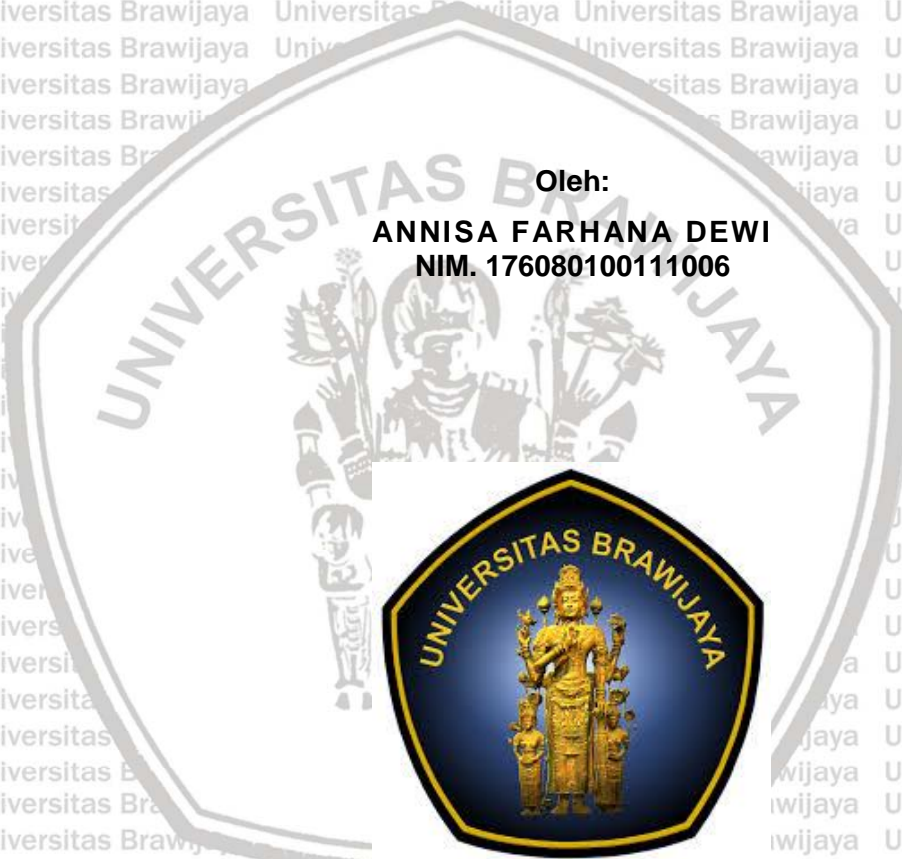


**ANALISIS PENGGUNAAN EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major* Linn.) TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**TESIS**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MAGISTER PASCASARJANA**

Oleh:  
**ANNISA FARHANA DEWI**  
**NIM. 176080100111006**



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



**ANALISIS PENGGUNAAN EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major* Linn.) TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

TESIS

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MAGISTER PASCASARJANA

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Magister Perikanan  
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya

Oleh:

ANNISA FARHANA DEWI  
NIM. 176080100111006



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019





**JUDUL TESIS:**

**ANALISIS PENGGUNAAN EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major* Linn.) TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**Nama Mahasiswa : Annisa Farhana Dewi**

**NIM : 176080100111006**

**Program Studi : Budidaya Perairan**

**Minat Ilmu Studi : Penyakit dan Kesehatan Ikan**

**KOMISI PEMBIMBING**

**Ketua : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS**

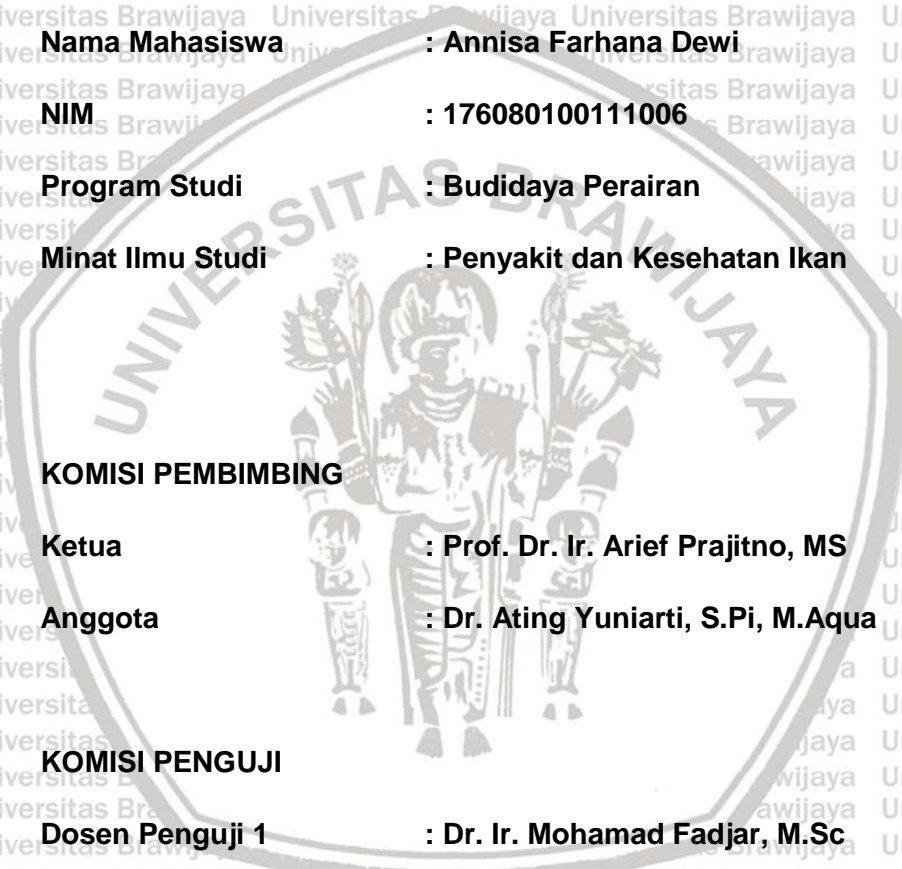
**Anggota : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua**

**KOMISI PENGUJI**

**Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**

**Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Maftuch, M.Si**

**Tanggal Pengujian : Senin, 24 Juni 2019**





## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah tesis yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri, dengan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat kar j 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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa naskah tesis ini terdapat unsur penjiplakan, maka saya bersedia diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Mei 2019

Mahasiswa



## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Annisa Farhana Dewi (penulis) lahir di Jember pada tanggal 22 Oktober 1994 dari pasangan suami – istri Ir. Koko Eko Harjono, M.Si dan Ahdiyar Dharmawati S.Psi. Penulis menempuh pendidikan TK pertama di TK Aisyah 74 Jakarta Selatan dan melanjutkan pendidikan dasar di MIN (Madrasah Ibtidaiyah Negri) 15 Bintaro, Jakarta Selatan selama 6 tahun

sejak tahun 2000 – 2006. Pendidikan Menengah Pertama ditempuh oleh penulis di SMP Negri 29 Kebayoran Baru, Jakarta Selatan pada tahun 2006 – 2009. Kemudian Penulis melanjutkan Pendidikan Menengah Atas di SMA Negri 86 Bintaro, Jakarta Selatan selama 3 tahun dari tahun 2009 – 2012.

Pada Tahun 2012, penulis melanjutkan pendidikan di perguruan tinggi, khususnya Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya jurusan Budidaya Perairan. Penulis menempuh pendidikan S1 selama 3,8 tahun hingga tahun 2016. Setelah mendapat gelar S.Pi, penulis melanjutkan pendidikan strata (S2) Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Akhir dari penyelesaian pendidikan S2 penulis membuat karya ilmiah dengan judul “Analisis Penggunaan Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major* Linn.) Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*”.



**UCAPAN TERIMAKASIH**

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tesis dengan baik dan tepat pada waktunya. Penulis juga ingin mengucapkan terimakasih kepada:

- 1) Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku Ketua promotor yang telah membimbing dan memberikan motivasi sejak penulisan proposal, penelitian hingga akhir penulisan laporan;
- 2) Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua selaku promotor yang telah senantiasa sabar dalam memberikan arahan dan bimbingan serta motivasi selama penelitian hingga akhir penulisan;
- 3) Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc dan Dr. Ir. Maftuch, M.Si selaku dosen penguji atas masukan dan arahnya.
- 4) Ayahanda Ir. Koko E. Harjono, M.Si dan Ibunda Ahdiyar Dharmawati, S.Psi dan seluruh keluarga yang selalu mendoakan tulus tanpa batas serta memberikan segala dukungan motivasi dan kekuatan hingga akhir penulisan;
- 5) Wahyu Kurniallah, M.Si, Maulana Abdurrahman S.Kel, Sitti Khairul Bariyyah, S.Pi, Cucun dan Wafi selaku teman yang selalu memberikan pertolongan saat penelitian, penulisan laporan serta memberikan motivasi dan doa.
- 6) Laboran Lab Parasit dan Kesehatan Ikan, Laboran Lab Budidaya Ikan, Laboran Lab Eksplorasi Suberdaya Perikanan dan kelautan yang senantiasa membantu baik memberikan ilmu, doa dan motivasi.
- 7) Rekan – rekan program Magister Budidaya perairan yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas dukungan dan doanya.

Serta pihak – pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per – satu. Semoga Allah SWT memberikan Rahmat serta Kurnia-Nya kepada kita semua dalam melaksanakan pengabdian untuk bangsa Indonesia ini.

Malang, Mei 2019

Penulis,

Annisa Farhana Dewi  
176080100111006.

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa ta'ala atas karunia serta rahmat yang dianugerahkan kepada penulis, sehingga proposal tesis dengan judul 'ANALISIS PENGGUNAAN EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major* Linn.) TERHADAP PROFIL HEMATOLOGI DAN HISTOPATOLOGI GINJAL IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG TERDIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*' dapat terselesaikan. Penulisan naskah tesis ini masih memiliki banyak kekurangan, sehingga sangat diharapkan kritik dan saran. Harapannya, penulisan naskah tesis ini dapat dimanfaatkan oleh berbagai pihak sebagai sumber informasi baru serta kajian ilmu. Penyelesaian proposal tesis ini ditujukan untuk memperoleh gelar Magister (S2) pada Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis



## RINGKASAN

**Annisa Farhana Dewi (176080100011006).** Analisis Penggunaan Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major* Linn.) Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS** dan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua.**

Konsumsi ikan di Indonesia mengalami peningkatan bersamaan dengan meningkatnya hasil produksi perikanan di Indonesia. Salah satu komoditas perikanan budidaya yang memiliki nilai ekonomis unggul seperti ikan mas (*C. carpio*) memiliki target produksi 785,800 pada tahun 2019. Peningkatan konsumsi serta target produksi ikan mas (*C. carpio*) yang diiringi dengan keterbatasan lahan dan tingginya aktifitas yang bersifat global menyebabkan lahirnya budidaya intensif yang akan memicu timbulnya penyakit seperti penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*). Penyakit MAS disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Munculnya penyakit ini dapat menyebabkan tingkat kematian pada ikan lebih dari 80%. Pengobatan yang selama ini telah dilakukan adalah dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan bakteri resisten dan meninggalkan residu pada lingkungan.

Pengobatan dengan antibiotik ini dapat disubstitusikan dengan menggunakan bahan alami seperti daun sendok (*P. major* L.) yang merupakan salah satu rumput liar yang memiliki kandungan senyawa antibakteri seperti flavonoid, fenol, tannin dan saponin. Kandungan antibakteri tersebut secara umum mampu mengganggu membran permeabilitas sel bakteri dan menyebabkan lisisnya bakteri sehingga diduga mampu mengobati ikan mas (*C. carpio*) dari infeksi bakteri *A. hydrophila*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis jenis senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibakteri pada daun sendok (*P. major* L.) serta menganalisis hematologi dan ginjal ikan setelah diberi penambahan daun sendok dari infeksi bakteri *A. hydrophila*.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 – Maret 2019 di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) dan terbagi menjadi 2 tahapan yaitu: (1) Ekstraksi daun sendok (*P. major* L.), Uji aktivitas antibakteri *A. hydrophila* (yaitu uji *Co-culture* dan cakram) dan karakterisasi senyawa antibakteri pada daun sendok (*P. major* L.) dengan uji fitokimia, FTIR dan UV-VIS; (2) Uji patogenitas bakteri *A. hydrophila*, uji toksisitas ekstrak daun sendok (*P. major* L.) dan pengaplikasian ekstrak daun sendok (*P. major* L.) yang bersifat antibakteri pada ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi *A. hydrophila* pada skala laboratorium. Pemeliharaan dilakukan selama 7 hari. Kemudian dilakukan pengamatan hematologi yang terdiri dari eritrosit, hemoglobin, hematokrit, leukosit, differensial leukosit (limfosit, neutrofil, monosit), pengamatan histopatologi ginjal, pengamatan gejala klinis, kelulushidupan, dan kualitas air.

Hasil dari penelitian tahap I diperoleh rendemen terbanyak dari ekstraksi menggunakan pelarut etanol. Kemudian hasil uji *co-culture* menunjukkan pelarut etanol memiliki nilai MBC lebih rendah dibandingkan dengan pelarut etil asetat, dimana pada dosis 100 ppm terjadi penurunan koloni bakteri. Hasil *co-culture* ini digunakan sebagai acuan penentuan dosis pada cakram yaitu 100,200,300,400 dan 500 ppm. Hasil uji cakram berturut – turut dari dosis terendah yaitu 8,30;



9,9;11,10; 12,11 dan 14 mm sedangkan perlakuan K(+) dengan menggunakan kloramfenikol diperoleh zona hambat sebesar 20,95 mm. Kemudian perlakuan K(-) dengan menggunakan DMSO tidak memberikan zona hambat pada pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) pada uji fitokimia diketahui mengandung senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Kemudian hasil uji FTIR dan UV-VIS memperkuat hasil fitokimia dimana pada panjang gelombang tertentu mengindikasikan gugus fungsi fenol, flavonoid dan tanin.

Hasil penelitian tahap II pada hematologi darah ikan mas (*C. carpio*) pasca perlakuan menunjukkan terjadinya pemulihan dari kondisi stress infeksi bakteri. Hasil uji anova menunjukkan ekstrak daun sendok berpengaruh pada hematologi ( $P < 0,05$ ) dengan dosis terbaik pada perlakuan D (300 ppm). Sedangkan histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* menunjukkan terjadinya beberapa kerusakan seperti nekrosis, hemoragik dan melanomakrofag yang meningkat. Setelah pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) terjadi pengurangan kerusakan dengan signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan dosis terbaik pada perlakuan D (300 ppm).

Perlu adanya penelitian lebih lanjut ekstrak daun sendok (*P. major L.*) sebagai imunostimulan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan mas (*C. carpio*) terhadap invasi bakteri *A. hydrophila*.





## SUMMARY

**Annisa Farhana Dewi (176080100011006).** Analysis of the Use of Daun Sendok Extract (*Plantago major* Linn.) On the Hematological Profile and Histopathology of Kidney Carp (*Cyprinus carpio*) Infected with *Aeromonas hydrophila*. Mentoring commission Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS and Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua

Fish consumption in Indonesia has increased along with the increase in fisheries production in Indonesia. Carp (*C. carpio*) is one of the aquaculture commodities that has superior economic value. This carp has a production target of 785,800 by 2019. Increased consumption as well as the target of carp production accompanied by limited land and high global activities lead to intensive cultivation which will trigger disease such as MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*). This disease occur because of *Aeromonas hydrophila* which can cause the death rate in fish more than 80%. The treatment that have been done so far was used antibiotics. But unfortunately uncontrolled use of antibiotics can cause resistant bacteria and leave residues in the environment.

Daun sendok (*P. major* L.) was known as a 'weed' that live freely in nature. This weed have several compounds such as fenol, flavonoid, tannin and saponin. The antibacterial compounds is generally able to disrupt the bacterial cell permeability and causes bacterial lysis so it was thought to be able to treat carp from infection with *A. hydrophila*. The purpose of this study was to analyze the types of secondary metabolites that have antibacterial properties on daun sendok (*P. major* L.) and analyze the hematology and kidney of fish after being given the addition of daun sendok from the infection of *A. hydrophila*. This study uses an experimental method with a complete randomized design and is divided into 2 stages, namely: (1) Extraction of *P. major* L., antibacterial activity test for *A. hydrophila* (such as co-culture and disc test) and and characterization of antibacterial compounds on daun sendok (*P. major* L.) such as phytochemical tests, FTIR and UV-VIS; (2) Pathogenicity test of *A. hydrophila*, toxicity test of *P. major* L. extract and application of antibacterial *P. major* L. extract to carp (*C. carpio*) infected with *A. hydrophila* on a laboratory scale. After that, fish maintenance was carried out after treatment for 7 days. Then observations of hematology such as erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocytes, lymphocytes, neutrophils, monocytes, kidney histopathological observation, clinical symptoms, survival and water quality.

The results of the first phase research obtained the highest yield from extraction used ethanol solvents. Then the results of the co-culture test showed that ethanol solvent had a lower MBC value compared to ethyl acetate solvents, where at a dose of 100 ppm there was a decrease in bacterial colonies. The results of this co-culture were used as a reference for the determination of doses on discs, namely 100,200,300,400 and 500 ppm. The results of the test discs respectively from the lowest dose of 8.30; 9.9; 11,10; 12,11 and 14 mm while treatment used chloramphenicol obtained a inhibition zone of 20,95 mm. Ethanol extract of daun sendok (*P. major* L.) in phytochemical test was known to contain phenol compounds, flavonoids, saponins and tannins. Then FTIR and UV-VIS test results strengthen the results of phytochemical screening where at certain wavelengths indicate the functional groups of phenols, flavonoids and tannins.

The results of the phase II study on hematology of carp (*C. carpio*) after treatment showed recovery from stress conditions of bacterial infection. ANOVA test results showed that daun sendok extract had an effect on hematology ( $P < 0.05$ )



with the best dose at treatment D (300 ppm). Whereas the histopathology of the carp (*C. carpio*) kidney infected with *A. hydrophila* showed some damage such as increased necrosis, hemorrhagic and melanomacrophage. After being given the addition of daun sendok extract (*P. major L.*) there was a significant reduction in damage ( $P < 0.05$ ).





DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>i</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran .....	7
2.1.3 Makan dan Kebiasaan Makan .....	7
2.2 Penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) .....	8
2.3 Bakteri Aeromonas hydrophila .....	9
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	9
2.3.2 Habitat dan Penyebaran .....	10
2.3.3 Mekanisme Invasi Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	11
2.3.4 Tingkat Virulensi .....	13
2.4 Daun Sendok ( <i>P. major</i> L.) .....	14
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	14
2.4.2 Habitat dan Penyebaran .....	14
2.4.3 Manfaat Tanaman .....	15
2.4.4 Kandungan Senyawa Bioaktif .....	16
2.5 Metode Ekstraksi Maserasi .....	17
2.6 Karakterisasi Senyawa .....	18
2.6.1 Uji Fitokimia .....	18
2.6.2 Analisis <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR) .....	18
2.6.3 Spektrofotometri UV-VIS .....	19
2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri .....	20
2.8 Hematologi Darah Ikan .....	22
2.8.1 Sel Darah Merah (Eritrosit) .....	22



2.8.2 Hemoglobin (Hb).....	23
2.8.3 Hematokrit.....	24
2.8.4 Sel Darah Putih (Leukosit).....	24
2.8.5 Diferensial Leukosit.....	25
2.8.3.1 Limfosit.....	25
2.8.3.2 Neutrofil.....	26
2.8.3.3 Monosit.....	26
2.9 Histopatologi Organ Ikan.....	27
2.9.1 Organ Ginjal.....	28
2.10 Gejala Klinis Infeksi <i>A. hydrophila</i> .....	28
2.11 Kualitas Air.....	29
<b>III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>	<b>31</b>
3.1 Landasan Teori.....	31
3.2 Kerangka Konsep.....	32
3.3 Hipotesis.....	33
3.4 Kerangka Operasional.....	33
3.5 Penelitian Terdahulu.....	35
3.6 Strategi Publikasi.....	36
<b>IV. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Desain Penelitian.....	37
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	37
4.3 Materi Penelitian.....	38
4.3.1 Alat Penelitian.....	38
4.3.2 Bahan Penelitian.....	38
4.4 Metode Penelitian.....	39
4.5 Rancangan Penelitian.....	39
4.6 Parameter Uji.....	41
4.6.1 Parameter Utama.....	41
4.6.2 Parameter Penunjang.....	41
4.7 Tahap Penelitian.....	41
4.7.1 Penelitian Tahap I.....	41
4.7.1.1 Ekstraksi Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	42
4.7.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri.....	42
4.7.1.2 Uji Skrining Fitokimia.....	44
4.7.1.3 Analisa FTIR.....	46
4.7.1.4 Analisa UV-VIS.....	46
4.7.2 Penelitian Tahap II.....	46
4.7.2.1 Uji Patogenitas <i>A. hydrophila</i> .....	46



4.7.2.2 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	47
4.7.2.3 Aplikasi Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) Pada Ikan yang Telah Diinfeksi Bakteri .....	48
4.7.2.4 Pengamatan Hematologi.....	49
4.7.2.5 Pengamatan Histopatologi .....	51
4.7.2.6 Pengamatan Gejala Klinis .....	52
4.7.2.7 Pengamatan Kelulushidupan (SR).....	52
4.7.2.8 Pengamatan Kualitas Air.....	53
4.8 Analisa Data.....	53
<b>V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>54</b>
5.1 Penelitian Tahap I.....	54
5.1.1 Ekstraksi Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) .....	54
5.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri .....	54
5.1.2.1 Uji <i>Co-culture</i> .....	54
5.1.2.2 Uji Cakram .....	56
5.1.3 Karakterisasi Metabolit Sekunder Ekstrak Terbaik Daun Sendok ( <i>P.</i> <i>major L.</i> ).....	57
5.1.3.1 Analisis Fitokimia.....	57
5.1.3.2 Analisis FTIR.....	58
5.1.3.3 Analisis UV- VIS.....	59
5.1.4 Mekanisme Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder.....	60
5.2 Penelitian Tahap II .....	62
5.2.1 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	62
5.2.2 Uji Patogenitas Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	63
5.2.3 Analisa Hematologi Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....	64
5.2.3.1 Eritrosit.....	64
5.2.3.2 Hemoglobin (Hb) .....	66
5.2.3.3 Hematokrit.....	68
5.2.3.4 Leukosit.....	70
5.2.3.5 Limfosit.....	72
5.2.3.6 Neutrofil.....	74
5.2.3.7 Monosit .....	77
5.2.4 Analisa Ginjal Ikan Mas Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	80
5.2.4.1 Ginjal Normal dan Infeksi .....	80
5.2.4.2 Ginjal Ikan Pasca Penambahan Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) .....	83
5.2.5 Gejala Klinis Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	90
5.2.6 Kelulushidupan (SR) .....	92
5.2.7 Parameter Penunjang.....	94

5.2.7.1 Parameter Kualitas Air..... 94

**VI. KESIMPULAN DAN SARAN ..... 96**

6.1 Kesimpulan ..... 96

6.2 Saran ..... 96

**DAFTAR PUSTAKA..... 97**

**LAMPIRAN..... 110**





DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
<b>Gambar 1.</b> Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) (Esmaeili, <i>et al.</i> , 2014).....	6
<b>Gambar 2.</b> <i>A. hydrophila</i> Dokumentasi Pribadi (pembesaran 1000x) .....	9
<b>Gambar 3.</b> Interaksi Inang Ikan Dengan Bakteri Patogen (Hamed, <i>et al.</i> , 2018).....	12
<b>Gambar 4.</b> Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) (Xu dan Chang, 2017).....	14
<b>Gambar 5.</b> Skema Spektrofotometer UV-VIS .....	20
<b>Gambar 6.</b> Mekanisme Antibakteri Senyawa Bioaktif (Radulović, <i>et al.</i> , 2013).....	21
<b>Gambar 7.</b> Kerangka Konsep .....	32
<b>Gambar 8.</b> Kerangka Operasional Penelitian .....	34
<b>Gambar 9.</b> Rancangan Penelitian .....	40
<b>Gambar 10.</b> Hasil Uji Cakram: (A) 75 ppm; (B) 150 ppm; (C) 225 ppm; (D) 300 ppm; (E) 375 ppm dan (K+) Kloramfenikol.....	57
<b>Gambar 11.</b> Hasil Uji FTIR Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	58
<b>Gambar 12.</b> Hasil Uji UV-Vis Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	59
<b>Gambar 13.</b> Eritrosit Perbesaran 1000x (A) Normal; (B) Pasca Infeksi.....	64
<b>Gambar 14.</b> Pola Perubahan Eritrosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	66
<b>Gambar 15.</b> Pola Perubahan Hemoglobin Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	68
<b>Gambar 16.</b> Pola Perubahan Hematokrit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	69
<b>Gambar 17.</b> Pola Perubahan Leukosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	71
<b>Gambar 18.</b> Limfosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) (Perbesaran 1000x).....	72
<b>Gambar 19.</b> Pola Perubahan Limfosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	74
<b>Gambar 20.</b> Neutrofil Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) (Perbesaran 1000x).....	75
<b>Gambar 21.</b> Pola Perubahan Neutrofil Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	77
<b>Gambar 22.</b> Monosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) (Perbesaran 1000x).....	77
<b>Gambar 23.</b> Pola Perubahan Monosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	79
<b>Gambar 24.</b> Histopatologi Ginjal Ikan Normal <b>[A]</b> : terdapat Tubulus Distal (D), Tubulus Proksimal (P), Hematopoietik (HE), Kapsula Bowman (KB), Glomerulus (G); Ginjal Infeksi <b>[B]</b> : Nekrosis (N), Hemoragik (H), Melanomakrofag (M). Perbesaran 400x .....	80
<b>Gambar 25.</b> Histopatologi Ginjal Ikan, (A) dosis 75 ppm; (B) dosis 150 ppm; (C) dosis 225 ppm; (D) dosis 300 ppm dan (E) dosis 375 ppm Perbesaran 400x .....	83

