
- Sumino, A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia cattapa* L.) untuk pengobatan infeksi *Aeromonas salmonicida* pada ikan patin (*Pangasioniodon hypophthalmus*). *Jurnal Sain Veteriner*. **3** (1) : 79-88.
- Supriyono, E., Yosmaniar, K. Nirmala dan Sukenda. 2013. Toksisitas moluskisida niklosamida terhadap pertumbuhan dan kondisi histopatologi juwana ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Iktiologo Indonesia*. **13**(1) : 77-84.
- Susanti, N. M. P., I, N, A, Budiman dan N. K. Warditiani. 2003. Skrining fitokimia ekstrak etanol 90% daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr). *Jurnal Udayana*. 83-87.
- Susanto. 2008. Pembenihan Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta. 34 hlm.
- Susanto, Dwi. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Insang, Otot dan Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) di Desa Cibanteng. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. 49 hlm.

- Syafitri, N. E., M. Bintang, dan S. Falah. 2014. Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah harendong (*Melastoma affine* d. don). *Current Biochemistry*. **1** (3) : 105–115.
- Taufik, Imam dan Eri Setiadi. 2012. Toksisitas serta potensi bioakumulasi dan bioeliminasi insektisida endosulfan pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). **7** (1) : 131-143.
- Thi, N. Do and Hwang, Eun-Sun. 2014. Bioactive Compound Contents and Antioxidant Activity in Aronia (*Aronia melanocarpa*) Leaves Collected at Different Growth Stages. *Prev. Nutr. Food Sci.* **19** (3) : 204-212.
- Tresnati, Joearnani., M. I. Djawad dan A.S. Bulqish. 2007. Kerusakan Ginjal Ikan Pari Kembang (*Dasyatis kuhlii*) Yang Diakibatkan Oleh Logam Berat Timbel (Pb). *Jurnal Sains dan Teknologi*. **7** (3) :153-160.
- Triyaningsih., Sarjito dan Sl. B. Prayitno. 2014. Patogenisitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2) : 11-17
- Triyanti, R. dan M. Yulisti. 2012. Rantai Pemasaran Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Kabupaten Blitar, Jawa Timur. *Buletin Riset Sosek Kelautan dan Perikanan*. **7** (1) : 14-20.
- Twigg, D. 2013. Buku Pintar Koi. Gramedia Pustaka Utama : Jakarta. 133 hlm.
- Ulfiana, Riris., G. Mahasri dan H. Suprpto. 2012. Tingkat kejadian aeromonas pada ikan koi (*Cyprinus carpio carpio*) yang terinfeksi *Myxobolus koi* pada derajat infeksi yang berbeda. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **4** (2) : 169-174.
- Ulmursida, Anisa., A. Ambariyanto, A. Trianto. 2017. Antibacterial activity of mangrove *Avicennia marina* leaves extract against *Virgibacillus marismortui* and *Micrococcus luteus* bacteria. *AACL Bioflux*. **10** (2) : 372-380.
- Utami, E. R. 2012. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. *Saintis*. **1** (1) :124-138.
- Wasis. 2008. Pedoman Riset Praktis untuk Profesi Perawat. Jakarta. EGC. 231 hlm.
- Weifu Yan., Yunyan Guo, Yong Xiao, Shuhua Wang, Rui Ding, Jiaqi Jiang, Haiyin Gang, Han Wang, Jun Yang, Feng Zhao. 2018. The changes of bacterial communities and antibiotic resistance genes in microbial fuel cells during long-term oxytetracycline processing. *Water Research*. **142** : 105-114.
- Werth, Martin., K. Mehlreter., O. Briones and M. Kazda. 2015. Stable carbon and nitrogen isotope compositions change with leaf age in two mangrove ferns. *Flora*. **210** : 80-86.

- Widiastuti, I. M. 2009. Pertumbuhan Dan Kelangsungan Hidup (*Survival Rate*) Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*) Yang Dipelihara Dalam Wadah Terkontrol Dengan Padat Penebaran Yang Berbeda. *Media Litbang Sulteng*. **2** (2) : 126–130.
- Wintoko, F., A. Setyawan, S. Hudaidah dan M. Ali. 2013. Imunogenisitas heat killed vaksin inaktif *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **2** (1) : 205-210.
- Wulandari, Ayu., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Patogenisitas isolat K14 yang diisolasi dari lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Demak. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2) : 143-149.
- YAO Ling., WU Ling-Ling., LI Qian., HU Qin-Mei., ZHANG Shu-Yuan., LIU Kang and JIANG Jian-Qin. 2018. Novel berberine derivatives: Design, synthesis, antimicrobial effects, and molecular docking studies. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **16** (10) : 774-781.
- Yixi Xie., W. Yang., F. Tang., X. Chen., L. Ren. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. **22** (1) : 132-149.
- Yuhana, M., I. Normalina, dan Sukenda. 2008. Pemanfaatan ekstrak bawang putih *Allium sativum* untuk pencegahan dan pengobatan pada ikan patin *Pangasionodon hypophthalmus* yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **7** (1) : 95-107.
- Zahro, L dan R. Agustini. 2013. Uji efektivitas antibakteri ekstrak kasar saponin jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNESA Journal of Chemistry*. **2** (3) : 120-129.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Penelitian



Akuarium (60x30x30)cm



Toples plastik 10L



Timbangan digital



Toples kaca 10L



Oven



Aerator Set

Lampiran 1. (Lanjutan)

 Nampan	 Pipet Tetes
 Bunsen	 Rak Tabung Reaksi
 Sprayer	 Jarum Ose
 Botol film	 Lemari pendingin

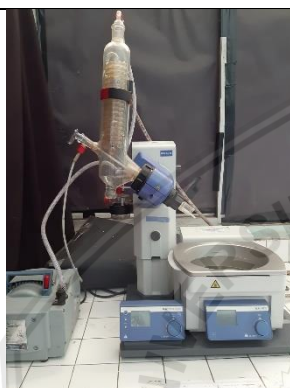
Lampiran 1. (Lanjutan)



Mikroskop



Gelas ukur



Rotary Evaporator



Spektrofotometer



Vortex mixer

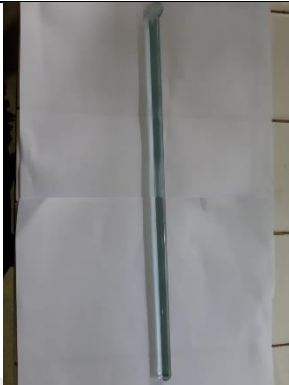


Inkubator

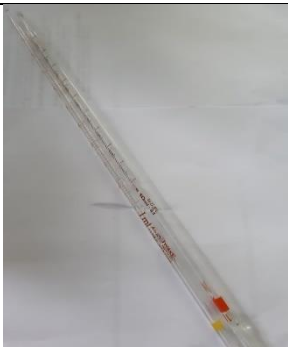
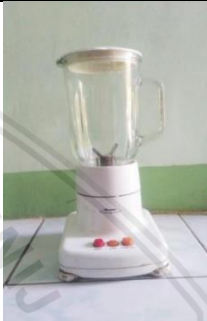
Lampiran 1. (Lanjutan)

