PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN TURI (*Sesbania grandiflora*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN PADA IKAN NILA (*Oreochromisniloticus*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Edwardsiellatarda*

TESIS

Oleh:

SURYANINGSIH NDAHAWALI

NIM. 166080100111012

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN

MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN TURI (*Sesbania grandiflora*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN PADA IKAN NILA (*Oreochromisniloticus*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Edwardsiellatarda*

TESIS

Untukmemenuhipersyaratan

MemperolehGelar Magister

Oleh:

SURYANINGSIH NDAHAWALI

NIM. 166080100111012

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN

MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

TESIS

PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN TURI (*Sesbania grandiflora*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Edwardsiella tarda*

Oleh:

SURYANINGSIH NDAHAWALI
NIM. 166080100111012

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 27 Desember 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Komisi Pembimbing,

Ketua	Anggota
Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS	**Dr. Ir. Hardoko,MS**
NIP. 19611106 198602 2 001	**NIP. 19620108 1998802 1 001**
Tanggal: 0 8 FEB 2019	**Tanggal:** 0 8 FEB 2019

Mengetahui,

Dekan	Ketua
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan	**Program Magister**
Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS	**Dr. Ir. Maftuch, M.Si**
NIP. 19600322 198601 1 001	**NIP. 19660825199203 1 001**
Tanggal: 0 8 FEB 2019	**Tanggal :** 0 8 FEB 2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

JUDUL TESIS:

PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN TURI (*Sesbania grandiflora*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN PADA IKAN NILA (*Oreochromisniloticus*) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Edwardsiellatarda*

Nama Mahasiswa	**: SuryaningsihNdahawali**
NIM	**: 166080100111012**
Program Studi	**: BudidayaPerairan**
MinatIlmuStudi	**: PenyakitdanKesehatanIkan**

KOMISI PEMBIMBING

Ketua	**: Prof.Dr. Ir. Sri Andayani, MS**
Anggota	**: Dr.Ir. Hardoko, MS**

KOMISI PENGUJI

DosenPenguji 1	**:Dr.Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc**
DosenPenguji 2	**:Dr.UunYanuharS.Pi., M,Si**

TanggalUjianTesis: 27 Desember 2018

SK Penguji :

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

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

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

Malang, 30 Januari 2019

Mahasiswa

Suryaningsih Ndahawali

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Waikabubak Kabupaten Sumba Barat Provinsi Nusa Tenggara Timur pada tanggal 17 Januari 1993, merupakan anak pertama dari empat bersaudara dari Bapak Agustinus Ndahawali dan Ibu Rambu Pari Boka. Jenjang pendidikan formal yang ditempuh penulis adalah sekolah dasar pada tahun 2000-2005 di SDN Tillu Mareda Kota Waikabubak.Penulis melanjutkan pendidikan pada sekolah menengah pertama tahun 2005-2008 di SMP Kristen Waikabubak, Sekolah Menegah Atas tahun 2008-2011 di SMA Kristen Waikabubak dan pendidikan S1 di Fakultas Kelautan dan Perikanan pada tahun 2011-2015 di Universitas Nusa Cendana Kota Kupang. Setalah itu tahun 2016 semester ganjil, Penulis diterima pada Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikana dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Hormat dan Kemulian Bagi Tuhan Yesus Yang Maha Kuasa, atas Rahmat dan Anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelsaikan Tesis yang berjudul : **Pemanfaatan Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) Sebagai Antibakteri dan Imunostimulan Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Terinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*.**

Penyususnan tesisi ini merupakan salah satu persyaratan untuk menperoleh gelar magister pada program studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Uniersitas Brawijaya Malang.

1. Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku Ketua Komisi Pembimbing dan Dr. Ir. Hardoko, MS selaku Anggota Komisi Pembimbing yang telah memberikan masukan, arahan, nasehat dan bimbingan ilmu mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya laporan tesis ini.
2. Dr. Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi.,M,Si yang telah bersedia menjadi dosen penguji dan memberikan arahan serta masukan pada saat ujian proposal dan ujian tesis untuk kelengkapan tesis ini.
3. Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Dr. Ir. Maftuch, MS selaku Ketua Program Pasca sarjana (S2) yang telah memberikan saran dan masukan dalam penyelesaian laporan tesis ini.
4. Kedua orang tua penulis Bapak Agustinus Ndahawali dan Ibu Rambu Pari Boka beserta adik-adik terkasih Goldfrida, Umbu, Adi Papa, Yuan, Sari, beserta keluarga yang telah membimbing dan mendoakan serta memberi motivasi dan dukungan moril pada penulis.
5. Rektor, para pembantu rektor beserta seluh sivitas Universitas Kristen Wira Wacana Sumba yang telah memeberika dukan finasial kepada penulis
6. Teman – teman angkatan Pasaca Sarjana 2016 Ganjil yang telah membantu memberi dukungan dan bantuan selama perkulihan dan penelitian tesis

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

Suryaningsih Ndahawali. PEMANFATAN EKSTRAK DAUN TURI (*Sesbania* grandiflora) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN PADA IKAN NILA (*Oreochromis* niloticus) YANG TERINFEKSI BAKTERI *Edwardsiella tarda* Dibawah bimbingan**Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** dan **Dr.Ir. Hardoko, MS**

Ikan nila merupakan ikan air tawar bernilai ekonomis tinggi yang dibudidayakan dapat hidup diperairan yang kadar salinitas tinggi. Dalam kegiatan pengembangan budidaya ikan nila terdapat kendala salah satunya adalah timbulnya penyakit infeksi oleh bakteri *Edwardsiella tarda* yang menyebabkan ikan sakit hingga mengalami kematian. Terkait hal tersebut perlu dilakukan pencegahan yang tidak memberikan dampak negatif pada ikan dan juga lingkungan yaitu dengan penggunaan imunostimulan. Peggunaan tanaman berpotensi sebagai imunostimulan yang dapat diaplikasikan sebagai upaya pencegahan ikan nila dari infeksi bakteri *Edwardsiella tarda*. Salah satunya penggunaan daun turi yang memiliki kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, steroid, tannin, terpenoid yang dapat berperan sebagai antibakteri, antioksidan, antikanker dan juga bioaktivitasnya sebagai imunostimulan dengan merangsang sistem imun pada ikan. Untuk pemanfaatan daun turi digunakan metode meserasi untuk mengoptimalisasi kandungan senyawa aktif pada daun turi sehingga dapat diberikan dengan cara diinjeksi pada ikan untuk melihat respon imun non spesifik ikan nila yang di uji tantang bakteri *E. tarda.*

Metode penelitianyang digunakan adalah metode eksperimen, dimana tujuan dari metode penelitian ini adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab-akibat serta berapa besar hubungan sebab-akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan. Analisa data yang digunakan dalam penelitian inti adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 3 perlakuan dan 3 kali ulangan.

Penelitian ini dibagi dua yaitu penelitian tahap I dan penelitian tahap II. Pada penelitian tahap I dilakukan ekstraksi daun turi dengan mengunakan 2 pelarut etanol dan etil asetat dengan parameter jumlah rendemen, fraksinasi mengunakan corong pisah, uji aktivitas antibakteri metode difusi sumuran (75, 100,125 ppm), analisis GC_MS, penetuan dosis ekstrak dengan uji LC50 danpatogenesis *E. tarda* dengan uji LD50. Pada tahap II dilakukan penyuntikan dosis daun turi (150, 300, 450 ppm) ikan nila dan dilakukan masa pemeliharaan hewan uji 7 hari kemudian proses uji tantang bakteri *E. tarda* dilakukan pada hari ke 7 serta pengamatan parameter respon imun non spesifik (total leukosit, diferensial leukosit dan aktivitas fagositosis) ikan nila dilakukan pada minggu pertama (hari ke 7) dan hari terakhir pemeliharan hewan uji (Pasca uji tantang).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

SUMMARY

Suryaningsih Ndahawali. "THE USE OF LEAF EXTRACT (Sesbania grandiflora) AS AN ANTIBACTERIAL AND IMMUNOSTIMULANE IN THILAPIA (*Oreochromis niloticus*) INFECTED BY *Edwardsiella tarda* BACTERIA**". Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS and Dr. Ir. Hardoko, MS**

Tilapia is a freshwater economically valuable freshwater fish that can live in waters with high salinity. In the development activities of tilapia cultivation there are obstacles, one of which is the emergence of infectious diseases by Edwardsiella tarda, which causes fish to become sick and die. Related to this, prevention must be carried out which does not have a negative impact on fish and also the environment, namely by using immunostimulants. The use of plants has the potential to be immunostimulants which can be applied as an effort to prevent tilapia from Edwardsiella tarda infection. One of them is the use of turi leaves which contain active compounds such as flavonoids, steroids, tannins, terpenoids which can act as antibacterial, antioxidant, anticancer and also bioactivity as immunostimulants by stimulating the immune system in fish. To use turi leaves, meseration method is used to optimize the content of active compounds in turi leaves so that they can be administered by injecting fish to see the non-specific immune response of tilapia tested against E. tarda bacteria.

The research method used is the experimental method, where the purpose of this research method is to investigate whether there is a causal relationship and how much the causal relationship is by giving certain treatments to several experimental groups and providing control as a comparison. Analysis of the data used in the core research is a simple Randomized Design (CRD) with 3 treatments and 3 replications.

This study was divided into two, namely phase I research and phase II research. In the first phase of the study extracted turi leaves using 2 ethanol and ethyl acetate solvents with parameters of number of yields, fractionation using separating funnels, antibacterial activity test wells diffusion method (75, 100,125 ppm), GC_MS analysis, determination of extract dose with LC50 test and pathogenesis E. tarda with LD50 test. In stage II the injection of turi leaves (150, 300, 450 ppm) of tilapia was carried out and the maintenance period of the test animals was carried out 7 days later and the E. tarda bacterial challenge test was carried out on day 7 and observed non-specific immune response parameters (total leukocytes, differential leukocytes and phagocytic activity) Tilapia is carried out in the first week (7th day) and the last day of maintenance of test animals (Post challenge test).

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa penulis panjatkan atas berkatdan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelsaikan proposal penelitian tesis dengan judul "**Pemanfaatan Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) Sebagai Antibakteri dan Imunostimulan Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Terinfeksi Bakteri *Edwardsiellla tarda*"**.

Penulis menyadari proposal penelitian tesis ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan, akhir kata penulis ucapkan limpah terimaksih semoga dapt bermanfaat bagi pembangunan ilmu pengetahuan khususnya bagi saya pribadi dan pembaca.

.

Malang, 30 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL
LEMBAR PENGESAHAN
IDENTITAS PENGUJI
ORISINALITAS
RIWAYAT HIDUP
UCAPAN TERIMA KASIH
RINGKASAN
SUMMARY
KATA PENGANTAR i
DAFTAR ISI ii
DAFTAR GAMBAR v
DAFTAR TABEL vi
GLOSARY vii
DAFTAR LAMPIRAN ix

I. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan penelitian 5
1.4 Manfaat Penelitian 5

II. TINJAUAN PUSTAKA **6**
2.1 Ikan Nila (*Oreochromisniloticus*) 6
2.1.1 Klasifikasi dan Marfologi 6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran 7
2.1.3 Penyakit 7
2.2 Turi (*Sesbania grandiflora*) 8
2.2.1 Klasifikasi dan Marfologi 8
2.2.2 Kandungan Kimia 10
2.2.3 Manfaat *Sesbania grandiflora* 11
2.2.4 Ekstraksi 11

2.3 Krakterisasi Faksinasi 12
2.3.1 Analisis Fitokimia 12
2.3.2 Corong Pemisah 13
2.3.3 Gas Spektrofotometri Massa (GC-MS) 14
2.4 *Edwardsiella tarda* 15
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi 15
2.4.2 Patogenesis 16
2.4.3 Aktivitas Antimikroba 17
2.4.3.1 Metode Difusi (Metode Sumuran) 17
2.4.3.2 Metode MIC (Minimal Inhbitory Concentration) 18
2.4.4 Mekanisme Kerja Antibiotik 19
2.5. Sistem Imun 20
2.5. Respon Imun Non Spesifik 21

III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN 28
3.1. Landasan Teori 28
3.2 Kerangka Konsep Penelitian 30
3.3. Kerangka Operasional Penelitian 31
3.4 Penelitian Terdahulu 32
3.5 Pembaruan Penelitian 33
3.6 Hipotesis Penelitian 33
3.7. Publikasi Jurnal 33

IV. METODE DAN MATERI PENELITIAN 34
4.1 Waktu dan Tempat 34
4.2 Alat dan Bahan 34
4.2.1 Alat Penelitian 34
4.2.2. Bahan Penelitian 34
4.3 Metode Penelitian 35
4.4 Rancangan Penelitian 36
4.5 Prosedur Penelitian 38
4.5.1 Penelitian Tahap 1 38
4.5.1.1. Pembuatan Media In vitro 38
4.5.1.2. Kultur Bakteri *Edwardsiella tarda* 38

4.5.1.3. Ekstraksi Daun Turi 39
4.5.1.4 Uji Aktifitas Antibakteri 40
4.5.1.5. Fraksinisasi Daun Turi 41
4.5.2 Penelitian Tahap 2 42
4.5.2.1 Uji Toksisitas 42
4.5.2.2 Penyuntikan Dosis Optimum Fraksi Daun Turi 43
4.5.2.3 Uji Respon Imun Non Spesifik 44
4.6 Analisis Data 46
V. HASIL DAN PEMBAHASAN 47
5.1. Penelitian Tahap 1 47
5.1.1. Ekstraksi Daun Turi 47
5.1.2. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak 48
5.1.3. Rendemen dan Daya Hambat 50
5.1.4. Analisis Komatografi Gas Spektrofotometri Massa (GC-MS) 54
5.2. Penelitian Tahap 2 57
5.2.1. Sel Darah Putih 57
5.2.2. Defrensial Leukosit 61
5.2.3. Fagositosis 66
5.2.4. Respon Bahan Aktif Daun Turi Sebagai Imunostimulan 70
VI. PENUTUP 74
6.1. Kesimpulan 74
6.2. Saran 74
DAFTAR PUSTAKA 76

DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Ikan Nila 6
2. Daun Turi 9
3. Corong Pisah 14
4. *Edwardsiella tarda* 15
5. Kerangka Konsep 30
6. Kerangka Oprasiona 31
7. Dena Penelitian 37
8. Grafik Hasil Corong Pisah 51
9. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Sumuran 53
10. Analis GC-MC Fraksi n-heksan Daun Turi 55
11. Hubungan Antra Dosis Ekstrak dan Jumlah Leukosit 60
12. Limfosit Ikan Nila 62
13. Monosit Ikan Nila 64
14. Aktifitas Fagositosis 66
15. Hubungan Antara Dosis Ekstrak dan jumlah Fagositosis 68
16. Hubungan Antara Dosis Ekstrak dan jumlah Fagositosis 68
17. Diagram Skema Interakasi Respon Imun Spesifik 68

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Penelitian Pendahuluan 32
2. Hasil Ekstrak Daun Turi..... 47
3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Turu..... 49
4. Perbandingan Uji Antibakteri Ekstrak dan Fraksi..... 51
5. Hasil Analisis GC-MS Fraksi n-heksan..... 56
6. Rata-rata Leukosit..... 58
7. Rata-rata Limfosit..... 62
8. Rata-rata Monosit..... 65
9. Rata-rata Aktifitas fagosit 67

GLOSARIUM

A Antibakteri	:	Zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolismemikroba yang merugikan.
Antibiotik	:	Segolongan molekul, baik alami maupun sintetik, yang mempunyai efek menekan atau menghentikan suatu proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh bakteri
B Bioaktif	:	Senyawa esensial dan non esensial (misalnya vitamin atau polifenol) yang terdapat di alam, menjadi bagian dari rantai makanan, dan memiliki pengaruh terhadap kesehatan tubuh manusia
E Ekstraksi	:	Suatu proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya
Ekstrak	:	Sediaan dalam bentuk kering, kental, atau cair dengan cara menyaring simplisia nabati atau hewan menggunakan metode yang tepat tanpa terkenah cahaya matahari langsung
F Fitokimia	:	Segala jenis zat kimia atau nutrien yang diturunkan dari sumber tumbuhan, termasuk sayuran dan buah-buahan. Dalam penggunaan

		umum, fitokimia memiliki definisi yang lebih sempit. Fitokimia biasanya digunakan untuk merujuk pada senyawa yang ditemukan pada tumbuhan yang tidak dibutuhkan untuk fungsi normal tubuh, tetapi memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan atau memiliki peran aktif bagi pencegahan penyakit.
Fagositosis	:	Proses dimana sel-sel hidup tertentu yang disebut fagosit menelan atau memakan sel lain atau partikel. Fagosit mungkin organisme bersel satu, yang hidup bebas seperti amuba, atau salah satu dari sel-sel tubuh, seperti sel darah putih.
H Hematologi	:	Ilmu yang mempelajari mengenai komponen darah beserta kelainan fungsional sel darah
I Imunostimulan		Senyawa yang dapat meningkatkan respon imun
L Leukosit	:	Sel darah putih, sel yang bertanggung jawab dalam system pertahanan tubuh
M Makrofag	:	Jenis sel darah putih yang membersihkan tubuh dari partikel mikroskopis yang tidak diinginkan seperti bakteri dan sel-sel mati.
P Patogen	:	Agen biologis yang menyebabkan penyakit pada inangnya. Sebutan lain dari patogen adalah mikroorganismeparasit. Umumnya istilah ini diberikan untuk agen yang mengacaukan fisiologi normal hewan atau tumbuhanmultiselular.

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Negara agraris merupakan negara yang kaya akan tanaman-tanaman yang bisa dimanfaatkan sebagai obat oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit untuk manusia maupun untuk hewan. Salah satu negara yang kaya akan tanaman-tanaman obat herbal adalah Indonesia, tanaman obat yaitu tanaman yang berupa daun, batang, bunga, buah dan akar yang memiliki kahsiat. Pemanfaatan tanaman sebagai bahan baku obat, terutama obat tradisional mencapai lebih dari 1000 jenis, dimana 74% diantaranya merupakan tumbuhan liar yang hidup dihutan (Amzu dan Haryanto, 1990). Informasi dan penelitian mengenai jumlah dan jenis-jenis tanaman obat sangat diperlukan untuk mendasari upaya pelestarian, pemanfaatan dan pengembangan tanaman obat melalui budidaya jenis. Selain itu tanaman obat mempunyai banyak keuntungan, antara lain mudah diperoleh, relatif murah dan memiliki efek samping yang sangat kecil atau dapat dikatakan tanpa efek samping sama sekali (Hastuti, 2013).

Peluang pengembangan tanaman obat tradisional masih terbuka lebar guna membantu mengurangi ketergantungan masyarakat akan bahan baku pembuatan obat – obatan yang hingga kini masih didatangkan dari luar. Salah satu tanaman obat yang telah dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah turi (*Sesbania grandiflora*) yang termasuk dalam family *Fabaceae* adalah pohon yang bercabang, telah banyak digunakan sebagai salah satu sumber zat gizi penting. Daun turi secara tradisional digunakan sebagai obat untuk mengobati nasal catarrah, nyctalopia dan cephalagia, pustaka mengungkapkan bahwa *Sasbania grandiflora* memiliki aktivitas antioksidan, antijamur,antikangker, antibakteri, antiinflamasi (China *et al*., 2012; Rajangopal., 2016). Turi telah banyak

dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat dan juga bahan makanan, daun turi digunakan untuk salah satu bahan pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Overa *et al*.,1988). Gandhi *et al*. (2017) menyatakan bahwa, daun dan bunga turi diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan steroid sehingga bisa dimanfaatkan sebagai obat.

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu komoditas perikanan yang digemari masyarakat dalam memenuhi kebutuhan protein hewani karena memiliki daging yang tebal serta rasa yang enak dan pertumbuhan yang cepat (Putra *et al*.,2011). Ikan nila juga merupakan ikan yang potensial untuk dibudidayakan karena mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan dengan kisaran salinitas yang luas (Hadi *et al*., 2009).

Budidaya ikan nila pada umumnya tidak terlepas dari Kendala yang sering dihadapi yaitu penyakit ikan yang menyebabkan mortalitas hingga 100%. Timbulnya suatu penyakit dalam suatu usaha budidaya ikan bisa disebabkan karena lingkungan, pakan, dan organisme patogen yang menyerang ikan. Dalam budidaya ikan nila masalah yang sering terjadi adalah serangan patogen yang menyebabkan penyakit pada ikan nila (Purwaningsih, 2013). Salah satu organisme patogen yang menyebabkan penyakit pada ikan nila adalah bakteri. *Edwardsiella tarda* merupakan bakteri gram negatif yang banyak menyerang ikan nila. Jenis bakteri ini termasuk dalam daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) yang harus dicegah penyebarannya (Narwiyani dan Karniasih, 2011). (Hastuti, 2013).

Edwardsiella tarda merupakan bakteri gram negatif yang sering menyerang ikan nila diperairan yang menyebabkan penyakit dan mengakibatkan kegagalan yang besar dalam budidaya ikan (Musallamah *et al*., 2010). Irianto (2015) menyatakan ikan yang terinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda* mempelihatkan gejala – gejala yaitu warna tubuh menjadi gelap, kemampuan

berenang menurun, mata ikan rusak dan menonjol, sisik terlepas, seluruh sirip rusak, insang berwarnah merah, perut kembung dan apabila dilakukan pembedahan akan terlihat pendarahan pada organ hati serta membengkaknya ginjal dan limpa. Afrianto dan Liulawaty (2009) melaporkan juga bahwa ikan yang terinfeksi bakteri *Edwarsiella tarda* terjadi luka pada kulit yang berdampak pada semua sisik telepas dan terjadi pendarahan.