**Gambar 26.** Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Nekrosis ..... 87

**Gambar 27.** Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Hemoragik ..... 88

**Gambar 28.** Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Melanomakroflag ..... 90

**Gambar 29.** Pola Tingkat Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*) ..... 93





DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
<b>Tabel 1.</b> Interaksi Sel Inang dengan Bakteri patogen (Rahmaningsih, 2018).....	11
<b>Tabel 2.</b> Penelitian Terdahulu.....	35
<b>Tabel 3.</b> Desain Penelitian.....	37
<b>Tabel 4.</b> Rendemen Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) .....	54
<b>Tabel 5.</b> Hasil Uji Co-culture Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) .....	55
<b>Tabel 6.</b> Hasil Uji Cakram Ekstrak Etanol Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ) .....	56
<b>Tabel 7.</b> Hasil Uji Fitokimia.....	58
<b>Tabel 8.</b> Serapan Puncak Gelombang FTIR.....	59
<b>Tabel 9.</b> Serapan Maksimum Panjang Gelombang UV-VIS (Harborne, 2006) ...	60
<b>Tabel 10.</b> Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	62
<b>Tabel 11.</b> Uji Patogenitas Bakteri <i>A. hydrophila</i> Terhadap Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) ..	63
<b>Tabel 12.</b> Nilai Eritrosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian .....	65
<b>Tabel 13.</b> Nilai Hemoglobin (Hb) Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian.....	66
<b>Tabel 14.</b> Nilai Hematokrit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian .....	68
<b>Tabel 15.</b> Nilai Leukosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian .....	70
<b>Tabel 16.</b> Nilai Limfosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian.....	73
<b>Tabel 17.</b> Nilai Neutrofil Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian .....	76
<b>Tabel 18.</b> Nilai Monosit Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian.....	78
<b>Tabel 19.</b> Hasil Skoring Kerusakan Histopatologi Ginjal Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) ...	84
<b>Tabel 20.</b> Hasil Skoring Rerata Nekrosis Histopatologi Ginjal Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....	86
<b>Tabel 21.</b> Hasil Skoring Rerata Hemoragik Histopatologi Ginjal Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....	87
<b>Tabel 22.</b> Hasil Skoring Rerata Melanomakrofag Histopatologi Ginjal Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) .....	89
<b>Tabel 23.</b> Pengamatan Gejala Klinis Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ).....	90
<b>Tabel 24.</b> Hasil Pengamatan Kualitas Air .....	94



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Pengukuran Nilai OD dan Perhitungan Kepadatan Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	110
Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	111
Lampiran 3. Klasifikasi Tanaman daun Sendok.....	112
Lampiran 4. Hasil Uji MIC.....	113
Lampiran 5. Hasil Uji Fitokimia Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	114
Lampiran 6. Hasil Uji UV-VIS Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	115
Lampiran 7. EPA Prohibit Analisis Toksisitas Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major L.</i> ).....	116
Lampiran 8. EPA Prohibit Analisis Patogenitas Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	118
Lampiran 9. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Eritrosit.....	119
Lampiran 10. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Hemoglobin.....	120
Lampiran 11. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Hematokrit.....	121
Lampiran 12. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Leukosit.....	122
Lampiran 13. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Limfosit.....	123
Lampiran 14. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Neutrofil.....	124
Lampiran 15. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Monosit.....	125
Lampiran 16. Skoring Kerusakan Histopatologi Ginjal.....	126
Lampiran 17. Uji Anova, Uji Duncan dan Polynomial Orthogonal Nekrosis.....	128
Lampiran 18. Uji Anova, Uji Duncan dan Polynomial Orthogonal Hemoragik.....	129
Lampiran 19. Uji Anova, Uji Duncan dan Polynomial Orthogonal Melanomakrofaq.....	130
Lampiran 20. Data Kelulushidupan Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> ) selama pemeliharaan.....	131
Lampiran 21. Data Kualitas Air Selama Pemeliharaan.....	132
Lampiran 22. Dokumentasi Kerja.....	134



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Konsumsi ikan di Indonesia mengalami peningkatan bersamaan dengan meningkatnya hasil produksi perikanan di Indonesia. Total produksi perikanan budidaya pada tahun 2017 mencapai angka 17,22 juta ton, sedangkan target produksi perikanan budidaya pada tahun 2018 adalah 24,08 juta ton (KKP, 2018). Salah satu komoditas perikanan budidaya yang memiliki nilai ekonomis unggul seperti ikan mas (*C. carpio*) memiliki target produksi pada tahun 2016, 2017, 2018 dan 2019 berturut – turut adalah 626,500, 679,900, 658,998 dan 785,800 ton sedangkan pada tahun 2016 yang terealisasi hanya mencapai 498,297 ton (DJPB-KKP, 2017).

Peningkatan target produksi ikan mas (*C. carpio*) ini disebabkan karena kandungan protein yang tinggi dan asam lemak omega-3 sehingga dapat dimanfaatkan untuk mengontrol kolestrol (Anugraha, *et al.*, 2014). Kandungan bioaktif lain seperti omega-6 (PUFA) serta asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) yang terdapat pada ikan mas sangat digemari masyarakat untuk memenuhi kebutuhan nutrisi (Kuevendziev, *et al.*, 2018). Peningkatan konsumsi serta target produksi ikan mas (*C. carpio*) yang diimbangi dengan keterbatasan lahan dan tingginya aktifitas yang bersifat global menyebabkan lahirnya sistem budidaya intensif. Penerapan sistem budidaya intensif dengan padat tebar dan dosis pakan yang tinggi akan memberikan pengaruh buruk terhadap kualitas air sehingga memicu timbulnya penyakit yang dapat merugikan usaha budidaya (Samsundari dan Wirawan 2013).

Salah satu kendala penyakit dalam budidaya ikan mas (*C. carpio*) yang sering terjadi adalah *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). Penyakit ini diketahui



telah menyebar diseluruh dunia dan telah masuk ke Indonesia pada beberapa pulau yaitu Kalimantan, Jawa dan Sumatra (Amanu, *et al.*, 2014). *A. hydrophila* merupakan bakteri yang dominan ditemukan pada bagian internal ikan yang terserang penyakit MAS (Nielsen, *et al.*, 2001). Ikan yang terserang penyakit ini akan menunjukkan gejala seperti hemoragik, perut membuncit, pergerakan renang yang tidak stabil, hipertropi dan nekrosis organ serta menyebabkan mortalitas yang tinggi baik pada benih maupun indukan mencapai lebih dari 80% dalam waktu yang singkat (Tantu, *et al.*, 2013; Triyanngsih, *et al.*, 2014; Wonglapsuan, *et al.*, 2016; Arwin, *et al.*, 2016; Zhang, *et al.*, 2016).

Antibiotik merupakan salah satu penanggulangan secara kimia terhadap penyakit bakterial yang sering diberikan dengan cara oral, injeksi dan perendaman (Suwarno, *et al.*, 2014). Pemberian antibiotik dengan dosis dan cara yang tepat akan memberikan hasil yang diinginkan, namun apabila antibiotik diberikan terus-menerus dan dengan dosis yang tidak sesuai akan meyebabkan terjadinya resistensi bakteri. Bakteri yang resisten akan mentransfer gen kepada bakteri lain dengan cara konjugasi, transformasi dan transduksi, sehingga akan menghasilkan bakteri yang kebal terhadap antibiotik tertentu (Bbosa, *et al.*, 2014). *A. hydrophila* yang diisolasi dari ikan lele (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) diketahui resisten 100% terhadap *Ampisilin*, *Cafixime* dan *Augmentin*, 90% terhadap *Ceufurxime*, 80% terhadap *Ciprofloxacin* dan 30% terhadap *Ofloxacin*, *Ceftazidime* dan *Gentamycin* (Saka, *et al.*, 2017). Monica, *et al.* (2013), menambahkan masalah lain yang ditimbulkan dari penggunaan antibiotik adalah efek toksik dari residu yang tertinggal yang akan membahayakan manusia sebagai konsumen akhir. Oleh karena itu diperlukan adanya alternatif obat pengganti antibiotik yang berbahan alami, aman, mudah dicari dan murah sehingga mempermudah usaha budidaya ikan mas (*C. carpio*).



Salah satu alternatif bahan alami yang dapat digunakan adalah daun sendok (*P. major L.*). Tanaman ini merupakan hama yang tumbuh liar di tepi jalan, perumputan dan pinggir sungai. Oleh masyarakat, daun sendok (*P. major L.*) biasa digunakan sebagai pertolongan pertama pada saat terjadi luka. Kelebihan dari tanaman ini adalah adanya beberapa aktivitas seperti antiinflamasi, analgesik, antioksidan, antivirus dan antijamur (Shirley, *et al.*, 2015). Tak hanya itu, daun sendok (*P. major L.*) diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri seperti *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *S. epidermis* dan *B. aureus* karena senyawa metabolit sekunder yang bersifat anitabakteri seperti favonoid, alkaloid dan tanin (Metiner, *et al.*, 2012; Sitorus, 2017).

Kajian daun sendok (*P. major L.*) sebagai antibakteri telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri gram negatif maupun gram positif, namun pemanfaatannya sebagai antibakteri *A. hydrophila* dan pengaplikasian untuk pengobatan ikan belum pernah dilakukan. Berdasarkan informasi tersebut maka perlu dilakukan penelitian dan kajian senyawa aktif yang terdapat pada daun sendok (*P. major L.*) sebagai antibakteri serta pengaplikasiannya untuk mengobati ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi *A. hydrophila* dilihat dari hematologi dan histopatologi organ ginjal pada ikan mas (*C. carpio*).

## 1.2 Rumusan Masalah

*Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri merugikan yang sering menginfeksi ikan mas (*C. carpio*) sehingga mengakibatkan mortalitas lebih dari 80% dan berujung pada kegagalan panen. Penanggulangan yang umum digunakan untuk permasalahan bakterial pada budidaya ikan adalah antibiotik, namun penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol bukan hanya dapat



menyebabkan bakteri menjadi resisten namun juga dapat menimbulkan residu pada lingkungan dan membahayakan manusia sebagai konsumen tingkat akhir.

Oleh karena itu alternatif pengobatan yang memiliki aktifitas antibakteri menggunakan bahan alami sedang gencar dilakukan. Beberapa informasi mengenai kemampuan daun sendok (*P. major L.*) sebagai antibakteri menyatakan bahwa tanaman ini diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri baik gram positif maupun gram negatif. Namun belum ada informasi kemampuan daun sendok (*P. major L.*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan uraian tersebut maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kemampuan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*
2. Apa saja jenis senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki sifat sebagai antibakteri terhadap *A. hydrophila*?
3. Bagaimana hematologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas (*C. carpio*) yang diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dari infeksi bakteri *A. hydrophila*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis kemampuan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*
2. Menganalisis jenis senyawa bioaktif daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila*.
3. Menganalisis profil hematologi dan histopatologi organ ginjal ikan mas (*C. carpio*) yang diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dari infeksi bakteri *A. hydrophila*.



#### 1.4 Manfaat Penelitian

Metode dan hasil dari penelitian ini diharapkan untuk memperkaya informasi dan sebagai perkembangan ilmu mengenai pengobatan *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) serta aktivitas antibakteri pada daun sendok (*P. major* L.). Selain itu diharapkan agar informasi ini dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan penyakit MAS yang beredar pada usaha budidaya ikan mas (*C. carpio*).



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*C. carpio*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Pembagian klasifikasi ikan mas (*C. carpio*) **Gambar 1.** menurut Sirisidthi, *et al.* (2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Superkelas : Osteichthyes  
Kelas : Actinopterygii  
Subkelas : Neopterygiis  
Superordo : Ostariophysi  
Ordo : Cypriniformes  
Superfamili : Cyprinoidea  
Famili : Cyprinidae  
Genus : *Cyprinus*  
Species : *Cyprinus carpio*



**Gambar 1.** Ikan Mas (*C. carpio*)  
(Esmaeili, *et al.*, 2014)

Ikan mas (*C. carpio*) memiliki morfologi bentuk tubuh yang tegak, memanjang dan pipih. Bagian tubuh yang memanjang dikelilingi oleh sisik dengan tipe sikloid (melingkar) yang berukuran relatif besar. Pada ujung posterior terdapat ekor dan bagian anterior terdapat mulut yang dapat disembulkan kebagian luar tubuh. Mulut ikan mas (*C. carpio*) berada pada bagian ujung tengah anterior dan dibagian bawah kepala terdapat dua jumlah sungut yang pendek (Hasrati dan Rusnawati, 2011). Warna tubuh ikan mas umumnya keemasan, namun beberapa ikan mas diketahui memiliki warna tubuh seperti biru, hijau dan merah (Mudlofar, *et al.*, 2013).

Bagian tubuh ikan mas (*C. carpio*) terdiri dari tiga yaitu anterior (kepala), badan dan posterior (ekor). Tubuh ikan mas memanjang dengan perbandingan panjang dan tingginya adalah 3 : 1. Dibagian anterior terdapat sepasang mata,



tutup insang, hidung serta mulut yang kecil, didalam mulut terdapat 3 susunan baris gigi graham. Pada bagian badan terdapat 4 sirip yaitu sirip punggung yang berjari keras, sirip dada, satu sirip perut dan sirip dubur. Pada bagian posterior terdapat satu sirip ekor yang berbentuk cagak (Supriatna, 2013).

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Ikan mas (*C. carpio*) merupakan ikan air tawar yang pertama kali ditemukan di daerah Eropa dan tersebar luas hampir di seluruh belahan dunia (Vilizzi, 2012).

Di Indonesia, ikan mas (*C. carpio*) tersebar hampir diseluruh wilayah Sumatra, Jawa, Sulawesi, NTT, NTB, Bali dan Irian Jaya (Mudlofar, *et al.*, 2013) dan ditemukan pada semua tipe habitat air tawar seperti sungai, meander sungai, danau, rawa, irigasi, genangan dan daerah vegetasi (Smith, 2005). Menurut Nuraini (2013), ikan mas (*C. carpio*) hidup baik pada daerah perairan tawar dengan kedalaman yang cukup, ketinggian 150 – 600 m diatas permukaan laut (dpl) dan kondisi perairan yang tidak terlalu deras. Meskipun tergolong ikan yang hidup pada perairan tawar, namun ikan mas (*C. carpio*) mampu hidup pada daerah muara dan perairan payau dengan salinitas 25 – 30%.

Pada umumnya ikan mas (*C. carpio*) berkumpul pada daerah hilir sungai pada suhu 23 – 30°C atau bahkan pada suhu yang lebih rendah serta kondisi supersaturasi (Flajšhans dan Hulata, 2007). Menurut Tatangindatu, *et al.* (2013), suhu dan pH yang optimum untuk menunjang pertumbuhan ikan mas adalah 28°C dan 6 – 9. Rascovic, *et al.*, (2010), menambahkan bahwa ikan mas (*C. carpio*) yang dibudidayakan dalam kolam memiliki standar optimal untuk dapat tumbuh yaitu pada kondisi suhu 22 – 26°C, DO > 5 mg/l dan kekeruhan 0,2 – 0,3 m.

### 2.1.3 Makan dan Kebiasaan Makan

Ikan mas (*C. carpio*) merupakan jenis ikan yang dapat memakan berbagai jenis makanan (omnivora). Umumnya ikan mas (*C. carpio*) akan menggali substrat



di dasar perairan untuk mendapatkan makanannya. Ikan mas (*C. carpio*) akan memakan organisme bentik seperti zooplankton, cacing, moluska, insekta dan larva insekta. Ikan mas (*C. carpio*) juga akan memanfaatkan daun, biji dan tangkai tanaman air maupun tanaman darat sebagai makanannya (Praseno, *et al.*, 2010).

Jenis makanan untuk ikan mas (*C. carpio*) ada dua yaitu pakan alami dan pakan buatan. Pakan alami merupakan jenis pakan yang tersedia secara alami baik dengan bantuan manusia maupun tanpa bantuan manusia dan memiliki kelimpahan relatif tinggi seperti zooplankton. Pakan buatan yang sering digunakan untuk pemeliharaan ikan mas (*C. carpio*) adalah pelet yang dijual dipasaran umum (Husniya, *et al.*, 2016). Ikan mas (*C. carpio*) yang diberi pakan buatan (pelet) yang mengandung tepung ikan, tepung jagung, tepung kedelai, tepung dedak dan vitamin dengan protein 30% diketahui mampu mengalami peningkatan pertumbuhan (Pratama, *et al.*, 2015).

## 2.2 Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS)

Penyakit MAS yang menyerang ikan air tawar disebabkan oleh tiga spesies dari genus *Aeromonas* yaitu: *A. hydrophila*, *A. caviae* dan *A. veronii*. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang paling sering muncul, dominan dan memiliki karakteristik berbeda yang sering disebut dengan *virulent Aeromonas hydrophila* (VAH). Penyakit ini sering dikaitkan akibat kondisi stress, kurangnya nutrisi, kandungan DO yang rendah dan fluktuasi suhu di perairan. Penyebaran bakteri pada penyakit MAS dominan terjadi secara horizontal yaitu ketika ikan yang terserang penyakit MAS dimangsa oleh ikan lainnya (Hanson, *et al.*, 2014).

Penyakit MAS yang telah menjadi permasalahan dalam pemeliharaan ikan air tawar yang menyebabkan beberapa kondisi patologis yaitu akut, kronis dan laten yang ditunjukkan dengan tanda klinis yang berbeda (Soltani, *et al.*, 2016). Gejala yang ditunjukkan oleh ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi MAS meliputi



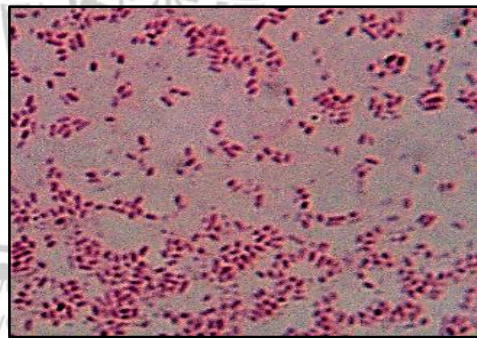
perubahan tingkah laku dan perubahan morfologi, perubahan tingkah laku yang terjadi seperti berenang pasif, respon makan berkurang, berkumpul di daerah aerasi. Perubahan morfologi pada ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi MAS adalah warna tubuh memudar, lendir meningkat, luka borok pada tubuh, *haemorrhage*, sisik mengelupas, sirip ekor geripis, pembengkakan bola mata (*exophthalmia*), insang pucat, perut kembung (Mulia, 2010; Khaerani, *et al.*, 2018 dan Sarjito, *et al.*, 2018).

## 2.3 Bakteri *A. hydrophila*

### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi taksonomi bakteri *A. hydrophila* (**Gambar 2**) menurut Liu (2017), adalah sebagai berikut:

Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Aeromonadales
Famili	: Aeromonadaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>



**Gambar 2.** *A. hydrophila*, Dokumentasi Pribadi (pembesaran 1000x).

Ciri utama yang membedakan *A. hydrophila* dengan bakteri *Aeromonas* lain adalah *A. hydrophila* memiliki morfologi berbentuk batang yang berukuran  $0,7 - 1,8 \times 1 - 1,5 \mu\text{m}$  yang bergerak menggunakan polar flagel dan tergolong fakultatif anaerob (Igbiosa, *et al.*, 2012). Arwin, *et al.* (2016) menambahkan, bakteri ini



berwarna merah dan kuning, tidak memiliki spora, bersifat motil dan hidup berkoloni membentuk seperti lingkaran atau bulatan. Koloni yang dibentuk oleh bakteri *A. hydrophila* berwarna keputihan sampai dengan kuning tua.

*A. hydrophila* tergolong ke dalam jenis protista prokariot uniseluler yang tidak memiliki membran pemisah inti dengan sitoplasma. Bentuk tubuhnya yang memanjang seperti batang dilengkapi alat gerak flagel yang berada hanya pada salah satu ujung tubuhnya. Bakteri gram negatif ini merupakan bakteri heterotrof, katalase positif dan oksidasi positif. *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media akan menghasilkan koloni yang berdiameter 1 – 3 mm yang halus dan terang (Haryani, *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *A. hydrophila* dapat ditemukan di air tawar dan air payau di seluruh dunia (Saka, *et al.*, 2017). Munculnya *A. hydrophila* sering dikaitkan dengan bahan organik yang terdapat didalam dan sedimen dasar perairan. Saat terjadi musim kemarau akan menyebabkan kandungan bahan organik di dalam dan sedimen perairan meningkat, sehingga *A. hydrophila* akan muncul dan memainkan perannya untuk menguraikan bahan organik. Saat menjelang musim hujan yang mana akan menyebabkan terjadinya fluktuasi suhu pada saat siang dan malam juga akan memicu kemunculan *A. hydrophila* (Afrianto, *et al.*, 2015).

*A. hydrophila* sering dijumpai pada daerah tropis dan akan tumbuh maksimal pada suhu 38 – 41°C, namun tetap dapat tumbuh pada kondisi suhu yang rendah dengan kisaran 0 – 5°C. Derajat keasamaan perairan yang menunjang pertumbuhan *A. hydrophila* adalah 5 – 5,9. Bakteri *A. hydrophila* akan hidup baik pada kandungan oksigen yang rendah, akumulasi metabolisme ikan serta bahan organik yang meningkat dan *overcrowding* atau padat tebar ikan yang tinggi (Samsundari, 2008).



### 2.3.3 Mekanisme Invasi Bakteri *A. hydrophila*

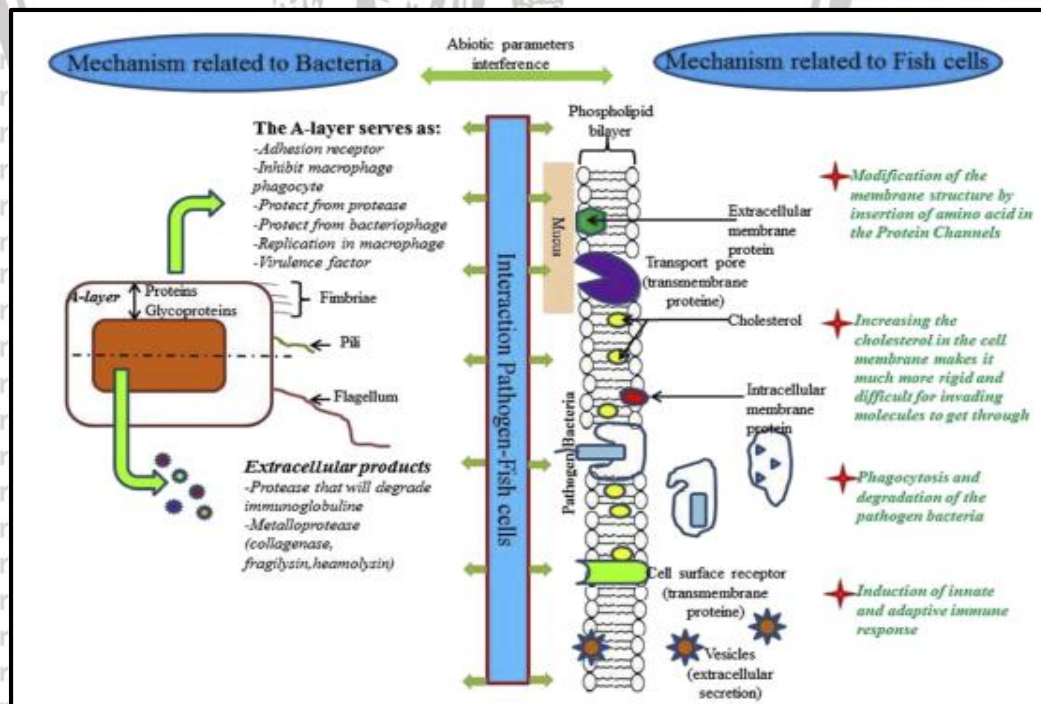
Bakteri masuk kedalam tubuh ikan dengan mekanisme yaitu melakukan penetrasi atau menerobos masuk kedalam sel dengan proses endositosis. Setelah berhasil masuk, bakteri akan menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi dan infeksi pada sel epitel (Ode, 2011). Yanuhar (2006), menambahkan dalam jurnalnya bahwa bakteri melakukan internalisasi dan penempelan pada seluruh jaringan dan organ ikan. Setelah berhasil melekat, bakteri akan melakukan penetrasi dan menembus kedalam sel dan memicu proses inflamasi serta infeksi yang menyebar hingga terjadi nekrosis dan berujung pada kematian ikan.