 Erlenmeyer	 Seser ikan
 Thermometer	 Hotplate
 DO meter	 pH meter
 Jangka Sorong	 Tabung reaksi

Lampiran 1. (Lanjutan)

 Autoklaf	 Spatula
 Sectio set	 Laminary Air Flow (LAF)
 Micropipet	 Beaker glass

Lampiran 1. (Lanjutan)

 Pipet volume	 Bola hisap
 Gelas Ukur	 Blender
 Penggaris	 Corong

Lampiran 2. Bahan Penelitian



Ikan koi (*C. carpio*) ukuran 8cm



Daun mangrove api-api (*A. marina*)



Isolat Bakteri *A. hydrophilla*



Alkohol 96%



Latex



Akuades

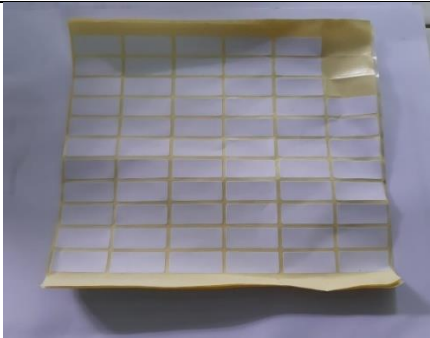


Etanol



Kapas

Lampiran 2. (Lanjutan)

 Spirtus	 Kertas label
 Plastic wrap	 Kertas saring
 Media	

Lampiran 3. Hasil Uji Identifikasi Daun Api-api (*A. marina*)



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI**

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN

No: 1499/IPH.06/HM/X/2018

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Nyi Ageng Dwi Linggasari
NIM : 155080507111027
Instansi : Fakultas Perikanan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
Tanggal material diterima : 9 Oktober 2018

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Subclass : Asteridae
Ordo : Scrophulariales
Family : Acanthaceae
Genus : Avicennia
Species : *Avicennia marina* (Forsk) Vierh.

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1965. Flora of Java Vol.II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 614
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XVII
3. M.S.M.Sosef, L.T. Hong dan S.Prawirohatmodjo. 1998 (esd) PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 5 (3) ;Timber trees: Lesser-known timbers Hal.94

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 24 Oktober 2018

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Dr. Sugeng Budiharta, M.Sc

Lampiran 4. Hasil Uji Fitokimia Daun Api-Api (*A. marina*)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 56D / 102.7 / 2019
Sifat : Biasa
Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon
Nama : Muhammad Zaky Zamani
NIM : 176080100011004
Instansi : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
Alamat Instansi : Malang
2. Identitas Sampel
Nama daerah sampel : Mangrove (Pohon Api-api)
Nama latin : *Avicennia marina*
Bagian sampel : Daun
Bentuk sampel : Ekstrak
Pelarut :
Tanggal penerimaan : 17 Mei 2019
Tanggal pemeriksaan : 22 Mei 2019

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Sampel	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Positif
2.	Alkaloid	Endapan Putih	Mangrove Tua	Negatif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Negatif
	Dragendrof	Endapan Jingga	Mangrove Tua	Negatif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Negatif
3.	Bouchardat	Endapan Cokelat	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Positif
	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Positif
			Mangrove Jatuh	Positif
4.	Terpenoid	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Mangrove Tua	Negatif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Negatif
	Steroid	Hijau Kebiruan	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Negatif
5.	Triterpenoid	Orange, Jingga Kecokelatan	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Negatif
			Mangrove Jatuh	Negatif
	Fenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman	Mangrove Tua	Positif
			Mangrove Muda	Positif
			Mangrove Jatuh	Positif

Lampiran 4. (Lanjutan)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Mangrove Tua (<i>Avicennia marina</i>)				
Mangrove Muda (<i>Avicennia marina</i>)				
Mangrove Jatuh (<i>Avicennia marina</i>)				

Nama Sampel	Tanin	Terpenoid	Fenol
Mangrove Tua (<i>Avicennia marina</i>)			
Mangrove Muda (<i>Avicennia marina</i>)			
Mangrove Jatuh (<i>Avicennia marina</i>)			

5. Pustaka

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 23 Mei 2019
 Kepala UPT Materia Medica Batu

 Dr. Hesti Rini Dwi A. M.Kes.
 NIP.19611102 199103 1 003

Lampiran 5. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. salmonicida*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
BADAN KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
**BALAI UJI STANDAR KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU,
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN**
JALAN RAYA SETU NO. 1, SETU CIPAYUNG, JAKARTA TIMUR 13880
TELP.: (021) 8451378, 84599367, 8448506 FAKSIMILE (021) 8448523, 8448679
LAMAM buski@bkipm.kkp.go.id POS ELEKTRONIK buski_jkt@yahoo.com, buskipm@gmail.com

Yth. Ibu Wydia
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

18 Oktober 2019

di _____
Tempat

SURAT PENGANTAR

Nomor: 2444/42.0/KI.110/X/2019

No.	Jenis yang dikirim	Banyak	Keterangan
1.	Kontrol Positif Bakteri : - <i>Aeromonas salmonicida</i>	1 ampul	Disampaikan dengan hormat untuk diketahui dan dipergunakan sebagaimana mestinya. Terima kasih.

Lembar kedua harap dikirim kembali.

Diterima tanggal :

Tanda Tangan :

Nama Penerima :



Kepala,

Woro Nur Endang Sariat

Lampiran 5. (Lanjutan)



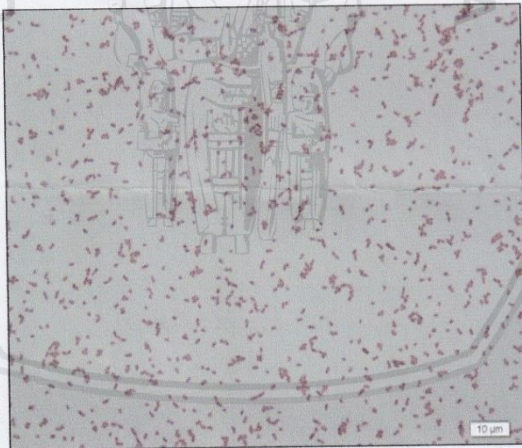
KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
BADAN KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
**BALAI UJI STANDAR KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU,
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN**
JALAN RAYA SETU NO. 1, SETU CIPAYUNG, JAKARTA TIMUR 13880
TELP.: (021) 8451378, 84599367, 8448506 FAKSIMILE (021) 8448523, 8448679
LAMAM buski@bkipm.kkp.go.id POS ELEKTRONIK buski_jkt@yahoo.com, buskipm@gmail.com