Sejauh ini usaha pengendalian penyakit dengan menggunakan bahan kimia dan antibiotik seperti oxolinic acid, streptomycin dan chloramphenico telah lama dilaksanakan oleh pembudidaya ikan. Namun cara ini menimbulkan dampak ikutan seperti pencemaran lingkungan, kematian organisme bukan sasaran, timbulnya organisme yang resisten terhadap bahan-bahan tersebut, serta timbulnya residu pada produk perikanan, Selain itu kesulitan mendapatkan antibiotik dan harganya yang mahal menyebabkan masyarakat cenderung masa bodoh sehingga membiarkan ikan mati (Haniffa *et al.,*2012). Melihat begitu besarnya potensi yang dimiliki oleh tanaman obat, hal ini menjadi peluang bagi setiap daerah untuk menjadikan tanaman obat sebagai salah satu prioritas dalam pembangunan sektor ekonomi, sosial dan budaya. Dengan melihat hal demikian maka perlu dilakukan suatu penelitian mengenai ” **Pemanfaatan Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) Sebagai Antibakteri dan Imunostimulan Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Terinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*”**

1.2. Rumusan Masalah

Edwardsiella tarda merupakan bakteri yang masuk dalam daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) yang harus diwaspadai dan dicegah penyebarannya. *E. tarda* dapat menyebabkan *Edwardsiellosis* atau *Enphisemathous Putrevactive disease of catfish* (EPDC) / *Edwardsiella*

septicaentia (ES) (Sustri *et al.,* 2011). Narwiyani dan Kurniasih (2011) melaporkan bahwa, *Edwardsiellosis* merupakan penyakit utama dalam budidaya ikan nila. *E. tarda* tidak memproduksi endotoksin seperti bakteri gram negatif lainnya, tetapi dapat menghasilkan 2 eksotoksiin yang akan menyebabkan lesi. Bakteri ini telah banyak tersebar di Indonesia seperti di daerah Jawa, Sumatra dan Kalimantan, *E. tarda* dapat diidentifikasi melalui gejala klinis, isolasi, morfologi dan molekul DNA.

Bakteri *E. tarda* merupakan tipe bakteri enteric, dapat ditularkan secara horizontal dari ikan sakit ke ikan sehat, dapat bertahan hidup pada air dan sedimen. Sedimen dan air dapat bersifat karier dan menyebabkan penyakit walaupun sudah terhindar dari ikan sakit (Prastiti *et al.,* 2015). Nucci *et al*., (2002) menyatakan bahwa, bakteri *E.tarda* hidup pada perairan tawar dan laut dapat dibawah oleh reptile, lobster air tawar dan tinja manusia. Infeksi *E. tarda* pada manusia ditularkan memalui kontaminasi tinja,makanan dan air atau disebut penularan oral, fecal. Strein *E.tarda* pada ikan diperoleh hanya dari penularan antara ikan.

Daun Turi (*Sasbania grandiflora*) dari jenis tanaman yang sudah dimanfaatkan oleh masyarakat untuk bahan makanan dan dalam mengobati berbagai macam penyakit seperti, pencahar, antipiretik, diuretic dan analgetik. Bagian dari tanaman turi hampir semua sudah dimanfaatkan yang meliputi daun, bunga, kulit batang dan akar sebagai obat (Anzwar, 2010). Turi diduga mengandung senyawa-senyawa metabolik sekunder yang dapat dimanfaatkan dalam dunia farmasi yang berkahsiat dapat mengobati penyakit (Makalalag *et al*.,2011).

Makalalag *et al.,* (2011) menyatakkan bahwa *S. grandiflora* mengandung beberapa senyawa bioaktif sesuai hasil analisis fitokimia seperti flavonoid, alkaloid, streroid, fenol, karbohidrat dan antrakuinon, yang diduga sebagai

antibakteri. Tanin, saponin, terpenoid, asam amino dan pitosteron yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Jiao *et al*., 2006).

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Karakteristik dan identifikasi senyawa fraksi dau turi (*Sesbania grandiflora*) dengan analisis GC-MS
2. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun turi (*Sasbania grandiflora*) untuk menghambat bakteri *Edwardsiella tarda* secara in vitro?
3. Bagaimana senyawa aktif ekstrak daun turi (*Sasbania grandiflora*) ini dapat mempengaruhi respon imun non spesifik pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi dengan *Edwarsiella tarda*?

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui jenis senyawa dari Karakteristik dan identifikasi fraksi daun turi (*Sesbania grandiflora*) mengunakan analisis GC-MS
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun turi (*Sasbania grandiflora*) untuk menghambat bakteri *Edwardsiella tarda* secara in vitro
3. Mengetahui dan menganalisi pemberian ekstrak daun turi (*Sasbania grandiflora*) ini dapat mempengaruhi respon imun non spesifik pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang di infeksi Edwardsiella *tarda*

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan bahan alternatif selain antibiotik dan bahan kimia lainnya dalam mengatasi kerugian yang diakibatkan bakteri dan mudah didapatkan karena tidak perlu mengeluarkan biaya yang mahal karena tersedia dialam, sekaligus diharapkan sebagai salah satu sumber informasi bagi pembudidaya atau para praktisi.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Saanin (1984), pengolongan ikan nila (Gambar 1) berdasarkan ilmu taksonomi dapat di kalisifikasi sebagai berikut :

Filum : Chordata

Sub filum : Vertebrata

Kelas : Osteichthyes

Ordo : Perciformes

Famili : Cichlidae

Genus : *Oreochromis*

Spesies : *Oreochromis niloticus*

Gambar 1. Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)(Farouq, 2011)

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan ikan air tawar yang memiliki bentuk tubuh pipih dan berwarna kehitaman. Spesies tersebut mempunyai garis vertical berwarna hijau kebiruan, pada sirip ekor terdapat garis melintang dengan warna kemerahan (Cholik, 2005). Ikan nila memiliki warna tubuh keabu-abuan pada bagian punggung dan semakin cerah pada bagian perut hingga pangkal ekor (Ghurfran, 2009). Menurut Wiryanta *et al*., (2010) spesies ini memiliki bentuk

mata yang besar dan menonjol, terdapat garis linear lateralis atau garis sisik yang terputus-putus menjadi dua bagian yaitu yang pertama terletak dari atas sirip dada hingga tubuh dan bagian kedua dari tubuh hingga ekor.

Cholik, (2005) menyatakan bahwa, ikan nila memiliki jenis sisik ctenoid dan terdapat lima buah sirip yang berada pada punggung, perut, dada, anus dan ekor.

2.1.2. Habitat dan Penyebaran

Ikan nila mempunyai tempat hidup atau habitat di perairan tawar, tetapi karena ikan nila bersifat euryhaline yang mampu hidup pada perairan yang bersalinitas atau toleransi pada kadar garam sehingga spesies ini mampu hidup dengan baik pada perairan payau (Ghufran, 2009). Ikan nila hidup pada berbagai habitat air tawar, termasuk pada saluran perairan yang dangkal. Hidup di perairan yang beriklim sedang, karena ikan nila tidak mampu hidup pada perairan bersuhu di bawah 21 ^{0}C (Simanjuntak *et al*., 2013).

Menurut Sugiarto, (1988) Ikan Nila berasal dari sungai Nil dan danau sekitarnya, sekarang telah terdapat diberbagai negara lain di lima benua yang beriklim tropis dan subtropis. Ikan ini banyak disukai oleh masyarakat karena dagingnya yang enak dan tebal. Mampu tumbuh pada kisaran suhu 14-38 ^{0}C, sedangkan suhu optimum untuk pertumbuhan dan berkembangbiak adalah 25-30^{0}C (Mudjiman, 2001).

2.1.3. Penyakit

Salah satu penyebab gagalnya usaha budidaya ikan adalah faktor penyakit, munculnya gangguan penyakit pada budidaya ikan merupakan masalah yang harus diantisipasi, karena sering kali penyakit yang menyerang

dapat mengakibatkan kematian massal ikan, penyakit yang paling banyak menyerang ikan disebabkan oleh bakteri (Afrianto *et al*., 2015).

Bakteri merupakan organisme yang berukuran sangat kecil, sehingga tidak dapat dilihat secara kasat mata, bakteri menyerupai pabrik senyawa kimia, beberapa jenis bakteri menghasilkan racun yang dikeluarkan ke dalam darah dan jaringan tubuh inang (Scallan *et al.,* 2011). Menurut Afrianto *et al*. (2015) penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah penyakit yang paling banyak menyebabkan kegagalan budidaya ikan, akibat infeksi bakteri masih sering terjadi dengan intensitas variatif.

Penyakit *Edwardsiellosis* merupakan penyakit yang paling banyak di temukan pada ikan nila, penyakit ini disebabkan oleh bakteri gram negatif genus *Edwardsiella* dengan gejala klinis seperti, perut mengembung, mata menonjol,pendarahan pada mata, warna tubuh menjadi gelap timbul bintik-bintik putih,terdapat kemerahan pada mulut, insang berdarah dan pangka ekor, berenang tidak beraturan, sedangkan organ dalam terjadi pembengkakan pada ginjal, hati berubah warna menjadi merah kehitaman, sehingga jika dilihat dari gejala klinis banyak yang menyatakan ikan nila terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla* (Dwinanti *et al*., 2014).

2.2. Turi (*Sasbania grandiflora*)

2.2.1. Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi turi (*Sesbania grandiflora)* (Gambar 2) menurut Van Steenis *et al.* (2003) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae

Subfamili : Faboideae

Bangsa : Robinieae

Genus : *Sesbania*

Spesies : *Sesbania grandiflora*

Gambar 2. Turi (*Sasbania grandiflora*) (Astriani, 2011)

Turi (*Sesbania grandiflora*) merupakan pohon kecil termasuk dalam family *Fabaceae*, tumbuhan dengan banyak kegunaan ini diduga berasal dari Asia Selatan dan Asia Tenggara, tetapi sekarang sudah tersebar hampir diseluruh daerah tropis. Turi merupakan pohon yang berkayu lunak dan berumur pendek dengan tinggi pohon 5-12 m , bentuk akar turi berbintil-bintil yang berguna untuk menyuburkan tanah, kulit kayu berwarna kelabu hingga kecoklatan, permukaan tidak rata dengan alur membujur dan melintang. Bentuk daun majemuk yang letaknya tersebar pada tangkai daun penumpu yang panjang 0,5 hingga 1 cm, ukuran daun 20-30 cm, menyirip genap dengan dua pasang anak daun yang bertangkai. Bunga berbentuk kupu-kupu jika mekar dengan ada dua warna yaitu merah dan putih, bahkan juga perpaduan dua warna tadi, sedangkan buah memanjang atau spiral dan menggantung panjang mencapai 20-55 cm dan lebar

7-8 mm, biji berukuran 15-50 terletak melintang didalam polong (Van Steenis *et al.,* 2003).

2.2.2. Kandungan Kimia

Metabolik sekunder merupakan senyawa aktif yang terdapat dalam satu tumbuhan, yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat yang berguna (Herbert, 1995). Menurut Kartasapoetra (1992) mutu obat ditentukan oleh kandungan senyawa aktif, semakin tinggi kandungan bahan kimia yang berfungsi sebagai obat maka akan dapat meningkatkan mutu tanaman tersebut. Kandungan metabolik sekunder dapat dipengaruhi oleh lokasi tumbuh, perlakuan pra dan pasca panen, faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa aktif dalam tumbuhan, juga berdampak pada mutu tanaman (Syukur dan Hrnami, 2001).

Sesbania grandiflora diketahui mengandung saponin, tanin, glikosida, peroksida, vitamin A, B, kalsium (Arief, 2006). Menurut Cushine *and* Lamb (2005) *S. grandiflora* juga mengandung flavonoid, saponin dan tannin yang merupakan senyawa polar yang mudah larut dalam pelarut seperti etanol, methanol, butal dan aseton, flovanoid merupakan golongan senyawa fenol, yang dapat menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur.

Makalalag *et al.,* (2011) menyatakan bahwa *S. grandiflora* mengandung beberapa senyawa bioaktif sesuai hasil analisis fitokimia methanol dan etanol seperti flavonoid, alkaloid, streroid, fenol, karbohidrat dan antrakuinon. Tanin, saponin, terpenoid, asam amino dan pitosteron yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Jiao *et al*., 2006).

2.2.3. Manfaat *Sasbania grandiflora*

Sasbania grandiflora sudah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional dengan cara direbus daun atau bunga untuk menyembuhkan beberapa penyakit seperti, keputihan, sakit kepala, radang tenggorokan, amandel dan sebagai obat demam karena nifas setelah melahirkan (Azwar, 2010).

2.2.4. Ekstraksi

Ekstrak merupakan sediaan dalam bentuk kering, kental, atau cair dengan cara menyaring simplisia nabati atau hewan menggunakan metode yang tepat tanpa terkenah cahaya matahari langsung (Ditjen POM, 1979).

Menurut Ditjen POM, (1995) menyatakan bahwa ekstrak juga adalah sediaan yang kental uang didapatkan dengan cara mengestraksi senyawa aktif dari simplisia hewani atau nabati menggunakan pelarut yang sesuai. Selanjutnya semua atau hampir semua pelarut diuapkan sehingga tersisah serbuk atau sediaan dalam bentuk pasta dan dilakukan memenuhi bahan baku yang telah ditetapkan.

Metode ekstraksi prinsipnya menggunakan pelarut organik adalah bahan yang kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu, dan dilakukan pemisahan dari bahan yang telah diekstraksi (Tobo, 2001). Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak, suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda, prinsip yang digunakan dalam metode ekstraksi adalah pelarut polar yang akan melarutkan senyawa polar sedangkan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (*like dissolve like*) (Wiryowidagdo, 2007).

Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan senyawa dari campuran (simplisia), ada berbagai macam metode ekstraksi yaitu meserasi, perkolasi,

refluks, sexhtletasi,infusa, dekok, destilasi (penyulingan), counter current. Dalam penelitian ini menggunakan metode meserasi yaitu cara ekstraksi simplisia dengan merendam dalam pelarut pada suhu kamar dan cahaya sehingga dapat meminimalisasi kerusakan atau degradasi metabolit (Hanani, 2014).

2.3. Krakterisasi Fraksinasi

2.3.1. Analisis Fitokimia

Fitokimia mengacu pada kandungan bahan kimia tumbuhan atau hewan. Uji fitokimia merupakan suatu metode untuk melihat kandungan senyawa kimia dalam simplisia tumbuhan maupun hewan, uji ini dilakukan untuk membuktikan ada atau tidaknya senyawa tertentu yang diperlukan dalam simplisia yang mau di amati (Hanani, 2014).

Perkembagan fitokimia semakin berkembang dengan banyak penelitian yang mengacu pada ektraksi dalam dunia medis dengan hasil pengamatan yang sering dilakukan, uji fitokimia akan mendapat hasil yang baik dengan faktor yang berperan penting yaitu pemilihan pelarut, metode ekstraksi, uji fitokimia dilakukan dengan melihat pengujian reaksi warna yang terjadi menggunakan suatu pereaksi warna (Sangi *et al.,* 2008).

Beberapa senyawa kimia yang diamati dalam uji fitokimia menurut Hanani (2014):

A. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolik sekunder yang mengandung unsur nitrogen (N) dan bersifat basa. Dalam tumbuhan alkaloid ditemukan berbentuk gram, alkaloid lebih larut pada pelarut non polar seperti eter, klorofom, dan benzene

B. Flavonoid

Merupakan metabolit sekunder, flavonoid umumnya ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida, flavonoid lebih muda larut dalam pelarut polar

seperti etanol, methanol dan air. Flavonoid merupakan senyawa polifenol bersifat agak asam sehingga muda larut dalam basa.

C. Fenol

Fenol dapat memberikan rasa panas jika bersentuhan dengan kulit secara langsung, fenol juga merupakan metabolit sekunder, fenol hampir ditemukan di semua tumbuhan terutama pada tumbuhan yang memiliki senyawa aromatik.

D. Saponin

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa yang baik jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam.

E. Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, berasa pahit dan kelat, yang bereaksi dengan menggumpalkan protein, atau berbagai senyawa organik lainnya termasuk asam amino dan alkaloid.

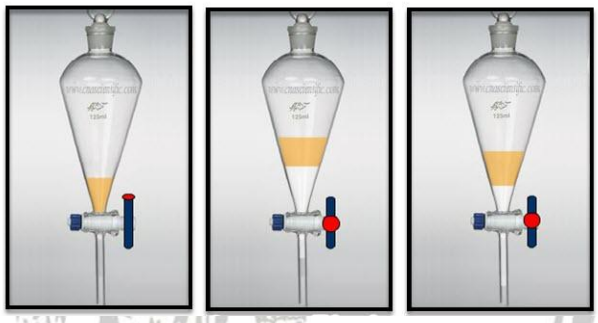
2.3.2. Corong Pemisah

Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran jumlah senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan (Lukmandaru *et al*., 2012)

Corong pisah merupakan peralatan laboratorium yang digunakan dalam ekstraksi cair-cair untuk memisahkan komponen-komponen dalam satu campuran antara dua fase pelarut dengan densitas berbeda yang tercampur. Umumnya salah satu fase berupa larutan air dan yang lainnya berupa pelarut organik lipofilik seperti eter, MTBE, diklorometana, kloroform, atau pun etil asetat. Kebanyakan pelarut organik berada di atas fase air kecuali pelarut yang

memiliki atom dari unsur halogen. Corong pemisah berbentuk kerucut yang ditutupi setengah bola, ia mempunyai penyumbat di atasnya dan keran di bawahnya. Corong pemisah yang digunakan dalam laboratorium terbuat dari kaca borosilikat dan kerannya terbuat dari kaca atau pun Teflon (Ali *et al.,* 2012).

Destilasi bertingkat atau fraksinasi adalah proses pemisahan destilasi ke dalam bagian-bagian dengan titik didih makin lama makin tinggi yang selanjutnya pemisahan bagian-bagian ini dimaksudkan untuk destilasi ulang. Destilasi bertingkat merupakan proses pemurnian zat/senyawa cair dimana zat pencampurnya berupa senyawa cair yang titik didihnya rendah dan tidak berbeda jauh dengan titik didih senyawa yang akan dimurnikan (Ismawati *et al.,* 2015).



Gambar 3. Corong Pisah (Lukmandaru *et al.,* 2011)

2.3.3. Uji GC-MS (Gas Cromatography – Mass Spectrometry)

Menurut Harborne (2006) kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) adalah sebuah metode yang menggabungkan fitur cair kromatografi gas dan spektrometri massa untuk mengindentifikasi zat yang berbeda dalam pengujian sampel GC-MS terdiri dari dua bangunan utama blok, yaitu gas kromatograf dan spectrometer massa.

Kromatografi gas merupakan salah satu alat pemisahan yang sering digunakan dalam analisis kimia. Peralatan asas kromatografi gas terdiri dari tangki gas pembawa, pengatur tekanan, penyuntik sampel (injector), kolom, detector, oven, amplifier, recorder dan sistem pengendalian data. Teknik analisis

GC-MS merupakan gabungan dari teknik kromatografi gas dan teknik spektrometri massa. Pada GC-MS kromatografi gas berfungsi sebagai pemisah senyawa-senyawa yang terdapat pada sampel yang dianalisis dengan resolusi tinggi, sedangkan bagian spektrometri massa berfungsi mengidentifikasi senyawa-senyawa yang telah dipisahkan oleh kromatografi gas (Zhao*et al*., 2015; Surjani, 2016).

2.4. *Edwardsiella tarda*

2.4.1. Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Holt *et al.* (1994) klasifikasi bakteri *Edwardsiella tarda* (Gambar. 4) sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Schizomycetes

Order : Eubacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Edwardsiella*

Species : *Edwardsiella tarda*

Gambar 4. *Edwardsiella tarda* (Park *et al., 2012*)

Edwardsiella tarda merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang, ukuran 1 x 2-3 µm, bergerak menggunakan flagella, tidak membentuk spora/ kapsul dan bersifat fakultatif anerob. *E. tarda* banyak terdapat diperairan tawar dan laut, dengan suhu pertumbuhan optimal sekitar 35 ^{0}C, sedangkan pada suhu dibawah 10 ^{0}C atau diatas 45 ^{0}C tidak dapat tumbuh. Bakteri *E. tarda* menyebabkan luka pada pada ikan yang terinfeksi karena bakteri memproduksi 2 eksotoksin (Park *et al.,* 2012).

Wei *et al*., (2008) melaporkan dapat mengidentifikasi 18 strein bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan ikan lele (*Clarias bathracus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), Ikan sidat (*Anguilla japonica*) dan ikan Gurame (*Osphronemus goramy*) yang berasal dari bubidaya di Malaysia. *E. tarda* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit *Edwardsiellosis* pada ikan. Menurut Park *et al.,* (2012) infeksi bakteri *E. tarda* dapat membahayakan inang yang terinfeksi, bahwa bakteri *E.tarda* menjadikan hewan amfibi, reptile, ikan serta manusia sebagai inang defenitif.

2.4.2. Patogenesis

Bakteri *E. tarda* adalah bakteri yang menyerang golongan ikan lele termasuk ikan air tawar lainnya seperti ikan nila, ikan mas dan ikan gurame dan menyebabkan penyakit *Edwardsiellosis*, *Enphisemathous Putrevactive disease of catfish* (EPDC) / *Edwardsiella septicaentia* (ES) dan *Rad pest*. *E. tarda* dapat hidup dalam cukup banyak inang termasuk manusia. Daerah penyebaran bakteri ini cukup luas yaitu seperti Eropa, Thailand, Amerika Serikat, Malaysia, Kanada, juga Indonesia (Sustri *et al.,* 2011).

Menurut Xiao *et al*., (2013) menyatakan bakteri *E.tarda* dapat menyebabkan pendarahan septikemis sistemik, penyakit putrefaktif emfisema dengan gejala klinis luka yang membengkak pada kulit ikan,timbulnya luka dan

nekrosis pada organ internal yaitu seperti hati, ginjal, limfa dan otot. Patogenisitas *E. tarda* memiliki mekanisme dengan melibatkan sistem dan faktor yang berkaitan dengan virulensi, sistem yang telah diamati yaitu sistem genetik gen htpG, Etha/Eth B haemolysin dan regulationnya EthR, katalase dan DNA adenine methylase (Dang *et al.,* 2011).

2.4.3. Aktivitas Antimikroba

2.4.3.1. Metode Difusi (Metode Sumuran)

Metode paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan diatas medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih inhibisi disekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu, metode difusi dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisasi (Jawet *et al.,*2007). Metode difusi terdiri dari 3 cara yaitu seperti metode silinder gelas, metode kertas cakram, dan metode lubang atau sumuran.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode cetak lubang atau sumuran, merupakan metode dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisikan dengan larutan yang akan diuji, setelah diinkubasi, amati pertumbuhan bakteri pada daerah hambat disekitar lubang (Ratnasari, 2009).

Misna *et al.,* (2016) melaporkan uji aktivitas antibakteri mengunakan metode sumuran dengan beberapa konsentrasi ekstrak bawang merah yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, memperoleh hasil yang signifikan antara beberapa konsetrasi ekstrak yang digunakan, dimana terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri *Straphylococcus aureus*. Konsentrasi ekstrak daun

binahong yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shingella flexneri* adalah konsentrasi 100% sebesar 22,2 mm, 80 % sebesar 20,5 mm dan konsentrasi 60 % sebesar 21,1 mm dari berbagai konsetrasi ekstrak daun binahong 20%, 40%, 60%, 80%, 100% yang terbaik adalah dengan daya hambat tertinggi dilihat dari luas zona hambat pada media agar yaitu 100%, 80% dan 60 % (Ainurrochmah *et al.,*2013).