Tahapan penetrasi sel bakteri kedalam tubuh ikan dijelaskan pada **Tabel 1.** (Rahmaningsih, 2018), berikut ini:

**Tabel 1.** Interaksi Sel Inang dengan Bakteri patogen (Rahmaningsih, 2018)

Tahapan Infeksi	Mekanisme Pertahanan Ikan	Resistensi Terhadap Pertahanan Inang
Pelekatan	Mukus Epidermis	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A layer/LPS yang berperan dalam adhesi pada sel inang dan mempertahankan sel bakteri dari serangan inang</li> </ul>
Penetrasi	Membran Integumen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Polimerisasi aktin (perbanyak protein globular yang berfungsi untuk transportasi dan migrasi)</li> <li>▪ Lapisan bakteri A-layer yang menghalangi protein reaktif makromolekul yang sangat penting untuk virulensi</li> <li>▪ Enzim hidrolitik (protease, lipase, glikosidase sebagai virulensi)</li> <li>▪ Sitotoksin</li> </ul>
Ketahanan dalam tubuh inang	Komplemen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lapisan A-layer dan LPS yang berfungsi mempertahankan integritas membrane sel bakteri</li> <li>▪ Sitotoksin</li> </ul>
	Fagosit ROS	

Interaksi antara bakteri patogen dengan inang **Gambar 3.** dilibatkan oleh faktor abiotik. Pada umumnya bakteri memiliki *survace layer* (A-layer) yang menyelubungi tubuhnya yang memiliki beberapa fungsi yaitu untuk penempelan atau adhesi pada inang, melindungi dari fagositosi makrofag, melindungi dari protease inang, melindungi dari *bacteriophage*, bereplikasi pada makrophag dan memiliki faktor virulensi. Selain itu, bakteri memiki produk ekstraseluler yang dapat mendegradasi antibodi ikan. Sedangkan pada sel eukariot ikan yang terdiri dari lipid bilayer memiliki bagian wilayah yang disebut dengan rakit lipid yang berfungsi untuk penyerapan hara dan persinyalan sel. Rakit lipid dilengkapi oleh kolestrol yang akan menjaga integritas membrane sel. Saat bakteri memasuki rakit lipid, bakteri akan dihadapng oleh makrofag dan dihancurkan dengan proses fagositosis. Namun ada beberapa bakteri yang mampu bertahan dan bereplikasi didalam sel makrofag, hal ini disebabkan karena adanya organisme patogen yang memperoleh gen yang menyandi protein yang berinteraksi secara khusus dengan molekul tertentu pada sel inang (Hamed, *et al.*, 2018).



**Gambar 3.** Interaksi Inang Ikan Dengan Bakteri Patogen (Hamed *et al.*, 2018).



### 2.3.4 Tingkat Virulensi

Ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*  $10^8$  cfu/ml dan dikombinasikan dengan suhu panas (efek pemanasan global) menyebabkan tingkat kematian 60% dalam waktu 24 jam dan 30% pada ikan yang diinfeksi *A. hydrophila* tanpa suhu panas (Shahi, *et al.*, 2017). Virulensi *A. hydrophila* bersifat *multifactorial* dengan penyakit yang dihasilkan seperti *aerolysin*, *adhesion*, sitotoksin, hemolisin, lipase, protease yang sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada umumnya bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 28°C, namun pada suhu 37°C aktivitas hemolisin dan sitotoksin meningkat (Rasmussen-Ivey, *et al.*, 2016).

*A. hydrophila* merupakan organisme yang memiliki patogenitas dengan merusak jaringan dan menghasilkan toksin. Bakteri ini memproduksi endotoksin dan eksotoksin dari tubuhnya. Endotoksin merupakan toksin yang terdapat pada dinding sel bakteri yang sangat erat kaitannya dengan lipopolisakarida (penyusun membran terluar bakteri gram negatif). Eksotoksin merupakan hasil ekskresi bakteri *A. hydrophila* pada fase pertumbuhan yang berupa elemen protein terlarut (Triyaningsih, *et al.*, 2014).

Faktor yang menyebabkan *A. hydrophila* menjadi berbahaya adalah racun yang dihasilkan oleh bakteri ini. Racun yang paling berbahaya diantaranya adalah *haemolysin* dan *aerolysin*. Racun *aerolysin* merupakan bagian dari elemen protein terlarut ekstraseluler yang memiliki sifat hemolitik dan sitolitik. Racun ini akan mengikat glikoprotein yang berada dipermukaan sel eukariot dan kemudian masuk ke dalam lapisan lemak. Racun tersebut kemudian membentuk sebuah lubang dan memasuki membran sebagai suatu preprotoksin yang memiliki kandungan peptida. *Aerolysin* ini akan menyebabkan gastroenteritis dan juga menyerang sel – sel epitel (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).



## 2.4 Daun Sendok (*P. major* L.)

### 2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Taksonomi dari daun sendok (*P. major* L.) **Gambar 4.** menurut Xu dan Chang (2017), adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Devisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Ordo : Lamiales  
Famili : Plantaginaceae  
Genus : Plantago Linn.  
Spesies : *Plantago major* Linn.



**Gambar 4.** Daun Sendok (*P. major* L.)  
(Xu dan Chang, 2017).

Daun sendok (*P. major* L.) memiliki morfologi bentuk oval yang saling berimpitan satu sama lain. panjang daunnya 5 – 20 cm dengan lebar 4 – 9 cm, namun beberapa diantaranya memiliki daun dengan panjang mencapai 30 cm dan lebar 17 cm. Terdapat 5 – 9 jari – jari daun yang terlihat jelas, ujung dari daunnya berbentuk lancip. Biji dari tanaman ini sangat kecil dan berbetuk bulat telur dengan ukuran 0,4 – 0,8 atau 0,8 – 1,5 mm dengan rasa yang pahit. Tanaman ini memiliki bunga yang berdiri memanjang dengan ukuran 5 – 15 cm diatas batang, beberapa diantaranya memiliki panjang hingga 13 – 15 cm atau bahkan hingga 70 cm (Nazarizadeh, *et al.*, 2013).

### 2.4.2 Habitat dan Penyebaran

*P. major* L. merupakan tanaman yang berada di daerah Asia utara, Asia tengah dan Eropa, namun sekarang banyak ditemukan tersebar luas diseluruh

Dunia dan dikenal sebagai rumput liar. *P. major* L. memiliki berbagai nama, Di Indonesia disebut dengan “daun sendok”, “Plantain” di Inggris, “llanten” di Spanyol, “Plantain majeure” di Prancis, “Breitwegerich” di Jerman, “Lisan Al-hamal” di Arab, “Tanchagem-maior” di Portugis dan “Grobald” di Swedia. (Adom, *et al.*, 2017). Di



Indonesia, daun sendok (*P. major L.*) merupakan gulma yang tumbuh dengan liar di pinggir jalan, hutan, perkebunan teh dan beberapa daerah dengan tanah yang padat (Sitorus, 2017).

Daun sendok (*P. major L.*) banyak ditemukan hidup di pinggir jalan sebagai rumput liar bersamaan dengan tanaman liar lainnya. Tanaman ini tumbuh pada kondisi tanah yang cenderung lembab, tidak terlalu asam serta kandungan P dan K yang tinggi (Kuiper dan Bos 2012). Daun sendok (*P. major L.*) dapat hidup pada (tanah yang padat dan daerah genangan air. Tanaman ini dapat hidup sepanjang tahun di daerah tropis. (Szhmelzer, *et al.*, 2008). Di pulau jawa, *P. major L.* tumbuh pada lahan terbuka yang subur seperti bantaran sungai, tepi jalan, hutan, padang rumput dan area pertanian dengan ketinggian 3300 m dpl, beberapa diantaranya ditemukan pada ketinggian 700m dpl atau lebih (Sugiyarto, *et al.*, 2006)

#### 2.4.3 Manfaat Tanaman

Daun sendok (*P. major L.*) merupakan gulma yang tanaman diketahui telah digunakan sebagai tanaman obat selama berabad – abad, tanaman ini terkenal ampuh untuk penyembuhan luka, sebagai anti-jamur, anti-inflamasi, antioksidan dan anti-virus (Shirley, *et al.*, 2015). Di Indonesia, tanaman ini diketahui dapat digunakan sebagai salah satu bahan jamu untuk hiperurisemia (Fitriani, *et al.*, 2017). Obat anti pendarahan dalam penanganan terhadap luka di daerah Minahasa, Sulawesi Utara (Kainde, *et al.*, 2016). Menangani permasalahan keputihan pada wanita di suku Sasak Pulau Lombok (Yamin, *et al.*, 2018).

Daun sendok (*P. major L.*) memiliki manfaat sebagai antibakteri. Kandungan bioaktif dalam daun sendok (*P. major L.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif. Ekstrak Aseton daun sendok (*P. major L.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. enteritidis*, *B. subtilis*, *S. aureus* dan *S.*



*epidermis* (Metiner, *et al.*, 2012). Najib, *et al.*, (2012) menambahkan, ekstrak dietil eter daun sendok (*P. major L.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *Vibrio sp.*

Pemanfaatan lain daun sendok (*P. major L.*) adalah untuk pengobatan infeksi kulit dan penyakit menular lain, gangguan pencernaan dan pernapasan, penghilang rasa sakit dan demam, pencegahan kanker dan meningkatkan sirkulasi serta reproduksi (Gonçalves dan Romano, 2016). Selain sebagai obat, daun sendok (*P. major L.*) dijadikan makanan untuk sup, salad segar dan teh herbal di Brazil (Andrade, *et al.*, 2018). *P. major L.* juga diketahui memiliki aktifitas potensial untuk mereduksi residu pestisida khususnya cyanophos di perairan (Romeh, 2014). Digunakan sebagai bioindikator dan biomonitor untuk lalu lintas terkait permasalahan logam berat (Galal dan Shehata, 2015).

#### 2.4.4 Kandungan Senyawa Bioaktif

Daun sendok (*P. major L.*) merupakan suku Plantaginaceae yang memiliki kandungan fitokimia dengan berbagai bermanfaat dibidang pengobatan seperti alkaloid, tannin, polifenol, monoterpenoid dan steroid (Rahmiyani *et al.*, 2015). Hal yang serupa dijelaskan oleh Sitorus (2017), bahwa ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) mengandung alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, glikosida dan steroid/triterpenoid, sedangkan ekstrak etil asetat daun sendok (*P. major L.*) mengandung alkaloid, saponin, tannin, flavonoid dan glikosida tanpa terdeteksi adanya steroid/triterpenoid. Karima, *et al.*, (2015) menambahkan dalam jurnalnya bahwa aktivitas antibakteri dan antioksidan yang dimiliki daun sendok (*P. major L.*) disebabkan oleh beberapa kandungan fitokimia diantaranya adalah fenolik dan flavonoid.

Komposisi kimia dari *P. major L.* menggunakan beberapa pelarut seperti petroleum eter, methanol, etil asetat, n-butanol dan aqueous menunjukkan bahwa



terdeteksi adanya kelompok fenol. Selain fenol, terdapat pula kelompok asam organik, flavonoid dan tepenoid dalam variasi yang berbeda. Daun sendok (*P. major* L.) mengandung 0,07% asam oleanolic dan 0,22% asam ursolat yang merupakan 2 kandungan utama terpenoid tanaman ini. Selain itu daun sendok (*P. major* L.) kaya akan asam lemak essensial (18:2 ω6 dan 18:3 ω3) dan karoten (Nazarizadeh, *et al.*, 2013).

## 2.5 Metode Ekstraksi Maserasi

Proses ekstraksi bahan aktif menyebabkan terjadinya analisis perpindahan massa dari padatan ke cairan (*solvent*) (Martono, *et al.*, 2012). Margareta (2011), dalam jurnalnya mengatakan pada saat padatan dan cairan (*solvent*) terhubung maka akan terjadi perpindahan zat atau difusi dari padatan ke cairan (*solvent*) sehingga terjadi pemisahan senyawa di padatan. Hasil akhir dari proses ekstraksi adalah senyawa bahan aktif yang diinginkan dapat dipisahkan dari senyawa – senyawa lain di padatan.

Pelarut merupakan komponen penting yang digunakan untuk proses pemisahan senyawa pada ekstraksi. Pelarut yang biasa digunakan untuk ekstraksi bioaktif adalah etanol, methanol, heksana, etil asetat, aqueus dan lain sebagainya. Pemilihan pelarut sangat erat kaitannya dengan komponen senyawa yang dibutuhkan dan mempengaruhi fistokimia ekstrak, karena pada umumnya bahan yang akan digunakan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki polaritas yang sama. Ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan hanya satu pelarut saja dan menggunakan beberapa pelarut (ekstraksi bertingkat). Beberapa penelitian membuktikan penggunaan ekstraksi bertingkat menghasilkan senyawa yang lebih banyak (Septiana dan Asnani, 2012).



## 2.6 Karakterisasi Senyawa

### 2.6.1 Uji Fitokimia

Secara umum tumbuhan banyak digunakan untuk pengobatan dikarenakan kandungan senyawa kimia yang dimilikinya. Untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam suatu tumbuhan diperlukan suatu pengujian (Marliana dan Saleh, 2011). Analisa fitokimia merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memeriksa kehadiran golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan. Senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan erat kaitannya dengan aktivitas biologinya. Metode analisa fitokimia ini sangat membantu dalam dunia fitofarmakologi khususnya dalam bidang kesehatan (Artini, *et al.*, 2013).

Metode analisa fitokimia diawali dengan cara ekstraksi dengan pelarut hingga menjadi ekstrak kental. Ekstrak tersebut diencerkan dan diteteskan dengan senyawa – senyawa kimia yang digunakan untuk mengetahui kandungan kimia tanaman. Umumnya uji fitokimia digunakan untuk mengetahui kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid dan lain sebagainya (Dewi, *et al.*, 2012).

### 2.6.2 Analisis *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Analisa menggunakan metode FTIR (*Fourier Transform Infrared*) memeberikan informasi struktur yang terdapat pada polimer (gabungan molekul – molekul) dan polipaduan (penggabungan dua polimer yang berbeda sifat), perubahan reaksi kimia dan stimulasi tekanan. Metode ini berbeda dengan spektrofotometer infrared biasa. FTIR menggunakan suatu interferometer Michelson yang menggantikan monokromator pada bagian depan. Interferometer kemudian akan memberikan sebuah sinyal kepada detektor dan berakhir pada informasi berupa interferogram. Interferogram merupakan informasi berdasarkan pada intensitas spektrum dari setiap frekuensi. Kegunaan FTIR sendiri umumnya



adalah untuk menganalisa getaran dan menganalisa sampel dengan konsentersasi rendah (Gunawan dan Azhari, 2010).

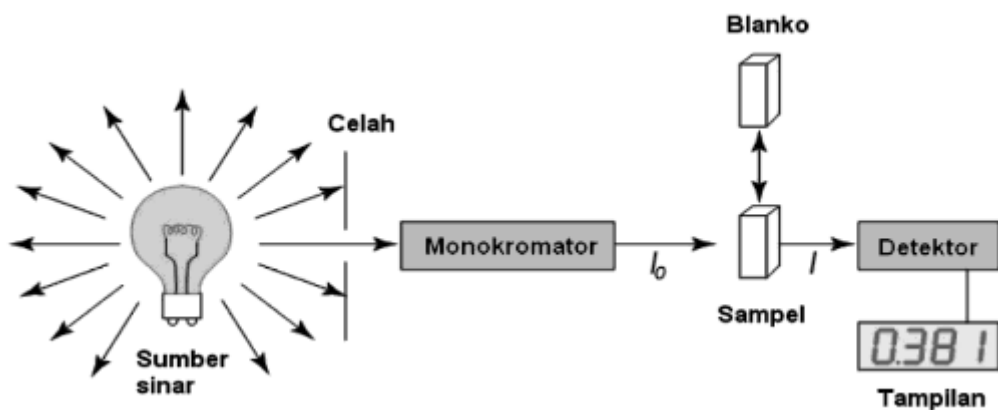
Metode FTIR merupakan salah satu metode spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi *fourier* pada hasil analisa spektrumnya. Metode ini merupakan metode absorpsi (penyerapan) didasarkan atas perbedaan penyerapan radiasi inframerah. Inti dari FTIR adalah alat yang digunakan untuk menganalisa frekuensi dalam sinyal gabungan yaitu interferometer Michelson (Anam, *et al.*, 2007). FTIR merupakan metode analitik yang tidak bersifat destruktif menggunakan radiasi inframerah untuk menginduksi getaran dalam ikatan kimia yang terdapat pada bahan organik (Cornet dan Javaux, 2017).

### 2.6.3 Spektofotometri UV-VIS

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari dua bagian yaitu spektrometer yang menghasilkan sinar dengan menggunakan panjang gelombang tertentu dan fotometer yang merupakan alat ukur intensitas cahaya yang diabsorpsi. Prinsip kerja alat ini yaitu sampel yang digunakan akan menyerap radiasi elektromagnetik yang akan terlihat pada panjang gelombang tertentu. Sedangkan Spektrofotometri UV-VIS merupakan suatu metode gabungan antara spektrofotometri UV dan Visible. Metode ini menggunakan sistem dengan menggabungkan dua buah sumber cahaya yang berbeda yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya tampak atau *Visible*. (Ramadhani, *et al.*, 2013).

Gandjar dan Rohman (2018), menyatakan bahwa cara kerja spektrofotometer UV-VIS adalah sampel yang diletakkan dalam salah satu berkas sinar, sedangkan untuk berkas sinar lainnya digunakan sebagai tempat referensi, baik seperti blanko maupun pelarut. Berkas sinar ini kemudian dilewatkan kedalam monokromator yang terdiri atas bagian yang berputar dengan cepat dan kemudian melewati dua berkas sinar secara bergantian ke prisma (kisi difraksi). Prisma yang bergerak

secara lambat ini kemudian akan melakukan varian panjang gelombang radiasi yang akan sampai kepada detektor. Detektor kemudian akan merekam perbedaan antara berkas sinar dari sampel dalam suatu rekorder. Skema spektrofotometer UV-VIS disajikan pada **Gambar 5**.



**Gambar 5.** Skema Spektrofotometer UV-VIS

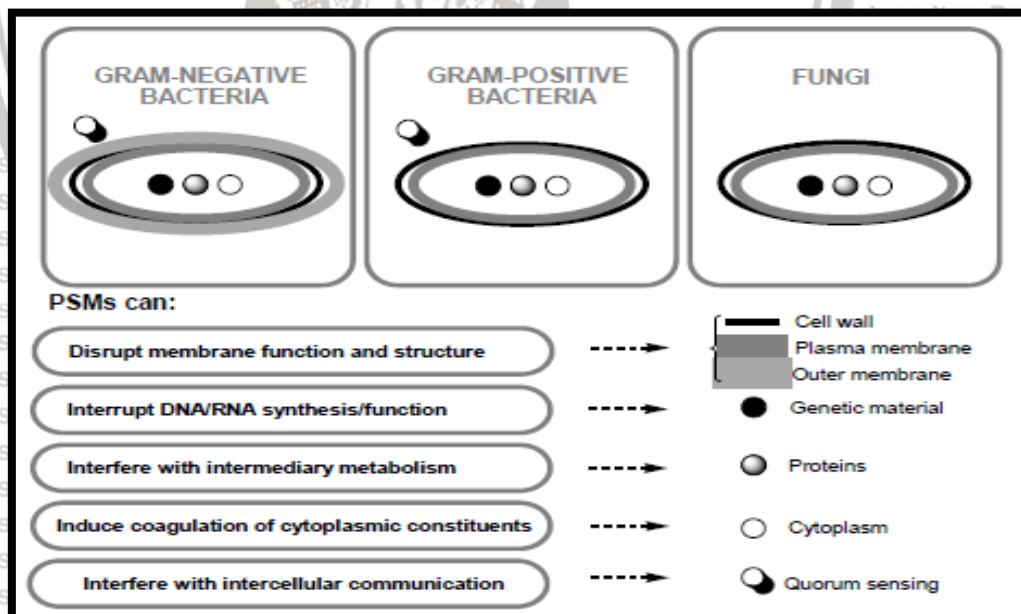
### 2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri

Senyawa bioaktif seperti fenol, flavonoid, saponin dan tannin memiliki sifat sebagai antibakteri dengan mekanisme yang hampir serupa yaitu mempengaruhi integritas membran sel. Flavonoid bekerja dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga merusak membran sel dan menembus ke bagian dalam sel serta menghambat sintesis DNA – RNA. Saponin bekerja dengan cara merendahkan tegangan dari permukaan membran sel sehingga membuat kebocoran sel dan menembus kedalam serta mengikat dan mempengaruhi sitoplasma sehingga sitoplasma menjadi bocor dan senyawa intraseluler keluar. Sedangkan tanin memiliki target mempengaruhi peptidoglikan dinding sel sehingga pembentukan sel menjadi tidak utuh kemudian masuk kedalam sel dan mengganggu metabolisme sehingga menyebabkan lisisnya bakteri (Ngajow, *et al.*, 2013).



Radulović, *et al.* (2013), dalam jurnalnya menerangkan bahwa senyawa bioaktif dari tanaman secara umum memiliki berbagai cara berbeda dalam mempengaruhi bakteri, walaupun pada dasarnya hampir seluruh bioaktif memiliki target utama yaitu membran sel. Proses bioaktif dalam menginvasi bakteri diawali dengan berdifusi melalui membran (masuknya bioaktif ke dalam sel) dan dilanjutkan dengan interaksi bioaktif dengan komponen sel bakteri. Secara umum cara kerja bioaktif dalam menginvasi bakteri **Gambar 6.** dijelaskan sebagai berikut:

- a. Bekerja dengan mempengaruhi struktur dan integrasi membrane sel, permeabilitas dan fungsionalitasnya
- b. Mengganggu sintesis dan fungsi DNA/RNA mikroba
- c. Mengganggu sistem perantara metabolisme
- d. Menginduksi penggumpalan sitoplasma
- e. Menginduksi koagulasi (pembekuan) komponen sitoplasma hingga mengganggu *quorum sensing* (QS).



**Gambar 6.** Mekanisme Antibakteri Senyawa Bioaktif (Radulović *et al.*, 2013).

Membran sitoplasma bakteri merupakan penghalang selektif yang mengontrol masuk dan keluarnya material atau zat – zat dan menampung banyak

enzim yang terlibat dalam fungsi bioenergetik, sintesis dinding sel dan sekresi makromolekul. Masuknya zat bioaktif ke fosfolipid bilayer akan memiliki efek yang sangat merugikan pada berbagai fungsi sel bakteri. Dalam beberapa kasus, penambahan zat bioaktif ini menginduksi gangguan membran yang menyebabkan kondisi tidak seimbang zat terlarut di fosfolipid bilayer dan mengakibatkan lisisnya sel bakteri (Taylor, *et al.*, 2013).

## 2.8 Hematologi Darah Ikan

Parameter hematologi (darah) ikan merupakan salah satu cara untuk mendapatkan data kondisi kesehatan atau respon fisiologis ikan yang disebabkan oleh lingkungannya. Hal ini disebabkan karena sistem sirkulasi darah ikan yang mudah ditemukan sehingga mempermudah dalam pengambilan darah ikan (Gober, *et al.*, 2013). Hal serupa dinyatakan Nugroho dan Nur (2018), bahwa parameter hematologi (darah) sangat penting untuk penentuan kondisi tubuh ikan sehingga digunakan untuk indikator sistem pertahanan tubuh bawaan dan regulasi fungsi sistem imun pada ikan. Parameter hematologi ikan tersebut diantaranya adalah sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit), limfosit, hemoglobin dan total protein.

### 2.8.1 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Sumber utama eritrosit darah ikan adalah pada ginjal kranial. Eritrosit yang sudah matang memiliki bentuk cenderung oval dengan ukuran diameter 7 – 36  $\mu\text{m}$ , sedangkan eritrosit yang belum matang akan cenderung berbentuk bulat. Peran eritrosit terhadap tubuh adalah pengikatan oksigen dan zat asam dengan kemampuan yang lebih unggul dibandingkan air. (Kilawati dan Afrianti, 2017). Hal serupa dinyatakan oleh Grant (2015), yaitu eritrosit darah ikan memiliki bentuk melingkar (seperti bentuk atom) hingga oval eliptik. Ukuran eritrosit ikan mas (*C. carpio*) umumnya lebih kecil dan memiliki bentuk agak oval dibanding dengan ikan



elasmobranch. Eritrosit memiliki beberapa fungsi, diantara fungsi tersebut yang paling utama adalah mengangkut oksigen, banyaknya oksigen tergantung pada jumlah konsentration hemoglobin dalam sel dan mekanisme pertukaran gas.