SERTIFIKAT ANALISIS

Strain Bakteri : *Aeromonas salmonicida*

Pasase 3 dari biakan original stock ≤ 4

Kode sampel	: 298A /BUSKIPM/2019
Asal Isolat	: NCIMB 13077
Kondisi Tumbuh	: Media Tumbuh TSA 0%; Temperatur : 27°C
Pengawetan	: Kering Beku
Kemurnian	: Berdasarkan hasil inokulasi pada media selektif dan non selektif menunjukkan morfologi sesuai dengan <i>Aeromonas salmonicida</i>
Pengujian	: Dilakukan dengan pewarnaan gram, uji biokimia
Cara Pemeliharaan	: Biakan dari kering beku dibuat stock dalam medium cair kemudian di simpan dalam freezer/suhu beku
Karakteristik Bakteri	: Berdasarkan <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> (Holt, et al.1996)
Gambar Pengecatan Gram	



Lampiran 5. (Lanjutan)

Karakterisasi Bakteri	
1. Gram	-
2. Bentuk	Batang
3. Indole production	-
4. MR	+
5. VP	-
6. Citrate, Simmons	-
7. H ₂ S production	-
8. Urea hydrolisis	-
9. Phenylalanine deaminase	-
10. Lysine decarboxilase	-
11. Arginin dihydrolase	+
12. Ornithin decarboxilase	-
13. Motility	-
14. Gelatin hydrolysis	-
15. Glucose	+
16. Gas from glucose	+
17. Arabinose	-
18. Glycerol	-
19. Inositol	-
20. Lactose	-
21. Maltose	+
22. Mannitol	+
23. Salicin	-
24. Sorbitol	-
25. Sucrose	-
26. Trehalose	-
27. Xylose	-
28. Esculin hydrolysis	+
29. DNase	+
30. Nitrate reduction	+
31. Oxidase	+
32. Brown soluble pigment	+



Ka. Sie. Pengujian HPIK
Mutu dan Keamanan
Hasil Perikanan,

Slamet Andriyanto, S.Si.
NIP. 19821012 200604 1 001

Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak

Pelarut yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi ekstrak uji yaitu aquades steril (9ml) dan DMSO (1ml), dimana perhitungan konsentrasi disajikan sebagai berikut:

- Perhitungan Stok Awal Ekstrak Daun *A. marina*

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = \frac{0,01 \text{ g}}{10 \text{ ml}}$$

a. Konsentrasi 100 ppm

$$\begin{aligned} - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \times 100 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1 \text{ ml} \\ - \text{Aquades} &= 10 \text{ ml} - 1 \text{ ml} = 9 \text{ ml} \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 125 ppm

$$\begin{aligned} - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \times 125 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1,25 \text{ ml} \\ - \text{Aquades} &= 10 \text{ ml} - 1,25 \text{ ml} = 8,75 \text{ ml} \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 150 ppm

$$\begin{aligned} - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \times 150 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1,5 \text{ ml} \\ - \text{Aquades} &= 10 \text{ ml} - 1,5 \text{ ml} = 8,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

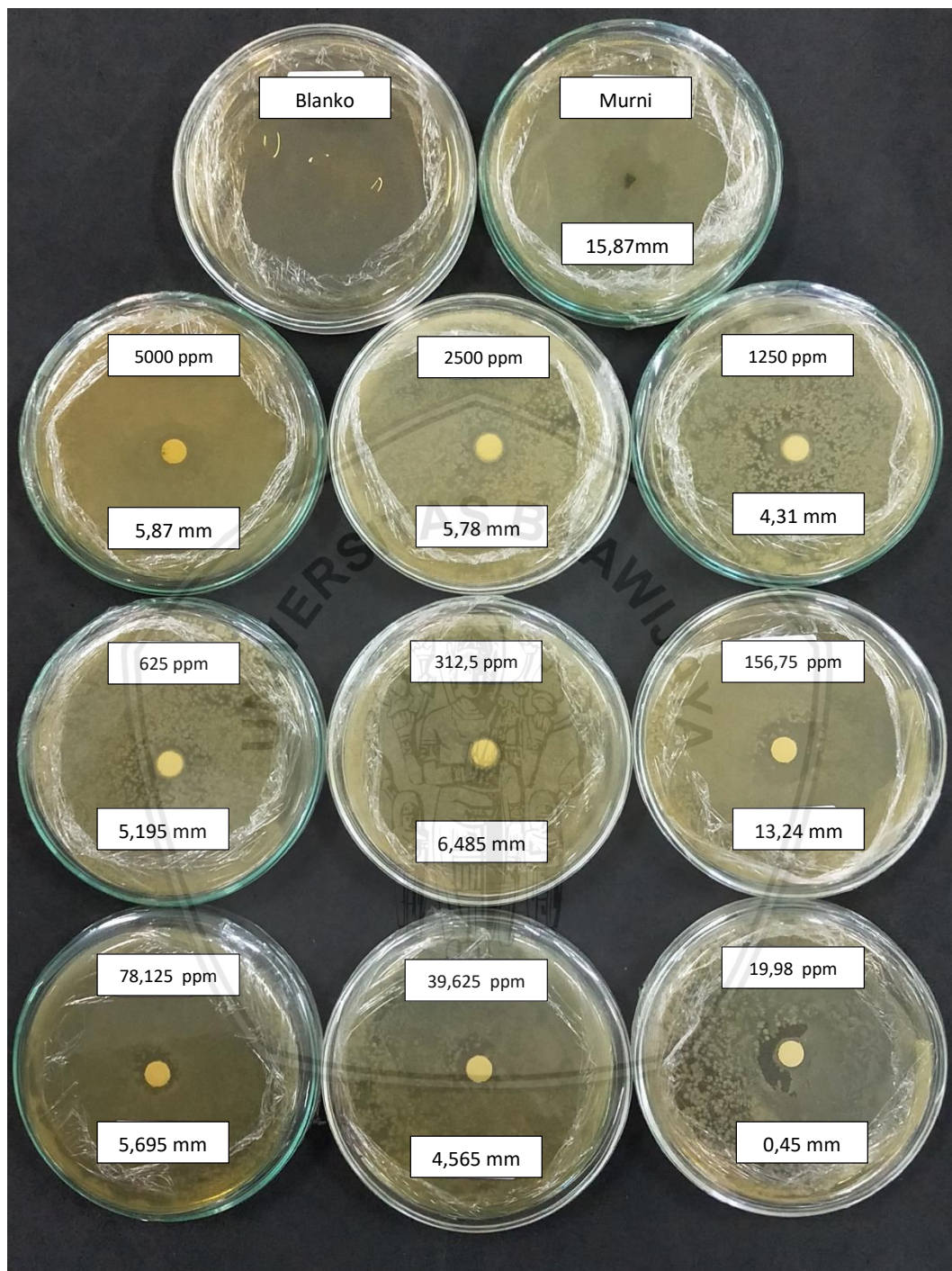
d. Konsentrasi 175 ppm

$$\begin{aligned} - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \times 175 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1,75 \text{ ml} \\ - \text{Aquades} &= 10 \text{ ml} - 1,75 \text{ ml} = 8,25 \text{ ml} \end{aligned}$$

e. Konsentrasi 200 ppm

$$\begin{aligned} - V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \times 200 \text{ ppm} \\ V_1 &= 2 \text{ ml} \\ - \text{Aquades} &= 10 \text{ ml} - 2 \text{ ml} = 8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 7. Hasil Uji Cakram Penentuan Konsentrasi (Pendahuluan)