Dalam penelitian Rinawati (2011), menggunakan ekstrak tanaman maja pahit dengan konsetrasi ekstrak 10%, 20%,30%, 40%, 50%,60%, 70%, 80%, 90%, 80%, 90%, 100% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio algionolyticus* dengan mengunakan metode difusi sumur, zona hambat terbesar terdapat pada konsentarsi 100% sehingga konsentrasi terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah 100%.

2.4.3.2. Metode Tabung (Minimu Inhbitory Concentration)

Antibakteri dapat juga ditentunkan dengan menentukan penghambatan pertumbuhan dengan menentukan kekeruhan atau dengan turbidimetri, atau dengan menentukan konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan (MIC = minimal inhibition concentration) atau konsentrasi terendah yang mematikan kuman (MLC = minimal lethal concentration) (Dzulkarnain *et al.,*1996). Ekstraksi dan identifikasi senyawa antibakteri bentuk bahan yang diuji dapat berupa bentuk sediaan yang digunakan secara empirik, seperti tumbukan, perasan, seduhan, rebusan dan sebagainya.

Percobaan pendahuluan ini dilanjutkan dengan bentuk sediaan yang diperoleh dengan penyaringan menggunakan berbagai penyari (palarut) seperti etanol, metanol, etil-asetat, eter minyak tanah, kloroform, diklorometana atau campuran bahan ini dengan berbagai perbandingan. Langkah lebih maju adalah dengan mencoba zat-zat murni dari tanaman (Dzulkarnain*et al*., 1996).

2.4.4. Mekanisme Kerja Antibiotik

Istilah antibiotik pertama kali digunakan oleh Waksman (1945);Taek (2009), sebagai nama dari suatu golongan substansi yang berasal dari bahan biologis yang kerjanya antagonis terhadap mikroorganisme. Dengan kata lain antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh organisme (mikroorganisme) yang dapat menghambat mikroorganisme lain. Sifat khas dari zat ini adalah meskipun tersedia dalam jumlah sedikitpun tetap memiliki daya penghambat mikroorganisme lain (Dwijoseputro, 2003). Idealnya suatu antibiotik harus mampu merusak sel penginfeksi dan sedapat mungkin tidak merusak sel inang dan inilah yang dikenal sebagai *selectivetoxicity.*

Berdasarkan cara kerjanya antibiotik ini dapat dibagi menjadi 2 yaitu : bakteriostatik dan bakterisida. Bakteriostatik jika suatu antibiotik hanya mampu menghambat multiplikasi tetapi jika zat penghambat itu dihilangkan maka multiplikasi dapat dilanjutkan lagi sedangkan bakterisida jika antibiotik dapat membunuh bakteri. Ada beberapa mekanisme kerja dari antibiotik terhadap bakteri target yaitu dengan meghambat sintesis dinding sel, menghambat sintesis protein, menghambat sintesis asam nukleat, merusak membran plasma dan menghambat sintesis metabolik esensial. Setiap mekanisme kerja ini mempunyai cara tersendiri yang menyebabkan bakterilisis dan akhirnya mati (Dwijoseputro, 2003).

Pada umumnya beberapa antibiotik jika digunakan pada konsentrasi rendah bersifat bakteriostatik tetapi jika konsentrasi dinaikkan sampai batas tertentu maka akan berubah menjadi bakterisid. Aktifitas antibakteri juga ditentukan oleh spektrum kerja luas dan spektrum kerja sempit. Dalam penggunaannya sebaiknya antibiotik ini tidak menyebabkan reisistensi terhadap bakteri, mudah larut dalam cairan tubuh dan *selective toxicitinya* hanya berlaku untuk sel bakteri dan bukan pada sel inang (Irianto, 2006).

2.5. Sistem Imun

Sistem imunitas merupakan kemampuan mekanisme tubuh untuk menahan dan mengeliminasi benda asing (sel abnormal) yang berpotensi membahayakan tubuh, imunitas merupakan kata lain dari imun dan resisten. Pada ikan, respon imun baru terbentuk sempurna manakalah ikan sudah dewasa. Meskipun pada larva atau ikan muda sudah terbentuk respon imun tetapi kerjanya belum efektif, ikan merupakan kelas paling bawah dari vertebrata karena memiliki kedua jenis sistem kekebalan yaitu sistem imun bawan dan system imun adaptif, meskipun mekanisme pertahanan adeptif tidak serumit seperti pada vertebrata lain (Elis, 2001).

Sistem kekebalan pada ikan terbagi atas sistem pertahanan non spesifik dan spesifik. Proses pertahanan tubuh yang sederhana ditampilkan oleh organisme sebagai bentuk pertahanan dengan mengandalkan struktur fisik, kerja mekanik alat pertahanan dan pengeluaran substansi kimiawi yang sangat sederhana (Anderson, 1992). Pada ikan, fagositosis adalah bentuk respon pertahan tubuh yang paling sederhana, namun sangat penting sebagai wujud sistem petahanan non spesifik. Ketika ikan mengalami infeksi mikroba patogen, mekanisme kekebalan non-spesifik akan bekerja untuk menghentikan proses infeksi tersebut. Jika mekanisme tersebut tidak bekerja efektif, maka infeksi akan berlanjut dan mampu menimbulkan gejala klinis penyakit. Pada saat itu respon kekebalan spesifik akan mulai terjadi dan jika ikan mampu bertahan hidup maka akan terbentuk antibodi spesifik terhadap agen infeksi pada level titer protektif dan terbentuk pula sel-sel memori. Jika terjadi reinfeksi oleh agen penyakit sejenis, maka ikan tersebut akan kebal, mampu menahan infeksi karena respon kekebalan sekunder akan terjadi, sebagai efek booster (Anderson, 1972).

Kekebalan tubuh ikan tidak lengkap sehubungan interaksi antara sel-sel dan organ serta sistem lain seperti endokrin, hal ini melibatkan beberapa faktor

humoral yang mengatur spectrum mekanisme baik tingkat sistem maupun lokal (Fischer *et al.,* 2013).

Menurut Almendras (2001) menyatakan bahwa sifat respon imun dalam menghadapi agen patogen penyerang, sistem imun terdiri dari sistem pertahanan bawaan (*Innate immunity*) yang merupakan respon non spesifik dan sistem pertahanan adaptif yang merupakan respon imun spesifik (adaptive immunity). Respon imun spesifik dibedakan lagi menjadi dua yaitu imun seluler dan humoral.

Sistem imun bawan antara lain dari penghalang fisik terhadap infeksi, pertahanan dan sel – sel fagositik, toleostei memiliki sejumlah penghalang fisik terhadap infeksi antara lain kulit dan mucus. Kemampuan mukus dapat menghambat kolonisasi mikroorganisme yang menyerang kulit, insang dan mukosa, mukus ikan memiliki immunoglobulin (IgM) alami, antibody atau immunoglobulin dapat menghancurkan patogen yang menginvasi (Irianto, 2005).

Menurut Kiron (2012) menyatakan bahwa respon imun dapat dipengaruhi oleh beberapa aspek seperti lingkungan, genetik, status gizi ikan yang merupakan aspek utama serta mudulasi perlawanan terhadap infeksi.

2.6. Respon Imun Non Spesifik

Kekebalan non-spesifik adalah suatu sistem pertahanan tubuh yang berfungsi untuk melawan segala jenis patogen yang menyerang dan bersifat alami. Kekebalan non-spesifik merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*), yaitu respon perlawanan terhadap zat asing yang dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut (Kiron,2012).

Sistem kekebalan non-spesifik mencakup pertahanan pertama dan pertahanan kedua. Pertahanan pertama yaitu pertahanan fisik meliputi, sisik, kulit, dan mukus. Mukus memiliki kemampuan menghambat kolonisasi

mikroorganisma pada kulit, insang dan mukosa. Mukus ikan mengandung imunoglobulin (IgM) alami dan bukan sebagai respon dari pemaparan antigen. Imunoglobulin merupakan antibodi yang dapat menghancurkan patogen yang menyerang tubuh. Adapun sisik dan kulit berperan dalam melindungi ikan dari kemungkinan luka dan sangat penting peranannya dalam mengendalikan osmolaritas tubuh. Kerusakan pada sisik atau kulit dapat mempermudah patogen menginfeksi inang (Rauta *et al.,* 2012).

Mekanisme kekebalan non-spesifik juga dikenal sebagai kekebalan alamiah (innate immunity), merupakan mekanisme pertahanan inang yang responnya tidak bergantung pada frekuensi kontak terhadap antigen tertentu. Berbeda dengan respon kekebalan spesifik (humoral mediated immunity maupun cellular mediated immunity) yang responnya sangat tergantung pada frekuensi kontak induk semang dengan antigen tertentu sebelumnya (sering pula disebut adaptive immunity) (Radji, 2015). Meskipun demikian, beberapa fungsi dari sistem kekebalan non-spesifik juga terlibat dalam sistem kekebalan spesifik. Sistem pertahanan pada ikan akan terbentuk sempurna saat ikan telah dewasa. Pada benih ikan sistem kekebalan tubuh sudah terbentuk tetapi belum berfungsi optimal sehingga kurang efisien dalam menahan infeksi patogen. Pada tahap ini, ikan rentan terhadap penyakit. Sistem pertahanan non spesifik merupakan pertahanan tubuh yang terdepan ketika menghadapi paparan patogen karena memberikan respon langsung terhadap antigen (Anderson, 2004). Sistem pertahanan tubuh non spesifik terdiri dari kulit dan selaput mukosa. Sistem pertahanan tubuh spesifik adalah sistem kekebalan tubuh khusus yang membuat limfosit peka untuk segera menyerang patogen tertentu (Alifuddin, 2002).

a. Sel Makrofag

Makrofag sebagai fungsi fagositosis merupakan sistem pertahanan tubuh yang dapat mengeliminasi benda asing yang masuk. Proses fagositosis akan

menghasilkan anion superoksida (O_2) dan hydrogen peroksida (H_2O_2), senyawa yang bersifat toksik pada mikroorganisme patogen, sehingga menjadi lisis dan mati. Makrofag akan membentuk bakteri yang lisis menjadi bentuk larutan, yang dapat dimanfaatkan tubuh merangsang kekebalan tubuh atau pun dibuang (Ellis, 1988).

Makrofag terdapat diseluruh tubuh dan terdapat juga pada beberapa jaringan seperti ginjal, hati, otak, limfa. Benda asing atau mikroorganisme yang masuk ke darah akan menghadapi makrofag akan masuk ke dalam limfa dan disaring melalui nodus limfa (Levinson and Jawetz, 1989).

b. Sel *Natural Killer* (Sel NK)

Sel *Natural Killer* (Sel NK) adalah golongan limfosit dan tidak mengandung penanda seperti pada permukaan sel B dan Sel T, biasa disebut sel nol, sel NK terdapat dalam pembuluh darah sebagai limfosit besar yang khusus. Mampu mengenal dan membunuh sel abnormal karena memiliki granular spesifik yaitu sel tumor dan sel yang menyebabkan infeksi patogen. Berperan penting dalam sistem imun non spesifik untuk patogen intraseluler, bentuk sel NK lebih besar dari limfosit B dan limfosit T (Paust *et al*., 2010).

Repon yang memiliki fungsi menekan fungsi sitotoksin dari sel NK adalah MHC kelas 1. Fungsi utama sistem kekebalan tubuh adalah mempertahankan homeostasis organisme ketika diserang bahan asing. Kebanyakan patogen dapat di kenal dari pola molekul patogen, melalui *non-self* atau molekul kompleks histocompatibility utama (MHC) kelas 1 (virus yang terinfeksi sel target), dan menghadirkan peptide *non-self* asing intraseluler (Kiron, 2012)

Menurut Fischer *et al.,* (2013) menyatakan untuk menghilangkan penyera ngan atau menghancurkan secara langsung kemampuan mereka untuk meniru khususnya sel imun dari respon bawaan dan adeptif muncul selama evolusi,

pertama pertahanan makrofag evolusioner kuno dan pembunuh alamia atau sel NK, mekanisme bawaan berkembang dengan baik pada ikan yang bertulang, dua jenis homolog sel NK yaitu sel sitotoksin non spesifik serta sel spesik NK.

c. Sel Darah Putih (Leukosit)

Merupakan salah satu sistem pertahanan yang tergolong dalam respon imun non spesifik dan spesifik, karena jumlah leukosit menunjukkan kesehatan ikan, sel darah putih berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh ikan yang bereaksi terhadap infreksi patogen, jumlah sel darah putih lebih sedikit dibandingkan sel darah merah, berkisar antara 20.000 – 150.000 per mm^3, bentuk leukosit lonjong hingga membulat dan tidak berwarna, tidak memiliki inti sel (Fujaya, 2004).

Leukosit terdiri dari agranulosit (monosit,limfosit) dan granulosit (neutrofil, eosinotif dan basofil), infiltrasi agranulosit pada 12 – 24 jam setah infeksi bakteri, setelah itu presentase granulosit dan makrofag akan meningkat hingga 2 – 4 hari (Noerchilis *et al.,* 2013).

d. Differensial Leukosit

Menurut Bijanti (2005) leukosit ikan dibagi menjadi 2 bagian besar yaitu granulosit (neutrofil, eosinofil dan basofil) dan agranolosit (limposit dan monosit).

1. Neutrofil

Neutrofil berperan dalam respon kekebalan terhadap serangan organisme patogen dan mempunyai sifat fagositik. Neutrofil dalam darah akan meningkat bila terjadi infeksi dan berperan sebagai pertahanan pertama dalam tubuh (Alamanda *et al*., 2007). Andayani *et al*. (2006) menyatakan meningkatnya kadar neutrofil menunjukkan aktifitas fagositik yang menyerang atau membunuh benda-benda asing yang masuk kedalam tubuh ikan sehingga neutrofil memiliki

peran utama dalam mempertahankan imunitas non-spesifik terhadap infeksi bakteri pada ikan.

Menurut Hardi *et al*. (2014) persentase neutrofil ikan nila normal sebesar 10%-18%, jumlah ini akan meningkat sebagai kekebalan tubuh yang bekerja sebagai respon adanya infeksi dalam tubuh. Fungsi utama neutrofil yaitu menghancurkan bahan asing melalui proses fagositosis yaitu kemotaktis dimana sel akan bermigrasi menuju partikel, pelekatan partikel pada sel, penelanan partikel oleh sel dan penghancuran partikel oleh enzim lisosim didalam fagolisosom.

Menurut Utami *et al.* (2013) setelah proses infeksi jumlah sel neutrofil dapat ditekan, sel-sel mati dan jaringan nekrotik yang salah satunya mengandung neutrofil yang telah mati secara bertahap akan mengalami lisis dalam beberapa hari.

2. Limfosit

Limfosit merupakan sel darah yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Pada ikan teleost, limfosit diproduksi di organ timus, limpa dan ginjal. Inti sel limfosit hampir memenuhi ruangan sel, berwarna gelap dengan sedikit sitoplasma yang mengelilingi inti, dan tidak bergranula (Mones, 2008). Jumlah differensial limposit ikan lebih besar dibandingkan dengan mamalia, dimana akan terus meningkat jika ikan mengalami stress (Andayani *et al*., 2006)

Menurut Suhermanto *et al*. (2011) mekanisme kerja limfosit dalam peranannya untuk sistem kekebalan tubuh berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh dengan cara mengenali antigen melalui reseptor spesifik pada membran sel. Pada limfosit T, ketika tubuh atau jaringan terpapar oleh antigen, maka limfosit T tidak mampu mengenal antigen tersebut sendirian tanpa melalui reseptor spesifik. Dengan adanya sel reseptor spesifik ini memungkinkan

sel T lebih cepat mengenali antigen yang ada sehingga langsung memberikan reaksi kekebalan dan menstimulasi sel B untuk mengeluarkan antibodi.

3. Monosit

Monosit ikan berasal dari jaringan hemopoietik ginjal. Secara morfologibentuk monosit ikan serupa dengan monosit mamalia. Persentase monosit pada ikan sebanyak 0.1 % dari populasi leukosit total yang bersikulasi. Namun demikian, jumlahnya akan bertambah dalam waktu singkat (± 48 jam) setelah disuntik dengan benda asing seperti karbon (Bijanti, 2005).

Menurut Hardi *et al*. (2014) persentase monosit ikan nila normal sebesar 3,9-5,9%. Fungsi monosit itu sendiri yaitu sebagai makrofag, dimana monosit tidak terlalu banyak dibutuhkan untuk memfagositosis, dikarenakan belum ada infeksi yang masuk ke dalam tubuh yang merangsang produksi monosit. Selain itu, fungsi lain dari monosit adalah sebagai agen makrofag yang memfagosit benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Andayani *et al*. (2006) menyatakan Fagositas monosit hampir sama dengan neutrofil akan tetapi memiliki aktivitas fagosit yang lebih tahan lama

Menurut Alamanda *et al*. (2007) pada saat terjadi infeksi oleh benda asing, maka monosit akan bergerak cepat meninggalkan pembuluh darah menuju daerah yang terinfeksi untuk melakukan fagositosis. Monosit memiliki kemampuan menembus dinding pembuluh kapiler, kemudian masuk ke jaringan dan berdiferensisasi menjadi makrofag.

e. Aktivitas Fagositosis

Fagositosis adalah proses penyerapan dan eleminasi mikroba atau partikel lain oleh sel-sel khusus yang disebut fagosit. Fagosit adalah sel-sel darah putih atau sel-sel yang berasal dari sel-sel darah putih tersebut, yang terdapat di dalam aliran darah. Di dalam proses penghancuran bakteri atau

kuman, fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau virus berada. Peningkatan kekebalan tubuh dapat diketahui dari aktivitas sel fagosit dari hemosit. Sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan (Amrullah, 2004).

Aktivitas fagositosis terjadi melalui beberapa proses yaitu seperti penelanan, pembunuhan, pencernaan patogen dan pelepasan sel-sel yang tidak tercerna. Ada tiga fase utama dalam fagositosis yaitu pelekatan patogen pada permukaan sel darah, penelanan melalui formasi fagosom dan penghancuran partikel dalam fogosom. Pelekatan suatu patogen pada membran fagosit merupakan suatu syarat untuk mempermudah dan biasanya relatif berlangsung secara pasif (Lukistyowati, 2011).

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1. Landasan Teori

Pencegahan atau pengendalian penyakit infeksi pada budidaya ikan yang disebabkan oleh bakteri, banyak mengunakan antibiotik dan kemoterapi dan sudah sejak lama bahkan hingga sekarang ini. Namun, pengunaan antibiotik dari bahan kimia dan obat-obat dalam budidaya menyebabkan residu pada ikan dan kualitas produksi ikan yang buruk. Sehingga teknik alternatif penanggulangan penyakit infeksi yang rama lingkungan dan tidak menyebabkan residu pada ikan hingga berdampak pada manusia, dengan memanfaatkan obat herbal dari tumbuh-tumbuhan untuk memperkuat sistem imun ikan, seperti aplikasi imunostimulan herbal pada ikan budidaya (Mehana *et al*., 2015)

Menurut Lamers *et al.,* (1985) bahwa respon imun awal di bentuk oleh stimulasi pathogen atau antigen, dan terjadi aklifasi antigeneti, dalam proses fagositosi makrofag merupakan pertahanan pertama yang akan menghancurkan antigen, dengan cara mengirim sinyal-sinyal ke sel limfosit, sehingga sel limfosit berpoliferasi membentuk sel T respon imun seluler dan sel B yang merupakan respon imun humoral. Sel efektor akan dibentuk oleh sel T yang memiliki fungsi dalam respon pertahanan yang diperantai sel, juga sel efektor berperan dalam mengeliminasi benda asing dalam proses fagositosis. Dan sel B membentuk antibody atau immunoglobulin, sel B juga dapat memebantuk sel memori terhadap pathogen tersebut sehingga dapat mempercepat pembentukan respon sekunder terhadap patogen yang sama.

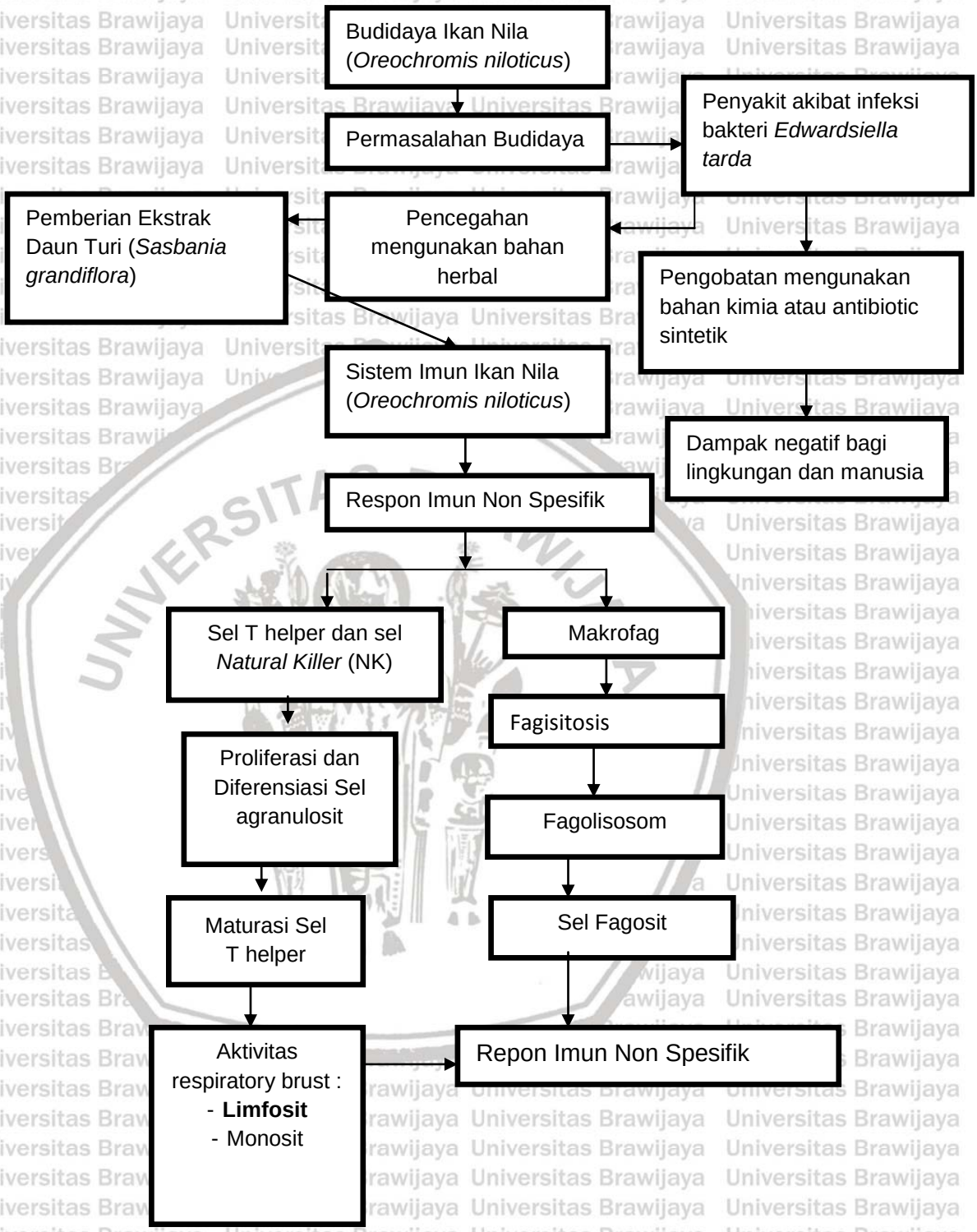
Jaringan limfoid yang menyatuh dengan myeloid yang diketahui dengan jaringan limfomyeloid merupakan jaringan yang membentuk respon imunitas, limpa, hati dan ginjal depan adalah teleostei organ limfomyleid pada ikan. Hasil dari jaringan limfomyeloid berupa sel-sel darah dan respon imunitas baik seluler

maupun humoral. Mekanisme pertahanan tubuh pada ikan antara pertahanan humoral dan seluler di tandai dengan adanya interleukin, interferon dan sitokin yang berperan sebagai komunikator dan amplikasi dalam mekanisme pertahanan tubuh (Guyton and Hall, 2008).