Pasca terinfeksi bakteri, ikan yang mengalami luka akan kehilangan banyak darah akibat beberapa pembuluh darah yang pecah (Kurniawan, *et al.*, 2013). Penurunan jumlah darah ini diperkirakan karena kerusakan sel darah merah akibat invasi enzim haemolisin bakteri yang bersifat toksin, sehingga terjadi lisisnya eritrosit (Minaka, *et al.*, 2012). Saat terjadi penurunan volume eritrosit, tubuh ikan akan sulit mengganti volume darah yang hilang. Akibatnya ikan mengalami anemia dan terjadi penghambatan metabolisme (Matofani, *et al.*, 2013). Pasca pengobatan, menunjukkan terjadinya peningkatan volume eritrosit. Saat jumlah eritrosit normal kembali, maka sirkulasi darah akan kembali berjalan normal (Sukarni, *et al.*, 2012).

### 2.8.2 Hemoglobin (Hb)

Parameter hemoglobin (Hb) sangat berpengaruh dengan kesehatan ikan dan erat kaitannya dengan eritrosit. Hemoglobin mengandung protein globin dan zat besi yang memiliki sifat dapat menyatu dengan oksigen sehingga hemoglobin dapat membawa oksigen keseluruh tubuh. Semakin sedikit kadar hemoglobin dalam tubuh ikan yang disebabkan terjadinya penurunan eritrosit akan menyebabkan terjadinya anemia. Anemia akan menghambat pertumbuhan ikan akibat dikarenakan terhambatnya suplai makanan ke dalam sel, jaringan dan organ pada saat rendahnya eritrosit dan hemoglobin (Matofani, *et al.*, 2013).

Kadar hemoglobin dalam darah ikan dinyatakan dengan G%. Kadar normal hemoglobin dalam darah ikan berada pada kisaran 5,05 – 8,33 G%. Penurunan kadar hemoglobin dapat menyebabkan stress yang berujung pada anemia, hal dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah perubahan kondisi lingkungan



atau kualitas air, masuknya benda asing seperti bakteri, virus dan parasit kedalam tubuh ikan, defisiensi vitamin dan rendahnya kandungan protein dalam pakan (Royan, *et al.*, 2014).

### 2.8.3 Hematokrit

Hematokrit merupakan salah satu indikator terjadinya perubahan pada tubuh ikan. Presentase hematokrit merupakan hasil dari perbandingan antara jumlah sel darah merah dengan plasma darah yang memiliki pengaruh terhadap pengaturan sel darah merah. Ikan yang mengalami stress baik pengaruh lingkungan maupun penyakit seperti bakterial akan menunjukkan terjadinya penurunan hematokrit pada darah (Azhar, 2013). Kadar hemaokrit yang dinyatakan dalam persen merupakan konsentration eritrosit dalam 100mL darah. Nilai hematokrit menurun karena menurunnya kadar sel darah (peningkatan volume plasma darah) yang menyebabkan anemia (Rasyada, *et al.*, 2014).

Hematokrit merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui ukuran volume sel darah merah. Nilai presentase hematokrit merupakan volume sel darah merah dalam darah. Pada ikan teleosteri seperti ikan mas, nilai hematokrit normal berada pada kisaran 20 – 30 %. Ukuran tubuh ikan, masa pemijahan dan jenis kelamin juga dapat mempengaruhi nilai hematokrit pada ikan. Hematokrit dalam darah akan mengalami penurunan saat terjadi infeksi. Hal ini akan menyebabkan jumlah sel darah merah berkurang dan terjadinya anemia (Royan, *et al.*, 2014).

### 2.8.4 Sel Darah Putih (Leukosit)

Sel darah putih (leukosit) yang dimiliki ikan hampir sama dengan leukosit mamalia lain, namun pembentukan leukosit pada ikan terjadi di limfa, ginjal dan timus. Jumlah leukosit pada ikan normal berbeda – beda, umumnya 20.000 hingga 150.000 sel/mm<sup>3</sup> (kilawati dan Afrianti, 2017). Jumlah leukosit ini akan berubah



saat terjadi penurunan kondisi tubuh ikan. Secara umum bentuk leukosit adalah oval, bulat lonjong dan beberapa diantaranya memiliki bentuk bulat. Kerja utama dari leukosit adalah sebagai sistem kekebalan tubuh pertama yang akan menginvasi benda asing (patogen) (Noerchoclis, *et al.*, 2013). Ikan yang terinfeksi bakteri akan menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah leukosit. Leukosit memperbanyak diri dan bekerja untuk memfagosit (menelan bakteri) serta membentuk antibodi (Mahasri, *et al.*, 2011). Hal ini disebabkan karena leukosit merupakan agen sistem imun non spesifik yang akan melakukan migrasi dari tempat asalnya menuju daerah yang terinfeksi untuk melakukan pertahanan sistem imun tubuh. Sel – sel leukosit akan bermigrasi melalui dinding kapiler untuk mencapai tempat infeksi (Kurniawan, *et al.*, 2014).

### 2.8.5 Diferensial Leukosit

Pada umumnya leukosit normal ikan terbagi menjadi dua yaitu granulosit dan agranulosit. Granulosit pada tubuh ikan mas (*C. carpio*) terdiri dari 3, 25% - 8,4% neutrofil, 2,4 % - 8% eosinophil dan 0,2% basophil. Agranulosit ikan mas (*C. carpio*) terdiri dari 60,2% - 81% limfosit dan 1% - 8% monosit (Afifah, *et al.*, 2014).

Karakteristik dan fungsi beberapa diantaranya dijelaskan sebagai berikut:

#### 2.8.3.1 Limfosit

Bentuk sel limfosit hampir serupa dengan bentuk sel darah putih lainnya yaitu oval yang diiringi dengan inti sel besar berwarna ungu violet. Inti sel limfosit besar dan hampir memenuhi seluruh bagian sel limfosit (Septriani, *et al.*, 2012).

Hal serupa dinyatakan Kilawati dan Afrianti (2017), bahwa sel limfosit berbentuk *spherical*. Saat terjadi kontak antara limfosit dan APC yang membawa benda asing akan menyebabkan sel limfosit berproliferasi dan kemudian berdiferensiasi memproduksi antibodi.



Limfosit merupakan anggota sel darah putih (leukosit) dengan presentase terbanyak dan sangat memiliki peran pada sistem pertahanan tubuh humoral ikan. Pada umumnya fungsi dari sel B limfosit ikan sama dengan mamalia lainnya, yaitu memproduksi immunoglobulin M (IgM). Limfosit (Sel B) pada ikan memiliki keunikan yaitu dapat melakukan aktifitas microbial dan fagositosis. Umumnya limfosit akan mengalami kondisi limfopenia saat terserang penyakit MAS yang disebabkan oleh *A. hydrophila* (Thrall, *et al.*, 2012).

### 2.8.3.2 Neutrofil

Neutrofil sering didefinisikan sebagai granulosit utama pada ikan. Sel ini memiliki bentuk melingkar hingga oval yang disertai inti nukleus dengan bentuk yang tidak beraturan. Sel neutrofil yang matang menunjukkan bentuk yang bervariasi seperti bulat, oval, bertakuk, memanjang hingga bersegmen. Sitoplasma dari nukleus matang berwarna keabu – abuan hingga tidak berwarna, sedangkan neutrofil yang belum matang akan berwarna abu – abu atau biru keabu-abuan (Campbell dan Ellis, 2013).

Neutrofil atau biasa disebut *polimoronuklear* (PMN) merupakan sel yang akan bekerja pertama kali menghadang kawanan bakteri dan akan sangat mendominasi pada daerah terjadinya inflamasi. Sel ini akan menelan bakteri atau mikroba yang berada dalam darah maupun jaringan dengan cepat, sayangnya sel ini hanya memiliki waktu untuk bertahan hidup dalam beberapa jam saja (Abbas, *et al.*, 2016). Saat terjadi invasi bakteri jumlah sel ini akan meningkat didalam sirkulasi darah (heterofilia) dan di jaringan tubuh ikan (Mahasri, *et al.*, 2011).

### 2.8.3.3 Monosit

Karakteristik bentuk monosit ikan adalah bulat memanjang (oval) dan memiliki inti sel yang serupa dengan bentuk selnya, namun beberapa diantaranya ditemukan memiliki inti sel berbentuk jantung (Septriani, *et al.*, 2012). Peran utama



dari sel monosit jauh lebih kuat dibanding sel neutrofil, hal ini disebabkan karena selain tugasnya memfagosit benda asing, monosit juga memiliki peran sebagai sel penyaji antigen/*antigen presenting cells* (APC). Tugas APC adalah menangkap benda asing dan menyajikannya kepada limfosit T. (Afifah, *et al.*, 2014).

Berbeda dengan neutrofil, monosit memiliki waktu hidup yang lebih lama dan bekerja memfagosit benda asing (termasuk bakteri) dalam darah dan jaringan.

Saat terjadi reaksi inflamasi dalam jaringan, monosit akan menembus kedalam jaringan tersebut kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag ini sering sekali terlihat berada pada semua jaringan ikat dan organ. Sel ini disebut sebagai *mononuclear* (MN) karena cara kerjanya sebagai sistem fagositosis (Abbas, *et al.*, 2016).

## 2.9 Histopatologi Organ Ikan

Histopatologi (HP) di bidang perikanan digunakan untuk indikator kesehatan ikan, karena HP memberikan informasi mengenai efek kronis atau bahkan mematikan dari *xenobiotic* (benda asing termasuk bakteri) yang menyerang organ tubuh ikan dan efek stress dari ikan. Penerapan HP biasanya pada penelitian untuk mengetahui kerusakan yang ditimbulkan oleh lingkungan dan juga hama penyakit. Indikator HP yang sering digunakan dalam menilai status kesehatan ikan adalah hati, insang, ginjal dan kulit ikan (Rascovic, *et al.*, 2013).

Studi HP ini melibatkan bioassay ikan yang ditempatkan pada satu wadah untuk pengujian toksisitas zat tunggal atau gabungan. Penggunaan HP ini sudah lama dan diakui sebagai metode yang berharga untuk mengidentifikasi efek toksik dari *xenobiotic* karena HP lebih mencerminkan kondisi kesehatan ikan yang sebenarnya dibandingkan dengan metode biomarker atau diagnosis lainnya.

Perubahan histopatologi yang diamati dalam rangkain perlakuan dengan waktu tertentu adalah pada organ hati yang paling terpengaruh oleh *xenobiotic*, kemudian



diikuti limfa, batang ginjal dan organ eksternal seperti insang dan kulit (Annabi, *et al.*, 2013).

### 2.9.1 Organ Ginjal

Antigen atau patogen berbahaya masuk kedalam tubuh melalui insang dan diteruskan keseluruh tubuh melalui aliran darah. Patogen tersebut akhirnya akan terakumulasi pada organ ginjal ikan. Paparan patogen yang terjadi terus menerus akan menyebabkan rusaknya ginjal dikarenakan keterbatasan pada organ ini dalam menyaring zat asing atau patogen. Perubahan yang terjadi pada organ ginjal ini adalah indikator masuknya suatu benda asing atau penyakit kedalam tubuh ikan (Dadiono, 2017).

Ginjal sangat berperan dalam sistem ekskresi. Pada ikan fungsi ginjal adalah sebagai proses osmoregulasi (Burhanuddin, 2015). Paparan toksin bakteri pada ginjal menyebabkan kelainan berupa kongesti, nekrosis dan degenerasi pada jaringan ginjal ikan yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Degenerasi merupakan kelainan yang dicirikan dengan terdapat ruang kosong dan tumpukkan sel berwarna hitam dengan jelas sedangkan nekrosis adalah kerusakan sel yang berujung pada kematian sel. Sel yang mengalami nekrosis akan memiliki warna yang pucat dan rapuh (Cahyaningrum, *et al.*, 2015).

### 2.10 Gejala Klinis Infeksi *A. hydrophila*

Ikan yang terinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* selama 48 jam menunjukkan gejala klinis pada bagian morfologi seperti terjadi perubahan warna tubuh menjadi keputihan, sirip tergeripis, hemoragik pada permukaan tubuh dan terjadi hipertropi pada organ internal (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010). Haryani, *et al.*, (2012) menambahkan dalam jurnalnya, ikan yang diinfeksi dengan cara injeksi mengalami inflamasi atau radang pada bagian bekas injeksi. Selain itu setelah 48



jam ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* akan menunjukkan gejala pendarahan atau hemoragik dengan ciri terkelupas bagian kulit dan keluarnya darah. Apabila diamati dari cara berenang, ikan sakit ini mengalami ketidakseimbangan tubuh sehingga berenang dengan posisi miring. Infeksi bakteri ini akan menyebabkan ikan menjadi lemas dengan pergerakan yang tidak terlalu aktif, nafsu makan berkurang. Pada pengamatan morfologi terjadi perbesaran jaringan dan nekrosis pada kulit, serta inflamasi ginjal, hati dan limpa (Lusiastuti, *et al.*, 2016). Rosmawaty, *et al.* (2016), menambahkan gejala klinis berupa perubahan fisik seperti mana menonjol, sirip rusak, sisik mengelupas, terdapat bercak merah dan perubahan tingkah laku seperti respon terhadap pakan berkurang dan pergerakan lebih lambat.

### 2.11 Kualitas Air

Suhu memainkan peran penting dalam pengaturan laju aktivitas mikroba, penyebaran sinyal biofilm dan pengendapan organisme dalam sistem akuatik (Mizan, *et al.*, 2018). Faktor virulensi *A. hydrophila* memiliki ekspresi yang berbeda-beda. Pada umumnya bakteri ini akan tumbuh baik pada suhu 28<sup>o</sup> C atau lebih, namun tetap dapat beradaptasi pada suhu yang lebih rendah yaitu 4<sup>o</sup>C dengan kapasitas toksin yang masih membahayakan (Rasmussen-Ivey, *et al.*, 2016). Di sisi lain, suhu optimum untuk pertumbuhan ikan mas (*C. carpio*) 25<sup>o</sup>C hingga 28<sup>o</sup>C (Pratama, *et al.*, 2017).

Selain suhu, pH merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan optimal *A. hydrophila*. Pada umumnya *A. hydrophila* dapat hidup pada rentang pH 4,5 sampai 9, namun pertumbuhan optimal bakteri ini berada pada rentang pH 5,5 sampai 9. Pada kondisi pH optimal, *A. hydrophila* mampu memproduksi berbagai jenis enzim hidrolitik seperti esterase, amilase, kitinase, lipase dan peptidase (Igbinosa, *et al.*, 2012). Sedangkan pada ikan mas (*C.*

*carpio*), pH memiliki peran dalam pertumbuhan dan kelulushidupan. Pada umumnya kondisi pH yang baik untuk ikan mas (*C. carpio*) adalah 7 – 8,5.

Parameter lainnya yang tak kalah penting bagi budidaya ikan adalah *dissolved oxygen* (DO). Budidaya ikan mas (*C. carpio*) akan mencapai titik optimal untuk pertumbuhan dan kelangsungan pada kondisi DO diatas 5 mg/l (Raskovic, *et al.*, 2010). Penurunan konsententrasi DO yang drastis akan menyebabkan berkembangnya bakteri *A. hydrophila* (Bastardo, *et al.*, 2012).





### III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

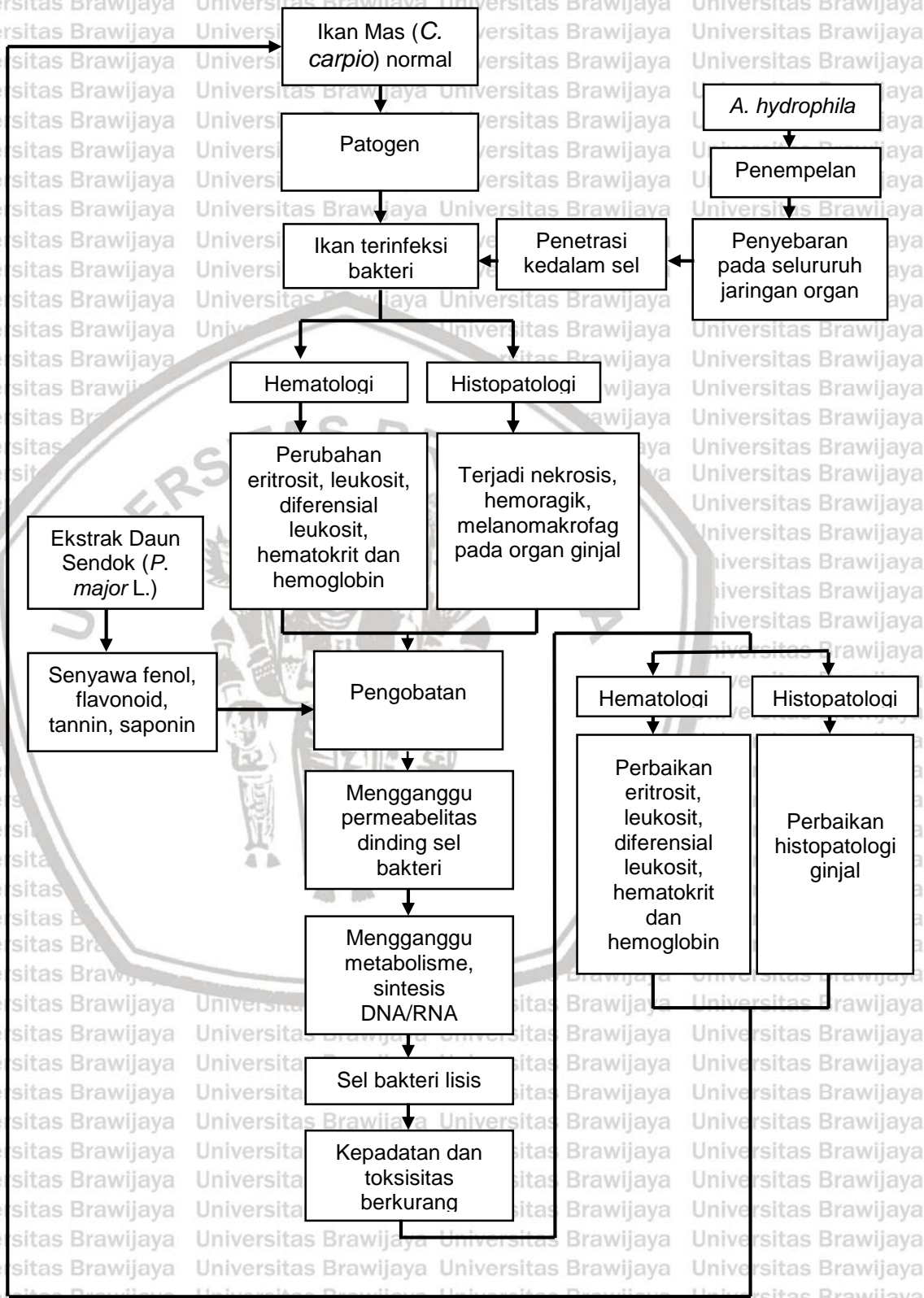
#### 3.1 Landasan Teori

Kementrian Kelautan dan Perikanan optimis pada peningkatan produksi ikan mas (*C. carpio*) dengan target pada tahun 2018 dan 2019 masing-masing adalah 658,998 dan 785,800 ton (DJPB-KKP, 2017). Hal ini disebabkan ikan mas (*C. carpio*) memiliki kandungan asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) dan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) (Kuvendziev, *et al.*, 2018). Karena nilai gizinya yang tinggi, ikan mas (*C. carpio*) sangat digemari oleh masyarakat. Sayangnya untuk memenuhi pencapaian target produksi, budidaya ikan mas masih memiliki kendala (Samsundari, 2008). Kendala terbesar disebabkan oleh penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) (Hanson, *et al.*, 2014). Wabah penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* (Sarjito, *et al.*, 2018). Bakteri ini muncul dan menginvasi ikan pada saat terjadi perubahan lingkungan seperti kondisi hipoksia, kadar nitrit yang tinggi dan peningkatan suhu yang akan meningkatkan faktor virulensi seperti hemolisin (Rasmussen-Ivey, *et al.*, 2016).

Permasalahan penyakit ini terpecahkan dengan penggunaan antibiotik, namun antibiotik sangat berbahaya dan menyebabkan bakteri akan mengalami mutasi serta timbulnya resistensi, selain itu antibiotik dapat meninggalkan residu dalam tubuh ikan dan lingkungan perairan (Bbosa, *et al.*, 2014). Alternatif pengganti antibiotik yang dianjurkan adalah menggunakan tanaman herbal, salah satunya daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki kandungan senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa – senyawa tersebut diduga mampu berperan sebagai antibakteri dengan mengganggu fungsi membran sel *A. hydrophila*. Sehingga diharapkan dapat memperbaiki kerusakan sel darah dan jaringan ikan mas (*C. carpio*).

### 3.2 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini disajikan pada Gambar 7 berikut ini:



Gambar 7. Kerangka Konsep



### 3.3 Hipotesis

Penelitian ini memiliki hipotesis sebagai berikut:

H<sub>0</sub>: Diduga Pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antibakteri tidak memberikan pengaruh terhadap hematologi darah dan histopatologi organ ginjal ikan ikan mas (*C. carpio*) setelah diobati.

H<sub>1</sub>: Diduga Pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antibakteri memberikan pengaruh terhadap hematologi darah dan histopatologi organ ginjal ikan ikan mas (*C. carpio*) setelah diobati.

### 3.4 Kerangka Operasional

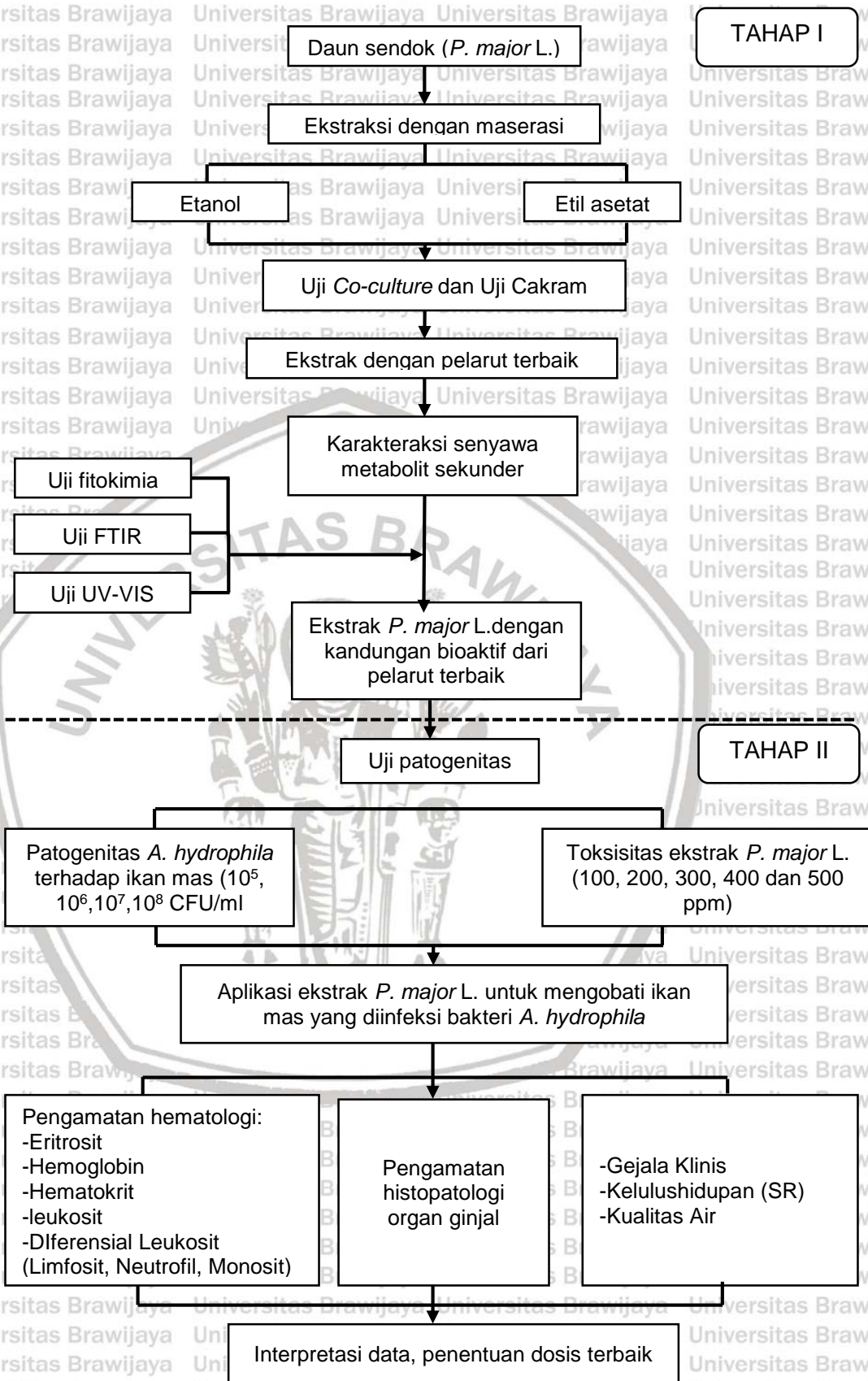
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dan deskriptif. Pelaksanaan dalam penelitian ini dibagi dalam dua tahapan yang dijadikan dalam satu kerangka operasional **Gambar 8**. Tahapan penelitian ini dijelaskan sebagai berikut:

**I. Penelitian Tahap I, yaitu Ekstraksi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Pada Daun Sendok (*P. major L.*) dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *A. hydrophila***

- a) Ekstraksi daun sendok (*P. major L.*) menggunakan pelarut polar (etanol) dan semi polar (etil asetat).
- b) Uji *Co-culture* dan cakram
- c) Karakterisasi kandungan senyawa metabolit sekunder *P. major L.*

**II. Penelitian Tahap II, yaitu Pengaplikasian Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) Pada Ikan Mas yang Diinfeksi *A. hydrophila* Pada Skala Laboratorium**

- a) Uji patogenitas bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan mas (*C. carpio*)
- b) Uji toksisitas ekstrak daun sendok (*P. major L.*)
- c) Aplikasi daun sendok (*P. major L.*) untuk pengobatan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. (pengamatan hematologi, histopatologi ginjal, gejala klinis, kelulushidupan dan kualitas air).