Lampiran 8. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak *A. marina* untuk Pengobatan Ikan Koi (*C. carpio*)

Volume toples yang adalah 10.000 ml dengan perhitungan sebagai berikut :

a. Konsentrasi 75 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 75 \text{ ppm} \\ V_1 &= 75 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 75 \text{ ml} = 925 \text{ ml} \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 125 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 125 \text{ ppm} \\ V_1 &= 125 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 125 \text{ ml} = 875 \text{ ml} \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 175 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 175 \text{ ppm} \\ V_1 &= 175 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 175 \text{ ml} = 825 \text{ ml} \end{aligned}$$

d. Konsentrasi 225 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 225 \text{ ppm} \\ V_1 &= 225 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 225 \text{ ml} = 775 \text{ ml} \end{aligned}$$

e. Konsentrasi 275 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 275 \text{ ppm} \\ V_1 &= 275 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 2,75 \text{ ml} = 725 \text{ ml} \end{aligned}$$

Dosis antibiotik *Chloramphenicol* 30 ppm (Kontrol positif)

a. Konsentrasi 50 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10.000 \text{ ppm} &= 10.000 \text{ ml} \times 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 50 \text{ ml} \\ \text{Air} &= 10.000 \text{ ml} - 50 \text{ ml} = 725 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 9. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Insang

Kerusakan Patologi	Perlakuan	ulangannya	Nilai Skoring					Rerata LP	Rerata Sampel
			1	2	3	4	5		
Fusi Lamela (F)	A	1	2	3	2	3	3	2,6	2,27
		2	1	2	2	2	3	2	
		3	2	3	2	2	2	2,2	
	B	1	2	1	2	3	2	2	1.8
		2	1	2	2	3	2	2	
		3	1	2	2	1	1	1.4	
	C	1	2	1	1	3	1	1.6	1.67
		2	2	2	2	1	1	1.6	
		3	1	2	3	1	2	1.8	
	D	1	2	1	3	2	1	1.8	1.47
		2	1	1	1	1	2	1.2	
		3	1	2	1	2	1	1.4	
	E	1	1	2	2	1	1	1.4	1,4
		2	2	2	1	1	2	1.6	
		3	1	1	2	1	1	1.2	
	K+	1	2	1	1	1	1	1.2	1.20
		2	1	1	1	1	2	1.2	
		3	2	1	1	1	1	1.2	
Nekrosis (N)	A	1	1	3	2	3	3	2.4	2.4
		2	2	4	2	2	3	2.6	
		3	3	2	2	2	2	2.2	
	B	1	1	2	4	3	1	2.2	2
		2	3	2	2	2	2	2.2	
		3	2	1	1	3	1	1.6	
	C	1	1	2	2	3	2	2	2
		2	2	1	3	2	1	1.8	
		3	3	2	3	1	2	2.2	
	D	1	3	1	1	1	1	1.4	1.6
		2	2	2	2	1	1	1.6	
		3	1	2	4	1	1	1.8	
	E	1	1	2	1	1	3	1.6	1.73
		2	2	3	1	3	1	2	
		3	2	2	1	1	2	1.6	
	k+	1	1	2	1	2	1	1.4	1.26
		2	1	1	1	1	2	1.2	
		3	1	2	1	1	1	1.2	

Lampiran 10. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Ginjal

Kerusakan Patologi	Perlakuan	ulangannya	Nilai Skoring					Rerata LP	Rerata Sampel
			1	2	3	4	5		
Kongesti (K)	A	1	2	1	1	3	2	1,8	1,73
		2	1	1	3	2	2	1,8	
		3	1	1	3	2	1	1.6	
	B	1	3	1	1	1	1	1,4	1.53
		2	2	2	2	1	1	1,6	
		3	1	2	2	2	1	1.6	
	C	1	2	1	1	2	1	1.4	1.33
		2	1	2	1	2	1	1.4	
		3	1	1	1	1	2	1.2	
	D	1	1	2	1	1	1	1.2	1.27
		2	1	1	2	1	2	1.4	
		3	1	1	1	2	1	1.2	
	E	1	1	2	2	1	1	1.4	1,27
		2	1	1	1	1	2	1.2	
		3	1	1	2	1	1	1.2	
	K+	1	1	1	2	1	1	1.2	1.33
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	1	2	1	1	1	1.2	
Nekrosis (N)	A	1	2	3	1	3	1	2	2.13
		2	3	2	2	2	2	2.2	
		3	1	2	4	3	1	2.2	
	B	1	1	1	3	2	2	1.8	1,67
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	1	3	1	2	1	1.6	
	C	1	1	1	1	3	1	1.4	1.53
		2	2	1	2	2	1	1.6	
		3	1	2	2	2	1	1.6	
	D	1	3	2	1	1	1	1.6	1.47
		2	2	1	2	1	1	1.4	
		3	1	2	1	1	2	1.4	
	E	1	1	2	1	2	1	1.4	1.4
		2	2	3	1	1	1	1.6	
		3	1	1	1	1	2	1.2	
	k+	1	1	2	1	2	1	1.4	1.33
		2	2	1	1	1	2	1.4	
		3	1	2	1	1	1	1.2	