Alternatif yang sering digunakan untuk menanggulangi ikan tidak terinfeksi bakteri yaitu dengan cara pemberian immunostimulan, yang merupakan zat kimia, stersor, obat-obat atau perlakuan untuk meningkatkan atau memperkuat respon imun ikan yang berinteraksi langsung dengan sel sistem imun (Sakai, 1999).

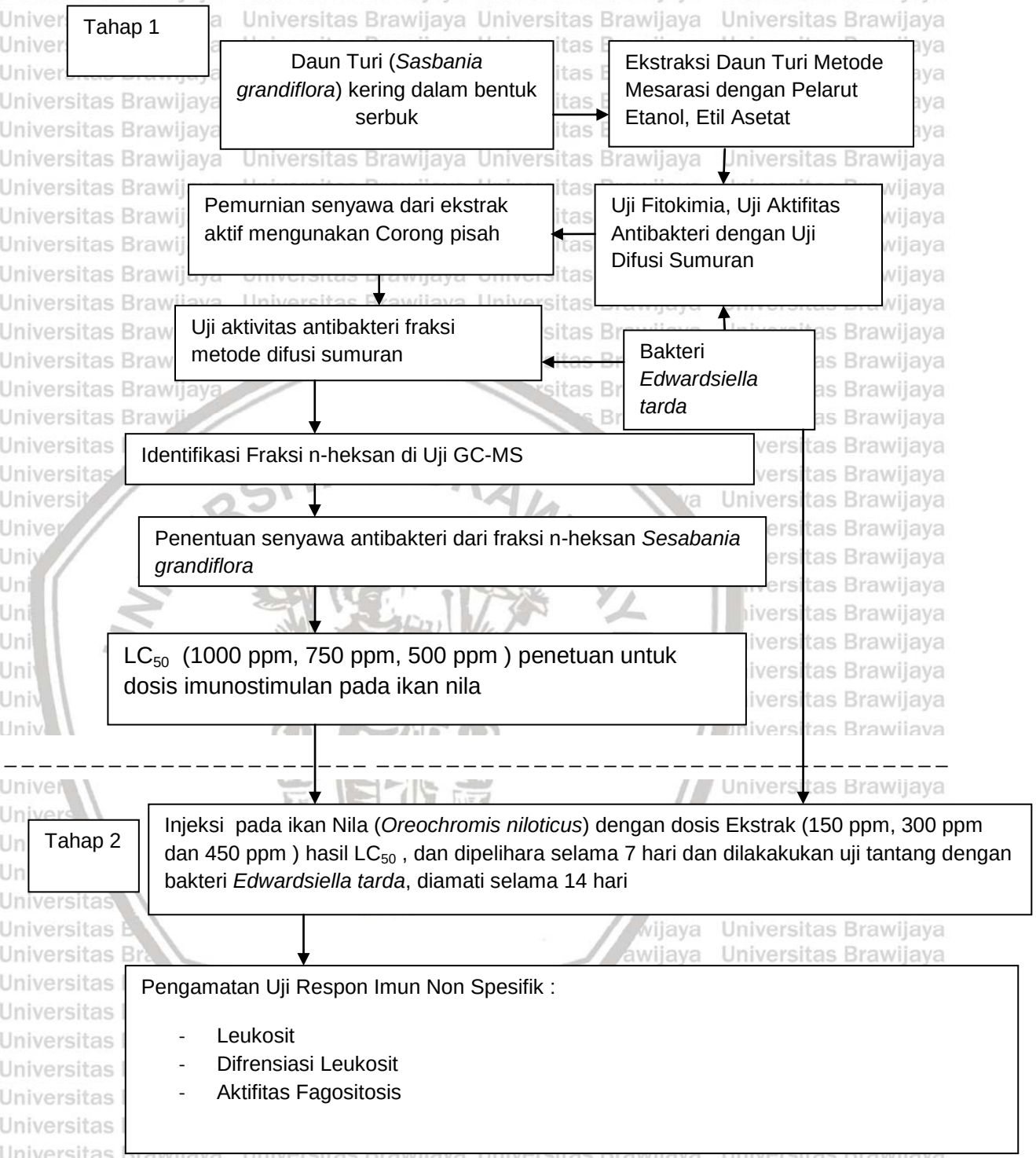
Cara menggunakan immunostimulan hampir sama dengan penggunaan antibiotic, tetapi penggunaannya masih harus melakukan penelitian lagi. Immunostimulan jika diberikan dengan dosis tinggi dapat menyebabkan penekanan pada mekanisme pertahanan. Dan tidak efektif jika dosis rendah, ini nyata secara injeksi. Penyuntikan dosis tinggi menyebabkan penekanan respon imun sepsifik dan jumlah leukosit menurun dapat dilihat pada kerangka konsep pada Gambar 5.

3.2. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 5. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Kerangka Oprasional Penelitian



Gambar 6. Kerangka Oprasional Penelitian

3.4. Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian terdahulu yang mengunakan daun turi *Sesbania grandiflora* dapat dilihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Penelitian terdahulu daun turi (*Sesbania grandiflora*)

No	Bahan	Penelitian	Refrensi
1	Daun Turi (*Sesbani grandiflora)*	Aktivitas Senyawa Antibakteri Daun Turi Terhadap Bakteri *Bacillus subtillis* dan *Escherichia coli Secara in vitro*	Susanti, 2016
2	Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)	In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of Sesbania grandiflora extract against Staphylococcus aureus	Gandhi *et al*., 2017
3	Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)	Antibacterial Potential and Antioxidant Activity of Polyphenols of *Sesbania grandiflora*	Ouattara *et al.,* 2011
4	Daun Turi (*Sesbani grandiflora*)	Antimikroba Activity of *Sesbania grandiflora* (L.) *Pers*	Vipin *et al.,* 2011
5	Daun Turi (*Sesbani grandiflora*)	Antimicrobial activity of Aqueous, Ethanol and Acetone extracts of Sesbania grandiflora leaves and its phytochemical characterization	Padmalochana *et al.,* 2014
6	Daun Turi (*Sesbani grandiflora*)	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n heksana, Etil Asetat, dan Air dari Daun Turi (Sesbania grandiflora Pers) terhadap Bakteri Shigella dysenteriae ATCC 9361	Mogi *et al.,* 2016

3.5. Pembaruan Penelitian

Beberapa penelitian terdahulu mengenai daun turi (*Sesbania grandiflor*) diatas menunjukkan bahwa penggunaan daun turi dapat sebagai antibakteri seraca invitro untuk berbagai jenis bakteri patogen namun belum ada yang meneliti daun turi dapat digunakan sebagai imunostimulan pada ikan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan berkaitan dengan pemanfaatan daun turi (*Sesabaia grandiflora*) sebagai antibakteri dan imunostimulan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) terhadap infeksi bakteri *Edwardsiella tarda* masih tergolong penelitian yang baru.

3.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Karakteristik dan identifikasi senyawa fraksi dau turi (*Sesbania grandiflora*) dengan analisis GC-MS
2. Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun turi (*Sasbania grandiflora*) untuk menghambat bakteri *Edwardsiella tarda*
3. Pemberian ekstrak daun turi (*Sasbania grandiflora*) ini dapat mempengaruhi respon imun non spesifik pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

3.7. Publikasi Jurnal

Hasil penelitian mengenai **"Phytochical Screening by FTIR Spectroscopic Analysis and Antibacterial Activity of *Sesbania grandiflora* Fractionst *Edwardsiella tarda*"** akan dipublikasikan di ***Journal of Experimental Life Science.*** Publikasi jurnal merupakan salah satu persyaratan menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

4. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 4 bulan (Juli – Oktober 2018), Laboratorium Parasit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Reproduksi Ikan, Laboratorium Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi (Saintek) Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.2. Alat dan Bahan

4.2.1. Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi akuarium, thermometer, aerator, pemanas akuarium, filter akuarium, blender, lemari pendingin, tabung falcon, *rotary evaporator vaccum*, pemanas (*hot plate*), magnetik,stirrer, mikropipet, mikrotip steril, tabung mikro, penggaris, timbangan analitik, pensil, timbangan digital, borosilicate glass chamber, glas ukur (10 ml, 50 ml dan 250 ml), corong, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, Bunsen, pipet tetes, spektrofotometer, erlenmeyer (250 ml, 500 ml dan 1000 ml),beaker glas (500 ml dan 1000 ml), autoclave, laminary airflow, tabung eppendorf, jarum suntik 1 ml, pipet thoma leukosit, sentrifus 4000 rpm, mikroplat, haemocytometer, gelas objek, gelas penutup, mikroskop cahaya, handtally cointer, corong pemisah, GC-MS. Alat yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1, berikut uraian bahan yang digunakan :

1. Hewan Uji

Ikan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) ukuran 10-12 cm, yang di ambil dari Balai benih Ikan Punten Batu, Malang, Jawa Timur

2. Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)

Daun Turi yang digunakan adalah daun turi putih, daun ini di peroleh dari daerah Sumba, Nusa Tenggara Timur. Daun turi yang digunakan adalah daun yang masih mudah, di cuci dan dikeringkan dengan cara di angin-anginkan dalam ruangan, kemudian diblender hingga menjadi serbuk

3. Ekstraksi

Bahan yang akan digunakan dalam ekstraksi ini adalah Daun turi (*Sesbania grandiflora*) dalam bentuk serbuk, etanol, etil asetat, kertas saring, aluminum foil.

4. Kultur Bakteri

Bahan yang digunakan dalam membuat kultur bakteri adalah bakteri murni *Edwardsiella tarda* yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Kelas I Surabaya II di Tanjung Perak, Surabaya Jawa Timur, media tumbuh dan pengencer bakteri *E. tarda*, *Trypticase Soy Broth* (TSB).

5. Respon Imun Non Spesifik

Aquades steril, tissue, larutan truk, larutan hayem, larutan giemsa, Na-sitrat 3,8 %, spuit 1 ml, alcohol, RPMI.

4.3. Metode Penelitian

Metode yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang mengadakan percobaan untuk mendapatkan hasil atau kaitan kasual dari variabel-variabel yang diamati, tujuan dari eksperimen ini adalah

untuk mengetahui ada atau tidaknya hubungan antara variabel dan perlakuan tertentu pada eksperimen. Sehingga hasil yang di peroleh dapat memberikan dan seberapa besar hubungan kasual, variabel dan kelompok eksperimen dengan memberi perlakuan, eksperimen dan Kontrol sebagai pembanding, pengumpulan data dilakukan secara langsung dengan pengamatan (Nazir, 1988)

4.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan rancangan penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL), digunakan untuk percobaan yang media dan tempat percobaan sama (homogen), sehingga banyak yang menggunakan RAL untuk penelitian skalah laboratorium, karena tempat percobaan (media) tidak memberi pengaruh pada parameter yang diamati.

Menurut Sastrosupadi (2000) model Rancangan Acak Lengkap yaitu sebagai berikut :

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

Ket :

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

μ : Nilai tengah umum

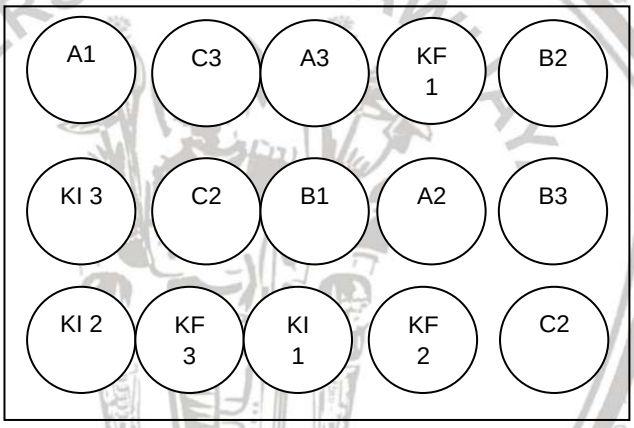
T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

E_{ij} : Pengaruh nilai gallat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Rancangan Acak Lengkap yang digunakan terdiri dari satu faktor dengan tiga perlakuan, kontrol normal dan infeksi, kontrol dengan daun turi (*S. grandiflora*) dengan tiga ulangan. Perlakuan yang dilakukan adalah perbedaan dosis fraksi daun turi, penelitian yang dilakukan pada respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberikan fraksi terbaik.

Penentuan konsetrasi pemberian dosis disesuaikan dengan penelitian ini yang terdiri dari 3 perlakuan dengan 3 kali pengulangan sebagai berikut Gambar 7 :

- Kontrol Negatif : Ikan nila di infeksi bakteri *Edwardsiella tarda* dan tanpa ekstrak daun *S. garndiflora*
- Kontrol Positif : Ikan nila diberikan ekstrak daun *S.* grandiflora 500 ppm
- Perlakuan A : Ekstrak daun *S. grandiflora* dengan dosis 450 ppm
- Perlakuan B : Ekstrak daun *S. grandiflora* dengan dosis 300 ppm
- Perlakuan C : Ekstrak daun *S. grandiflora* dengan dosis 150 ppm



Gambar 7. Dena Penelitian

Keterangan :

KF (Kontrol Positif) A B C (Perlakuan)

KI (Kontrol Negatif) 123 (Ulangan)

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Penelitian Tahap 1. Identifikasi Fraksi, Uji Aktifitas Antibakteri dan Optimalisasi Dosis Fraksi Daun Turi (*Sasbania grandiflora*)

4.5.1.1. Pembuatan Media In Vitro

1. Pembuatan *Trypticase Soy Agar* (TSA) dari OXOID

TSA 40 gram dengan komposisi 15,0 gr Tryptone, 5,0 gr soya peptone, 5,0 gr sodium choride dan 15,0 gr agar, dilarutkan dalam 1 liter aquades dalam erlenmeyer, selanjutnya erilenmeyer ditutup menggunakan kapas dan alumunium foil lalu dididihkan. Setelah itu larutan TSA disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 ^{0}C selama 15 menit. TSA yang sudah steril dituangkan ke dalam cawan petri dalam kedaan panas sebanyak 10 – 12 ml, penuangan dilakukan berdekatan dengan api bunsen dan cawan petri dipanaskan setelah penuangan larutan TSA selesai, selanjutnya media dibiarkan dingin dan memadat.

2. Pembuatan Media *Trypticase Soya Broth* dari OXOID

TSB kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquades dalam erlemeyer. Selanjutnya ditutup menggunakan kapas lalu didihkan hingga larut sempurna dan jerni. Larutan dalam erlemeyer disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 ^{0} C selama 15 menit, dan larutan dibiarkan dingin agar bakteri yang akan dibiakkan tidak mati.

4.5.1.2. Kultur Bakteri *Edwardsiella tarda*

Bakteri *E. tarda* biakan murni yang akan digunakan dalam penelitian ini di peroleh dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Kelas I Surabaya II di Tanjung Perak, Surabaya Jawa Timur. Sebelum digunakan untuk pengujian antibakteri, bakteri tersebut diremajakan dulu, karena bakteri yang digunakan untuk uji antibakteri berumur 24 jam.

Bakteri ini sebelum diberikan perlakuan ke ikan uji terlebih dahulu dikultur pada media TSA selama 24 jam dan dipindah ke media GSP lalu diencerkan menjadi 10^6 setara dengan tingkat kekeruhan. diinkubasi dalam media TSB (*Trypticase Soy Broth*) miring pada tabung reaksi selama 18-24 jam dengan suhu 24-25 ^{0}C, kemudian biakan murni bakteri tersebut diambil dengan menggunakan jarum ose untuk selanjutnya diremajakan di media selektif GSP, lalu diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, isolat tersebut diambil menggunakan jarum ose untuk dilarutkan dalam 25 ml TSB dan di inkubasi lagi selama 18-24 jam. Suspensi bakteri diambil 1 ml dari TSB dicentrifuge, didiamkan, dibilas dua kali dengan NaCl fisiologis. Kemudian dihitung dengan teknik pengenceran berseri untuk memperoleh dosis atau kosentrasi bakteri untuk uji pengobatan.

4.5.1.3. Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)

Daun turi yang digunakan merupakan daun muda yang diperoleh dari daerah Sumba, Nusa Tenggara Timur, dalam penelitian Syukur dan Hermani (2001) meyatakan konsetrasi senyawa kimia dalam tumbuhan ditentukan oleh lokasi tumbuh dengan tekstur tanah dan unsure hara yang ada dalam tanah. Daun tua yang telah dipetik, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari langsung, setelah kering diblender hingga menjadi serbuk, sampel siap diekstraksi (Astriani*.,* 2013).

Pembuatan ekstrak daun turi (*S. grandiflora*) dalam bentuk serbuk, di mesarasi metode ini menggunakan pelarut – pelarut dengan waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi.

Ekstraksi daun turi menggunakan metode mesarasi dengan dua pelarut seperti ethanol, etil asetat yang merupakan pelarut polar dan semi polar, untuk mengetahui pelarut terbaik digunakan untuk mengestraksi senyawa aktif daun turi (Harborne, 1987). Dengan perbadingan 1:3 b/v, 100 gram daun turi direndam

dalam masing-masing pelarut 300 ml, dan didiamkan selama 48 jam pada suhu kamar dan tidak terkena cahaya, filtarsi dipisahkan dari ampas dengan cara di saring menggunakan kertas saring, hasil fitrat kemudian dievaporator dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator*, sampai semua pelarut menguap dan mendapatkan hasil pasta daun turi.

4.5.1.4. Uji Aktifitas Antibakteri

1. Uji Difusi (Metode Sumur)

Pengujian aktifitas antibakteri ekstrak daun turi menggunakan metode difusi agar dengan teknik sumur (*hole /well*). Sebanyak 20 mL TSA yang telah disterilkan dituangkan ke dalam *petri disk* secara aseptik dan dibiarkan memadat, setelah media agar memadat dimasukkan suspensi bakteri *E. tarda* dengan kepadatan bakteri 10^7 CFU/mL sebanyak 100 µL dan suspense di sebar pada permukaan media agar secara merata dengan mengunakan *cotton buds*.

Selanjutnya dibuat empat lubang sumur dalam satu *petridisk* dengan diameter masing-masing sumur sebesar 6 mm. Setiap sumur diisi dengan 50 µL ekstrak crued dan fraksi daun turi (*Sasbania grandiflora*) dengan berbagai konsentrasi (75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm), kontrol positif menggunakan tetrasiklin 2 % dan kontrol negatif (DMSO) 10%. Perlakuan uji aktivitas antibakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ^{0}C dalam kondisi anaerob. Kemudian diukur diameter zona hambat pada daerah bening sumur dengan menggunakan jangka sorong (Aziz, 2010; Marselia *et al.,* 2015).

2. Analisis Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration) Dan MBC *(Minimum Bactericidal Concentration)*

Metode yang digunakan dalam analisis uji MIC dan MBC sama dengan penentuan uji aktivitas anatibakteri, yaitu dengan penentuan uji aktivitas

antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar menggunakan sumur. Ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik selanjutnya ditentukan menggunakan uji MIC dan MBC dengan konsentrasi yang ditentukan. Pentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan metode berdasarkan metode Bloomfield (1991), yaitu dengan memplotkan nilai log konsentrasi ekstrak pada sumbu X terhadap nilai kuadrat diameter zona hambat pada sumbu y. perpotongan antra kurva linear dengan sumbu X merupakan nilai Mt (diperoleh dari anti log nilai X).

4.5.1.5. Fraksinisasi Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) dan Krakterisasi Senyawa

A. Corong Pisah

Ukuran corong pemisah bervariasi antara 50 mL sampai 3 L. Dalam skala industri, corong pemisah bisa berukuran sangat besar dan dipasang sentrifuge. Untuk memakai corong ini, campuran dan dua fase pelarut dimasukkan ke dalam corong dari atas dengan corong keran ditutup.

Pemisahan dilakukan dengan ekstrak cair menggunakan corong pisah, ekstrak yang dalam bentuk pasta dilarutkan lagi sesuai pelarut masing-masing yang digunakan pada saat mesarasi. Ekstrak etanol sebanyak 5 gram di larutkan menggunakan pelarut air, kemudian dimasukkan kedalam corong pisah dan dipartisi dengan pelarut n-heksana, etil asetat dengan volume masing-masing 75 ml di partisi sebanyak tiga kali (Mogi *et* al., 2016). Corong ini kemudian ditutup dan digoyang dengan kuat untuk membuat dua fase larutan tercampur. Corong ini kemudian dibalik dan keran dibuka untuk melepaskan tekanan uap yang berlebihan. Corong ini kemudian didiamkan agar pemisahan antara dua fase berlangsung. Penyumbat dan keran corong kemudian dibuka dan dua fase larutan ini dipisahkan dengan mengontrol keran corong pisah (Lili *et al*., 2011).