Gambar 8. Kerangka Operasional Penelitian



### 3.5 Penelitian Terdahulu

Penelitian sebelumnya yang menggunakan daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Tabel 2** sebagai berikut:

**Tabel 2.** Penelitian Terdahulu

No.	Penulis	Judul	keterangan
1.	Najib, et al. (2012)	Isolation and Identification of Antibacterial Compound from Diethyl Ether Extract of <i>Plantago major L.</i>	Menggunakan pelarut methanol mampu menghambat <i>E. coli</i> dan <i>Vibrio sp.</i>
2.	Metiner, et al. (2012)	Antibacterial effects of Ethanol and Acetone Extract of <i>Plantago major L.</i> on Gram positive and Gram-Negative Bacteria	Pelarut aseton lebih baik menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif dibanding pelarut etanol
3.	Raziq, et al. (2012)	The Study Activity of <i>Plantago Major</i> and <i>Ceratonia Silqua</i>	Ekstrak methanol <i>P. major L.</i> mampu menghambat bakteri gram positif dan negatif
4.	Adriaan, et al. (2014)	Parameter Farmakologi Simplisia <i>Plantago major L.</i> dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>Plantago major L.</i> Secara In Vitro	<i>P. major L.</i> yang dimaserasi bertingkat dengan pelarut n-heksan dan methanol hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri <i>S. aureus</i>
5.	Sitorus (2017)	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Sendok ( <i>Plantago major</i> ) Terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	Ekstrak etanol <i>P. major</i> mampu menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> dengan baik dibanding air dan fraksi etil asetat
6.	Behrooz, et al. (2017)	The Antimicrobial Effect and Interaction Between The Aqueous and Ethanolic Extract <i>Plantago major</i> on <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Escherchia coli</i> and <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> in Vitro	Ekstrak air dan etanol <i>P. major</i> mampu menghambat <i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> dan <i>P aeruginosa</i>

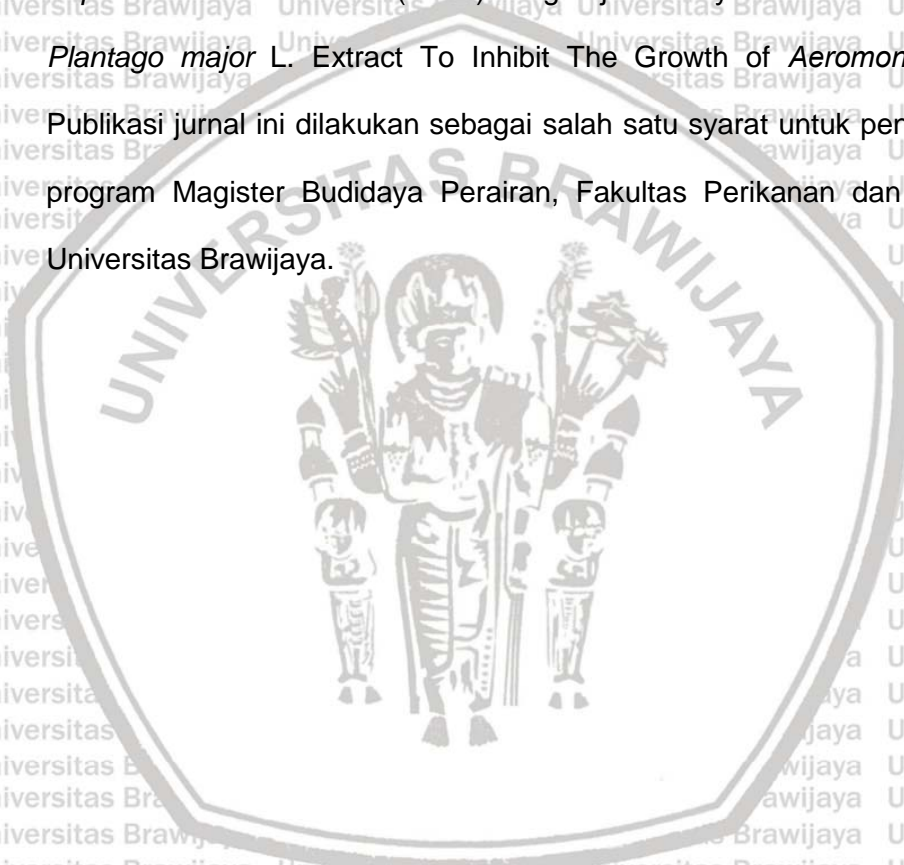
Hasil dari beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa daun sendok (*P. major L.*) memiliki sifat antibakteri. Namun belum ada laporan aktivitas

antibakteri daun sendok (*P. major L.*) terhadap bakteri *A. hydrophila* serta belum ada pemanfaatan pada budidaya perikanan khususnya pada pengobatan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, sehingga penelitian ini masih tergolong penelitian baru.

### 3.6 Strategi Publikasi

Hasil dari penelitian tahap I ini dipublikasikan di *The Journal of Experimental Life Science (JELS)* dengan judul 'Phytochemicals and The Ability of *Plantago major L.* Extract To Inhibit The Growth of *Aeromonas hydrophila*'.

Publikasi jurnal ini dilakukan sebagai salah satu syarat untuk penyelesaian studi program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.





#### IV. METODE PENELITIAN

##### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan disajikan pada **Tabel 3** di bawah ini:

**Tabel 3.** Desain Penelitian

Pokok Pembahasan	Hasil
Masalah Penelitian	Bagaimana pengaruh penggunaan ekstrak daun sendok ( <i>P. major L.</i> ) terhadap hematologi dan organ ginjal ikan mas ( <i>C. carpio</i> ) yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i>
Tujuan Penelitian	Mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun sendok ( <i>P. major L.</i> ) terhadap hematologi dan organ ginjal ikan mas ( <i>C. carpio</i> ) yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i>
Variabel data dan Sumber Data	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Variabel bebas yang digunakan adalah ekstrak daun sendok (<i>P. major L.</i>)</li> <li>➤ Variabel terikat yang digunakan adalah uji pengamatan darah dan organ</li> </ul>
Metode Pengumpulan Data	Eksperimental
Metode Analisa Uji	Skrining fitokimia, uji karakterisasi senyawa FTIR dan UV-VIS, Uji patogenitas bakteri dan toksisitas ekstrak daun sendok ( <i>P. major L.</i> ) terhadap ikan mas ( <i>C. carpio</i> ), uji hematologi dan uji histopatologi organ ginjal
Metode Analisa data	RAL (Rancangan acak lengkap)

##### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 – Maret 2019, bertempat di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan,

Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan, Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya serta Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.

### 4.3 Materi Penelitian

#### 4.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, *rotary vacuum evaporator*, *vortex mixer*, sendok bahan, nampan, corong, timbangan digital, timbangan analitik, botol film, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, bola hisap, bunsen, hot plate, spektrofotometer, pipet tetes, botol sprayer, *laminar air flow* (LAF), oven, kulkas, *incubator*, gelas ukur, autoklaf, *beaker glass*, akuarium, aerator, blower, selang aerator, batu aerasi, *heater* akuarium, *sectio set*, spuit *thermo*, tabung *Eppendorf*, pipet thoma eritrosit, pipet thoma leukosit, *object glass*, *cover glass*, *haemocytometer*, mikrohematokrit, botol vial, tip mikropipet, pinset, mikroskop cahaya, pipet tetes, *hand tally counter*, *haemofuge*, pH meter, DO meter, *thermometer*

#### 4.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam kegiatan ekstraksi adalah daun sendok (*P. major L.*), pelarut untuk maserasi yaitu etanol dan etil asetat dengan kualitas pro-analisis (PA), kertas saring merk dagang Whatman No. 42, *aluminium foil* dan *plastic wrap*, DMSO dan *hydrobat*.

Untuk kultur bakteri dan uji daya hambat antibakteri, bahan yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, media kultur yaitu *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptone Soya Broth* (TSB), Aquades, Alkohol, kertas cakram dengan diameter 6 mm dan alkohol.



Untuk penelitian tahap II, bahan yang digunakan adalah ikan mas (*C. carpio*) dengan ukuran 7 – 10 cm yang diperoleh dari Pasar Ikan Punten, Batu, Jawa Timur, pakan pellet 5% dari berat tubuh ikan, ekstrak daun sendok (*P. major* L.) Pada pengamatan hematologi bahan yang dibutuhkan adalah EDTA sebagai anti koagulan, larutan turk, giemsa, methanol, sampel darah ikan, aquades steril, hayem, HCl 0,1%, *emersion oil* dan tissue. Pada pengamatan histopatologi bahan yang digunakan adalah formalin 10%, acetone, xylol, paraffin blok, alcohol 96%, pewarna haematoksilin, eosin, aquades dan sampe jaringan organ ginjal ikan mas (*C. carpio*).

#### 4.4 Metode Penelitian

Dalam penelitian ini, metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen menggunakan pendekatan kuantitatif yang terdiri dari tiga syarat yaitu mengontrol, memanipulasi dan observasi dengan menggunakan beberapa variabel bebas dan variabel terikat yang telah ditentukan oleh peneliti. Penelitian dengan metode ini mengharuskan semua variabel yang dicoba diukur dengan instrumen yang sudah distandardisasi, selain itu digunakan perlakuan kontrol yang digunakan sebagai perbandingan terhadap hasil uji (Noor, 2016).

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Rancangan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Andriani, *et al.* (2017), menyatakan bahwa karakteristik RAL adalah variasi atau keragaman hanya disebabkan oleh perlakuan yang merupakan suatu level dari faktor tertentu, sedangkan faktor diluar perlakuan seperti kondisi lingkungan dilakukan dengan homogen. Penempatan dari setiap perlakuan yang diberikan dilakukan secara acak. Ada beberapa keuntungan dari penggunaan RAL diantaranya adalah:

- a) Kemudahan dalam pembuatan denah rancangan percobaan
- b) Sangat sederhana dan mudah dalam pemberian perlakuan, pengulangan dan jumlah penggunaan
- c) Analisa statistik terhadap percobaan sangat elementer (mudah).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut:

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

Dimana,

$Y_{ij}$  = Respon atau nilai pengamatan perlakuan ke-i, ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai rata – rata

$T_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan perlakuan kei, ulangan ke-j

Perlakuan yang digunakan pada penelitian tahap II terdiri dari 5 dosis yang berbeda, kontrol positif, kontrol negatif dan ulangan sebanyak 3 kali. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

Perlakuan A = Perlakuan dengan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) 75 ppm

Perlakuan B = Perlakuan dengan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) 150 ppm

Perlakuan C = Perlakuan dengan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) 225 ppm

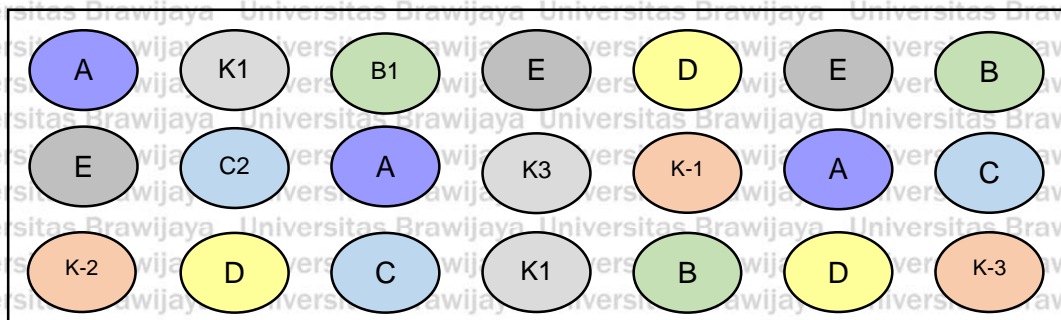
Perlakuan D = Perlakuan dengan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) 300 ppm

Perlakuan E = Perlakuan dengan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) 375 ppm

Perlakuan K(-) = Perlakuan infeksi bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan K(+) = Perlakuan tanpa infeksi dan tanpa pemberian ekstrak

Adapun denah dari penelitian ini disajikan dalam **Gambar 9** dibawah ini



**Gambar 9.** Rancangan Penelitian



Keterangan:

ABCDE = Perlakuan yang diberikan

1,2,3 = Ulangan

K- = Kontrol negatif

K+ = Kontrol positif yang digunakan sebagai kontrol normal

#### 4.6 Parameter Uji

##### 4.6.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini adalah:

- Uji *Co-culture* dan cakram
- Karakterisasi metabolit sekunder menggunakan uji fitokimia, FTIR dan UV-VIS
- Uji toksisitas ekstrak dan uji patogenitas bakteri *A. hydrophila*
- Pengamatan hematologi yang terdiri dari eritrosit, hematokrit, hemoglobin leukosit, diferensial leukosit (limfosit, monosit, neutrofil), setelah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan setelah diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*)
- Pengamatan organ ginjal ikan mas (*C. carpio*) setelah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan setelah diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*)
- Pengamatan gejala klinis respon makan seperti tingkah laku dan kerusakan morfologi ikan mas (*C. carpio*)
- Pengamatan *Survival Rate* (SR)

##### 4.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah pengamatan kualitas air yang dilakukan setiap hari meliputi suhu, DO dan pH.

#### 4.7 Tahap Penelitian

##### 4.7.1 Penelitian Tahap I

Penelitian tahap I yang akan dilakukan adalah ekstraksi, uji aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila* dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder

yang terdapat pada ekstrak daun sendok (*P. major L.*). Adapun rangkaian dari penelitian tahap I dijelaskan sebagai berikut:

#### 4.7.1.1 Ekstraksi Daun Sendok (*P. major L.*)

Daun sendok (*P. major L.*) seluruh bagian tanamannya dikumpulkan, dan dibersihkan dengan air mengalir, setelah itu dikeringanginkan dan dipotong kecil-kecil. Seluruh bagian tanaman yang terpotong kecil – kecil ini dikeringkan dalam ruangan serta dihindari dari panas matahari. Kemudian digiling dengan blender dan diayak hingga diperoleh serbuk yang halus. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan metode yang lebih praktis, menggunakan pelarut untuk perendaman dengan tujuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder dari bahan yang diinginkan (Putra, *et al.*, 2014). Maserasi daun 100 g serbuk sendok (*P. major L.*) direndam dalam 500 ml pelarut (1:5) selama 5 hari seraya diaduk kemudian disaring. Hasil maserasi kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 50°C hingga memperoleh ekstrak etanol kental. Hal yang serupa dilakukan pada pelarut etil asetat hingga memperoleh ekstrak etil asetat kental.

#### 4.7.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri

##### a) Kultur Bakteri *A. hydrophila*

Biakan bakteri *A. hydrophila* murni diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Biakan murni tersebut dikultur pada media cair *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan prosedur sebagai berikut:

- Media TSB disiapkan kedalam erlenmeyer sebanyak 5 ml
- Diambil satu ose bakteri dari kultur murni, kemudian dicelupkan kedalam media TSB
- Larurutan TSB yang telah dicelupkan bakteri *A. hydrophila* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada incubator dengan suhu 31 – 33°C



- Setelah 24 jam apabila media berwarna keruh menunjukkan bahwa bakteri telah tumbuh

- Semua proses dilakukan dengan steril menggunakan aseptis alcohol 70%

#### b) Uji Co-Culture

Uji co-culture dilakukan dengan penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). Langkah uji

MIC disajikan sebagai berikut:

- Disiapkan DMSO 10%, tabung reaksi steril berisi TSB dan larutan Na-fis

- Tabung reaksi 1 sampai dengan 5 diisi ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan konsentrasi 1, 10 100, 500 dan 1000 ppm, tabung reaksi 6 dan diisikan antibiotik sebagai kontrol positif dan tabung reaksi 7 tidak diisi ekstrak maupun antibiotik sebagai kontrol negatif

- Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri pada bakteri dari kepadatan  $2,35 \times 10^{10}$  sel/ml berdasarkan data OD yang disajikan pada **Lampiran 1**.

Pengenceran dilakukan dengan menggunakan Na-fis diambil sebanyak 1 ml dan dituangkan pada tabung reaksi yang berbeda dari tabung 1 ke tabung 2 kemudian di vortex untuk menghomogenkan, dan dilakukan pengenceran lagi dari tabung 2 ke tabung 3 hingga kepadatan  $10^7$  sel/ml

- Bakteri dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi dosis yang berbeda dan divortex.

- Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam kemudian diamati kekeruhan dengan visulasiasi dan spektrofotometer.

Kemudian hasil dari MIC dilakukan inokulasi untuk uji MBC. Dilakukan pengenceran menggunakan NaFis untuk memudahkan perhitungan jumlah koloni bakteri. Pengenceran pada 3 tabung terakhir ditanam dengan metode tuang pada media PCA dengan suspense 0,1 ml. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dan dihitung jumlah koloni yang terdapat pada media. Hasil nilai MBC dilihat dari



konsentrasi ekstrak yang dapat membuat tidak tumbuhnya koloni bakteri dalam cawan petri.

### c) Uji Cakram (Zona Hambat Bakteri)

Tahap uji cakram ini dilakukan untuk menentukan pelarut dengan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan kemudian akan digunakan sebagai acuan untuk pengobatan pada ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri tersebut. Tahapan dalam uji cakram ini akan dijelaskan sebagai berikut:

- Disiapkan media pada *Trypticase Soy Agar (TSA)* kedalam cawan petri dan ditunggu hingga padat dan dingin
- Bakteri dalam media TSB dituangkan 0,1 ml menggunakan mikropipet dan ditebar di media TSA kemudian diratakan dengan cara membentuk angka 8
- Disiapkan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan berbagai dosis menggunakan DMSO 10% serta kertas cakram dengan diameter 6 mm.
- Kertas cakram direndam kedalam ekstrak daun sendok (*P. major L.*) selama 15 menit berdasarkan dosis yang telah ditentukan, ditiriskan dan diletakan dipermukaan lempeng media TSA yang telah ditumbuhi *A. hydrophila*
- Diinkubasi selama 24 jam dalam pada suhu ruang 31 – 33°C dan dihitung zona hambat yang membentuk disekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital.

#### 4.7.1.2 Uji Skrinning Fitokimia

##### 1) Analisa Senyawa Flavonoid

Ekstrak daun sendok (*P. major L.*) ditambahkan etanol 95%, kemudian dipanaskan. Lapisan yang terdapat diatas pipet kemudian ditambahkan dengan larutan HCl pekat 2N dan serbuk Mg. Flavonoid yang terdeteksi akan terlihat dengan terbentuknya warna merah (Lumbessy, *et al.*, 2015).

##### 2) Analisa Senyawa Fenolik



Pengujian senyawa fenolik dimulai dari sampel ekstrak sebanyak 1 – 2 tetes dan dimasukkan kedalam plat tetes, kemudian ditambah 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  5%. Ekstrak yang mengandung senyawa fenolik akan membentuk warna hijau, hitam, dan kebiruan yang kuat (Putri dan Hidajati, 2015).

### 3) Analisa Senyawa Alkaloid

Sampel ekstrak sebanyak 5 ml dicampurkan dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2ml dan dihomogenkan hingga terbentuk lapisan. Lapisan atas diambil dan ditetaskan dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendrof. Sampel yang mengandung alkaloid akan menghasilkan endapan dengan warna putih, coklat dan merah jingga (Sitorus, 2017).

### 4) Analisa Senyawa Saponin

Metode uji saponin mengacu pada Putri dan Hidajati (2015), yaitu sampel ekstrak 1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml aquadest, setelah itu dipanaskan. Hasil ekstrak yang mengandung saponin akan membentuk busa dengan buih yang bertahan selama 2 – 4 menit.

### 5) Analisa Senyawa Steroid/Triterpenoid

Pengujian senyawa triterpenoid mengacu pada metode Adhayanti, *et al.* (2018), yaitu ekstrak daun sendok (*P. major L.*) sebanyak 5 ml dicampur dengan 2 ml kloroform, setelah itu ditambahkan kembali 3 ml asam sulfat pekat. Ekstrak yang mengandung senyawa triterpenoid akan menunjukkan warna merah hingga kecoklatan pada permukaannya.

### 6) Analisa Senyawa Tanin

Ekstrak daun sendok (*P. major L.*) diambil dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu dimasukkan 10 ml air dengan suhu panas dan dihomogenkan. Hasilnya ditambahkan dengan 20 ml  $\text{NaCl}$  10%, kemudian disaring. Hasil filtrat dari penyaringan ditambahkan  $\text{FeCl}_3$ . Ekstak yang positif

mengandung senyawa tanin akan mengalami perubahan warna menjadi biru tua atau hitam (Adhayanti, *et al.*, 2018).

#### 4.7.1.3 Analisa FTIR

Identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR yang mengacu pada Sariningsih, *et al.*, (2015).. Sampel ekstrak daun sendok (*P. major L.*) ditambakan dengan KBr (Kalium bromida) dalam mortar dengan menggunakan perbandingan 1 : 200. Kemudian sampel dan KBr dipress dengan tekanan 6 bar selama 2 menit hingga menjadi seperti pellet. Pellet sampel kemudian diletakkan didalam alat spektrofotometri FTIR (FT1000 Varian)

#### 4.7.1.4 Analisa UV-VIS

Analisa UV-Vis dilakukan dengan mengacu pada metode Jain, *et al.* (2016), menggunakan spektrofotometri UV-Visible (Cary50 Conc Varian). Ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disentrifugasi pada 300 rpm selama 10 menit. Ekstrak kemudian diencerkan dengan menggunakan etanol 1:10, lalu diperiksa dibawah sinar UV panjang gelombang 200 – 800 nm.

### 4.7.2 Penelitian Tahap II

Pada tahap ini, dilakukan pengobatan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dari pelarut yang menghasilkan aktivitas antibakteri paling baik pada skala laboratorium. Adapun rangkaian langkah penelitian pada tahap II ini akan dijelaskan sebagai berikut:

#### 4.7.2.1 Uji Patogenitas *A. hydrophila*

Uji patogenitas digunakan untuk mengetahui berapa kepadatan yang dibutuhkan bakteri *A. hydrophila* untuk menghasilkan 50% kematian hewan uji dalam jangka waktu tertentu. Persiapan awal yaitu biakan bakteri *A. hydrophila*



dengan konsentrasi  $2,35 \times 10^{10}$  sel/ml (berdasarkan data OD) diencerkan menjadi berbagai macam konsentrasi yang berbeda dimulai dari  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  dan  $10^5$  sel/ml dalam media TSB. Kemudian dilakukan perhitungan yang disajikan pada

**Lampiran 1** dengan rumus sebagai berikut:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:

$N_1$  : Kepadatan bakteri dalam media TSB (sel/ml)

$V_1$  : Volume bakteri dalam TSB yang dibutuhkan

$N_2$  : Kepadatan bakteri yang dicari (sel/ml)

$V_2$  : Volume media air dalam wadah perendaman

Setiap konsentrasi bakteri diinkubasi pada suhu  $27 - 30^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

Ikan mas (*C. carpio*) berisi 10 ekor dalam setiap akuarium yang berbeda kemudian diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi yang berbeda dengan cara perendaman. Pengamatan dilakukan setiap 4 jam sekali. Ikan yang mati dihitung pada awal infeksi sampai dengan 24 jam. Setelah perlakuan perendaman ekstrak, diamati perubahan tingkah laku dan dicatat waktu serta jumlah ikan yang mati hingga 50%. Data kemudian dianalisa dengan menggunakan EPA *Prohibit*

*Analysis*.

#### 4.7.2.2 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Uji toksisitas ekstrak ini dilakukan guna mendapatkan konsentrasi ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang diperkirakan dapat menyebabkan efek kematian sebesar 50% terhadap populasi hewan uji setelah 48 jam perlakuan. Langkah awal adalah 10 ekor ikan mas (*C. carpio*) diaklimatisasi kedalam wadah akuarium selama 7 hari dan diberi pakan pellet. Setelah itu dilakukan perendaman ekstrak pada dosis 100, 200, 300, 400 dan 500, perhitungan dosis disajikan pada

**Lampiran 2**. Dosis diambil dari hasil tahap satu in vitro pada uji cakram dengan



mengamati zona hambat. Setelah perlakuan perendaman ekstrak, diamati perubahan tingkah laku dan dicatat waktu serta jumlah ikan yang mati hingga 50%.