Lampiran 11. Hasil Skoring Kerusakan Jaringan Usus

Kerusakan Patologi	Perlakuan	ulangannya	Nilai Skoring					Rerata LP	Rerata Sampel
			1	2	3	4	5		
Nekrosis (N)	A	1	2	4	2	2	3	2.6	2.8
		2	3	3	4	3	2	3	
		3	1	4	4	2	3	2.8	
	B	1	3	2	2	1	3	2.2	2.13
		2	2	2	3	4	1	2.4	
		3	1	2	2	2	2	1.8	
	C	1	2	2	1	2	3	2	2
		2	2	2	2	2	2	2	
		3	1	3	2	2	2	2	
	D	1	1	1	3	2	2	1.8	1.8
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	2	3	1	3	1	2	
	E	1	1	1	3	2	2	1.8	1.73
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	1	3	1	3	1	1.8	
	K+	1	1	2	1	2	1	1.4	1.4
		2	2	3	1	1	1	1.6	
		3	1	1	1	1	2	1.2	
Edema (E)	A	1	3	4	3	4	2	3.2	3
		2	3	2	4	1	3	3	
		3	2	3	3	4	2	2.8	
	B	1	2	2	3	2	2	2.2	2.47
		2	3	1	3	2	3	2.4	
		3	1	3	1	2	1	2.8	
	C	1	2	2	2	3	1	2	2
		2	2	2	2	2	2	2	
		3	1	2	3	2	2	2	
	D	1	1	1	3	2	2	1.8	1.8
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	2	2	3	1	2	2	
	E	1	1	1	3	2	2	1.8	1.73
		2	1	1	3	2	1	1.6	
		3	1	3	2	1	2	1.8	
	k+	1	1	2	2	2	1	1.6	1.46
		2	2	1	1	1	2	1.4	
		3	1	2	2	1	1	1.4	

Lampiran 12. Perhitungan Kerusakan Jaringan Insang

a. Nekrosis

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	2,4	2,6	2,2	7,2	2,40	±0,20
B	2,2	2,2	1,6	6	2,00	±0,35
C	2	1,8	2,2	6	2,00	±0,20
D	1,6	2	1,6	5,2	1,73	±0,23
E	1,4	1,6	1,8	4,8	1,60	±0,20

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
 $= \frac{29,2^2}{15}$
 $= 56,84$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$
 $= (2,4^2 + 2,6^2 + \dots + 1,8^2) - 56,84$
 $= 58,56 - 56,84$
 $= 1,72$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$
 $= \frac{7,2^2 + 6^2 + 6^2 + 5,2^2 + 4,8^2}{3} - 56,84$
 $= 1,13$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 1,72 - 1,13$
 $= 0,59$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$
 $= (5 \times 3) - 1 = 14$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$
 $= 5 - 1$
 $= 4$

Lampiran 12. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 1,13/4$
 $= 0,28$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,59/10$
 $= 0,06$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,28/0,06$
 $= 4,82$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	1,13	0.28	4,82*	3.48	5.99
Acak	10	0.59	0.06	-	-	-
Total	14	-	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% (berbeda nyata) maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,06}{3}} = 0,20$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,20$
 $= 0,44$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,20$
 $= 0,63$

Lampiran 12. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1,60	1,73	2,00	2,00	2,40	
E	1,60	-	-	-	-	-	a
D	1,73	0,13 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	2,00	0,40 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-	-	-	a
B	2,00	0,40 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-	-	a
A	2,40	0,80 ^{**}	0,67 ^{**}	0,40 ^{ns}	0,40 ^{ns}	-	b

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-B diikuti oleh perlakuan A

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	7,2	-2	2	-1	1
B	6	-1	-1	2	-4
C	6	0	-2	0	6
D	5,2	1	-1	-2	-4
E	4,8	2	2	1	1
Q= $\sum (ci \cdot Ti)$		-5,6	0,8	-0,8	3,2
Hasil Kuadrat ($\sum ci^2$)		10	14	10	70
Kr= ($\sum ci^2$)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		1,045	0,015	0,021	0,049

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 1,045 + 0,015 + 0,021 + 0,049 \\
 &= 1,131
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	1,131			3.48	5.99
Linier	1	1,045	1,045	17,82**		
Kuadratik	1	0,015	0,015	0,260 ^{ns}		
Kubik	1	0,021	0,021	0,364 ^{ns}		
Kuartik	1	0,049	0,049	0,831 ^{ns}		
Acak	10	0,587	0,059			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R^2 masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{1,045}{1,045 + 0,587} \\
 &= 0,64
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,015}{0,015 + 0,587} \\
 &= 0,03
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,021}{0,021 + 0,587} \\
 &= 0,04
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,049}{0,049 + 0,587} \\
 &= 0,08
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

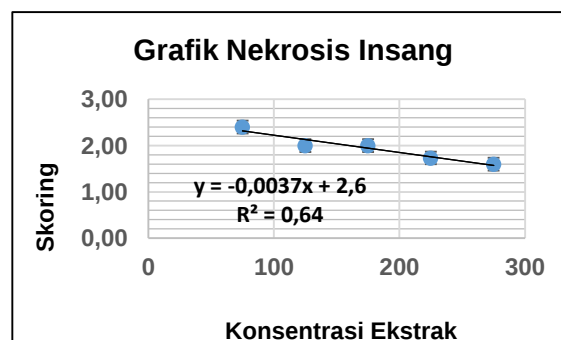
Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x ²
A1	75	2,4	172,80	5184
A2	75	2,6	187,20	5184
A3	75	2,2	158,40	5184
B1	125	2,2	275,00	15625
B2	125	2,2	275,00	15625
B3	125	1,6	200,00	15625
C1	175	2	350,00	30625
C2	175	1,8	315,00	30625
C3	175	2,2	385,00	30625
D1	225	1,6	360,00	50625
D2	225	2	450,00	50625
D3	225	1,6	360,00	50625
E1	275	1,4	385,00	75625
E2	275	1,6	440,00	75625
E3	275	1,8	495,00	75625
Total	2616	29,20	4808	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,00397$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 2,6$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut : $y = -0,0037x + 2,6$



Lampiran 12. (Lanjutan)

b. Fusi Insang

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	2,6	2	2,2	6,8	2,27	±0,31
B	2	2	1,4	5,4	1,80	±0,35
C	1,6	1,6	1,8	5	1,67	±0,12
D	1,8	1,2	1,4	4,4	1,47	±0,31
E	1,4	1,6	1,2	4,2	1,40	±0,20

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
 $= \frac{25,8^2}{15}$
 $= 44,38$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$
 $= (2,6^2 + 2^2 + \dots + 1,2^2) - 44,38$
 $= 46,52 - 44,38$
 $= 2,14$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$
 $= \frac{6,8^2 + 5,4^2 + 5^2 + 4,4^2 + 4,2^2}{3} - 44,38$
 $= 1,42$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 2,14 - 1,42$
 $= 0,72$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$
 $= (5 \times 3) - 1 = 14$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$
 $= 5 - 1$
 $= 4$

Lampiran 12. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 1,42/4$
 $= 0,36$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,72/10$
 $= 0,07$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,36/0,07$
 $= 4,94$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	1,42	0.36	4,94*	3.48	5.99
Acak	10	0.72	0.07	-	-	-
Total	14	-	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% (berbeda nyata) maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,07}{3}} = 0,22$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,22$
 $= 0,49$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,22$
 $= 0,69$