Hasil fraksi air, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat selanjunya di uji aktivitas antibakteri dengan dosis 75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm

B. Analisis Krakteristik dan Identifikasi Fraksi Daun Turi *Sesbania grandiflora*mengunakan GC-MS

Mengetahui senyawa aktif yang mendominasi dalam ekstrak *S. grandiflora*, uji fitokimia dilakukan selanjutnya dilakukan analisis menggunakan GC-MS, merupakan kombinasi antara kromatografi cair menggunakan deteksi spektrofotometri massa. Spectrum GC-MS bisa terbentuk dengan melewatkan sumber ion ke sampel yang kemudian diproses dengan suhu tinggi, karena sampel masih dalam bentuk cair dipisahkan dari GC, melalui suatu alat mass analyser yang kemudian dibaca oleh detector berupa sinyal. Sinyal itu kemudian diubah menjadi spectrum dengan bantuan monitor (Nadinah,2008).

4.6. Penelitian Tahap 2

4.6.1. UjiToksisitas

1. Uji LC_{50} (*Lethal Consetrat*) Ekstrak Etanol Daun Turi (*S. Grandiflora*)

Uji lethal Consetrat 50% (LC_{50}) Ekstrak etanol daun *Sesbania gransiflora* bertujuan untuk mendapatkan dosis letal yang dapat membunuh 50% populasi organisme uji. Dosis ekstrak yang digunakan yaitu 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm (China *et al.,*2012). Konsentrasi ini dipakai untuk menentukan LC_{50} dari ekstrak daun *Sesbania grandiflora* terhadap ikan nila (*O. niloticus*) parameter mortalitas ikan diamati selama 72 jam yang dimana LC_{50} yang diperoleh pada dosis 500 ppm (Lampiran 2), sehingga dosis ekstrak yang digunakan pada penelitian tahap 2 yaitu pada dosis 450 ppm, 300 ppm dan 150 ppm. Persentase mortalitas semakin tinggi seiring dengan meningkatnya dosis dan waktu pemaparan (Lampiran 2). Connell *et al*. (2016) menjelaskan pemberian suatu zat

kimia akan semakin tinggi tingkat toksisitasnya terhadap organisme seiring meningkatnya dosis dan waktu pemaparan.

2. Uji Lethal Dossage 50% (LD_{50}) *Edwardsiella tarda*

Patogenesis *E.tarda* dilakukan dengan uji LD_{50} (*Lethal Dossage*) 50% untuk mengetahui pada lama waktu dan kepadatan berapa bakteri ini dapat mematikan ikan uji sebanyak 50%. kepadatan bakteri *E. tarda* yang digunakan untuk uji LD_{50} yaitu 10^7, 10^8, 10^9 sel/ml dilakukan perendaman. Dari hasil LD_{50} ini diperoleh kepadatan bakteri yang akan digunakan untuk proses uji tantang pada ikan nila adalah 10^7 sel/ml. Data mortalitas ikan nila (*O. niloticus*) selama LD_{50} yang dipapar dengan bakteri *E. tarda* pada kepadatan 10^7 sel/ml dan dapat di lihat pada Lampiran 2.

Kepadatan bakteri *Edwardsiella tarda* dalam uji LD_{50} yang tingkat mortalitas populasi ikan uji sebanyak 50% selama masa uji merupakan kepadatan LD_{50}. Patogenitas bakteri *E. tarda* ini juga dapat ditingkatkan dengan cara mengisolasi bakteri dari ikan yang telah diinfeksi. (Wahjuningrum *et al.* 2013). Tingkat patogenitas bakteri juga berpengaruh terhadap daya tahan tubuh ikan yang digunakan sebagai hewan uji, karena patogen harus menembus sistem imun ikan terlebih dahulu agar dapat menimbulkan penyakit, tetapi jika sistem imun ikan kuat maka ikan mempunyai kemampuan menahan serangan patogen sehingga tidak mudah terjadi penyakit (Bergey's 2014; Wei *et al.,*2008). Sistem imunitas pada ikan berbeda bergantung pada umur, jenis kelamin, asupan nutrisi dan tingkat stress yang terjadi pada ikan Rey *et al.* 2009 ; Park *et al*., 2012).

4.6.2. Penyuntikan Dengan Dosis Optimum Ekstrak Daun Turi (*Sesbania gradiflora*)

Penelitian ini menggunakan metode injeksi dengan dosis optimal ekstrak yang diperoleh dari LC_{50} yaitu 150 ppm, 300 ppm dan 450 ppm, dilakukan

penyuntikan ekstrak terlebih dahulu lalu dipelihara selama 7 hari dan dilakukan uji tantang dengan bakteri *Edwardsiella tarda*. Lalu dilakukan pengamatan respon imun non spesifik.

4.6.3. Uji Respon Imun Non Spesifik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Prameter pengamatan respon imun non spesifik pada ikan nila yang terinfeksi *E. tarda* dengan memberikan ekstrak terbaik dari *S.* grandiflora sebagai berikut:

1. Leukosit

Prosedur kerja perhitungan leukosit (Andriyanti, 2010) :

1) Darah ikan yang tercampur dengan antikoagulan diambil dengan pipet eritrosit sampai skala 0,5.
2) Kemudian diencerkan dengan larutan turk dalam pipet leukosit sampai menunjukan skala 101.
3) Setelah itu, darah yang telah dicampur, dikocok hingga homogen (membentuk angka delapan) dalam pipet kemudian campuran tersebut diambil dan dimasukan ke dalam kamar hitung improvet Neubauer terlebih dahulu dibuang dua tetes agar larutan yang diambil benar-benar homogen.
4) Dengan mengguankan mikroskop cahaya, dihitung banyaknya leukosit pada semua kotak leukosit. Perhitungan dimulai dari kotak kiri atas, kanan atas, kanan bawah dan kotak kiri bawah.

Jumlah sel darah putih dihitung dengan menggunakan rumus (Nabib dan Pasaribu, 1989) :

Jumlah leukosit (SDP= (A/N) x (1/V) x Fp

Keterangan :

SDP : Jumlah Leukosit

A : Jumlah sel leukosit terhitung (sel)

N : Jumlah kotak leukosit pada hemacytometer (4)

V : Volume hemacytometer 0,1 mm^3 (1 mm (P) x 1 mm (L) x 0,1 mm (Kedalaman)

Fp : Faktor pengencer (20)

2. Diffrensial Leukosit

Prosedur kerja perhitungan diffrensial leukosit adalah:

a. Darah ikan yang telah diberikan antikoagulan di ambil menggunakan pipet kapiler dan di teteskan pada ujung gelas objek
b. Membuat hapusan darah yaitu dengan meletakkan gelas objek lain pada ujung gelas objek yang ditetesi darah dan membentuk sudut 30-40 derajat
c. Didorong dengan sudat yang sama dan membentuk lapisan tipis lalu dibiarkan kering
d. Gelas objek difiksasi dengan menggunakan methanol selama 1-2 menit
e. Pengecatan dengan menggunakan giemsa pada lapisan darah yang telah difiksasi dan dibiarkan selama ± 15 menit
f. Dibilas dengan menggunakan air mengalirdan dikeringkan
g. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali untuk menentukan leukosit seperti neurtrofil, monosit, dan limfosit
h. Perhitungan diffrensial leukosit optimal 100 sel

∑ difrensial leukosit (%) = (komponen leukosit/100) x 100 %

3. Aktivitas Fagositosis

Menurut Irianto (2004), uji aktivitas fagositosis makrofag adalah sebagai berikut :

a. Suspense makrofag dimasukkan dalam tabung ofendof kemudian di sentrifugasi selama 5 menit

b. Suspense makrofag ditetesi pada objek glass dan diratakan
c. Objek glass di cuci menggunakan RPMI 1640^{+} untuk menghilangkan sel yang tidak menempel, selanjutnya ditambahkan suspense yeast
d. Dicuci lagi selama 3 kali menggunakan RPMI 1640^{+}
e. Selanjutnya siamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x di hitung dan ditentukan aktifitas fagositosis nya :

Aktifitas Fagositosis =∑Makrofag yang menelan yeast/100 makrofag x 100 %

4.7. Analisis Data

Analisis data yang akan digunakan sesuai dengan pola percobaan RAL, selanjutnya dilakukan analisis ANOVA satu arah untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri dan pengaruh dosis ekstrak daun turi sebagai imonstimulan. Selanjutnya data diolah dan dianalisis menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Penelitian Tahap 1 (Ekstraksi dan Uji Antibakteri)

5.1.1. Ekstraksi Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)

Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia mengunakan pelarut yang sesuai, ekstraksi juga dapat disebut sebagai penyaringan. Ekstraksi dilakukan dengan metode mesarasi dimana daun turi direndam dalam pelarut organik yang berbeda yaitu pelarut dengan kepolaran bertingkat seperti etanol dan etil asetat dengan lama perendaman 48 jam (2 hari) dan dilakukan pengadukan setiap 3 jam sekali. Perbandingan pelarut dan serbuk daun turi adalah 1:3 (w/v) (Mogi *et al*., 2016). Pengunaan pelarut untuk perendaman diacuh dari penelitian terdahulu,bertujuan untuk komponen senyawa yang ada dalam *Sasbania grandiflora* terlarut dengan baik, lama waktu ekstraksi akan memberi pengaruh terhadap hasil rendemen ekstrak. Antari *et al* (2011) dalam penelitiannya menyatakan rendemen ekstrak tinggi jika proses ekstraksinya berlangsung dalam waktu lama dan bentuk serbuk sampel, tetapi tidak berpengaruh terhadap terlarutnya komponen senyawa yang terdapat dalam daun turi.

Hasil proses ekstraksi daun turi di saring mengunakan kertas saring dan dipekatkan mengunakan *Rotary evaporator* hingga di peroleh ekstrak crude, hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2 dan Lampiran 3.

Tabel 2. Hasil ekstrak daun turi (*Sesbania grandiflora*)

Pelarut	Bentuk	Rendemen (%) X̄±stdev
Etano	Pasta	5,66 ± 0,66
Etil Asetat	Cair kental	3,45 ± 0,04

Diketahui hasil rendemen yang diperoleh dari meserasi menggunakan 2 pelarut polar dan non polar, menunjukkan bahwa kemampuan komponen bahan organik dapat terlarut pada pelarut semi polar yaitu pelarut etil asetat (5,66 ± 0,66 %) kemudian pelarut etanol yang bersifat polar (3,45 ± 0,04 %), hal ini menunjukkan bahwa komponen senyawa bioaktif yang bersifat semi polar dari daun turi lebih sedikit apabila dibandingkan dengan pelarut polar. Hasil perhitungan rendemen ekstrak menunjukkan bahwa pelarut dengan pelarut etanol memiliki nilai rendemen yang paling banyak. Sesuai dengan penelitian Sucita *et al*., (2013) yang menyatakan bahwa jenis pelarut bersifat nyata ($p<0,05$) terhadap rendemen ekstrak daun *Sesbania grandiflora.* Nilai rendemen tertinggi adalah dengan menggunakan pelarut polar dan dikuti oleh semi polar dan non polar. Hal tersebut menujukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam daun*S. grandiflora* adalah senyawa bersifat polar.

5.1.2. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun *Sesbania grandiflora* dilakukan dengan metode lubang sumuran. Misna *et al.,*(2016) menyatakan pengguanaan metode difusi dengan cara sumuran yaitu ekstrak langsung dimasukkan disetiap lubang maka efek untuk menghambat bakteri lebih kuat. Pada metode sumuran terjadi proses osmolaritas dari konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi dari metode difusi kertas cakram, setiap lubang diisi dengan konsentrasi ekstrakmaka osmolaritas terjadi lebih menyeluruh dan lebih homogen serta konsentrasi ekstrak lebih kuat dan lebih tinggi untuk menghambat pertumbuhan bakteri. konsentrasi masing ekstrak etanol dan etil asetat 125 ppm, 100 ppm dan 75 ppm, uji ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. tarda*. Hasil uji dapat diliat pada Tabel 3 Lampiran 4

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar daun turi (*Sesbania grandiflora*)

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm) Ẋ±stdev	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
Pelarut Etanol	125	9,20±1,01	0.77	3.08
	100	8,16±0,35		
	75	6,60±0,037		
Pelarut Eti Asetat	125	5,31±0,37	0,58	2,34
	100	4,18±0,48		
	75	3,24±0,71		

Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak dengan pelarut etanol memiliki zona hambat terbesara dari beberapa konsentrasi yang berbeda, sedangkan ekstrak yang menggunakan pelarut etil asetat terbentuk zona hambat tetapi berukuran sangat kecil. Adanya zona hambat yang terbentuk mengindikasikan bawa senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak *S. grandiflora* bekerja menghambat pertumbuhan *E. tarda* dan bukan merupakan aktifitas dari larutan uji (DMSO), terlihat dari tidak terbentuknya zona hambat.sebesar 9,20±1,01mm (Tabel 3), menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak daun turi pelarut etanol memiliki zona hambat lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat, meskipun masih termasuk dalam kategori sedang. Hal ini sesuai dengan, Susanto *et al*., (2012) mengkategorikan hasil zona hambat berdasarkan besaran zona bening, lemah adalah diameter zona hambat ≤ 5 mm.

Ekstrak etanol dengan konsentrasi 125 ppm membentuk zona hambat sebesar Kategori sedang memiliki diameter zona hambat berkisar 6 – 10 mm, diameter zona hambat yang kuat memiliki diameter 11- 20 mm dan untuk kategori ≥ 20 merupakan zona hambat sangat kuat. Sehingga dapat di kategorikan sesuai peryataan Susanto *et al*., (2012) hasil dari diameter zona hambat ekstrak yang mengunakan pelarut etil asetat dengan konsentrasi 125 ppm, 100 ppm dan 75 ppm secara berturut- turut (5,31±0,37 ; 4,18±0,48 ;

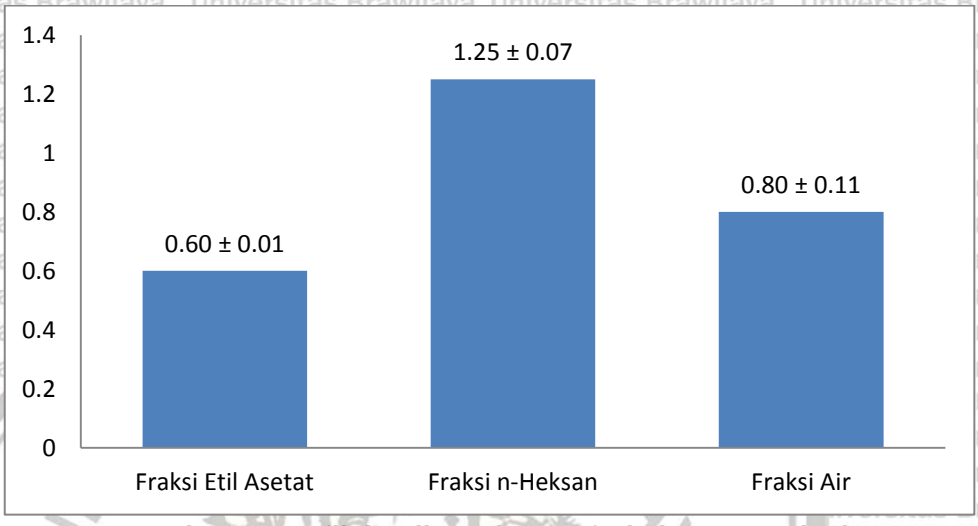
3,24±0,71) seluruhnya masuk dalam kategori lemah dan ekstrak yang mengunakan pelarut etanol diameter yang dihasilkan bersikas 6,60±0,038 - 9,64±0,56, sehingga seluruh hasil zona hambatyang mengunakan pelarut etanol masuk dalam kategori sedang.

Kecilnya ukuran zona hambat pada larutan etil asetat disebabkan oleh kurang optimalnya pelarut dalam menarik senyawa yang terkandung dalan daun *Sesbania grandiflora*, selainitu juga dapat dipengaruhi oleh lamanya perendaman (Manoi, 2015). Menurut Cakrawati (2008) berpendapat bahwa hasil meserasi biasa dipengaruhi oleh suhu dan lama penyimpanan ekstrak serta jenis pelarut, selain itu ditambahkan oleh pernyataan Wiyanto (2010) bersarnya zona hambat juga dipengaruhi oleh konsentrasi dosis, semakin tinggi dosis maka akan semakin besar zona hambat yang ditimbulkan. hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *E. tarda* merupkan senyawa yang bersifat polar, sehingga memperkuat penyataan Rahayu *et al.*, (2006) bahwa daun *Sesbania* grandiflora mempunyai senyawa yang bersifat antibakteri. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Padmalocha *et al.,*(2014) menyatakan daun turi (*Sesabania grandiflora*) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tannin dan terpenoid yang terbukti memiliki efek antibakteri.

5.1.3. Rendemen dan Daya Hambat Fraksi

Ekstrak kasar dengan pelarut etanol kemudian dimurnikan mengunakan corong pisah (Lampiran 5). Corong pisah merupakan salah satu metode fraksinasi yang digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya, jumlah senyawa yang dapt dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda sesuai tumbuhan yang digunakan (Lukamandaru *et al*., 2012). Ekstrak etanol dipilih karena hasil uji aktivitas antibakteri *Sesabania grandiflora* terhadap bakteri *E. tarda* (Tabel 4) menunjukakkan zona hambat terbesar dibandingkan ekstrak pelarut etil asetat (Tabel 4). Metode ini dilakukan untuk menarik

senyawa-senyawa yang bersifat non polar dan semi polar (Lampiran 5), menggunakan pelarut *n*-heksan dan semi polar pelarut etil asetat, pada uji ini menggunakan ekstrak sebanyak 15 g, dengan lama pemisahan 5-8 jam agar terpisah dengan sempurna. Hasil fraksi dapat dilihat pada Gambar 8 .



Gambar 8. Grafik hasil rendemen fraksi corong pisah

Hasil fraksi corong pisah yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri untuk mengetahuiperbedaan antibakteri ekstrak dan hasil fraksi. Hal ini menunjukkan bahwa zona hambat fraksi *n*-heksan lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol (Tabel 4) zona hambat semakin besar dengan bertambahnya dosis Lampiran 4

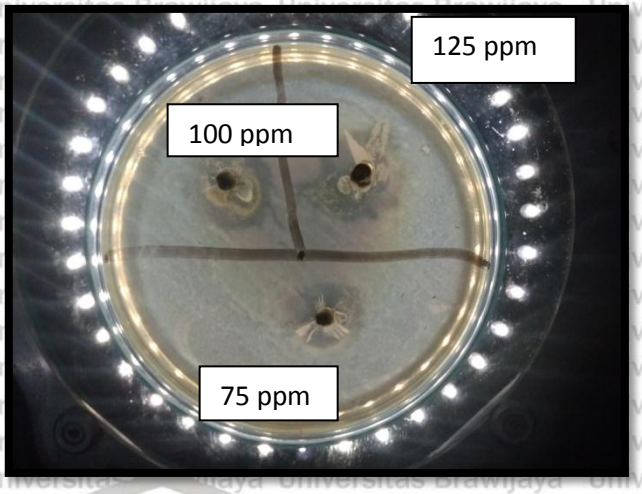
Tabel 4. Perbandingan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun *Sesbania grandiflora*

Perlakuan	Konsentrasi (mg/L)	Diameter (mm) x±stdev	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
Ekstrak Etanol	125	9.20 ± 1.01	0.77	3.08
	100	8.16 ± 0.32		
	75	6.60 ± 0.37		
Fraksi n-Heksan	125	19.16 ± 0.24	57.16	228.64
	100	14.72± 0.84		
	75	11.28± 1.90		
Fraksi Etil Asetat	125	7.82± 0.33	18.38	73.52
	100	7.04 ± 0.21		

	75	5.55 ± 0.58		
	125	5.70 ± 0.77	0.61	2.46
	100	4.82 ± 0.19		
Fraksi Air	75	4.67 ± 0.12		

Hasil perbandingan menunjukkan bahwa proses pemurnian senyawa yang dilakukan meningkatkan aktivitas antibakteri dari daun turi. Zona hambat terbesar ditunjukakn oleh fraksi *n*- heksan yang terbentuk berkisar 10-20 mm sehingga termasuk dalam kategori yang bersifat kuat. Berdasarkan penelitian Mogi *et al.,* (2016) uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki aktivitas antibakteri, senyawa bioaktif yang terdapat dalam fraksi n-heksan bekerja secara sinergis menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat,memungkinkan senyawa yang tersari dari fraksi n-heksan adalah alkaloid dan terpnoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa terpenoid flavonoid yang terdapat dalam tanaman herbal mampu merusak membran bakteri dengan cara menghancurkan membran luar dari bakteri Gram negatif (Agunwande *et al.*, 2007; Ragasa *et al.*, 2009; Makkawi *et al*., 2015).

Uji MIC dan MBC dilakukan pada fraksi *n*-heksan hasil corong pisah, bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang mampu menghambat dan membunuh bakteri *E. tarda*. Parameter yang diukur untuk menentukan nilai MIC dan MBC adalah zona hambat keseluruhan yang terbentuk sekitar satu lubang sumur, hasil uji menunjukan dengankonsentrasi (125, 100, dan 75 ppm) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri Gambar 9.



Gambar 9. Hasil uji aktifitas antibakteri fraksi *n*-heksan metode difusisumur

Hasil pengukuran zona hambat terbesar yang terbentuk, diketahui bahwa zona hambat terbesar dihasilkan oleh fraksi n-heksan dan dikuti oleh ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan bahwa besar zona hambat berbanding lurus dengan konstrasi fraksi n-heksan persamaan (Y=0.703 - 0.157x) (Lampitan 4). Nilai R^2 menunjukkan hubungan antara kedua variable, dimana semakin tinggi konsetrasi fraksi, zona hambat yang terbentuk juga semakin besar, dimana jika semakin mendekati 1 maka ikatan yang terjadi semakin kuat dengan nilai R^2 yang diperoleh sebesar (R^2= 0.994).Nilai MIC dan MBC pada (Tabel 5) menunjukkan daunturi dapat bersifaat membunuh dan mencegah pertumbuhan bakteri *E. tarda*, berbedanya konsentrasi hambat dapat dipengaruhi oleh bakteri uji, karena bakteri memiliki kerentanan terhadap senyawa yang berbeda.