Data kemudian dianalisa dengan menggunakan EPA *Prohibit Analysis*.

#### 4.7.2.3 Aplikasi Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) Pada Ikan yang Telah Diinfeksi Bakteri

Setelah ditentukan konsentrasi patogen bakteri *A. hydrophila* dan menentukan dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dilakukan aplikasi ekstrak pada ikan yang diinfeksi bakteri. Langkahnya adalah persiapan ikan mas (*C. carpio*) umur 2 bulan dengan ukuran 7 – 10 cm dan berat 8 – 13 gram sebanyak 15 ekor per akuarium. Ikan mas direndam dengan bakteri *A. hydrophila* hingga menunjukkan gejala klinis seperti tubuh lemah, warna tubuh menjadi gelap, sirip tergeripis hingga hemoragik yang diamati secara deskriptif. Penginfeksi dilakukan selama 12 jam (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010) setelah itu diambil darah dan organ ginjal untuk diamati.

Setelah 12 jam ikan yang terinfeksi dipindahkan ke akuarium dengan yang berisi ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan dosis berbeda. Pengobatan ikan dilakukan dengan metode perendaman hingga 24 jam. Metode perendaman dinilai lebih aplikatif karena senawa antibakteri yang larut dalam air dapat terserap baik oleh tubuh, selain itu metode perendaman lebih mempermudah proses pengobatan pada ikan berukuran kecil (Haryani, *et al.*, 2012). Ikan kemudian dipindahkan pada akuarium pemeliharaan hingga 7 hari. Pada akhir pengamatan diambil darah dan organ ginjal untuk diamati. Selama proses penyembuhan diamati gejala klinis meliputi tingkah laku, nafsu makan dan morfologis seperti perbaikan jaringan pada luka – luka dan warna tubuh. Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore, sedangkan pembersihan akuarium dilakukan



4 kali dalam seminggu. Kualitas seperti suhu, pH dan DO dicatat dari awal pemeliharaan hingga akhir pemeliharaan.

#### 4.7.2.4 Pengamatan Hematologi

Pengamatan hematologi dilakukan pada ikan normal, ikan yang telah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan setelah pemeliharaan selama 7 hari pasca diberi penambahan dengan ekstrak daun sendok (*P. major* L.). Darah ikan diambil dan dilakukan perhitungan eritrosit, hemoglobin, hematokrit, leukosit serta diferensial leukosit yang akan dijelaskan sebagai berikut:

##### a) Eritrosit

Grant (2015), dalam jurnalnya menjelaskan langkah perhitungan eritrosit darah ikan yaitu darah diambil menggunakan spuit yang telah dicampur antikoagulan sebanyak 0,5 µL. Darah tersebut diencerkan dengan menggunakan larutan hayem didalam pipet eritrosit hingga 101 µL, kemudian dihomogenkan dengan cara dikocok pelan. Diambil campuran tersebut sebanyak 20 µL, ditetaskan kedalam *Improved Neubauer* dan ditutup dengan menggunakan cover glass. Diamati jumlah eritrosit menggunakan mikroskop pada semua kotak eritrosit, kemudan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah eritrosit (sel/mm}^3\text{)} = N \times \frac{1}{(5 \text{ area } \times 1)/250(\text{volume})} \times 200 \text{ (pengenceran)}$$

##### b) Leukosit

Darah ikan diambil sebanyak 5 ml/ikan pada daerah arteri kaudal (linea lateralis ikan mas) menggunakan spuit 1ml yang sudah dicampurkan antikoagulan EDTA. 50 µL darah diambil dengan mikropipet dan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf dan dicampur dengan larutan Turks 1:10, kemudian dikocok perlahan supaya darah dan larutan tercampur dengan baik. Darah dan larutan yang telah tercampur diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Darah ikan mas (*C. carpio*)

diteteskan pada *Haemocytometer* dan ditutup dengan cover glass, kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali (Manoppo dan Kolopita, 2015). Total leukosit dihitung dengan menggunakan rumus dari Utami, *et al.* (2013) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

### c) Diferensial Leukosit

Diferensial leukosit yang dihitung yaitu limfosit, neutrofil dan monosit.

Tahap awal yang dilakukan adalah merendam objek glass kedalam larutan methanol agar lemak yang terdapat pada objek glass luntur. Darah ikan mas (*C. carpio*) diteteskan pada objek glass dan ditutup dengan objek glass lain dengan sudut  $45^\circ$ . Objek glass pertama digeser kebelakang sehingga menyentuh sampel darah. Objek glass yang kedua digeser ke arah yang berlawanan sehingga lapisan darah terbentuk sangat tipis. Ulasan darah kemudian dikering anginkan dan diwarnai dengan menggunakan larutan *Giemsa* selama 15 menit. Setelah itu dibilas dengan air mengalir. Masing masing jenis leukosit diamati dari 100 jumlah sel terhitung (Utami, *et al.*, 2013).

### d) Hematokrit

Pengujian hematokrit berdasarkan pada metode Royan, *et al.* (2014), yaitu sampel darah ikan diambil dari ikan mas dan dihisap dengan tabung mikrohematokrit hingga  $\frac{3}{4}$  bagian pada tabung. Tabung ditutup dengan *cryotoseal* hingga 1 cm pada bagian ujung. Tabung kemudian disentrifugase selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Nilai hematokrit dilakukan dengan membandingkan volume sel darah merah dengan volume total darah dengan skala hematokrit.

### e) Hemoglobin

Tabung sahlinometer diisi dengan HCl 0,1 N hingga mencapai angka 10, kemudian tabung ditempatkan diantara 2 tabung dengan warna standar. Darah



ikan diambil dari tabung *Eppendorf* dengan menggunakan pipet sahli sampai 0,02 mL. Ujung pipet dibersihkan, darah dimasukkan kedalam tabung sahinometer dan didiamkan hingga 3 menit. Ditambahkan akuades dengan pipet tetes secara bertahap atau sedikit demi sedikit seraya diaduk dengan gelas pengaduk hingga terjadi perubahan warna yang setara dengan warna standar. Kadar hemoglobin dinyatakan dalam G% (Royan, *et al.*, 2014).

#### 4.7.2.5 Pengamatan Histopatologi

Pengambilan jaringan ginjal dilakukan dengan membedah tubuh ikan kemudian mengambil organ ginjal dan dimasukkan kedalam tabung *ependorf* serta ditambahkan formalin 10% (tahapan fiksasi). Diadoni (2017), menyatakan pada tahap dehidrasi dilakukan penarikan air selama 20 jam. Setelah itu tahap *clearing* untuk mengganti larutan alcohol dari jaringan. Tahap ke 4 yaitu impregnasi yang bertujuan untuk menyamakan jaringan dengan bahan *embedding*. Tahap *embedding* (pemblokkan) untuk mempermudah penyayatan dengan mikrotom. Hasil sayatan terbaik dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Haematoxylin-Eosin*. Pewarnaan HE menggunakan 2 macam zat warna yaitu hematosilin untuk mewarnai inti sel dan memberikan visualiasai warna biru serta eosin untuk mewarnai sitoplasma sel dan jaringan penyambung serta memberikan visualisasi warna merah muda. Analisa kerusakan histopatologi organ ginjal ikan mas (*C. carpio*) dilakukan dengan cara skoring. Skoring merupakan cara untuk mengetahui tahap kerusakan dari setiap perlakuan yang terjadi pada organ ginjal ikan mas (*C. carpio*). Kemudian perhitungan dilakukan dengan menggunakan Microsoft Excel. Kerusakan yang terjadi meliputi:

- a) Nekrosis: nekrosis dicirikan dengan ukuran sel yang bertambah besar berwarna pucat, rapuh serta mudah rusak (Andayani, *et al.*, 2017)



b) Hemoragik: dicirikan dengan keluarnya darah atau berwarna merah pada jaringan (Prameswari, *et al.*, 2013)

c) Melanomakrofag: merupakan sel yang terdapat pada ginjal normal namun jumlahnya akan meningkat saat terjadi kondisi stres (Hadi, *et al.*, 2017).

Uji histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) dilakukan di Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya selama  $\pm$  3 minggu.

#### 4.7.2.6 Pengamatan Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dalam penelitian ini dilakukan pasca ikan mas (*C. carpio*) diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* dan pasca diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang kemudian dipelihara selama 7 hari. Pengamatan ini dilakukan secara deskriptif meliputi respon makan, tingkah laku dan perubahan morfologi. Hasil pengamatan dilakukan skoring yang mengacu pada modifikasi dari Khaerani, *et al.* (2018), dimana skor yang diberikan adalah sebagai berikut:

- a: berenang pasif, nafsu makan berkurang
- b: warna tubuh pucat, kondisi lendir berlebih
- c: sisik mengelupas, kemerahan pada operculum
- d: luka borok, peradangan, pembengkakan hingga tukak
- e: berenang mulai aktif dan nafsu makan kembali normal
- f: kemerahan pada operculum berkurang
- g: peradangan mulai menghilang
- h: ikan normal

#### 4.7.2.7 Pengamatan Kelulushidupan (SR)

Pengamatan kelulushidupan atau tingkat kelangsungan hidup dilakukan setiap hari dengan mencatat jumlah ikan yang mati. Hasil dari pengamatan kelulushidupan dihitung dengan mengacu rumus yang dinyatakan oleh Arifin, (2016) adalah sebagai berikut:

$$SR(\%) = \frac{\text{Jumlah ikan mati} \times 100\%}{\text{Jumlah ikan hidup}}$$



#### 4.7.2.8 Pengamatan Kualitas Air

Pengamatan kualitas air pada penelitian ini dilakukan pada sore hari selama 7 hari pada saat masa pemeliharaan. Kualitas air yang diamati meliputi suhu, pH dan DO. Pengukuran suhu menggunakan thermometer, pH menggunakan pH meter dan DO menggunakan DO meter. Pengamatan kualitas air ini dilakukan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan.

#### 4.8 Analisa Data

Penelitian dengan judul 'Analisis Penggunaan Daun Sendok (*P. major L.*)

Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*C. carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*' ini menggunakan analisa kualitatif dan kuantitatif.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisa menggunakan sidik ragam (ANOVA). Analisa sidik ragam digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pengaruh perlakuan pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) pada hematologi dan histopatologi ginjal ikan (*C. carpio*) dari infeksi bakteri *A. hydrophila*. Data tersebut diolah menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versi 25 for windows. Apabila terdapat pengaruh perlakuan ( $P < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji Duncan dan *Polynomial Orthogonal*. Untuk penyajian grafik dalam penelitian ini digunakan *Microsoft Excel 2013*.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Penelitian Tahap I

#### 5.1.1 Ekstraksi Daun Sendok (*P. major L.*)

Hasil dari ekstraksi dari tanaman daun sendok (*P. major L.*) menggunakan pelarut etanol PA sebanyak 1L dan 200g simplisia disajikan pada **Tabel 4.** dan klasifikasi tanaman serta hasil ekstraksi daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Lampiran 3.**

**Tabel 4.** Rendemen Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Pelarut	Titik Didih pelarut	Berat Ekstrak (gram)	Lama Waktu Ekstraksi	Rendemen (%)
Etanol	78,37 <sup>o</sup>	5,49	90 menit	2,475
Etil Asetat	77,1 <sup>o</sup>	2,01	45 menit	1,025

Dari tabel tersebut diketahui terdapat perbedaan pada nilai rendemen ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan pelarut yang berbeda. Maligan, *et al.* (2015), menyatakan bahwa rendemen merupakan gambaran keefektifan suatu pelarut terhadap bahan yang digunakan dan bukan menunjukkan tingkat aktivitas ekstrak. Selain itu Hidayat, *et al.* (2015), menambahkan bahwa hal yang mempengaruhi perbedaan nilai rendemen salah satunya adalah lama waktu ekstraksi dan titik didih dari suatu pelarut. Pada proses ekstraksi terdapat pemisahan ekstrak dengan pelarut yang menggunakan penguapan, sehingga titik didih dari ekstrak maupun pelarut tidak boleh terlalu dekat.

#### 5.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri

##### 5.1.2.1 Uji Co-culture

Uji *Co-culture* dilakukan guna mengetahui konsentrasi terendah dari ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri

*A. hydrophila*. Hasil uji Co-Culture disajikan pada **Tabel 5** dan **Lampiran 4.**



**Tabel 5.** Hasil Uji *Co-culture* Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Konsentersasi (ppm)	Etanol		Etil Asetat	
	Rerata Absorbansi	Σkoloni Bakteri (sel/ml)	Rerata Absorbansi	Σkoloni Bakteri (sel/ml)
K (+)	0,241	0	0,241	0
1000	0,277	$4,47 \cdot 10^9$	0,561	$2,76 \cdot 10^{15}$
500	0,142	$8,61 \cdot 10^9$	0,761	$6,21 \cdot 10^{16}$
100	0,249	$2,10 \cdot 10^{13}$	0,977	$1,01 \cdot 10^{18}$
10	0,975	$2,23 \cdot 10^{18}$	1,203	$2,45 \cdot 10^{18}$
1	1,361	$3,00 \cdot 10^{18}$	1,378	$3,02 \cdot 10^{18}$
K(-)	1,374	$3,65 \cdot 10^{18}$	1,374	$3,65 \cdot 10^{18}$

Hasil absorbansi spektrofotometer menunjukkan bahwa pada pelarut etanol, konsentersasi 100 ppm memiliki nilai yang hampir mendekati dengan kontrol positif. Berbeda dengan pelarut etil asetat, konsentersasi 1000 ppm memiliki nilai yang hampir mendekati kontrol positif, hal ini diduga disebabkan bahwa kekeruhan yang terjadi pada setiap tabung tidak hanya berasal dari pertumbuhan bakteri, tetapi juga disebabkan oleh ekstrak yang digunakan. Ekstrak yang digunakan dalam uji MIC hanya sebatas ekstrak kasar yang melalui proses evaporasi, sehingga memungkinkan terjadinya endapan pada tabung reaksi.

Hasil pengamatan jumlah koloni bakteri / MBC (*Minimum Bactericidal Conteration*) pada tabel menunjukkan konsentersasi minimum ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah 100 ppm pada pelarut etanol dan 500 ppm pada pelarut etil asetat. Penentuan nilai MBC tersebut didasarkan pada konsentersasi paling rendah pada ekstrak yang diketahui mampu menghambat atau mengurangi pertumbuhan bakteri.

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari uji *co-culture* adalah jumlah koloni bakteri semakin berkurang dengan meningkatnya konsentersasi yang diberikan baik pada pelarut etanol maupun pelarut etil asetat. Namun pada ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A.*



*hydrophila* pada konsentersasi yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak etil aasetat daun sendok (*P. major L.*). Sehingga ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) ini kemudian dilanjutkan dengan uji cakram untuk melihat aktivitas antibakteri dari zona hambat yang terbentuk.

### 5.1.2.2 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) pada konsentersasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, kontrol (+) dengan kloramfenikol dan kontrol (-) dengan DMSO 10%. Dosis yang digunakan ini mengacu pada hasil uji *co-culture* yaitu pada dosis 100 ppm telah menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji cakram disajikan pada

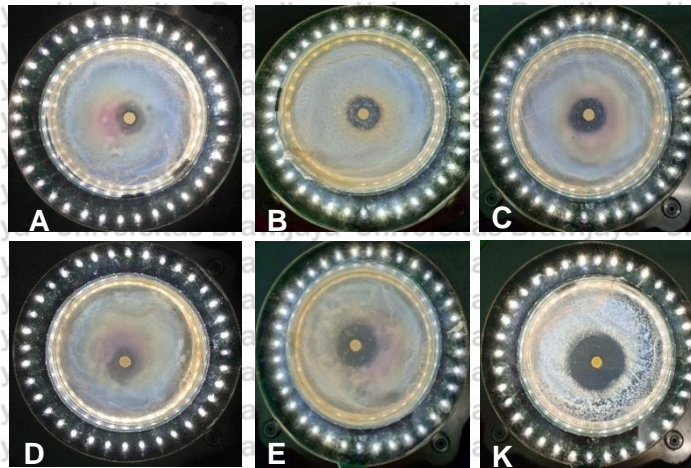
**Tabel 6.**

**Tabel 6.** Hasil Uji Cakram Ekstrak Etanol Daun Sendok (*P. major L.*)

Konsentersasi (mg.L <sup>-1</sup> )	Zona Hambat (mm) Pelarut Etanol	Klasifikasi Respon Zona Hambat (Erlyn, 2016)
K (-)	0 ± 0.00	-
100	8,30 ± 0.01 <sup>a</sup>	Sedang
200	9,9 ± 0.17 <sup>b</sup>	Sedang
300	11,10 ± 0.11 <sup>c</sup>	Kuat
400	12,11 ± 0,18 <sup>d</sup>	Kuat
500	14 ± 0.10 <sup>e</sup>	Kuat
K(+)	20,95 ± 0.07	Sangat kuat

Hasil Anova (*Analysis of variance*) pada uji cakram menunjukkan bahwa nilai diameter zona hambat yang terbentuk setelah diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) adalah signifikan atau memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa pada dosis 500 ppm memberi nilai rerata terbaik yaitu sebesar 14 mm, diikuti oleh dosis 400, 300, 200, dan 100 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin besar zona hambat yang terbentuk. Zona hambat bakteri yang terbentuk disajikan pada **Gambar 10**.





**Gambar 10.** Hasil Uji Cakram: (A) 75 ppm; (B) 150 ppm; (C) 225 ppm; (D) 300 ppm; (E) 375 ppm dan (K+) Kloramfenikol

### 5.1.3 Karakterisasi Metabolit Sekunder Ekstrak Terbaik Daun Sendok (*P. major L.*)

#### 5.1.3.1 Analisis Fitokimia

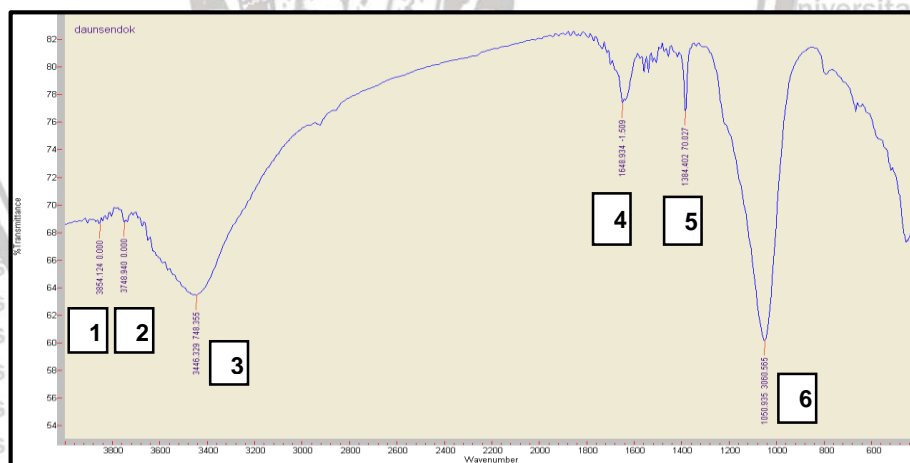
Uji fitokimia terhadap daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Tabel 7.** dan **Lampiran 5.** Uji fitokimia ini dilakukan dengan menggunakan pelarut polar dari uji cakram terbaik (etanol). Parameter yang digunakan pada uji fitokimia antara lain fenol, flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan terpenoid (steroid dan triterpenoid). Berdasarkan hasil uji pada 6 jenis parameter ini diketahui daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Hal ini diperkuat oleh Sitorus (2017), yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) terdeteksi mengandung flavonoid, saponin dan tannin dalam uji fitokimia. Nugraha, *et al.* (2017) menambahkan bahwa senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin tergolong kedalam senyawa yang bersifat polar dan memiliki berbagai macam fungsi, salah satunya adalah terdapat aktivitas antibakteri.

Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia

No.	Identifikasi Senyawa	Hasil	Keterangan
1.	Fenol	+	Berwarna hijau kehitaman, biru kehitaman
2.	Flavonoid	+	Berwarna merah bata, merah muda, merah tua
3.	Alkaloid		
	Mayer	-	Tidak terdapat endapan putih
	Dragendrof	-	Tidak terdapat endapan jingga
	Bouchardat	-	Tidak terdapat endapan coklat
4.	Saponin	+	Terdapat busa permanen
5.	Tanin	+	Berwarna hijau kehitaman, biru kehitaman
6.	Terpenoid		
	Steroid	-	Tidak berwarna hijau kebiruan
	Triterpenoid	-	Tidak berwarna orage atau biru kehitaman

### 5.1.3.2 Analisis FTIR

Hasil uji FTIR ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 10** berikut ini



**Gambar 11.** Hasil Uji FTIR Daun Sendok (*P. major L.*)

Dari kurva FTIR tersebut diperoleh hasil serapan panjang gelombang. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada ekstrak daun sendok (*P. major L.*) memiliki 6 serapan senyawa yang disajikan pada **Tabel 8**.



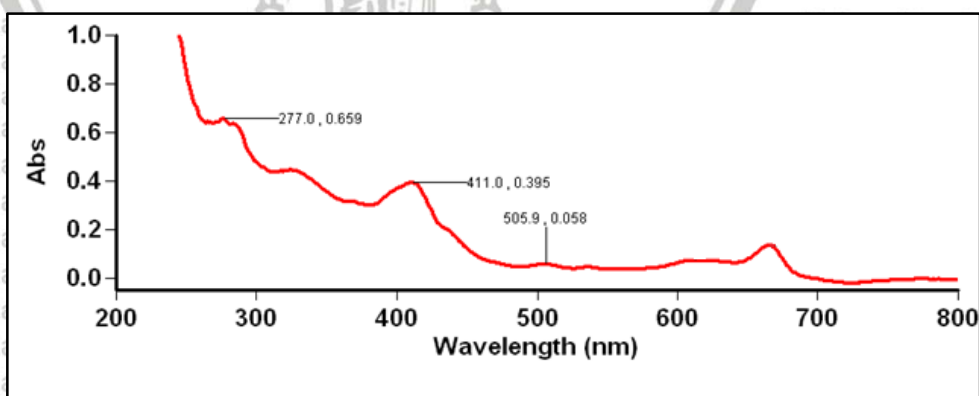
**Tabel 8.** Serapan Puncak Gelombang FTIR

No.	Bilangan Gelombang	Gugus Fungsi
1.	1050,935	C – OH alcohol
2.	1384,402	C – H alkane
3.	1640,934	C = C alkana
4.	3446,329	O – H alkohol, fenol
5.	3740,940	O – H alcohol
6.	3854,124	O – H asam karboksilat

Dari tabel interpretasi spektrum FTIR, diperoleh pita ulur dari grup fenil C = C; –OH dan –CH yang merupakan karakteristik IR yang mengindikasikan keberadaan senyawa fenol, flavonoid dan tanin (Kiswandono, *et al.*, 2015; Zirconia, *et al.*, 2015; Juliani, *et al.*, 2016; Nugraha, *et al.*, 2017). Serapan spektrum IR ini serupa dengan Bebhahani, *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa daun sendok (*P. major L.*) mengandung gugus karboksil, hidroksil dan metil. Gugus fungsi dari spektrum FTIR ini mempertegas hasil uji fitokimia yang menyatakan bahwa daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa fenol, flavonoid dan tanin.

### 5.1.3.3 Analisis UV- VIS

UV-VIS ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 12** dan **Lampiran 6**. Dari hasil tersebut terdeteksi 14 panjang gelombang.



**Gambar 12.** Hasil Uji UV-Vis Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Puncak gelombang tertinggi diperoleh pada 227 nm, 411 nm dan 505 nm. Berdasarkan hasil tersebut pada panjang gelombang 227, 411 dan 505 diduga

kuat terdapat senyawa golongan flavonoid utama. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Harborne (2006), daerah spectrum UV yang disajikan pada **Tabel 9**.

Hasil UV-VIS ini memperkuat hasil uji fitokimia serta serapan gugus fungsi IR dimana ekstrak daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan serapan maksimum UV-VIS, flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun sendok adalah jenis flavon, flavonol, auron dan antosianin. Adom, *et al.* (2017), menyatakan bahwa flavonoid utama yang terdapat pada daun sendok (*P. major L.*) adalah flavon. Kawashty (1993) dalam jurnalnya menyebutkan bahwa terdapat beberapa flavon dalam daun sendok (*P. major L.*) namun hanya 1 flavonol yang terdeteksi.