Lampiran 12. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1,40	1,47	1,67	1,80	2,27	
E	1,40	-	-	-	-	-	a
D	1,47	0,07 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	1,67	0,27 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-	-	-	a
B	1,80	0,40 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-	-	a
A	2,27	0,87 ^{**}	0,80 ^{**}	0,60 ^{**}	0,47 ^{ns}	-	b

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-B diikuti oleh perlakuan A

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	6,8	-2	2	-1	1
B	5,4	-1	-1	2	-4
C	5	0	-2	0	6
D	4,4	1	-1	-2	-4
E	4,2	2	2	1	1
Q= $\sum (ci \cdot Ti)$		-6,2	2,2	-0,6	1,8
Hasil Kuadrat ($\sum ci^2$)		10	14	10	70
Kr= ($\sum ci^2$)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		1,281	0,115	0,012	0,015

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 1,281 + 0,115 + 0,012 + 0,015 \\
 &= 1,424
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F _{hit}	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	1,424			3.48	5.99
Linier	1	1,281	1,281	17,80**		
Kuadratik	1	0,115	0,115	1,601 ^{ns}		
Kubik	1	0,012	0,012	0,167 ^{ns}		
Kuartik	1	0,015	0,015	0,214 ^{ns}		
Acak	10	0,720	0,072			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R² masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{1,281}{1,281 + 0,720} \\
 &= 0,64
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,115}{0,115 + 0,720} \\
 &= 0,14
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,012}{0,012 + 0,720} \\
 &= 0,017
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,015}{0,015 + 0,720} \\
 &= 0,021
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

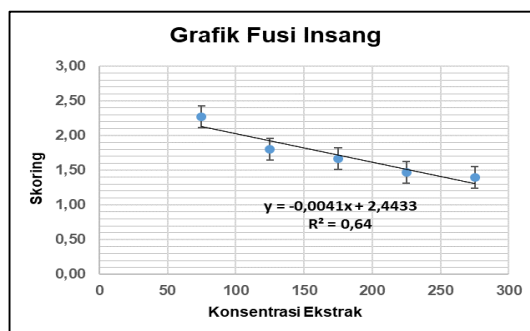
Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x2
A1	75	2,6	187,20	5184
A2	75	2	144,00	5184
A3	75	2,2	158,40	5184
B1	125	2	250,00	15625
B2	125	2	250,00	15625
B3	125	1,4	175,00	15625
C1	175	1,6	280,00	30625
C2	175	1,6	280,00	30625
C3	175	1,8	315,00	30625
D1	225	1,8	405,00	50625
D2	225	1,2	270,00	50625
D3	225	1,4	315,00	50625
E1	275	1,4	385,00	75625
E2	275	1,6	440,00	75625
E3	275	1,2	330,00	75625
Total	2616	25,80	4185	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0041$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 2,4433$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut : $y = -0,0041x + 2,4433$



Lampiran 13. Perhitungan Kerusakan Jaringan Ginjal

a. Kongesti

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	1,8	1,8	1,6	5,2	1,73	±0.12
B	1,4	1,6	1,6	4,6	1,53	±0.12
C	1,4	1,4	1,2	4	1,33	±0.12
D	1,2	1,4	1,2	3,8	1,27	±0.12
E	1,4	1,2	1,2	3,8	1,27	±0.12

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
 $= \frac{21,4^2}{15}$
 $= 30,53$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$
 $= (1,8^2 + 1,8^2 + \dots + 1,2^2) - 30,53$
 $= 31,16 - 30,53$
 $= 0,63$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$
 $= \frac{5,2^2 + 4,6^2 + 4^2 + 3,8^2 + 3,8^2}{3} - 30,53$
 $= 0,49$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 0,63 - 0,49$
 $= 0,133$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$
 $= (5 \times 3) - 1 = 14$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$
 $= 5 - 1$
 $= 4$

Lampiran 13. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 0,49/4$
 $= 0,124$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,13/10$
 $= 0,0133$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,124/0,0133$
 $= 9,3$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	0,496	0.124	9,3**	3.48	5.99
Acak	10	0.133	0.013	-	-	-
Total	14	2.96	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan lebih besar dari F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,03}{3}} = 0,094$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,094$
 $= 0,21$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,094$
 $= 0,30$

Lampiran 13. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1.27	1.27	1.33	1.53	1.73	
E	1.27	-	-	-	-	-	a
D	1.27	0 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	1.33	0.06 ^{ns}	0.06 ^{ns}	-	-	-	a
B	1.53	0.26*	0.26*	0.20 ^{ns}	-	-	b
A	1.73	0.46**	0.46**	0.40**	0.20 ^{ns}	-	c

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-D-C diikuti oleh perlakuan B kemudian diikuti oleh perlakuan A.

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	5,2	-2	2	-1	1
B	4,6	-1	-1	2	-4
C	4	0	-2	0	6
D	3,8	1	-1	-2	-4
E	3,8	2	2	1	1
Q= $\sum (ci \cdot Ti)$		-3,6	1.6	0,2	-6
Hasil Kuadrat ($\sum ci^2$)		10	14	10	70
Kr= ($\sum ci^2$)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		0,432	0.061	0.0013	0.0017

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 0,432 + 0.061 + 0.0013 + 0.0017 \\
 &= 0,496
 \end{aligned}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F _{hit}	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	0,496			3.48	5.99
Linier	1	0,432	0,432	32.40**		
Kuadratik	1	0,061	0,061	4.57*		
Kubik	1	0,001	0,001	0.10 ^{ns}		
Kuartik	1	0,002	0,002	0.13 ^{ns}		
Acak	10	0,133	0,013			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R^2 masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,432}{0,432 + 0,133} \\
 &= 0,764
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,061}{0,061 + 0,133} \\
 &= 0,314
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,001}{0,001 + 0,133} \\
 &= 0,010
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,002}{0,002 + 0,133} \\
 &= 0,012
 \end{aligned}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

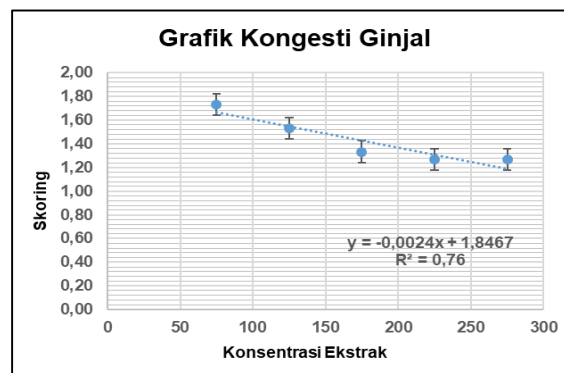
Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x ²
A1	75	1,8	129,60	5184
A2	75	1,8	129,60	5184
A3	75	1,6	115,20	5184
B1	125	1,4	175,00	15625
B2	125	1,6	200,00	15625
B3	125	1,6	200,00	15625
C1	175	1,4	245,00	30625
C2	175	1,4	245,00	30625
C3	175	1,2	210,00	30625
D1	225	1,2	270,00	50625
D2	225	1,4	315,00	50625
D3	225	1,2	270,00	50625
E1	275	1,4	385,00	75625
E2	275	1,2	330,00	75625
E3	275	1,2	330,00	75625
Total	2616	21,40	3549	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0024$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 1,8467$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut: $y = -0,0024x + 1,8467$