Hasil uji difusi dengan metode sumuran menunjukkan nilai MIC fraksi n-heksan yaitu 4,08 ± 1,09 mg/L, hal ini dapat mengindikasikan bahwa pertumbuhan *E. tarda* dapat di hambat oleh fraksi pada konsentrasi terendah 4.08 mn/L. Sedangkan kemampuan bateriasida fraksi *n*-heksan dari daun *S. grandiflora* terdapat pada konsentrasi terendah sebesar 16,32 ± 4,36 mg/L. data

hasil perhitungan MIC dan MBC dapat dilihat pada Lampiran 4. Menurut Vipin *et al*., (2011) dalam penelitianya konsentrasi MIC bunga *Sesbania grandiflora* terhadapa bakteri *Eschericia coli, Bacilus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* sebesar 0,4 mg/L. sehingga dapat di ketahui daun turi memiliki senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. tarda*. Perbedaan konsentrasi hambat yang berbeda dikarenakan beberapa hal seperti kosentrasi ekstrak, organisme uji, komposisi media kultur, waktu inkubasi dan kondisi inkubasi yaitu suhu dan pH (Sumaryati *et al*., 2015).

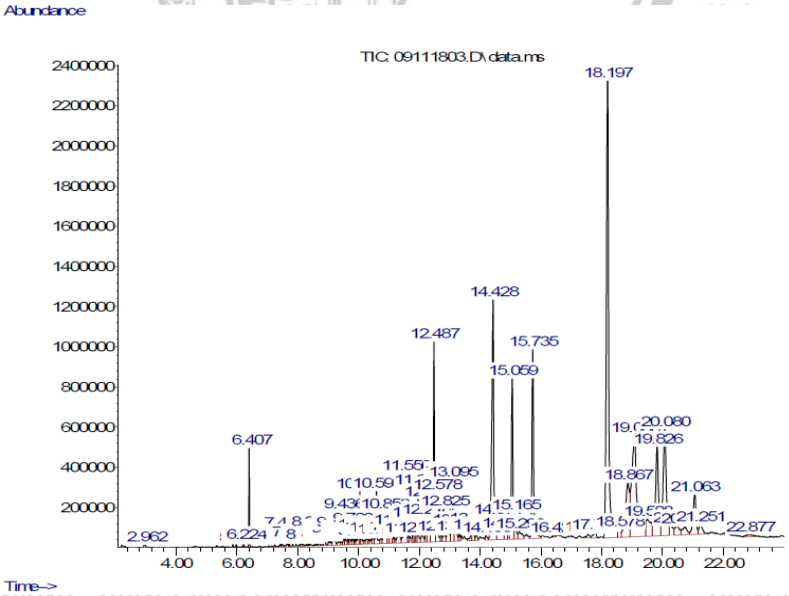
5.1.4. Analisis GC-MS Fraksi *n*-Heksan

Teknik GC diperkenalkan oleh James dan Martin pada tahun 1952 (Sparkman et al., 2011). GC merupakan salah satu teknik kromatografi yang dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap dimana dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan (Drozd, 1985). Pemisahan menggunakan kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan pada fase diam sedangkan, gas sebagai fase gerak mengelusi fase diam. Cara kerja dari GC adalah suatu fase gerak yang berbentuk gas mengalir di bawah tekanan melewati pipa yang dipanaskan dan disalut dengan fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang disalut pada suatu penyangga padat. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen yang ada di fase diam (Sparkman et al., 2011).

Seiring dengan perkembangan teknologi maka instrument GC digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain seperti Mass-Spectrometer (MS). Spektrometer massa diperlukan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsip dari MS adalah pengionan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Molekul yang telah terionisasi akibat

penembakan elektron berenergi tinggi tersebut akan menghasilkan ion dengan muatan positif, kemudian ion tersebut diarahkan menuju medan magnet dengan kecepatan tinggi. Medan magnet atau medan listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang dihasilkan (David, 2005).

Analisis GC-MS adalah identifikasi lanjutan dari analisis idenstifikasi spektrofotometri FTIR. GC-MS bertujuan untuk mengukur jenis dan senyawa yang terkandung dalam satu sampel baik secara kualitatif maupun kuantitatif. GC-MS adalah metode dengan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan 2 metode analisis senyawa seperti krotomatografi gas (GC) untuk menganalisis jumalah senyawa yang terdapat pada sampel secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa (Sahayaraj *et al.,* 2015 ; Zhaoe *et al*., 2015). Hasil analisis GC-MS fraksi *n*-heksan daun turi (*Sesbania grandiflora*) terdapat 78 senyawa aktif (Lampiran 6). Identifikasi senyawa berdasarkan waktu retensi dan spectrum massa dengan data library Gambar 10.



Gambar 10. Hasil GC-MS Fraksi *n*-Heksan Daun Turi (*Sesbania grandiflora*)

GC menunjukkan konsentrasi relatif dari berbagai senyawa yang dielusi sebagai fungsi waktu retensi. Ketinggian puncak menunjukkan konsentrasi relatif dari komponen yang ada dalam tumbuhan (Arora *et al*., 2016) . Spektrometer massa menganalisa senyawa yang terelusi pada waktu yang berbeda; mengidentifikasi sifat dan struktur senyawa. Jumlah fragmen yang lebih besar menjadi senyawa yang lebih kecil, sehingga menimbulkan penampilan puncak pada rasio (m / z) yang berbeda.

Hasil identifdikasi (Gambar 10) terdapat beberapa senyawa aktif yang tinggi, berdasarkan data base dari library dari MS, terdapat senyawa Analisis GC-MS dari fraksi n-heksan daun turi (*Sesabnia grandiflora*), masing-masing menunjukkan 12, 14 dan 18 puncak (Gambar. 10) menunjukkan adanya 78 senyawa dalam fraksi n-heksan. Identifikasi senyawa didasarkan pada waktu retensi (RT), area puncak, rumus molekul, fungsi senyawa (Tabel 5). Hexadeconoic acid, n-Hexadeconoic acid, 2,6,10-Trimethyl-14-Ethylene-14-Pentadecne dan 2-Hexadecen-3,7,11,15-Tretramethyl pada puncak tertinggi. Hasil analisis GC-MS pada Tabel 5 dan Lampiran 6.

Tabel 5. Hasil analisis GC-MS Senyawa aktif fraksi n-heksan daun turi (*Sesbania grandiflora*) (Herborne 2006; (Arora *et al*., 2016)

R. Time	Nama Senyawa	% Area	Rumus Kimia	Fungsi Senyawa
12.487	Hexadeconoic acid	3.66	$C_{17}H_{34}O$	Antioksidan, antijamur
14.427	n-Hexadeconoic acid	8.67	$C_{16}H_{32}O_2$	Antifungal, Antioksidan, Hypocholesterolemic Nematicide, Agen Antimikroba, Antimalaria, dan Antijamur
15.061	Hexadecanoic acid	4.33	$C_{17}H_{34}O$	Antioksidan, antijamur
15.164	Eicosane	0.83	$C_{20}H_{42}$	Antijamur, Antitumor, Antibakteri, Larvasida, Antimikroba dan efek sitotoksik

18.576	2,6,10-Trimethyl-14-Ethylene-14-Pentadecne	19.27	$C_{20}H_{38}$	Antiproliferative,dan antibakteri
18.576	2-Hexadecen-3,7,11,15-Tretramethyl	0.42	$C_{20}H_{40}O$	Antimikroba dan anestesi

Herborne (2006) mengatakan senyawa terpenoid berbentuk unit C_{15} dan C_{20} mengahasilkan triterpenoiod dan steroid. Terpenoid memiliki gugus molekul asam karboksilat yang berikatan dengan molekul isoprene $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ dan kerangka karbon terhubung dengan dengan 2 atau lebih unit C_5. Berdasarkan peryataan tersebut dapat disimpulkan $C_{20}H_{38}$, $C_{20}H_{40}O$, $C_{20}H_{42}$, termasuk turunan senyawa terpenoid jenis diterpenoid karena memiliki 4 molekul isoperana C_5 ($C_{20}H_{38}$).

Terpenoid merupakan bentuk senyawa dengan struktur yang besar dalam produk alami yang diturnkan dan unit isoprene yang diturunkan dari metabolisme asam (Sermakkani*et al.,* 2015).

5.2. Penelitian Tahap 2(Respon Imun Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

5.2.1. Leukosit (Sel Darah Putih)

Leukosit terdiri dari agranulosit (monosit dan limfosit) dan granulosit (neutrofil, eosinofil dan basofil). Leukosit memiliki fungsi sebagai sistem pertahanan non spesifik pada ikan yang bereaksi terhadap gangguan dari luar termasuk infeksi patogen (Noercholis *et al*., 2013). Total leukosit pada ikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan eritrosit, berkisar antara 20,000 sel/ml – 146,000 sel/ml, peningkatan jumlah leukosit merupakan respon proteksi diri terhadap sel asing (Anderson, 1992). Menurut Jhonny *et al*., (2005) factor yang mempengaruhi jumlah leukosit tingkat stress dan kesehatan tubuh ikan. Jumlah leukosit merupakan indikator adanya infeksi tertentu pada ikan.

Joseph dan Sujatha (2010) melaporkan bahwa faktor suhu lingkungan juga dapat menyebabkan stres pada ikan. Stres akibat suhu air pada ikan berdampak terhadap performa dan kesehatan ikan berupa gangguan fungsi sel-sel darah (El-Sherif dan El-Feky, 2009). Jumlah total leukosit dalam darah menunjukkan kesehatan ikan. Ikan yang mengalami stres yang disebabkan oleh perubahan kondisi lingkungan maupun karena infeksi patogen memperlihatkan respons kenaikan jumlah sel leukosit (Hastuti, 2004), hasil pengamatan leukosit dapatdilihat pada Tabel 6 dan Lampiran 7.

Tabel 6. Hasil pengamatan leukosit ikan nila (*O.niloticus*) (X 10^4 sel/ml)

Dosis Ekstrak (ppm)	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
Kontrol (-)	26,36 ±0,87^b	19,66 ± 0,57^a
450	25,21 ± 0,76^b	28,30 ± 0,85^c
300	20,19 ± 0,54^a	23,87 ± 0,76^b
150	21,12 ± 0,40^a	22,26± 1,18^b
Kontrol (+)	21,88 ± 0,48^a	22,94 ± 0,94^b

Keteranagan : angka pada pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang sama tidak berbedanyata (p>0,05)

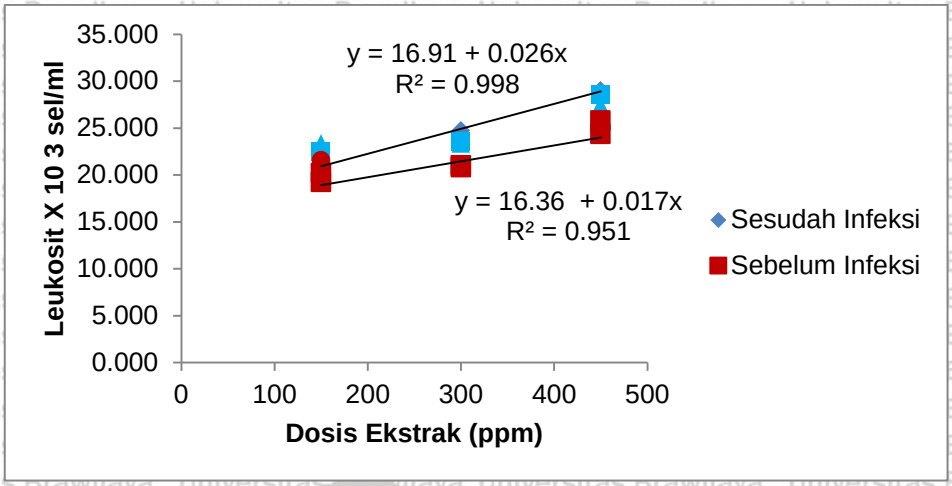
Hasil pengamatan leukosit ikan nila selama penelitian menunjukkan Pemberian ekstrak daunturi dengan cara di injeksi dapat meningkatkan jumlah leukosit pada ikan nila. Hasil penelitian (Tabel 6) menunjukkan bahwa jumlah leukosit tertinggi diperoleh pada perlakuan dengan pemberian dosis ekstrak 450 ppm dari sebelum infeksi dan setelah diinfeksi yaitu(25,21-28,30 x 10^4sel/ml), kemudian diikuti oleh dosis 300 ppm, 150 ppm berturut-turut (20,19 - 23,87x 10^4 sel/ml dan 21,12 x 10^4-22,26 x 10^4 sel/ml) dan kontrol (+) yang hanya di beri ekstrak tanpa infeksi *Edwardsiella tarda* yaitu 21,88 x 10^4 - 22,94 x10^4sel/ml dan jumlah leukosit terendahpada kontrol (-) dimana pada perlakuan ini tanpa pemberian ekstrak tetapi diinfeksi *Edwardsiella tarda* yaitu 26,36x 10^4- 19,66 x 10^4sel/ml.

Perlakuan sebelum infeksi dan sesudah infeksi menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan meningkatnya jumlah sel leukosit setelah uji tantang dengan bakteri *E. tarda.*Menurut Hardi *et al.*(2011), peningkatan dan aktifitas leukosit dapat disebabkan oleh infeksi yang memicu aktifitas pembelahan sel.Namun pemberian ekstrak daun turi (*Sesbania grandiflora*) tidak mempengaruhi peningkatan jumlah leukosit yang signifikan masih dalam jumlah normal leukosit, tetapi jika dilihat dari kisaran normal jumlah sel darah putih pada ikan normal umumnya berkisar 20.000-150.000 sel/ml sehingga dapat dinyatakan bahwa pemberian ekstrak daun turijuga berpengaruh terhadap jumlah sel darah putih yang dihasilkan ikan nila (Sasongko 2001). Hingga akhir penelitian jumlah leukosit semakin mendekati normal.

Kontrol (-) pada awal penelitian mengalami peningkatan jumlah leukosit, dimana pada perlakuan ini tanpa pemberian ekstrak daun turi, tetapi infeksi *E. tarda* dikarenakan ikan nila mempunyai respon imun bawan yang dapat melawan sel asing masuk, tetapi mengalami penurunan jumlah leukosit dalam masa pemeliharan dimana ikan atau repon imun non spesifik tidak mampu untuk mengatasi infeksi yang disebabkan oleh *E.tarda*, hal in sesuai dengan Haditomo (2011), berpendapat bahwa penurunan jumlah sel leukosit belum mampu mengatasi infeksi yang disebabkan oleh patogen dalam darah.

Peningkatan leukosit pasca uji tantang diduga berkaitan dengan senyawa tannin, terpenoid, saponin yang tekandung dalam ekstrak daun turi yang mampu menstimulasikan produksi leukosit umtuk mempertahankan tubuh ikannila dari infeksi (Mogi *et al*., 2016).

Berdasarkan total leukosit pada Tabel 6. Terlihat nyata pengaruh pemberian dosis ekstrak daun turi pengaruh secara linear. Hubungan antara dosis ekstrak daun turi dan total leukosit dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Hubungan antara dosis ekstrak daun turi (*Sesbania grandiflora*) dan total leukosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

Hasil perhitungan regresi menunjukkan pada perlakuan sebelum infeksi terdapat hubungan dimana dosis mempengaruhi jumlah leukosit dengan nilai koefisien diterminasi sebesar R^2 0.951 atau sama dengan 95%, berepengaruh, selanjutnya 0,05 atau 5 % di pengaruhi oleh faktor lain, diduga dipengaruhi oleh lingkungan perairan dan ikan uji, sedangkan perlakuan sesudah infeksi hubungan dosis ekstrak daun turi dan jumlah leukosit, terdapat hubungan yang linear dimana semakin meningkatnya dosis jumlah leukositsemakin meningkat, dengan nilai koefisen diterminasi R^2 0,998 yang berarti pemberian dosis berpengaruh 99%.

Leukosit dalam darah berfungsi dalam sistem kekebalan tubuh. Leukosit membantu membersihkan tubuh dari benda asing, termasuk invasi patogen melalui sistem tanggap kebal. Ikan yang sakit akan menghasilkan banyak leukosit untuk memfagosit bakteri dan mensintesis antibodi (Mahasri *et al*., 2011).

Perlakuan sebelum dan sesudah uji tantang menunjukan terjadinya keseimbangan respon imun. Pada perlakuan dosis 150 ppm terjadi kenaikan total leukosit dan nilainya paling mendekati perlakuan kontrol (+) yang merupakan perlakuan tanpa uji tantang. Sedangkan perlakuan 450 pp dan 300 ppm

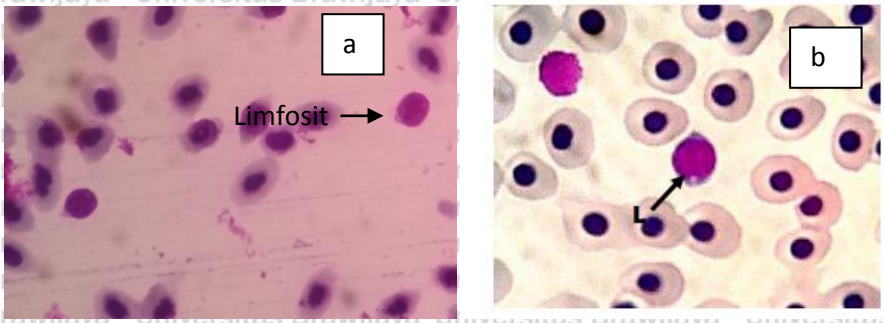
mengalami peningkatan dan total leukositnya berada diatas kisaran ikan normal. Menurut Prakoso (2012) mengemukakan bahwa meningkatnya jumlah leukosit karena komponen leukosit memberikan respon imun terhadap bakteri, sedangkan penurunan jumlah leukosit mengindikasikan bahwa proses peradangan telah berhenti.

Aktivitas senyawa aktif pada tanaman berpotensial sebagai imunostimulan. Komponen aktivitas imunostimulan telah dievaluasi pada ikan. Komponen aktif dapat menghambat pertumbuhan sel inang patogen sehingga mengurangi replikasi patogen dan merangsang pertahanan sistem kekebalanbawaan. Selain itu, senyawa aktif juga berperan sebagai zat pelindung yang dapat mencegah atau menunda kerusakan oksidatif dari spesies oksigen reaktif (Elham dan Amani, 2017). Penggunaan bahan alami dengan dosis yang tepat dapat merangsang sitem imun dan meningkatkan proteksi terahadap adanya infeksi (kareem *et al*., 2017).

5.2.2. Differensial Leukosit

a. Limfosit

limfosit memiliki fungsi untuk menyediakan zat kebal dalam mempertahankan tubuh, ditemukan dalam jumlah yang besar meskipun pada saat terjadi infeksi terjadi penurunan, limfosit termasuk leukosit yang mampu keluar pembuluh darah jika terjadi infeksi. Limfosit adalah sel yang berfungsi memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor dalam menanggapi antigen



Gambar 12. Limfositperbesaran 400x : a. Limfosit ikan nila (*Oreochromis* niloticus), b. (Hartika *et al.*,2014)

Hasil pengukuran diffrensial leukosit menunjukkan bahwa jumlah presentasi limfosit mengalami peningkatan setelah pemberian ekstrak daun turi (*Sesbania grandiflora*) dan pasca infeksi. Peningkatan jumlah limfosit berturut-turut sebagai berikut : Perlakuan dosis 450 ppm 69,00 – 76,33 %, dosis 300 ppm 67,00 – 74,66 %, dosis 150 ppm 66,00 – 73,00 % dan perlakuan kontrol (+) 71,00 – 74,00 %, sedangkan Kontrol (-) 61,66 % mengalami penurunan total limfosit sebesar 58,66 %. Hasil pengamatan limfosit dapat di lihat pada Tabel 7 dan Lampiran 8.

Tabel 7. Hasil Rata-rata Limfosit % Ikan Nila (*Oreochromis nilotikus*)

Dosis Ekstrak (ppm)	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
K (-)	61,66 ±0,52^{a}	58,66 ± 1,25^{a}
450	69,00 ± 1,00^{c}	76,33 ± 0,57^{a}
300	67,00 ± 1,00^{b}	74,66 ± 0,57^{b}
150	66,00 ± 1,00^{b}	73,00 ± 1,00^{b}
K (+)	71,00 ± 1,00^{c}	74,00 ± 1.00^{b}

Keterangan : Angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata (p>0,05)

Hasil pengamatan total limfosit dilihat dari analisis data menggunakan anova satu arah (one way anova) didapat bahwa sebelum infeksi dan sesudah infeksi bakteri *Edwardsiella tarda* berbeda nyata antara tiap perlakuan dengan (P>0,05) (Lampiran 8).

Tingginya presentasi limfosit pada ikan nila perlakuan ekstrak daun turi, disebabkan ekstrak mampu mengendalikan infeksi bakteri *E. tarda*. Sedangkan rendah presentasi limfosit pada kontrol (-) disebabkan karena kegiatannya dalam menyediakan zat kebal terganggu oleh masuknya bakteri *E. tarda* kedalam tubuh. Limfosit tidak bersifat fagosit tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi, kekurangan limfosit dapat menyebabkan menurunnya konsentrasi daya tahan tubuh sehingga menyebabkan meningkatnya serangan penyakit (Fujaya, 2004).

Hal ini sejalan dengan Tanbiyaskur (2011), bahwa pemberian ekstrak , untuk pengendalian infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* mengalami peningkatan presentasi jumlah limfosit dari presentasi jumlah limfosit ikan pada keadaan normal. Peningkatan limfosit yang dihasilkan ikan nila berperan cukup besar terhadap peningkatan respon imun atau ketahanan tubuh ikan nila terhadap serangan penyakit dan infeksi. Limfosit tidak bersifat fagositik namun memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi (Baratawidjaja 2012).

Berdasarkan tempat sel-sel ini dimatangkan maka limfosit terbagi menjadi limfosit T dan limfosit B, kedua jenis limfosit ini berfungsi dalam mekanisme imunitas spesifik. Limfosit T berperan melalui selulernya yaitu interferon yang berperan terhadap reaksi-reaksi alergi, penolakan sel asing dan menyusun pertahanan utama terhadap bakteri, jamur dan virus. Limfosit B mempunyai reseptor-reseptor pada permukaan untuk antigen tertentu, apabila antigen berikatan dengan sel, maka sel akan dirangsang untuk membela diri dan sel-sel anak diubah menjadi sel plasma, sel-sel inilah yang mengsekresi antibodi (Rukyani, 1999 ; Hartika *et al.,* 2014).