**Tabel 9.** Serapan Maksimum Panjang Gelombang UV-VIS (Harborne, 2006)

No.	Puncak Maksimal Utama (nm)	Tipe Flavonoid
1.	255 – 265	Isoflavon
2.	±225, 275 – 290	Flavon dan Flavonol
3.	250 – 270, 330 – 350	Flavon dan Biflavol
4.	250 – 270, 350 – 390	Flavonol
5.	365 – 390	Khalkon
6.	390 – 430	Auron
7.	475 – 560	Antosianin

#### 5.1.4 Mekanisme Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder

Berdasarkan hasil uji fitokimia, FTIR dan UV-VIS ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) memiliki kandungan senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin yang diduga mampu bekerja menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Senyawa fenol sebagai antibakteri memiliki mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein membrane sel. Lebih jelasnya bahwa fenol akan berikatan dengan protein pada struktur dinding sel bakteri dan membentuk ikatan hydrogen (Novita, *et al.*, 2016). Ikatan hydrogen ini kemudian akan membuat protein dinding sel dan membran sitoplasma rusak



sehingga terjadi ketidakseimbangan antara makromolekul dan ion di dalam sel (Bontjura, *et al.*, 2015; Hariati, *et al.*, 2018).

Senyawa lain seperti flavonoid sebagai antibakteri bekerja dengan berbagai macam cara, diantaranya adalah penghambatan DNA gyrase, penghambatan membrane sitoplasma serta metabolisme energi (Suteja *et al.*, 2016). Flavonoid mampu merusak permeabilitas dinding sel bakteri dengan berikatan pada protein dinding sel sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat (Putri, *et al.*, 2016). Aktivitas flavonoid sebagai antibakteri lainnya yaitu dengan berikatan pada protein sehingga mempengaruhi permeabilitas dan masuk ke dalam sel bakteri sehingga terjadi koagulasi protein dan melumpuhkan enzim bakteri (Nirwana, *et al.*, 2017).

Saponin bekerja dengan mempengaruhi tegangan pada dinding sel bakteri, senyawa ini akan berikatan pada lipopolisakarida bakteri yang mengakibatkan permeabilitas dinding sel meningkat dan tegangan permukaan dinding sel menurun. Kemudian saponin akan masuk ke dalam sel bakteri dan mengganggu metabolisme (Dwicahyani, *et al.*, 2018). Tanin sebagai antibakteri akan bekerja dengan cara denaturasi protein yang mengakibatkan terhambatnya proses metabolisme. Saat proses metabolisme terhambat, pertumbuhan dan perkembangan bakteri akan terhambat (Karmila, *et al.*, 2017).

Mekanisme antibakteri antar satu senyawa dengan lainnya yang dikombinasikan menjadi satu akan bekerja secara sinergis dan lebih efektif dalam memerangi bakteri (Rempe, *et al.*, 2017). Disisi lain, kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini karena merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk pengendalian terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Kloramfenikol diketahui mampu menghambat sintesis protein bakteri *A. hydrophila* dengan cara mengikat subunit ribosom sehingga terjadi pembentukan ikatan peptide (Dian, *et al.*, 2015; Putri, *et al.*, 2016).

## 5.2 Penelitian Tahap II

### 5.2.1 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Uji toksisitas ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dilakukan guna mengetahui dosis letal yang dapat membunuh 50% dari populasi ikan uji. Dosis yang dipakai pada uji toksisitas ini adalah 100, 200, 300, 400, 500 ppm selama 48 jam. Hasil dari uji toksisitas ekstrak daun sendok sebesar (*P. major L.*) disajikan pada **Tabel 10**. Berdasarkan analisa menggunakan EPA *Probit Analysis* (**Lampiran 7**) didapatkan nilai 356,788 ppm, artinya pada dosis 356,788 ppm ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dapat mengakibatkan mortalitas 50% selama 48 jam.

**Tabel 10.** Uji Toksisitas Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Dosis	Mortalitas (ekor) pada jam ke-			Jumlah
	12	24	48	
100	-	-	1	1
200	-	1	1	2
300	-	1	4	5
400	-	3	3	6
500	-	3	4	7

Dari tabel diatas diketahui bahwa mortalitas ikan mas (*C. carpio*) semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya dosis ekstrak yang digunakan serta lama waktu pemaparan. Nazarizadeh *et al.*, (2013), menyatakan bahwa daun sendok (*P. major L.*) memiliki kandungan antinutrisi yang dapat dikategorikan sebagai racun seperti asam oksalat, erucic, saponin dan alkaloid dalam tingkat yang rendah. Penggunaan daun sendok (*P. major L.*) masih dapat dikategorikan aman namun semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin tinggi komposisi racun sehingga akan semakin berbahaya.



### 5.2.2 Uji Patogenitas Bakteri *A. hydrophila*

Uji patogenitas bakteri *A. hydrophila* dilakukan guna mengetahui dosis lethal bakteri *A. hydrophila* yang mampu membunuh hingga 50% dari seluruh ikan yang diujikan. Hasil uji patogenitas disajikan pada **Tabel 11**.

**Tabel 11.** Uji Patogenitas Bakteri *A. hydrophila* Terhadap Ikan Mas (*C. carpio*)

Jam ke-	Kepadatan Bakteri (CFU/ml)			
	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
0	-	-	-	-
12	1	1	3	4
24	-	1	2	5
Jumlah	1	2	5	9

Berdasarkan analisa menggunakan EPA *Probit Analysis* (**Lampiran 8**) didapatkan nilai  $1,2 \times 10^7$  sel/ml artinya pada konsentersasi  $10^7$  CFU/ml dapat mengakibatkan mortalitas 50% selama 24 jam. Arindita, *et al.* (2014) dalam jurnalnya mengatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan kematian ikan hingga 50% pada konsentersasi  $10^7$  CFU/ml. Namun dalam beberapa studi ditemukan bahwa patogenitas bakteri *A. hydrophila* memiliki nilai yang berbeda – beda. Putri (2018), menyatakan bahwa level atau tingkatan patogenitas bakteri *A. hydrophila* bergantung pada daya tahan tubuh ikan. Hal ini disebabkan patogen harus dapat menembus sistem pertahanan tubuh ikan untuk menimbulkan suatu penyakit. Keadaan sistem imun yang kuat akan sulit ditembus oleh patogen.

Dari tabel uji patogenitas tersebut juga diketahui bahwa tingkat konsentersasi bakteri berbanding lurus dengan tingkat mortalitas populasi uji. Kumar, *et al.* (2016), menyatakan bahwa pada dasarnya level patogenitas bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan mas (*C. carpio*) dalam beberapa studi ditemukan dengan hasil yang berbeda beda. Namun satu hal yang dapat disimpulkan bahwa

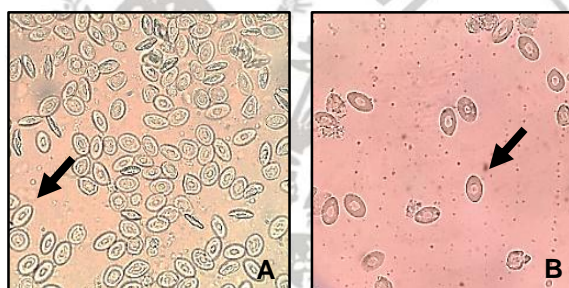


semakin tinggi dosis yang diberikan akan menyebabkan tingkat kematian ikan yang lebih tinggi.

### 5.2.3 Analisa Hematologi Ikan Mas (*C. carpio*)

#### 5.2.3.1 Eritrosit

Eritrosit atau sel darah merah merupakan salah satu parameter hematologi yang digunakan untuk mengetahui kondisi kesehatan tubuh ikan. Umumnya eritrosit memainkan peran sangat penting dalam transpor oksigen dan karbondioksida. Pada saat kondisi stress nilai eritrosit akan berkurang, hal ini disebabkan karena sel eritrosit akan mengalami kerusakan seperti sperosit dan seroid yang kemudian akan menjadi lisis (Syahrial, *et al.*, 2013). Morfologi eritrosit ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada **Gambar 13**.



**Gambar 13.** Eritrosit Perbesaran 1000x (A) Normal; (B) Pasca Infeksi

Hasil rerata nilai eritrosit yang disajikan pada **Tabel 12** menunjukkan bahwa pada pra-infeksi berada pada kisaran  $1,80 - 1,96 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Namun pada saat terjadi infeksi bakteri *A. hydrophila* terjadi penurunan nilai eritrosit hingga mencapai kisaran  $1,05 - 1,12 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Berkurangnya nilai eritrosit diduga akibat pathogenesis *A. hydrophila*. Bakteri ini diketahui mampu menghasilkan lebih dari satu toksin yang dapat menyebabkan anemia hemolitik pada ikan. Kondisi ini berupa kematian eritrosit yang lebih cepat serta berbanding terbalik dengan pembentukan eritrosit baru (Santos, *et al.*, 2017).



**Tabel 12.** Nilai Eritrosit Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

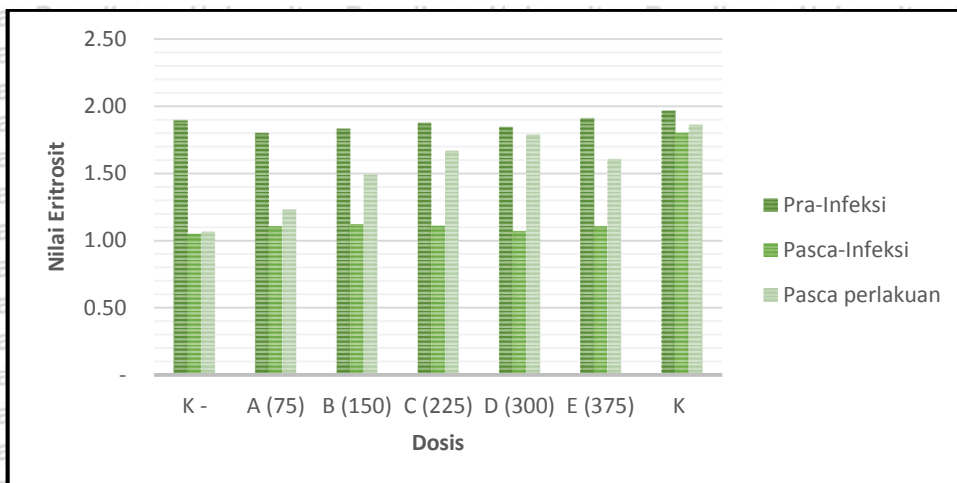
Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi ( $10^6$ sel/mm <sup>3</sup> )	Pasca-Infeksi Bakteri ( $10^6$ sel/mm <sup>3</sup> )	Pasca Perlakuan ( $10^6$ sel/mm <sup>3</sup> )
K -	1,89 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,05 <sup>a</sup>
A (75)	1,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,06 <sup>b</sup>
B (150)	1,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,09 <sup>c</sup>
C (225)	1,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,01 <sup>d</sup>
D (300)	1,84 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,09 <sup>e</sup>
E (375)	1,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,01 <sup>d</sup>
K	1,96 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,86 ± 0,05 <sup>e</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Dari tabel tersebut diketahui bahwa penambahan ekstrak daun sendok (*P. major* L.) pasca infeksi bakteri dapat meningkatkan kembali nilai eritrosit secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan kisaran  $1,23 - 1,79 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Nilai eritrosit tersebut diketahui termasuk kedalam nilai eritrosit ikan normal pada umumnya yaitu sebesar  $1,5 - 3,0 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> (Dianti, *et al.*, 2013). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel, serta perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap eritrosit ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major* L.) terhadap eritrosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9649 dan persamaan  $y = -1E-05x^2 + 0,0069x + 0,764$ . Berdasarkan nilai persamaan tersebut, perlakuan dosis 345 ppm dapat menghasilkan pengaruh eritrosit tertinggi sebesar

1,95 sel/mm<sup>3</sup>. Hasil uji ANOVA, Duncan dan *polynomial orthogonal* disajikan pada **Lampiran 9**. Selanjutnya untuk melihat pola perubahan eritrosit pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major* L.) disajikan pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Pola Perubahan Eritrosit Ikan Mas (*C. carpio*)

### 5.2.3.2 Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin (Hb) merupakan salah satu protein terbanyak dalam tubuh yang sangat berperan dalam mempertahankan metabolisme aerobik dengan mengangkut oksigen dari permukaan pernafasan seperti insang, paru – paru dan ginjal (Stroz, 2018). Hb mengangkut ± 90% oksigen dari insang melalui epitel secara berdifusi kemudian akan berikatan dengan Hb sel darah merah yang berada pada kapiler darah. Secara umum kadar Hb ikan mas ± 6,40 g dL<sup>-1</sup> (Syawal, *et al.*, 2011). Oleh karena itu, Hb merupakan salah satu parameter yang mengklasifikasikan kondisi kesehatan ikan. Sehingga pengukuran nilai Hb dilakukan dalam penelitian ini. Nilai Hb ikan mas (*C. carpio*) yang telah dilakukan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 13.

Tabel 13. Nilai Hemoglobin (Hb) Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi (g%)	Pasca-Infeksi Bakteri (g%)	Pasca Perlakuan (g%)
K -	4,63 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,90 ± 0,10 <sup>a</sup>
A (75)	4,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,17 <sup>b</sup>
B (150)	4,63 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,17 <sup>c</sup>
C (225)	4,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,27 ± 0,21 <sup>d</sup>
D (300)	4,63 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,17 <sup>e</sup>
E (375)	4,67 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,10 <sup>c</sup>
K	4,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,10 <sup>b</sup>	4,80 ± 0,15 <sup>e</sup>

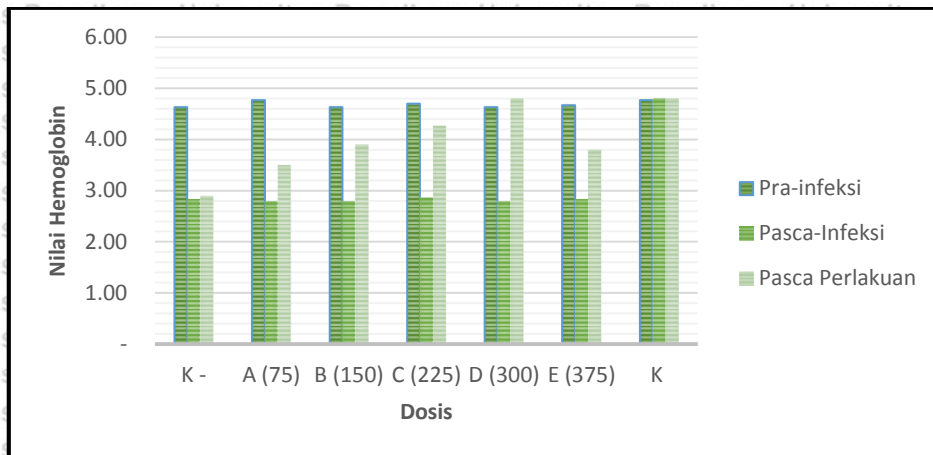
Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata (P>0,05).



Dari tabel diatas, diketahui nilai Hb ikan mas (*C. carpio*) pada keadaan normal (pra-infeksi) berkisar dari 4,33 – 4,89 g%, namun pada saat diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* terjadi penurunan kadar Hb darah ikan mas (*C. carpio*). Penurunan nilai Hb ini diduga dapat menimbulkan gejala anemia pada ikan. Astuti, *et al.* (2017), menyatakan bahwa pada saat nilai eritrosit dalam darah mengalami penurunan maka akan terjadi penurunan nilai Hb dalam darah ikan. Hal ini dapat menyebabkan ketersediaan O<sub>2</sub> dalam tubuh ikan berkurang (kondisi hipoksia) sehingga akan menyebabkan kekurangan energi yang mengindikasikan kondisi anemia.

Penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) pada ikan pasca terinfeksi bakteri *A. hydrophila* diketahui dapat meningkatkan kembali nilai Hb apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol (K). Hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan bahwa ekstrak daun sendok (*P. major L.*) pada ikan pasca terinfeksi bakteri *A. hydrophila* memiliki pengaruh yang signifikan ( $P < 0,05$ ) atau berbeda nyata pada kisaran 3,70 – 4,8 g%. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap Hb ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

Hubungan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan Hb ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,724 dan persamaan  $y = -3E-05x^2 + 0,0171x + 2,284$ . Berdasarkan hasil nilai persamaan tersebut diperoleh dosis 285 ppm mampu menghasilkan pengaruh terhadap Hb tertinggi sebesar 4,7%. Hasil uji ANOVA, uji Duncan dan polynomial orthogonal disajikan pada **Lampiran 10**. Selanjutnya pola perubahan Hb pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 15**.



Gambar 15. Pola Perubahan Hemoglobin Ikan Mas (*C. carpio*).

### 5.2.3.3 Hematokrit

Hematokrit pada dasarnya digunakan sebagai salah satu parameter untuk mengetahui kondisi ikan dengan membandingkan volume plasma darah dan sel darah merah (Hazzuli, *et al.*, 2015). Tinggi rendahnya nilai hematokrit diduga mempengaruhi potensi darah dalam membawa oksigen dan aktivitas aerobik pada tingkat sel (Lavabetha, *et al.*, 2015). Hasil pengamatan hematokrit yang dilakukan selama penelitian disajikan pada Tabel 14.

Tabel 14. Nilai Hematokrit Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi (%)	Pasca-Infeksi Bakteri (%)	Pasca Perlakuan (%)
K -	27,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	11,33 ± 1,00 <sup>a</sup>	11,33 ± 0,58 <sup>a</sup>
A (75)	27,67 ± 1,15 <sup>a</sup>	12,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	22,00 ± 1,00 <sup>c</sup>
B (150)	27,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	12,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	23,33 ± 1,00 <sup>c</sup>
C (225)	28,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	13,33 ± 1,73 <sup>a</sup>	25,00 ± 1,00 <sup>d</sup>
D (300)	28,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	13,67 ± 1,00 <sup>a</sup>	20,00 ± 1,00 <sup>b</sup>
E (375)	27,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	10,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	11,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
K	28,33 ± 1,15 <sup>a</sup>	28,33 ± 1,00 <sup>b</sup>	29,00 ± 1,00 <sup>e</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata (P>0,05).

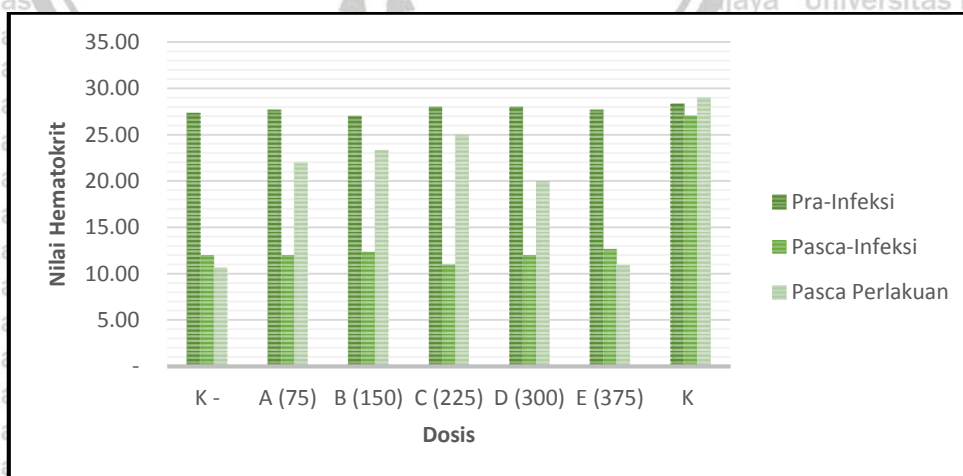
Berdasarkan tabel tersebut, nilai hematokrit pra-infeksi berkisar antara 27,33 – 28,33%, kemudian saat diinfeksi bakteri *A. hydrophila* mengalami penurunan dengan kisaran 10,33 – 11,33%. Penurunan kadar hematokrit dapat terjadi karena adanya defisiensi eritrosit. Nursatia, *et al.* (2017), menyatakan bahwa invasi



bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan turunya nafsu makan ikan yang akan berimbas pada penurunan kadar eritrosit dan rendahnya nilai hematokrit.

Nilai rerata hematokrit pasca diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh yang nyata secara signifikan ( $P < 0, 05$ ) pada kisaran 11 – 25%. Baba, *et al.* (2016), memaparkan bahwa nilai hematokrit ikan mas (*C. carpio*) normal pada umumnya sebesar  $\pm 24\%$ . Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan C (225 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap hematokrit ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan hematokrit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9733 dan persamaan  $y = -0,0003x^2 + 0,1224x + 14,2$ . Berdasarkan nilai persamaan tersebut diperoleh dosis 204 ppm mampu memberikan pengaruh hematokrit tertinggi sebesar 26,68%. Hasil uji ANOVA, uji Duncan dan *polynomial orthogonal* disajikan pada **Lampiran 11**. Kemudian pola perubahan hematokrit yang terjadi pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan Pada **Gambar 16**.



**Gambar 16.** Pola Perubahan Hematokrit Ikan Mas (*C. carpio*)

### 5.2.3.4 Leukosit

Leukosit diproduksi pada jaringan hemopoetik yang memiliki fungsi untuk membantu tubuh melawan infeksi. Leukosit akan berdifusi secara khusus ke daerah organ, jaringan maupun sel saat terjadi infeksi. Saat kondisi stress atau terjadi infeksi bakteri, jumlah leukosit akan meningkat untuk menghasilkan antibodi yang dilakukan oleh sel limfosit ataupun memfagosit bakteri yang dilakukan oleh sel neutrofil dan monosit (Budi, *et al.*, 2013; Huu, *et al.*, 2016). Nilai total leukosit dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 15.

**Tabel 15.** Nilai Leukosit Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi ( $10^4$ sel/mm <sup>3</sup> )	Pasca-Infeksi Bakteri ( $10^4$ sel/mm <sup>3</sup> )	Pasca Perlakuan ( $10^4$ sel/mm <sup>3</sup> )
K -	10,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,94 ± 0,06 <sup>b</sup>	14,68 ± 0,58 <sup>f</sup>
A (75)	10,83 ± 0,05 <sup>a</sup>	14,98 ± 0,02 <sup>b</sup>	13,33 ± 1,00 <sup>e</sup>
B (150)	10,80 ± 0,0a <sup>a</sup>	14,98 ± 0,01 <sup>b</sup>	12,55 ± 1,00 <sup>d</sup>
C (225)	10,84 ± 0,03 <sup>a</sup>	15,01 ± 0,04 <sup>b</sup>	12,05 ± 1,00 <sup>c</sup>
D (300)	10,80 ± 0,02 <sup>a</sup>	14,98 ± 0,01 <sup>b</sup>	11,45 ± 1,00 <sup>b</sup>
E (375)	10,81 ± 0,02 <sup>a</sup>	14,98 ± 0,06 <sup>b</sup>	12,03 ± 1,00 <sup>c</sup>
K	10,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	10,65 ± 0,35 <sup>a</sup>	10,66 ± 1,00 <sup>a</sup>

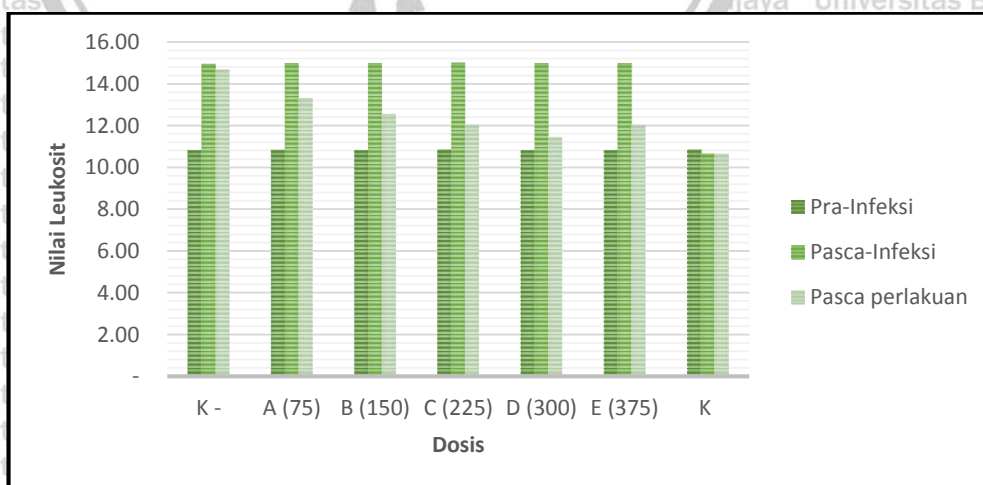
Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Dari tabel tersebut diketahui nilai leukosit pra infeksi-berkisar antara 10,71 – 11,04 x 10<sup>4</sup> sel/mm<sup>3</sup>. Namun pasca infeksi bakter *A. hydrophila*, jumlah leukosit meningkat hingga kisaran 14, 74 – 15, 25 x10<sup>4</sup> sel/mm<sup>3</sup>. Peningkatan jumlah sel leukosit ini disebabkan oleh adanya invasi bakteri *A. hydrophila*, sehingga leukosit akan berusaha melawan invasi bakteri tersebut baik dengan fagositosis ataupun dengan antibodi. Dianti, *et al.* (2013), menyatakan bahwa peningkatan nilai leukosit merupakan sebuah indikator terjadinya trauma akibat toksin, bakteri, ataupun kuman lainnya. Selain itu Santos, *et al.* (2017), menyatakan bahwa infeksi bakteri *A. hydrophila* akan menyebabkan inflamasi, sehingga sel leukosit akan memperbanyak diri dan berdifusi ke daerah yang terjadi proses inflamasi.