Lampiran 13. (Lanjutan)

b. Nekrosis

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	2	2,2	2,2	6,4	2,13	±0,12
B	1,8	1,6	1,6	5	1,67	±0,12
C	1,4	1,6	1,6	4,6	1,53	±0,12
D	1,6	1,4	1,4	4,4	1,47	±0,12
E	1,4	1,6	1,2	4,2	1,40	±0,20

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
 $= \frac{24,6^2}{15}$
 $= 40,34$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$
 $= (2^2 + 2,2^2 + \dots + 1,2^2) - 40,34$
 $= 41,56 - 40,34$
 $= 1,22$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$
 $= \frac{6,4^2 + 5 + 4,6^2 + 4,4^2 + 4,2^2}{3} - 40,34$
 $= 1,03$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 1,22 - 1,03$
 $= 0,19$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$
 $= (5 \times 3) - 1 = 14$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$
 $= 5 - 1$
 $= 4$

Lampiran 13. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 1,03/4$
 $= 0,26$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,19/10$
 $= 0,02$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,26/0,02$
 $= 13,79$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	1,03	0.26	13,79**	3.48	5.99
Acak	10	0.19	0.02	-	-	-
Total	14	-	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,19}{3}}$
 $= 0,11$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,11$
 $= 0,25$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,11$
 $= 0,35$

Lampiran 13. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1,40	1,47	1,53	1,67	2,13	
E	1,40	-	-	-	-	-	a
D	1,47	0,07 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	1,53	0,13 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-	-	-	a
B	1,67	0,27*	0,20 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-	-	b
A	2,13	0,73**	0,66**	0,60**	0,40**	-	c

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-D-C diikuti oleh perlakuan B kemudian perlakuan A.

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	6,4	-2	2	-1	1
B	5	-1	-1	2	-4
C	4,6	0	-2	0	6
D	4,4	1	-1	-2	-4
E	4,2	2	2	1	1
Q= $\sum (ci \cdot Ti)$		-5	2,6	-1	0,6
Hasil Kuadrat ($\sum ci^2$)		10	14	10	70
Kr= ($\sum ci^2$)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		0,833	0,161	0,033	0,002

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 0,833 + 0,161 + 0,033 + 0,002 \\
 &= 1,029
 \end{aligned}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	1,029			3.48	5.99
Linier	1	0,833	0,833	44,64**		
Kuadratik	1	0,161	0,161	8,622**		
Kubik	1	0,033	0,033	01,786 ^{ns}		
Kuartik	1	0,002	0,002	0,092 ^{ns}		
Acak	10	0,187	0,019			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R^2 masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,833}{0,833 + 0,187} \\
 &= 0,82
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,161}{0,161 + 0,187} \\
 &= 0,46
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,033}{0,033 + 0,187} \\
 &= 0,15
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,002}{0,002 + 0,187} \\
 &= 0,01
 \end{aligned}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

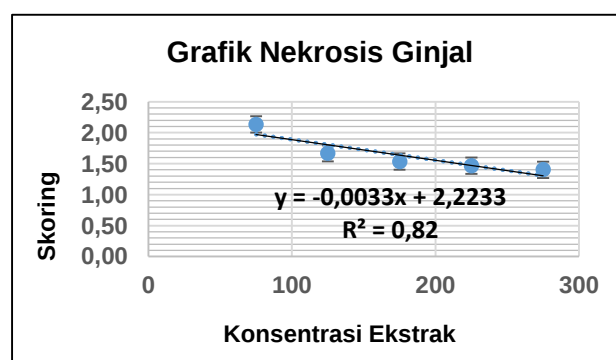
Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x ²
A1	75	2	144,00	5184
A2	75	2,2	158,40	5184
A3	75	2,2	158,40	5184
B1	125	1,8	225,00	15625
B2	125	1,6	200,00	15625
B3	125	1,6	200,00	15625
C1	175	1,4	245,00	30625
C2	175	1,6	280,00	30625
C3	175	1,6	280,00	30625
D1	225	1,6	360,00	50625
D2	225	1,4	315,00	50625
D3	225	1,4	315,00	50625
E1	275	1,4	385,00	75625
E2	275	1,6	440,00	75625
E3	275	1,2	330,00	75625
Total	2616	24,60	4036	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0033$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 2,2233$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut : $y = -0,0033x + 2,2233$



Lampiran 14. Perhitungan Kerusakan Jaringan Usus

a. Nekrosis

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	2,6	3	2,8	8,4	2,80	±0,20
B	2,2	2,4	1,8	6,4	2,13	±0,31
C	2	2	2	6	2,00	±0,00
D	1,8	1,6	2	5,4	1,80	±0,20
E	1,8	1,6	1,8	5,2	1,73	±0,12

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$

$$= \frac{31,4^2}{15}$$

$$= 65,73$$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$

$$= (2,6^2 + 3^2 + \dots + 1,8^2) - 65,73$$

$$= 68,28 - 65,73$$

$$= 2,55$$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$

$$= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$$

$$= \frac{8,4^2 + 6,4^2 + 6^2 + 5,4^2 + 5,2^2}{3} - 65,73$$

$$= 2,18$$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan

$$= 2,55 - 2,18$$

$$= 0,37$$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$

$$= (5 \times 3) - 1 = 14$$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$

$$= 5 - 1$$

$$= 4$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 2,18/4$
 $= 0,54$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,37/10$
 $= 0,04$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,54/0,04$
 $= 14,57$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	2,18	0.54	14,57**	3.48	5.99
Acak	10	0.37	0.04	-	-	-
Total	14	-	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,04}{3}}$
 $= 0,16$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,16$
 $= 0,35$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,16$
 $= 0,50$

Lampiran 14. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1,73	1,80	2,00	2,13	2,80	
E	1,73	-	-	-	-	-	a
D	1,80	0,07 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	2,00	0,27 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-	-	-	a
B	2,13	0,40*	0,33 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-	-	b
A	2,80	1,07**	1,00**	0,80**	0,67**	-	c

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-D-C diikuti oleh perlakuan B kemudian perlakuan A.