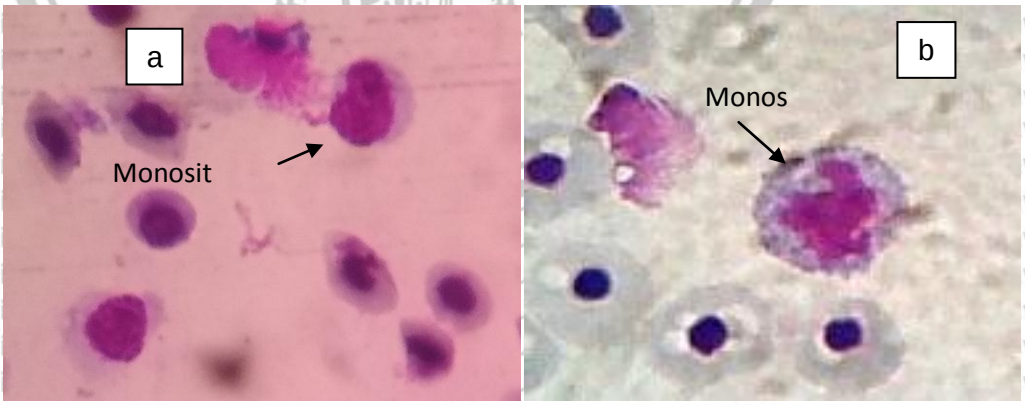
Berdasarkan nilai regresi diffrensial leukosit pemberian dosis ekstrak daun turi sangat berpengaruh pada nilai diffrensial leukosit, dimana rata-rata perlakuan dosis ekstrak meningkatkan jumlah limfosit selama pemeliharaan

sebagai banteng pertama dalam melakukan perlawanan terhadap pengenalan antigen yang masuk kedalam tubuh ikan. Setiawan *et al*. (2012) limfosit sebagai parameter utama dalam melihat tinggi rendahnya nilai diffrensial leukosit dikarenakan limfosit memiliki proporsi terbanyak dibandingkan monosit dan neutrofil yang berfungsi sebagai penyedia zat kebal tubuh.

b. Monosit

Monosit merupakan bagian dari leukosit yang berfungsi dalam kekebalan tubuh, monosit memiliki ukuran sel yang besar, jika dibandingkan dengan neutrofil bahkan eritrosit, bentuk tidak teratur dan padat, berbentuk lipatan seperti lipatan otak, sitoplasma berwarna biru pucat, jumlah sel monosit yang ditemui pada ikan normal berkisar antara 1-21% akan tetapi dapat meingkat hingga 35 % (Lukistyowati *et al*., 2007).

Sel ini melawan infeksi dengan memakan kuman dan memberi sinyal ke sistem kekebalan tubuh mengenai benda asing yang masuk, monosit terdapat dalam sel darah, jika monosit terdapat dalam jaringan disebut sebagai makrofag, dapat dilihat bentuk monosit pada Gambar 13.



Gambar 13. Monosit Perbesaran 400x : a. Monosit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*), b. (Hartika*et al.,*2014)

Berdasarkan hasil pengamatan rata-rata presentasi monosit ikan sebelum infeksi dan setelah infeksi adalah perlakuan 450 ppm sebesar 22,66 % menjadi

30,66 %, pelakuan 300 ppm 21, 33 % - 28,60 %, perlakuan 150 ppm 21,00 % - 25,33 % dan Kontrol (+) 23,33 %- 23,66%, hasil rata-rata presentasi monosit dapat dilihat pada Tabel 8 dan Lampran 9.

Tabel 8. Hasil rata-rata monosit (%) ikan nilai (*Oreochromis niloticus*)

Dosis Ekstrak (ppm)	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
K (-)	24,33 ± 2,08^{c}	34,66 ± 1,15^{a}
450	22,66 ± 0,57^{a}	30,66 ± 1,52^{a}
300	21,33 ± 1,52^{b}	28,60 ± 1,52^{a}
150	21,00 ± 1,00^{b}	25,33 ± 0,57^{a}
K (+)	23,33 ± 0,57^{a}	23,66 ± 1,15

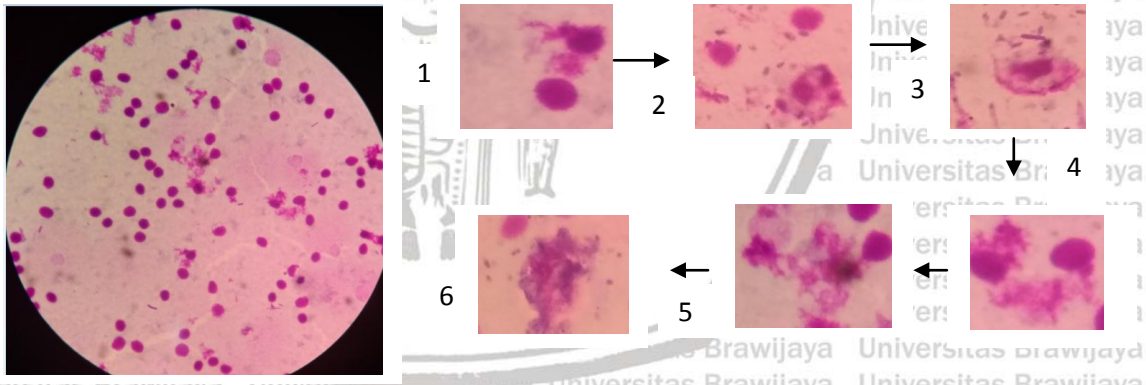
Keterangan : Angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata (p>0,05)

Hasil analisis data dengan menggunakan analisis one way anova didapatkan bahwa sebelum infeksi dan sesudah infeksi *E. tarda* berbeda nyata dengan selang kepercayaan 95% atau P>0,05, dosis ekstrak mempengaruhi jumlah monosit.

Jumlah monosit meningkat disebabkan adanya infeksi bakteri *Edwarsiella tarda* dan neutrofil merupakan pertahanan pertama tidak mampu bertahan lebih lama sehingga fagositosis dilanjutkan oleh monosit (Fujaya, 2004). Hal ini diduga terjadi pengumpulan makrofag di daerah terjadinya infeksi untuk memfagositosis bakteri *E. tarda.* Menurut Lukistyowati *et al*. (2007), jumlah sel monosit yang ditemui pada ikan normal berkisar antara 1-21%, akan tetapi dapat meningkat sekitar 38%, hal ini bisa disebabkan oleh jenis ikan, suhu dan musim (Klontz 1994). meningkatkan presentase monosit ikan nila. Penurunan monosit diduga karena monosit meninggalkan pembuluh darah karena waktu paruh dan masa hidup monosit yang pendek, seperti yang dinyatakan oleh Guyton & Hall (1997), bahwa masa hidup monosit sangat cepat hanya berkisar 10 – 20 jam setelah diproduksi.

5.2.3. Aktivitas Fagositosis

Mekanisme respon imun yang dibentuk oleh tubuh ikan dalam mempertahankan diri dari serangan mikroorganisme patogen adalah melalui proses fagositosis. Peningkatan indeks fagositik pada ikan nila menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun turi tersebut dapat meningkatkan kinerja leukosit dalam memfagosit antigen yang masuk. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan pernyataan Tizard (1982) yang menyatakan bahwa, salah satu upaya dari tubuh ikan untuk mempertahankan diri terhadap serangan patogen adalah dengan menghancurkan patogen tersebut melalui proses fagositik. Proses fagositosis bakteri atau benda asing yang masuk, sel fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau antigen yang masuk. Sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan (Amrullah, 2004), Proses fagositosis dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Aktivitas Fagositosis Darah Ikan Nila : 1. Sel Monosit, 2. Pelekatan, 3. Aktivitas membaran, 4. Fagositosis, 5. Peghancuran, 6. Proses pengeluaran partikel yang tidak tercerna

Fagositosis adalah proses penyerapan dan eleminasi mikroba atau partikel lain oleh sel-sel khusus yang disebut fagosit. Fagosit adalah sel-sel darah putih atau sel-sel yang berasal dari sel-sel darah putih tersebut, yang terdapat di dalam aliran darah. Proses penghancuran bakteri atau kuman,

fagosit dapat keluar dari dinding pembuluh darah menuju bakteri atau antigen yang masuk. Sel fagosit berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan (Amrullah, 2004), Magnadottir (2006) menambahkan sel fagosit memiliki fungsi ganda yaitu sebagai sel pencernaan dan sel defentif yaitu akan menelan organis asing yang masuk dalam tubuh.

Hasil pengamatan aktivitas fagositosis pada perlakuan pemberian ekstrak daun turi (*Sesbania grandiflora*) dengan dosis 450 ppm, 300 ppm dan 150 ppm, menunjukkan aktivitas fagositosis yang lebih tinggi di bandingkan kontrol (-) yang tidak diberi ekstrak daun turi. Hal ini dapat diindikasikan ekstrak daun turi mampu mengenali antigen yang masuk kedalam tubuh ikan. Hasil pengamatan rata-rata aktivitas fagositosis pada Tabel 9 dan Lampiran 10.

Tabel 9. Hasil Aktifitas Fagositosis (%) Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Dosis Ekstrak (ppm)	Sebelum Infeksi	Setelah Infeksi
K (-)	21,39 ± 0,89[a]	20,26 ± 1,00[a]
450	27,48 ± 0,88[c]	34,24 ± 0,99[c]
300	24,47 ± 0,56[b]	29,31 ± 0,90[b]
150	23,55 ± 0,62[b]	28,36 ± 0,93[b]
K (+)	24,26 ± 1.01[b]	27,19 ± 1,06[b]

Keterangan : Angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata (p>0,05)

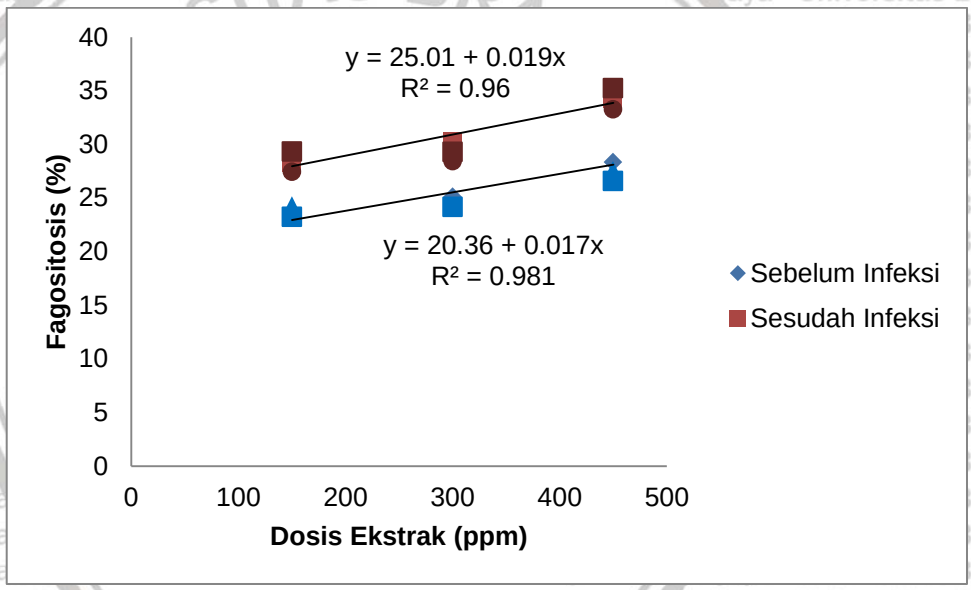
Hasil pengamatan sebelum dan sesudah di uji tantang dengan *E. tarda* memberi hasil indeks aktivitas fagositosis makrofag ikan nila yang berbeda nyata seperti pada Tabel 9.

Hasil pengamatan indeks aktivitas fagositosis (Gambar 14) darah ikan nila dapat dilihat bahwa presentasi setelah di uji tantang mengalami peningkatan ketika belum di uji tantang, rata-rata indeks aktivitas fagositosis tertinggi pada perlakuan dosis 450 ppm yaitu 27,48 % menjadi 34,24 %, selain itu dipengaruhi oleh jumlah leukosit, aktifitas fagositosis dipengaruhi oleh ekstrak daun turi, dan

nilai aktivitas fagositosis terendah terdapat pada kontrol (-) dimana perlakuan ini tidak diberi ekstrak, hal ini diduga aktivitas fagositosis tidak beraktifitas dengan baik, karena ikan hanya mempunyai pertahanan non spesifik bawaan, yang tidak mampu mefagositosis antigen bakteri *E. tarda* dan menyabakan ikan terinfeksi.

Mekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang sistem imun tubuh dengan cara meningkatkan sel-sel fagosit (El.Boshy *et al*., 2014).

Hasil pengamatan pada (Tabel 9) diketahui pemberian ekstrak daun turi memberi pengaruh terhadap meningkatnya aktivitas fagositosis, sehingga dilakukan perhitungan regresi linear untuk mengetahui hubungan antara ekstrak daun turi dan aktifitas fagositosis (Gambar 15)



Gambar 15. Hubungan dosis ekstrak daun turi dengan total aktifitas fagositosis darah ikan nila

Hasil analisis regresi (Gambar 19) sebelum infeksi menunjukan bahwa terdapat hubungan antara pemberian ekstrak daun turi pada aktifitas fagositosis ikan nila dengan persamaan y = 20.36 + 0.017xdan nilai koefisien diterminasi R^2 = 0.981. Berdasarkan persamaan regresi tersebut bahwa terjadinya peningkatan aktivitas fagosiotosis pada ikan nila dipengaruhi oleh ekstrak daun turi sebesar 98 %. Sedangkan pada perlakuan setalah pasca infeksi hubungan antara

pemberian ekstrak daun turi dengan aktivitas fagositosis ikan nila sebesar Y= 25.01 + 0.019x dan R^2 = 0.96, sehingga dapat disimpulakan peningkatan aktivitas fagositosis pada ikan nila dipengaruhi oleh pemberian ekstrak daun turi sebesar 96 %. Peningkatan fagositosis setelah diuji tantang menunjukkan tingginya respon imun pada ikan yang diamati dalam mengenal antigen yang masuk (Handayani *et al*., 2011).

Semakin tinggi jumlah leukosit, maka semakin tinggi pula aktivitas fagositosis. Pemberian ekstrak daun turi dapat meningkatkan aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan tanpa pemberian ekstrak daun turi hal ini menandakan bahwa sistem imun ikan nila sedang merespon terhadap bakteri *E. tarda* yang masuk kedalam tubuh ikan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Purwaningsih *et al*. (2014) yaitu tingginya nilai aktivitas fagositosis mengindikasikan bahwa ekstrak yang diberikan dapat meningkatkan respon imun non spesifik pada ikan yang terinfeksi bakteri atau patogen lainya sehingga dapat merangsang kerja sel fagositosis yang mempunyai fungsi ganda sebagai sel pencernaan dan sel detentif yang menelan organism asing (Marentek *et al*. 2013).

Setelah diinfeksi oleh *E. tarad*, total aktivitas fagositosis semakin meningkat dengan meningkatnya dosis ekstrak yang diberikan. Hal ini diindikasikan bahwa sistem imun ikan sedang merespon adanya dua benda asing yang masuk yaitu dosis ekstrak dan infeksi *E. tarda*. Aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan tanpa pemberian ekstrak diduga sistem imun ikan dalam merespon infeksi bakteri didukung oleh senyawa terpenoid, saponin, tanin yang terkandung dalam ekstrak daun turi yang berperan sebagai imunostimulan. Thilsted *et al*. (1979) ; Meydani *et al*. (1995) dan Bendich (1993) menjelaskan senyawa turunan terpenoid, saponin, tanin yang dapat mendukung fungsi sel B untuk memproduksi imunoglobin darah dalam merespon

imun humoral yang dibantu oleh sel T helper dimana nantinya akan bersirkulasi secara bebas untuk melindungi tubuh terhadap serangan sel asing melalui aktifitas fagositosis. Putri *et al*. (2013) juga menyatakan bahwamekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang sistem imun tubuh adalahdengan cara meningkatkan aktivitas sel-sel fagosit. Selain dipengaruhi oleh jumlahleukosit, aktivitas fagositosis juga dipengaruhi oleh dosis ekstrak,dimana dosis aplikasi pemberianimmunostimulan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi peningkatanrespon imun.

5.2.4. Respon Bahan Aktif Daun Turi Sebagai Imunostimulan

Ikan memiliki perthanan secara inet dan adaptif ketika ada patogen atau antigen yang masuk. Pertahanan secara innate merupakan pertahanan pertama dalam melindungi tubuh dari serangan antigen yang masuk. Dalam respon imun innate terdapat pertahanan yang berupa seluler diantra yang berperan penting adalah darah, darah ikan terdapat dua jenis darah yaitu sel darah merah (Eritrosit) dan sel darah putih (Leukosit), pada seldarah putih terdiri dari sel drah agrnulosit dan granulosit (Jenkins, 2003). Sel darah merupakan mediator dalam mekanisme pertahanan pada ikan, dan sel putih/ WBC (White Blood Cell) merupakan komponen kecil dari pertahanan innate, dimana respon pertahanan tersebut dapat terukur dan dipengaruhi oleh adanya stressor (Adams, 2002 ; Jenkins, 2003) dalam respon adanya stress tersebut mengakibatkan kadar sel darah putih mengalami penurunan yang mengindikasikan terjadinya immunosupresi

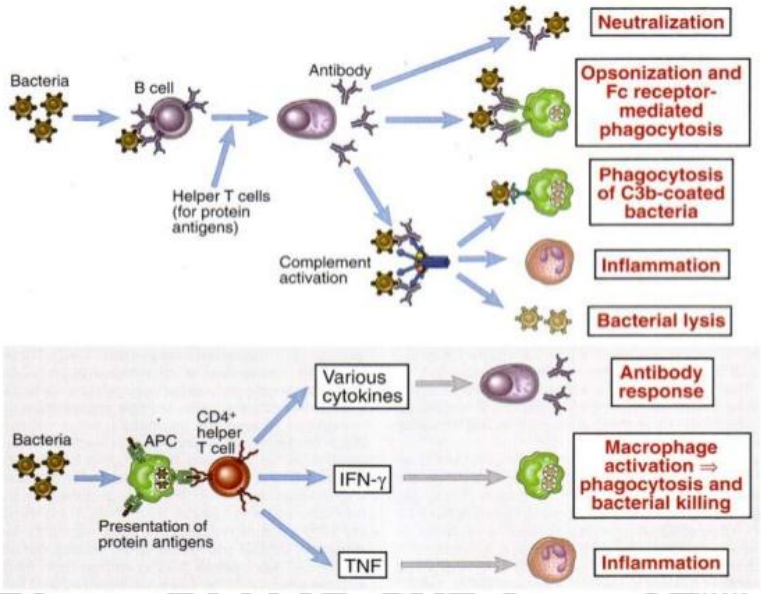
Untuk tahap pertama pembentukan antibody adalah fagositosis antigen, biasanya oleh sel penyaji antigen terutama makrofag ata sel B, yang memproses dan menyajikan antigen kepada sel T. Sel T yang teraktivitas ini kemudian berinteraksi dengan sel B (Jawetz *et al.,* 2001). Cohen (1988) menambahkan

bahwa kerja sistem imun ini bekerja spesifik dan menggunakan memori. Antigen akan mencetuskan seretantan reaksi yang menghasilkan aktivasi limfosit, produksi antibodi dan limfosit efektor yang spesifik untuk imunogen. Pada pertahanan spesifikini, antigen mula-mula di tangkap oleh APC dan dipresentasikan oleh sel T. pada waktu yang bersamaan sel APC melepas IL-1 yang mengaktifkan sel T. Sel T yang diaktifkan melepas berbagai interluikin.

Dalam respon terhadap kebanyakan antigen (kecuali antigen selT independen) antigen perlu diproses dahulu oleh sel APC. Hal ini sebabkan oleh kerena sel T yang merupakan regulator dari respons imun, hanya mengenal antigen melalui molekul MHC kelas II (MHC restricted). Sel-sel yang memiliki permukaan MHC kelas II dan berfungsi sebagai APC adalah makrofag, sel dendritik, sel langerhans dikulit, sel kupffer di hati, sel microglia disusunan saraf pusat, sel B dan sekitar 1 % dari semua sel monosit perifer.

Sebagai legulator respons imun, sel Th mengaktifkan limfosit lainnya dari sistem imun seperti sel B, sel Te dan sel Tdh. Aktivasi sel Th tersebut lain memerlukan 2 signal, yang pertama beral dari ikatan antra reseptor antigen pada permukaan untuk limfosit sel T dengan kompleks antigen MHC kelas II pada sel APC dan yang kedua berasal dari interleukin-1 (protein larut yang diproduksi sel APC). Kedua signal bersama-sama akan meningkatkan reseptor/ekspresi permukaan untuk limfosit lain, IL-2 serta produksi faktor pertumbuhan dan diferensial (*growth and differentiation factor*) antara lain untuk sel B dan makrofag. IL-2 meningkatkan pertumbuhan sel yang memiliki ekspresi IL-2 (reseprot untuk IL-2) termasuk sel Th sendiri (efek autokrin) dan sel Tc. Jadi

fungsi utama dari IL-2 ialah meningkatkan respon imun.



Gambar 16. Diagram skema interaksi respon imun spesifik (Jawetz *et al*., 2001)

Senyawa terpenoiddan turuanannya merupakan salah satu antibakteri yang bekerja dengan menganggu fungsi membran sitoplasma. Adanya senyawa terpenoid ini menyebabkan keruskan pada membaran sitoplasma.

Dijelaskan oleh Pelczar *et al.,* (1998) bahwa senyawa terpenoid sebagai antibakteri menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri dengan cara merusak membrane sitoplasma dan mendenaturasi protein sel. Golongan utama yang mempunyai sifat antibakteri adalah fenol, alcohol, alkaloid, halogen. Senyawa terpenoid dapat berinteraksi dengan komponen dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan dapat juga berdifusi kedalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan sel bakteri terhambat atau mati, selain itu juga senyawa ini juga mampu menembus membrane yang berinteraksi dengan material genetik mengakibatkan bakteri mengalami mutasi (Trisnawati dan Susanto, 2003) menambahkan,sifat daya hambat senyawa terpenoid terhadap mikroba disebabkan karena gugus hidroksil yang dimilikinya

dapat berinteraksi dengan protein membrane sel mikroba melalui ikatan hydrogen, sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya.