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	8,4	-2	2	-1	1
B	6,4	-1	-1	2	-4
C	6	0	-2	0	6
D	5,4	1	-1	-2	-4
E	5,2	2	2	1	1
Q= $\Sigma(ci \cdot Ti)$		-7,4	3,4	-1,2	2,4
Hasil Kuadrat (Σci^2)		10	14	10	70
Kr= (Σci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q²/Kr		1,825	0,275	0,048	0,027

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 1,825 + 0,275 + 0,048 + 0,027 \\
 &= 2,176
 \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	2,176			3.48	5.99
Linier	1	1,825	1,825	48,89**		
Kuadratik	1	0,275	0,275	7,372**		
Kubik	1	0,048	0,048	1,286 ^{ns}		
Kuartik	1	0,027	0,027	0,735 ^{ns}		
Acak	10	0,373	0,037			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R^2 masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{1,825}{1,825 + 0,373} \\
 &= 0,83
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,275}{0,275 + 0,373} \\
 &= 0,42
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,048}{0,048 + 0,373} \\
 &= 0,11
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,027}{0,027 + 0,373} \\
 &= 0,07
 \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

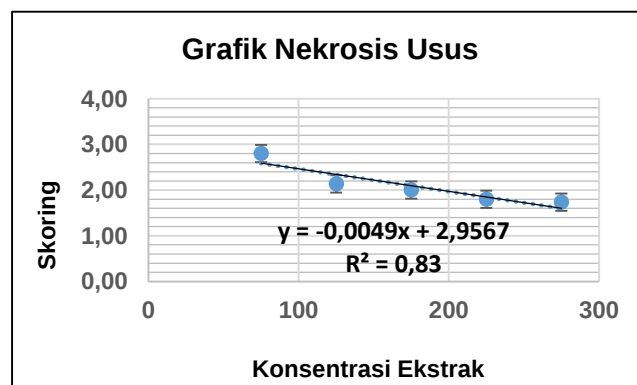
Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x ²
A1	75	2,6	187,20	5184
A2	75	3	216,00	5184
A3	75	2,8	201,60	5184
B1	125	2,2	275,00	15625
B2	125	2,4	300,00	15625
B3	125	1,8	225,00	15625
C1	175	2	350,00	30625
C2	175	2	350,00	30625
C3	175	2	350,00	30625
D1	225	1,8	405,00	50625
D2	225	1,6	360,00	50625
D3	225	2	450,00	50625
E1	275	1,8	495,00	75625
E2	275	1,6	440,00	75625
E3	275	1,8	495,00	75625
Total	2616	31,40	5100	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0049$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 2,9567$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut : $y = -0,0049x + 2,9567$



Lampiran 14. (Lanjutan)

b. Edema

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	STDEV
	1	2	3			
A	3,2	3	2,8	9	3,00	±0,20
B	2,2	2,4	2,8	7,4	2,47	±0,31
C	2	2	2	6	2,00	±0,00
D	1,8	1,6	2	5,4	1,80	±0,20
E	1,8	1,6	1,8	5,2	1,73	±0,12

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{N}$
 $= \frac{33^2}{15}$
 $= 72,60$
- JK Total = $(A-1^2 + A-2^2 + \dots + E-3^2) - FK$
 $= (3,2^2 + 3^2 + \dots + 1,8^2) - 72,60$
 $= 76,36 - 72,60$
 $= 3,76$
- JK Perlakuan = $\frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK$
 $= \frac{9^2 + 7,4^2 + 6^2 + 5,4^2 + 5,2^2}{3} - 72,60$
 $= 3,39$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 3,76 - 3,39$
 $= 0,37$
- Derajat Bebas (db) Total = $(n \times r) - 1$
 $= (5 \times 3) - 1 = 14$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan = $n - 1$
 $= 5 - 1$
 $= 4$

Lampiran 14. (Lanjutan)

- Derajat Bebas (db) Acak = $n \times (r - 1)$
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 3,39/4$
 $= 0,85$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
 $= 0,37/10$
 $= 0,04$
- F.Hitung = KTP/KTA
 $= 0,85/0,04$
 $= 22,68$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	3,39	0.85	22,68**	3.48	5.99
Acak	10	0.37	0.04	-	-	-
Total	14	-	-	-	-	-

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

- **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 0,04}{3}}$
 $= 0,16$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
 $= 2,23 \times 0,16$
 $= 0,35$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
 $= 3,17 \times 0,16$
 $= 0,50$

Lampiran 14. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Perlakuan	Rerata	E	D	C	B	A	Notasi
		1,73	1,80	2,00	2,47	3,00	
E	1,73	-	-	-	-	-	a
D	1,80	0,07 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	2,00	0,27 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-	-	-	a
B	2,47	0,74 ^{**}	0,67 ^{**}	0,47 [*]	-	-	b
A	3,00	1,27 ^{**}	1,20 ^{**}	1,00 ^{**}	0,53 ^{**}	-	c

Keterangan: (*) = berbeda nyata
(**) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan E-D-C diikuti oleh perlakuan B kemudian perlakuan A.

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	kuartik
A	9	-2	2	-1	1
B	7,4	-1	-1	2	-4
C	6	0	-2	0	6
D	5,4	1	-1	-2	-4
E	5,2	2	2	1	1
Q= $\sum (ci \cdot Ti)$		-9,6	3,6	0,2	-1
Hasil Kuadrat ($\sum ci^2$)		10	14	10	70
Kr= ($\sum ci^2$)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		3,072	0,309	0,001	0,005

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linier} + \text{JK Kuadratik} + \text{JK Kubik} + \text{JK Kuartik} \\
 &= 3,072 + 0,309 + 0,001 + 0,005 \\
 &= 3,387
 \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F _{hit}	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	3,387			3.48	5.99
Linier	1	3,072	3,072	82,29**		
Kuadratik	1	0,309	0,309	8,265**		
Kubik	1	0,001	0,001	0,036 ^{ns}		
Kuartik	1	0,005	0,005	0,128 ^{ns}		
Acak	10	0,373	0,037			
Total	14					

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 (**) = sangat berbeda nyata
 (*) = berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung R^2 masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{3,072}{3,072 + 0,373} \\
 &= 0,89
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,309}{0,309 + 0,373} \\
 &= 0,45
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,001}{0,001 + 0,373} \\
 &= 0,004
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,005}{0,005 + 0,373} \\
 &= 0,01
 \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y.

Perlakuan	x	y	Xy	x ²
A1	75	3,2	230,40	5184
A2	75	3	216,00	5184
A3	75	2,8	201,60	5184
B1	125	2,2	275,00	15625
B2	125	2,4	300,00	15625
B3	125	2,8	350,00	15625
C1	175	2	350,00	30625
C2	175	2	350,00	30625
C3	175	2	350,00	30625
D1	225	1,8	405,00	50625
D2	225	1,6	360,00	50625
D3	225	2	450,00	50625
E1	275	1,8	495,00	75625
E2	275	1,6	440,00	75625
E3	275	1,8	495,00	75625
Total	2616	33,00	5268	533052

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0064$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 3,32$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut : $y = -0,0064x + 3,32$