6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

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

1. Berdasarkan karakteristik dan identifikasi senyawa daun turi menggunakan analisis GC-MS fraksi n-heksan hasil corong pisah mengandung Hexadeconoic acid, n-Hexadeconoic acid, 2,6,10-Trimethyl-14-Ethylene-14-Pentadecne dan 2-Hexadecen-3,7,11,15-Tretramethyl yaitu $C_{20}H_{38}$, $C_{20}H_{40}O$, $C_{20}H_{42}$, termasuk turunan senyawa terpenoid jenis diterpenoid karena memiliki 4 molekul isoperana C_5 ($C_{20}H_{38}$).
2. Ekstrak etanol dan fraksi n-heksan daun turi (*Sesbania grandiflora*) berpotensi sebagai antibakteri dengan konsetrasi 75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm, dimana semakin meningkatnya dosis zona hambat yang terbentuk semakin besar
3. Pemberian Ekstrak daun turi *(Sesabnia grandiflora*) dengan pelarut etanol berpengaruh terhadap peningkatan respon imun non spesifik, dimana jumalah leuksot, diferensial leukosit dan aktifitas fagositosis meningkat pada ikan nila *(Oreochromis niloticus*) yang di uji tantang dengan bakteri *Edwardsiella tarda*, dengan dosis ekstrak terbaik yaitu 300 ppm jumlah leukosit, limfosit, monosit dan aktifitas fagositosis mengalami peningkatan yang merata.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka disarankan perlu adanya untuk pemberian fraksi 125 ppm, 100 ppm dan 75 ppm daun turi sebagai antibakteri terhadap jenis ikan yang diuji tantang dengan patogen ,sehingga dapat diketahui kerja antibakteri lebih baik dan perlu dilakukan uji lanjutan pada fraksi daun turi

(*Sesabania grandiflora*) agar di peroleh hasil karakteristik struktur molekul yang lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

Abba, A. K., Lichmant, A. H. 2015. *Cytokines in*: *Cellular and molecular immunology*.5th. Ed. Philadelpia: W. B. Saunders Company.

Abdul, R. (2007). Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Afrianto, E., Liviawaty, E., Jamaris, Z., Hendi. 2015. Buku Penyakit Ikan Jakrta. Hal. 70

Alifuddin, M. 2002.Imunostimulan Pada Hewan Akuatik.*Jurnal Akuakultur Indonesia*.1(2):87-92

Ali, R. B., I. J. Atangwho, Navneet K., O. S. Abraika, M. Ahmad, R. Mahmud dan M. Z. Asmawi, 2012, Bioassay Guided Antidiabetic Study of *Phaleria macr ocarpa* Fruit Extract, *Molecules*, (*17*) : 4986-5002

Alam G. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) sebagai bioassay dalam isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam. Majalah Farmasi dan Farmakologi. 2002; 6(2):432-6.

Alamanda, I.E., N.S. Handajani dan A.Budihardjo 2007. *Pengunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah untuk Penetapan Kesehatan Ikan Leke Dumbo (Clarias gariepinus) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali*. Biodiversitas 8 (1): 34-38.

Astriani. 2011. Ujiaktifitas Antimikroba Ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) Secara KLT-Bioautografi. Skripsi.

Amzu, E dan Hariyanto. 1990. *Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat di Indonesia*. Seminar Nasional Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat. Bogor.

Anderson D P. 2004. *Immunostimulants, Vaccines, and Environmental Stressors in Aquaculture: NBT Assays to show Neutrophil Activity by these Immunomodulators*. Avances en Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, Méxic

Anderson, D.P. 1992. *Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture*. Annual Review of Fish Diseases 21, 281-307.

Anderson, D.P. S.F. Snieszko & H.R. Axelrod (eds.).1974. *Immunology of fish diseases*. Book 4. Diseases of Fishes. T.F.H. Publication. Neptune, N.J.

Anantaworasakul, P., Klayraung, S.,Okonogi, S. 2011. Antibacterial activities *of Sesbania grandiflora* extracts. Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University. Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand. Drug Discoveries & Therapeutics. 2011; 5(1):12-17. DOI: 10.5582/ddt.v5.1.12

Arun A., Karthikeyan P., Sagadevan P., Umamaheswari R., 2014, Phytochemical Screening of Sesbania grandiflora (Linn), International Journal Bioscience Nanoscience, 1:33–36.

Arief, H. 2006. *Tumbuhan obat dan khasiatnya*. Penebar Swadaya : Jakarta Hlm 73-74.

Arora S, Meena S .GC-MS Profiling of *Ceropegia bulbosa* Roxb. var. *bulbosa*, an endangered plant from Thar Desert, Rajasthan. The Pharma Innovation Journal 2017. ISSN (E): 2277- 7695

Arora S, Meena S. Qualitative premilinary phytochemical screening and GC-MS analysis of root of S*arcostemma viminale* (L.) R. Br., an endangered plant. International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science. 2016; 5(2):89-100.

Aziz, S., 2010, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Umbi Bakung Putih (Crinum aiaticum L.) terhadap bakteri penyebab jerawat, UIN, Jakarta.

Bijanti R., 2005 *Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan*. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hlm 195.

Bloomfield, S.F., 1991, *Assessing Antimicrobial Activity*, Di dalam: Denyer, S.P and Hugo, W.B., Editor: Mechanism of Action of Chemical Biocides, Oxford: Blackwell Scientific Publication, Hlm. 1-22.

Cushnie, T. P. & Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids, International Journal of Antimicrobial Agents, 26 : 343–356.

China R., Sayani M., Suradip S., Sreedipa B., Sanjukta D., Hemanta K., Santinath G., Pubali D., 2012, Antimicrobial activity of Sesbania grandiflora flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism Lactobacillus acidophilus, Microbiological Research, 167 (8) : 500–506.

Dang, C.W., Y. Wang, K.P. Chen, Q. Yao, D.B. Zhang and M. Guo, 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor family in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. J. Insect Sci., ISBN .11. 10.1673/031.011.8401

Dass, C .2007. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc. pp. 151 194. doi:10.1002/9780470118498.ch5. ISBN 9780470118498.

Direktorat Jenderal Pengawas Obatdan Makanan Farmakop Indonesia. Edisi III. Depertemen Kesehatan RI. Jakarta. 1979

Direktorat Jenderal Pengawas Obatdan Makanan Farmakop Indonesia. Edisi IV. Depertemen Kesehatan RI. Jakarta. 1995

Dwinanti, S.H., Sukenda., Yuhana, M., Lusiastuti, A.M., 2016. Toksisitas Dan Imunogenisitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* Tipe Non Hemolitik Pada Ikan Nila *(Oreochromis niloticus*). Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia, 2(1) : 105-116. ISSN : 2303-2960

Dwijoseputro, D. 2003. *Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Jembatan*. Jakarta.

Dzulkarnain B, Dian S, Au C. 1996. Tanaman Obat Bersifat Antibakteri di Indonesia *Cermin Dunia Kedokteran* . 110 : 34-47.

Erawati, C. I., Marsoedi. (2004). Pengaruh pemberian Perasan Kasar Daun pepaya (*Carica papaya*) dengan Dosis Yang Berbeda terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Penelitian Perikanan, 7*(2). ISBN 979-420-574-5

Estuningtyas A, Arif A, Setiabudy R. 2007. *Farmatologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Jakarta. UI.

Ellis, A. E., 2001. Innete Host Defence mechanism of fish against viruses and bacteria. Journal of Developmental Comp. Immunology (25): 827-839.

Forssten S.D., Björklund M., Ouwehand A.C., 2010, Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models, 290–298.

Fakhrudin, N., P. S. Putri, Sutomo dan Wahyuono, 2013, Antiinflamatory Activity OfMethanolic Extract Of *Mangifera Casturi* In Thioglycollate-Induced LeukocyteMigration On Mice, *Trad. Med. J*, 18 (3) : 151-156.

Gandhi, A. D., Vizhi, D.K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Rajeswari, V. D., Babujanarthana, B. 2017. In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of Sesbania grandiflora extract against Staphylococcus aureus. Biochemistry and Biophysics Reports 12 (2017) 193–197

Gustiana., Rantetondok, A., Zainuddin, E. N., 2015. Efektivitas Ekstrak Biji JIntan Hitam (*Nigella sativa* Linn.) Terhadap Infeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Linn.). Torani (Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan) Vol.25 (1) : 26-31. ISSN: 0853-4489

Hardi EH. 2011. Kandidat Vaksin Potensial *Streptococcus agalactiae* untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis Pada Ikan Nila *Oreochromis niloticus* [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Hardi, E. H., C.A Pebrianto dan G. Saptiani. 2014. *Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri Pseudomonas sp. pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus)*. *Jurnal Veteriner*. **15**(3) : 312-322.

Hartika, R.Mustahal. Putra, A P. 2014.Gambaran Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dengan Penambahan Dosis Prebiotik yang Berbeda dalam Pakan. Jurnal Perikanan dan Kelautan. Vol. 4 No. 4 : 259-267.

Hanani, E, 2014, Analisis Fitokima, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta

Hastuti, S. D. 2013. Aplikasi Antigen Bakteri *Streptococcus agalactiae Sebagai Kandidat Vaksin untuk Pencegahan* Streptococcosis *Pada Ikan Nila* (*Oreochromis* sp). Jurnal Gamma. ISSN 2086-3071

Harikrishnan, R., C. Balasundaram, M.S. Heo, 2010. Herbal supplementation diest on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydophilla*. Fish & Shellfish Immunology 28.P.354-361.

Haniffa, M. A., & Kavitha, K. (2012). Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila. Journal of Agricultural Technology, 8*(1): 205-211.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Nonmotile (or rarely motile), Gramnegative curved bacteria. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn, pp. 65 69.

Irianto. 2005. Buku Patologi Ikan Teleostei. Universitas Gadjah Mada Press. Anggota IKAPI. ISBN 979-420-574-5

Ismawati, F.,Rurini,R., Sutrisno., Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera* casturi Kosterm) Dengan Pelarut n-Butanol Kimia Student Journa, Vol.1, No. 1, pp. 785 - 790, Universitas Brawijaya Malang Received 21 April 2015, Accepted 22 April 2015, Published online 24 April 2015

Jacob,C., Kirsch, G., Slusarenko, A., Winyard, P. G., Burkholz, T. 2014. eds. 014. Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products. Springer Netherlands. pp. 31-94. Doi: 10,1007/978-94-017-89530 3. ISBN 9789401789522

James J.2017. "Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry". The Clinical Biochemist Reviews. 30 (1): 19–34. ISSN 0159-8090. PMC 2643089 .PMID 19224008.

Jain I., Bist D., Sharma A., Srivastava B., Grupta N., 2015, Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria-*Streptococcus mutans*, *Brazilian Dental Journal*, 26 (2), 110–115.

Jiao, C. J.; Xu, Q. L.; Wang, C. Y.; Li, F. M.; Li, Z. X.; Wang, Y. F., 2006. Accumulation pattern of toxin β-ODAP during lifespan and effect of nutrient elements on β-ODAP content in Lathyrus sativus seedlings. J. Agric. Sci., 144 (3): 543-549

Kresno, S.B. 2001. Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi Ketiga. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. 437 hlm.

Krishnarajua, A.V., Tayi V. N. Rao, T.Y.N., Sundararaju, D., Vanisree,V., Tsay, H.S., Subbaraju, G.V. 2005. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay†. International Journal of Applied Science and Engineering. 3, 2: 125-134

Latitha MK. 2004. *Manual On Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vellore: Depertement Of Microbiologi Christian Medical College.

Liana, I. 2010. Aktivitas Antimikroba Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Senggani (Melastoma candidum D. Don) terhadap Staphylococcus aureus dan Salmonella typhimurium serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Teraktif. Skripsi Jurusan Biologi FMIPA UNS. Surakarta.

Lili, D., Imran, G., Fachruddin. 2011. Skrining Bioaktivitas Ekstrak Kulit Akar Bakau Merah (*Rhizophora apiculata* bl.) Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Streptococcus sp*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Haluoleo *J. Prog.Kim. Si. 2011, 1 (2) :* 73-82

Lukmandaru, G., K. Vembrianto dan A. A. Gazidy, 2012, Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kayu *Mangifera indica L., Mangifera foetida lour*, dan *Mangiferaodorata griff*, *Jurnal Ilmu Kehutanan*, 6 (1): 5-12

Mehana Elsayed E., Arshad H. Rahmani and Salah Mesalhy Aly. 2015 Immunostimulants and Fish Culture: An Overview. Sciencedomain *international. Annual Research & Review in Biology 5(6): 477-489*

Mones, R. A. 2008. *Gambaran Darah pada Ikan Mas (Cyprinus carpio) Strain Majalaya yang Berasal dari Daerah Ciampea*. Skripsi. IPB. Bogor.

Marselia, S.,Wibowo, M.A., Arreneuz, Z. 2015. Aktivitas Antibakter Ekstrak Daun Soma (*Ploiarium alternifolium* Melch) Terhadap *Propionibacterium acnes.* ISSN 2303-1077. JKK, Tahun 2015, Volume 4(4): 72-82

Mallik, Arunabha and Nayak, Satish., 2015, study the Immunomodulatory Effects of Combined Extract of Sesbaia grandiflora Flowers and Cocculus hirsutus Leaves on the Circulating Antibody Response, American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 199-208.

Makalalag, A. K., Sangi, M., Kumaunang, M., 2011. Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Dari Daun Turi (*Sesbania grandiflora* Pers). Korespondensi dialamatkan kepada yang bersangkutan: Balai Riset dan Standarisasi Industri, Manado

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.

Mudjiman, A. 2001. Makanan Ikan. Cetakan IX. Penebar Swadaya. Jakarta.

Musallamah, Aunorohim dan Abdulgani N. 2010. Pengaruh Paparan Timbal (Pb) terhadap Perubahan Histopatologi Hepatopankreas Udang Galah (Macrobrachium rosenbegii De Mann). [Skripsi]. ITS. Surabaya.

Mogi, B. C., Harjanti, R.,Samsumaharto, R. A..2016.Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n-heksana, Etil Asetat, dan Air dari Daun Turi (Sesbania grandiflora Pers) terhadap Bakteri Shigella dysenteriae ATCC 9361. BIOMEDIKA. ISSN : 1979 - 035X (printed edition). ISSN : 2302 - 1306 (electronic/Portal e-Journal).

Mustikasari, K. dan D. Ariyani, 2007, Skrining Metabolit Sekunder Pada Akar Binjai*(mangifera caesia)* dan Kasturi *(mangifera casturi),* Laporan Penelitian Doosen,FMIPA Universtas Lambung Mangkurrat, Banjarbaru.

Narwiyani, S. dan Kurniasih. 2011. Perbandingan Patogenesitas, *Edwardsiella tarda* Pada Ikan Mas Koki (*Charassius auratus*) dan Ikan Celebes Rainbow (*Telmatherina celebensis*). Jurnal J. Ris. Akuakultur. 6(2): 291 – 301.

Nucci, C., Silveira, W.D., Correa, S.S., Nakazato, G., Bando, S.Y., Ribeiro, M.A. dan Castro, A.F.P. 2002. Microbiological Comparative Study of Isolates of *Edwardsiella tarda* Isolated in Different Countries from Fish and Human. *Veterinary Microb.*, 89: 29−39.

Ouattara, M.B.,Konaté, K.,Kiendrébéogo, M.,Ouattara, N.,Compaore, M., Meda, R.,Rasolodimby, J.M., Nacoulma, O.G. 2011. Antibacterial Potential and Antioxidant Activity of Polyphenols of *Sesbania grandiflora.* Laboratoire de Biochimie et Chimie Appliquées. Current Research Journal of Biological Sciences 3(4): 351-356, ISSN: 2041-0778.

Padmalochana K dan Rajan DMS. 2014. Antimicrobial activity of aqueous, ethanol and acetone extracts of *Sesbania grandiflora* leaves and its phytochemical characterization. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* 5:957-962.

Park S. B., Aoki T., Jung T. S. (2012). Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. Vet. Res. 43:67. 10.1186/1297-9716-43-67

Pasaribu, S.P., Nuriah, W., Erwin. 2013. Uji toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Berbagai fraksi Ekstrak Daun Tanaman Kamboja (*Plumeria acuminate* Ait). Jurnal Kimia Mulawarman Vol. 10 No. 2 : 94-99

Prasititi, L. A. Sarjito. Prayitro, B.S. 2015. Pengaruh Penambahan Estrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) Pada Media Pemeliharaan Terhadap Kelulushidupan Dan Pertumbuhan Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) Yang Di Infeksi Bakteri *Edwardsiella tarda.* Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.*Volume 4, Nomor 3, Tahun 2015, Halaman 31-37 Online di http://ejournal s1.undip.ac.id/index.php/jamt*.

Purwaningsih, I. 2013. Identifikasi Ektoparasit Protozoa pada Benih Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) di Unit Kerja Budidaya Air Tawar (UKBAT) Cangkringan Sleman DIY. [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Sunan Kalijaga. Yogyakarta.

Putra I, Setiyanto DD, Wahyuningrum D. 2011. Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Ikan *Oreochromis niloticus* Dalam Sistem Resirkulasi. Jurnal Perikanan dan Kelautan 16(1) : 1-6

Radji, M. 2015. Imunologi dan Virologi : Edisi Revisi. Isfi Penerbitan. Jakarta. 354 hal.

Rauta Pradipta R., Bismita Nayak, Surajit Das,. 2012. *Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms*. elsevier. Immunology Letters 148 : 23–33

Sangi, M., Runtuwene, M.R.J., Simbala, H.E.I. & Makang, V.M.A. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. Chemistry Progress. 1: 47-53.

Syukur, C., dan Hernani. 2001. *Budidaya Tanaman Obat Komersial*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Sangeetha A., Sriram P.G., Subramanian S., 2014, Antihyperglycemic and Antioxidant Potentials of *Sesbania grandiflora* Leaves Studies in STZ Induced Experimental Diabetic Rats, *International Journal Pharmacy Reserch*, 5 : 2266–2275.

Saifuddin A, Rahayu, Yuda Hilwan. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Graha Ilmu. Yogyakarta. hal. 1-22.

Sachi, B., A. Patil, P. Kandangire, S. Gite, D. Shinde dan P. Wakte, 2012, ActivityGuided Isolation Of Antioxidant Compound From Leaves Of *Mangifera Indica,International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, Vol 4, (4):1-22

Sahayaraj, A. Amaladasan. Gowri. Dharmalingam. Prabha, L. Rajendran. Gas Chromatography – Mass Spectrometry Analysis of Different Solvent Crude Extracts from the Coastal region of *Wedelia biflora.*L. *International Research Journal of Biological Sciences.* 2015. ISSN 2278-3202

Sermakkani M, Thangapandian V. GC-MS analysis of Cassia italic leaf methanol extract. Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research. 2012; 5(2):90-94.

Scallan,E.,Griffin,P.M.,Angulo, F. J., Tauxe, R.V., Hoekstra, R. M. 2011. Foodborneillness acquired in United States- unspecified agents. Emerging Infections Diseases 17(1):16-22

Shinde, S. S, dan A. R. Chavan, 2014, Isolation of Mangiferin from DifferentVarieties of *Mangifera Indica* Dried Leaves, *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 5, pp. 928-934.

Simanjuntak, A.P. dan Pramana, R., 2013, Pengontrolan Suhu Air Pada Kolam Pendederan dan Pembenihan Ikan Nila Berbasis Arduino, Universitas Maritim Raja Ali Haji, Tanjungpinang.

Sutomo, S. Wahyuono, S. Rianto, and E.P Setyowati, 2013, Isolation and Identification of Active Compound of n-hexane Fraction from Kasturi (Mangiferacasturi Konsterm.) against Antioxidant and Immunomodulatory Activity, *J. Biol. Sci*.,13 (7) : 596-604.

Sustri L., N. Aryani, I. Lukistyowati. 2011. Sensitivitas Larutan Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Edwardsiella tarda. http://repository.unri.ac.id.pdf*. Diakses pada hari Sabtu, 7 April 2018, pukul 20.00 WITA.

Suhermanto Achmad, and Maftuch Andayani, Sri. 2011. "Pemberian Total Fenol Teripang Pasir (Holothuria Scabra) Untuk Meningkatkan Leukosit Dan Diferensial Leukosit Ikan Mas (Cyprinus Carpio) Yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas Hydrophila." Jurnal Kelautan 4 (2): 150–257.

Sugiarto. 1988. Tekhnik Pembenihan Ikan Mujair dan Nila. CV. Simplex. Bogor. 74 hal

Tobo, F., Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I. Laboratorium Fitikimia. Jurusan Farmasi. Fakultas MIPA. Universitas Hasanuddin. Makasar. 2001

Taek, T. 2009. Aktifitas Antibakteri beberapa Tanaman Darat terhadap Bakteri *Aeromonas hydropilla* dan *Vibrio harveyi* secara In Vitro. Universitas Nusa Cendana. Kupang

Tamat,SR., Wikanta, T.,Lina, S., Maulina.2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. ISSN 1693-1831.Vol. 5 No.1

Utami, D.T., S.B. Prayitno, S. Hastuti dan A. Santika. 2013. *Gambaran Parameter Hematologis pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus) yang*

Diberi Vaksin DNA Streptococcus iniae Dengan Dosis yang Berbeda. Journal of Aquaculsture Management and Technology. Vol 2 (4): 7-20.

Vipin K, Arun GK, Rajesh G. 2011. Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *International research journal of pharmacy* 2:85-87. ISSN 2230-8407

Varadarajan P, Rathinaswamy G, Rangasamy D, Asirvatahm D. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of *Rheo discolor*.Ethnobotanical Leaflets. 2008; 12(1):841-845.

Wei, L. S., Musa, N., Seng, C. T., Shazili, N. A. M., Wee, W., Musa, N., & Wahid, M. E. A. (2011). Antibiogram and plasmid profiling from Edwardsiella tarda isolated from freshwater fish in east coast Malaysia. Journal of Sustainability Science and Management, 6(1), 19–27.

Wijayanti, T. R. A. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Turi Terhadap Juml ah Makrofag pada Mencit Nifas yang Diinfeksi *Streptococcus agalactiae. Jurnal Kesehtan Hesti Wira Sakti,* Volume 5, Nomor 1, April 2017. Hlm. 56 – 59

Widyawati, P. S., H. Wijaya, P. S. Harjosworo dan D. Sajuthi, 2010, Pengaruh Ekstraksi Dan Fraksinasi Terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas Dpph(1,1-Difenil-2- Pikrilhidrazil) Ekstrak Dan Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea IndicaLess*), Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses, Universitas Diponegoro, semarang.

Xiao J, Qin Liu Q, Wang X, Liu H, Zhang Y. Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. Aquacult Res. 2009;40:13–17.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Universitas Brawijaya