Total rerata nilai leukosit pasca diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh yang nyata secara signifikan ( $P < 0, 05$ ) pada kisaran  $11, 45 - 13,33 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Witeska, *et al.* (2016), menyatakan bahwa kisaran normal nilai leukosit juvenile ikan mas (*C. carpio*) adalah  $1,1 - 17,8 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Hal berbeda dinyatakan oleh Nursatia, *et al.*, (2017) bahwa nilai leukosit ikan normal berkisar antara  $2 - 15 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap leukosit ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan leukosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9392 dan persamaan  $y = 3E-05 x^2 - 0,0199x + 14,702$ . Berdasarkan persamaan tersebut dosis 331,67 ppm dapat menghasilkan pengaruh leukosit tertinggi sebesar 11,40 sel/mm<sup>4</sup>. Hasil uji ANOVA, uji Duncan dan *polynomial orthogonal* disajikan pada **Lampiran 12**. Sedangkan pola perubahan leukosit yang terjadi pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan Pada **Gambar 17**.

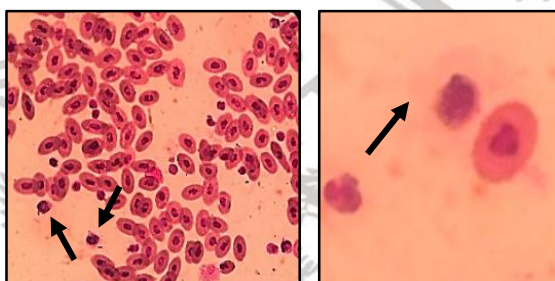


**Gambar 17.** Pola Perubahan Leukosit Ikan Mas (*C. carpio*)

### 5.2.3.5 Limfosit

Limfosit merupakan salah satu sel diferensial leukosit yang memiliki bentuk melingkar dengan inti berwarna ungu violet yang hampir menyelubungi seluruh sel. Wulandari, *et al.* (2018), menyatakan bahwa limfosit merupakan sel dengan diameter yang kecil, bentuknya bulat atau bundar dengan kromatin yang kasar.

Limfosit dengan ukuran sel yang lebih besar (12 – 16  $\mu\text{m}$ ) merupakan sel yang dipercaya telah dirangsang oleh antigen asing seperti virus, bakteri ataupun protein asing lainnya. Morfologi limfosit ikan mas (*C. carpio*) pada penelitian ini disajikan pada **Gambar 18**.



**Gambar 18.** Limfosit Ikan Mas (*C. carpio*) (Perbesaran 1000x).

Rerata nilai limfosit sebelum diinfeksi bakteri berada pada kisaran 85 – 87% (**Tabel 16**). Sedangkan saat diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, limfosit ikan mas (*C. carpio*) merespon dengan mengalami penurunan jumlah hingga mencapai kisaran 64 – 66%. Hal ini diduga disebabkan oleh kerja limfosit untuk melawan invasi bakteri. Abbas, *et al.* (2016), mengatakan bahwa saat terjadi invasi bakteri, sel T CD4<sup>+</sup> pada limfosit akan menghasilkan sitokin serta meningkatkan kerja sel fagosit lain sedangkan sel T CD8<sup>+</sup> membunuh sel yang telah terinfeksi. Disisi lain, limfosit sel B akan bekerja dengan membentuk antibodi yang akan bekerja secara spesifik.

Shabirah, *et al.* (2019), menyatakan bahwa limfosit ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* berada pada kisaran nilai 65 – 75%.

Penurunan jumlah limfosit dari kondisi normal disebabkan oleh kerja dari limfosit



untuk menangkal serangan bakteri patogen. Saat limfosit berkurang maka konsentrasi antibodi akan berkurang, sehingga akan meningkatkan serangan penyakit. Barros, *et al.* (2014), menyatakan bahwa kondisi ini disebut dengan *lymphopenia* (menurunnya jumlah limfosit).

**Tabel 16.** Nilai Limfosit Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi (%)	Pasca-Infeksi Bakteri (%)	Pasca Perlakuan (%)
K -	86 ± 1,00 <sup>a</sup>	66 ± 1,00 <sup>a</sup>	66 ± 1,73 <sup>a</sup>
A (75)	85 ± 1,00 <sup>a</sup>	65 ± 1,00 <sup>a</sup>	67 ± 0,01 <sup>a</sup>
B (150)	86 ± 1,00 <sup>a</sup>	65 ± 1,00 <sup>a</sup>	71 ± 1,73 <sup>b</sup>
C (225)	85 ± 1,00 <sup>a</sup>	66 ± 1,00 <sup>a</sup>	76 ± 1,73 <sup>c</sup>
D (300)	85 ± 1,00 <sup>a</sup>	66 ± 1,00 <sup>a</sup>	83 ± 1,00 <sup>e</sup>
E (375)	87 ± 1,00 <sup>a</sup>	64 ± 1,00 <sup>a</sup>	80 ± 1,00 <sup>d</sup>
K	86 ± 1,00 <sup>a</sup>	85 ± 1,00 <sup>b</sup>	85 ± 1,00 <sup>e</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Pasca pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) total rerata limfosit berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh yang nyata secara signifikan ( $P < 0,05$ ) pada rentang 66 – 83 % yang hampir mendekati nilai limfosit ikan mas (*C. carpio*) normal. Wietsaka, *et al.* (2016), menyatakan bahwa nilai limfosit ikan mas (*C. carpio*) pada kondisi normal berada pada 82,7 – 89,5%. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap limfosit ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

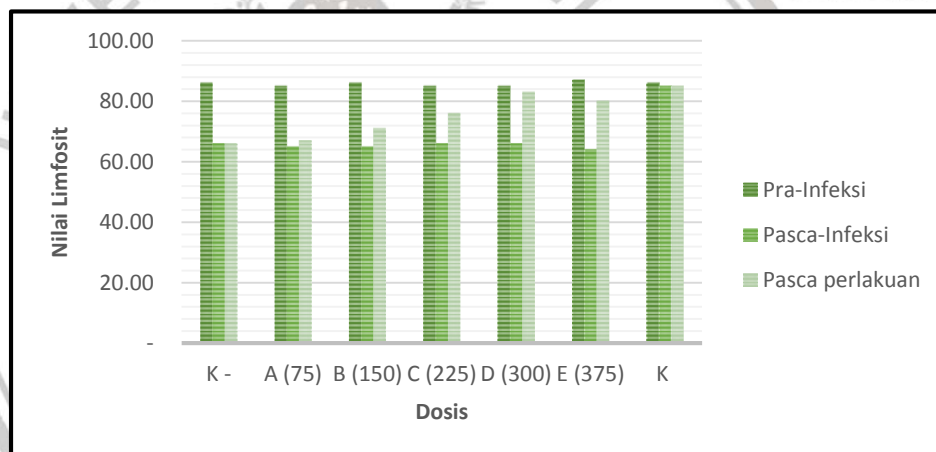
Meningkatnya sel limfosit pasca pemeliharaan diduga disebabkan oleh kemampuan dari ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dalam menstimulasi limfosit.

Flores, *et al.* (2000), menyatakan bahwa ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dapat merangsang proliferasi sel limfosit. Dimungkinkan bahwa ekstrak bersifat lektin terhadap sel limfosit sehingga memicu proliferasi sel limfosit. Namun, semakin tinggi dosis yang diberikan menunjukkan nilai limfosit yang kembali menurun pada

perlakuan E (375 ppm). Indriatmoko, *et al.* (2017), menambahkan bahwa sel limfosit tidak mampu memanfaatkan senyawa dalam ekstrak secara optimal dan menyebabkan peristiwa toksik karena dosis yang berlebihan.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan limfosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9142 dan persamaan  $y = 0,0002x^2 + 0,1192x + 58$ . Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 298 mampu memberikan pengaruh limfosit terbaik sebesar 75,76%. Hasil uji ANOVA, uji Duncan dan *polynomial orthogonal* disajikan pada **Lampiran 13**.

Selanjutnya pola perubahan limfosit yang terjadi pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 19**.



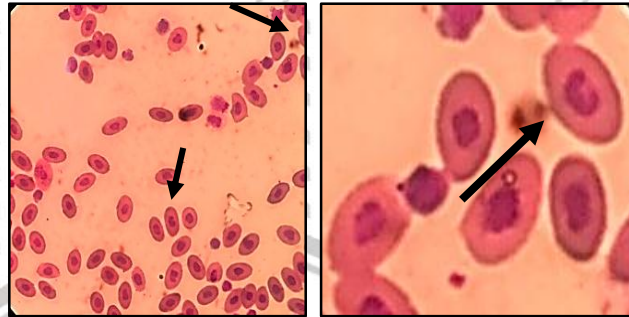
**Gambar 19.** Pola Perubahan Limfosit Ikan Mas (*C. carpio*).

### 5.2.3.6 Neutrofil

Neutrofil (**Gambar 20**) merupakan sel yang berbentuk oval atau melingkar dengan inti sel yang tidak berbentuk bulat utuh. Wulandari, *et al.* (2018), menyatakan bahwa sel neutrofil memiliki diameter 12 – 15  $\mu\text{m}$ . Nukleus atau inti selnya memiliki berbagai macam bentuk yang khas dengan sitoplasma biru pucat. Hal serupa dinyatakan oleh Kumar, *et al.* (2016), bahwa neutrofil memiliki beberapa ukuran, tetapi pada dasarnya sel ini lebih besar daripada eritrosit. Sel granulosit



ini dapat dijumpai dalam berbagai macam bentuk seperti elips, bola, atau bahkan buah pir. Nukleus dari neutrofil berwarna ungu dengan rasio yang lebih kecil dari monosit dan limfosit. Nukleus dari neutrofil dapat berbentuk seperti bulat telur, tapal kuda atau bentuk beberapa segmen dan berkorelasi di pusat atau eksentrik.



**Gambar 20.** Neutrofil Ikan Mas (*C. carpio*) (Perbesaran 1000x).

Nilai neutrofil ikan mas (*C. carpio*) normal atau pra-infeksi berada pada kisaran 8 – 10% (Tabel 17). Namun pasca infeksi bakteri *A. hydrophila*, rerata nilai neutrofil ikan mas (*C. carpio*) mengalami peningkatan hingga mencapai rentang 21 – 23%. Meningkatnya nilai neutrofil pasca infeksi bakteri diduga merupakan respon tubuh ikan mas (*C. carpio*) terhadap invasi bakteri.

Barros, *et al.* (2014), menyatakan bahwa sel neutrofil yang meningkat merupakan salah satu ciri dari ikan yang mengalami kondisi stres yang dapat dikaitkan dengan eliminasi dari mikroorganisme melalui fagositosis. Pratiwi, *et al.* (2016) menambahkan bahwa neutrofil mengandung vakuola yang berisikan enzim – enzim untuk menghancurkan mikroorganisme atau benda – benda asing. Sel ini akan meninggalkan pembuluh darah dan melakukan aktivitas fagositosis.



**Tabel 17.** Nilai Neutrofil Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

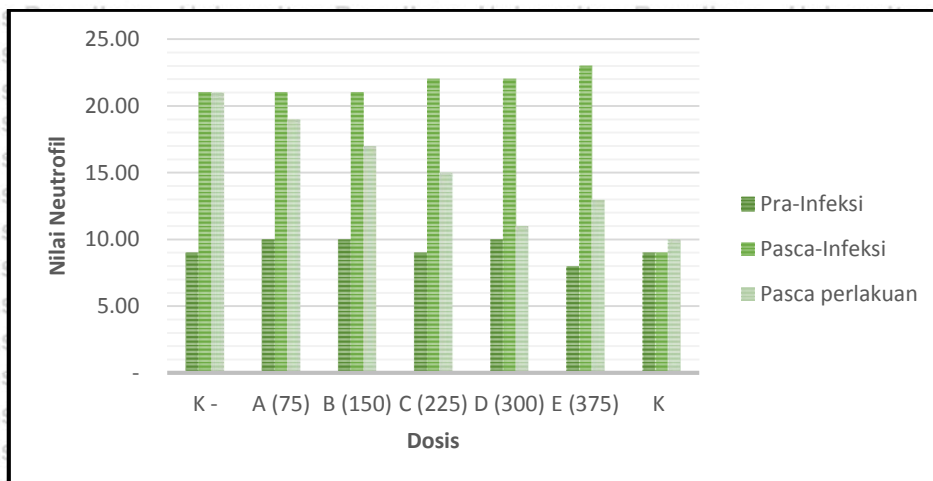
Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi (%)	Pasca-Infeksi Bakteri (%)	Pasca Perlakuan (%)
K -	9 ± 1,00 <sup>a</sup>	21 ± 1,00 <sup>b</sup>	21 ± 1,00 <sup>f</sup>
A (75)	10 ± 1,00 <sup>a</sup>	21 ± 1,00 <sup>b</sup>	19 ± 1,00 <sup>e</sup>
B (150)	10 ± 1,00 <sup>a</sup>	21 ± 1,00 <sup>b</sup>	17 ± 1,00 <sup>d</sup>
C (225)	9 ± 1,00 <sup>a</sup>	22 ± 1,00 <sup>b</sup>	15 ± 1,00 <sup>c</sup>
D (300)	10 ± 1,00 <sup>a</sup>	22 ± 1,00 <sup>b</sup>	11 ± 1,00 <sup>a</sup>
E (375)	8 ± 1,00 <sup>a</sup>	23 ± 1,00 <sup>b</sup>	13 ± 1,00 <sup>b</sup>
K	9 ± 1,00 <sup>a</sup>	9 ± 1,00 <sup>a</sup>	10 ± 1,00 <sup>a</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Dari tabel tersebut diketahui bahwa rerata neutrofil pasca diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of variance*) menunjukkan pengaruh yang nyata secara signifikan ( $P < 0,05$ ) pada kisaran 19 – 11%. Nilai neutrofil tersebut merupakan nilai yang tergolong normal, hal ini diperkuat oleh Santos, *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa nilai neutrofil normal berada pada kisaran 8,1 – 10,7%. Sedangkan Wietsaka, *et al.* (2016) menyatakan bahwa pada umumnya nilai neutrofil normal ikan mas (*C. carpio*) berada pada rentang 4 – 28%. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap neutrofil ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan limfosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,8743 dan persamaan  $y = 3E-05x^2 - 0,0583x + 23,4$ . Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 364,37 dapat memberikan pengaruh neutrofil tertinggi sebesar 12,78%. Hasil uji anova, uji Duncan dan *polinomia orthogonal* disajikan pada **Lampiran 14**. Kemudian, untuk melihat pola perubahan neutrofil yang terjadi pada ikan mas (*C. carpio*) pada saat pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 21**.





Gambar 21. Pola Perubahan Neutrofil Ikan Mas (*C. carpio*)

### 5.2.3.7 Monosit

Monosit (Gambar 22.) memiliki bentuk melingkar dengan ukuran sel yang besar, Kumar, *et al.* (2016), menyatakan bahwa sel monosit ikan merupakan sel yang paling besar diantara diferensial leukosit lainnya. Sel ini memiliki nukleus yang hampir menempati sepertiga sel. Nukleus dari monosit memiliki bentuk seperti ginjal atau bahkan bulat telur dengan warna ungu atau biru tua. Septriani, *et al.* (2012) menambahkan beberapa diantaranya ditemukan memiliki bentuk nukleus yang menyerupai jantung.



Gambar 22. Monosit Ikan Mas (*C. carpio*) (Perbesaran 1000x)

Nilai monosit ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada Tabel 18. Pada tabel tersebut diketahui rerata monosit pra-terinfeksi berada pada kisaran 4 – 6%.

Namun nilai monosit pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* mengalami peningkatan hingga rentang 12 – 14 %. Bhuvaneswari, *et al.* (2018), menyatakan bahwa nilai

monosit ikan mas pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* memiliki rentang 12,8 – 19,8%. Hal ini diduga disebabkan oleh pertahanan tubuh ikan mas dalam menghadapi bakteri.

Rousdy dan Wijayanti (2016), menyatakan bahwa meningkatnya nilai monosit menandakan kondisi stress ikan pasca infeksi. Abbas, *et al.* (2016) menambahkan, bahwa sebagian dari monosit akan berdiferensiasi menjadi sel makrofag yang berfungsi untuk memproduksi sitokin, meregulasi inflamasi, fagositosis mikroba, membersihkan jaringan-jaringan yang sudah mati serta sangat berperan dalam proses penyembuhan.

**Tabel 18.** Nilai Monosit Ikan Mas (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan (ppm)	Pra-Infeksi (%)	Pasca-Infeksi Bakteri (%)	Pasca Perlakuan (%)
K -	5 ± 1,00 <sup>a</sup>	13 ± 1,00 <sup>b</sup>	13 ± 1,73 <sup>d</sup>
A (75)	5 ± 1,00 <sup>a</sup>	14 ± 1,00 <sup>b</sup>	14 ± 0,01 <sup>df</sup>
B (150)	4 ± 1,00 <sup>a</sup>	14 ± 1,00 <sup>b</sup>	12 ± 1,73 <sup>d</sup>
C (225)	6 ± 1,00 <sup>a</sup>	12 ± 1,00 <sup>b</sup>	9 ± 1,73 <sup>c</sup>
D (300)	5 ± 1,00 <sup>a</sup>	12 ± 1,00 <sup>b</sup>	6 ± 1,00 <sup>a</sup>
E (375)	5 ± 1,00 <sup>a</sup>	13 ± 1,00 <sup>b</sup>	7 ± 1,00 <sup>ab</sup>
K	5 ± 1,00 <sup>a</sup>	6 ± 1,00 <sup>a</sup>	5 ± 1,00 <sup>a</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Total rerata monosit pasca diberi penambahan ekstrak daun sendok (*P. major* L.) berdasarkan hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh yang nyata secara signifikan ( $P < 0,05$ ) pada kisaran 7 – 14%. Nilai rerata monosit tersebut berada pada kisaran monosit normal ikan mas (*C. carpio*).

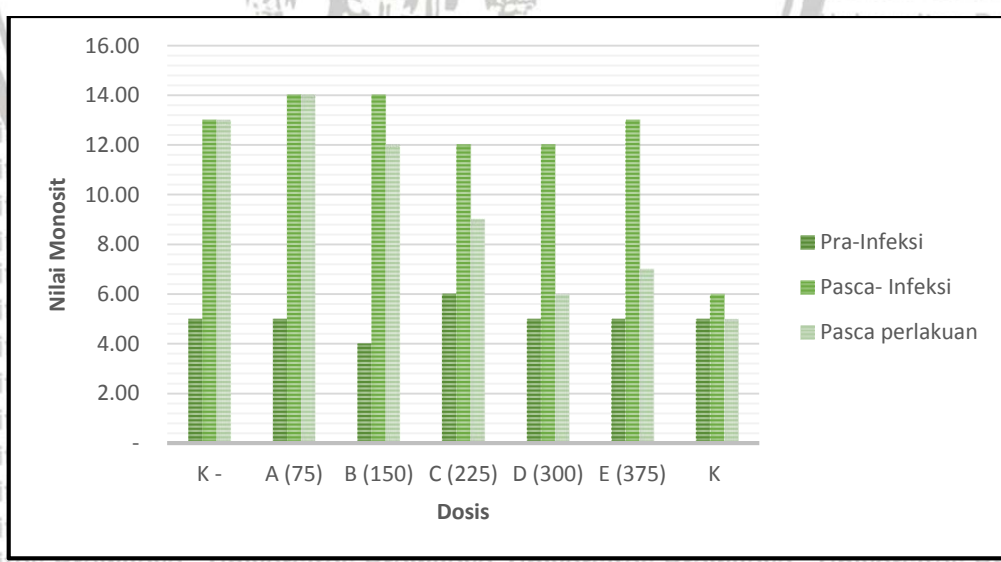
Pernyataan ini sesuai dengan pendapat Wietsaka, *et al.* (2016), yang menyatakan bahwa nilai monosit ikan mas (*C. carpio*) normal berada pada rentang 5 – 13%.

Selanjutnya Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar setiap perlakuan yang ditunjukkan dengan pemberian notasi berbeda pada tabel dan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh terbaik terhadap monosit ikan mas (*C. carpio*) dibandingkan 4 perlakuan lainnya.



Flores, *et al.* (2000), menyatakan bahwa ekstrak daun sendok (*P. major L.*) mampu meningkatkan produksi TNF- $\alpha$  yang dilakukan oleh makrofag atau diferensiasi sel monosit. Supit, *et al.* (2015), menambahkan bahwa TNF- $\alpha$  merupakan sitokin utama yang merespon saat terjadi inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif. TNF- $\alpha$  juga diketahui mampu merangsang faktor aktivitas sitokin lain, merangsang melekul adhesi dari sel leukosit, berperan dalam proses inflamasi serta regulator terhadap sel neutrofil.

Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan perubahan limfosit ikan mas (*C. carpio*) memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9418 dan persamaan  $y = 8E-05x^2 - 0,061x + 18,6$ . Berdasarkan persamaan tersebut, dosis 381,25 memberikan pengaruh monosit terbaik sebesar 6,9%. Hasil uji ANOVA, uji Duncan dan polynomial orthogonal disajikan pada **Lampiran 13**. Selanjutnya untuk melihat pola perubahan limfosit yang terjadi pada ikan mas (*C. carpio*) pra-infeksi, pasca-infeksi dan pasca penambahan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada **Gambar 23**.



**Gambar 23.** Pola Perubahan Monosit Ikan Mas (*C. carpio*)

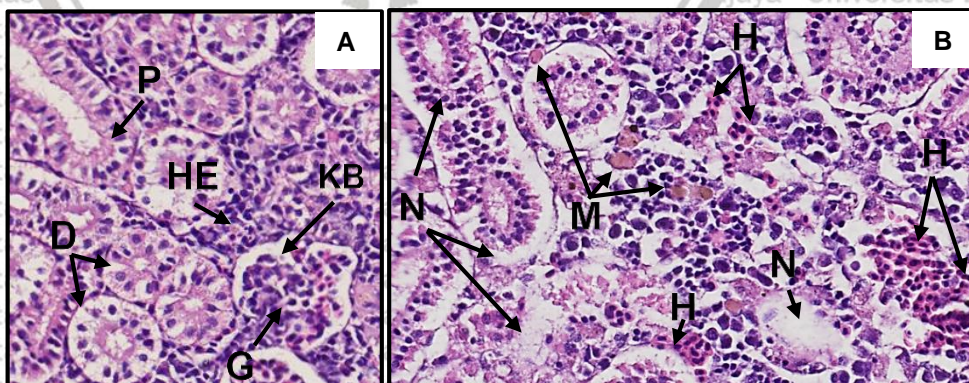


## 5.2.4 Analisa Ginjal Ikan Mas Mas (*C. carpio*)

### 5.2.4.1 Ginjal Normal dan Infeksi

Ginjal merupakan salah satu organ vital dalam tubuh ikan yang sangat berperan dalam menjaga homeostatis, pembersihan benda – benda asing dari darah, erythropoiesis dan membantu menjaga cairan tubuh, volume serta pH darah (Supriyono, *et al.*, 2013). Yanuhar, *et al.* (2012), menambahkan bahwa bagian ginjal yang terpenting adalah *head kidney* (ginjal anterior). *Head kidney* merupakan organ hematopoietic yang bertindak sebagai lymphoid sekunder yang berperan dalam menginduksi respon imun. Organ ini diketahui bekerja sebagai produsen antibodi dan pengumpulan melanomakrofag, dimana melanomakrofag mampu menyimpan dan memelihara antigen dalam waktu yang lama.

Yancheva, *et al.* (2015), menyatakan bahwa *head kidney* (ginjal anterior) secara embriologi berasal dari pronephros, sedangkan *trunk kidney* (ginjal posterior) berasal dari mesonephros. *Trunk kidney* berisi nefron dengan jumlah yang sangat bervariasi dari jaringan heampoietik dan jaringan limfoid di interstitium. Bagian ginjal umumnya terdiri dari sel – sel ginjal yaitu kapsul bowman, glomerulus, tubulus ginjal dan saluran pengumpul. Hasil dari ginjal normal pada penelitian ini disajikan pada **Gambar 24**.



**Gambar 24.** Histopatologi Ginjal Ikan Normal [A]: terdapat Tubulus Distal (D), Tubulus Proksimal (P), Hematopoietik (HE), Kapsula Bowman (KB), Glomerulus (G); Ginjal Infeksi [B]: Nekrosis (N), Hemoragik (H), Melanomakrofag (M). Perbesaran 400x



Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa ginjal ikan normal pada umumnya memiliki tubulus distal, tubulus proksimal, jaringan hematopoeietik, korpuskel renalis atau badan malpigi yang terdiri dari kapsula bowman dan glomerulus dalam keadaan normal. Gupta, *et al.* (2016), menyatakan bahwa kapsul bowman, glomerulus dan tubulus (distal dan proksimal) serta jaringan hematopoeietik ginjal ikan akan terlihat jelas dalam keadaan normal. Lubis, *et al.* (2017), menambahkan histologi ginjal terdiri dari jutaan nefron, setiap nefron berisi badan malphigi (kapsula bowman dan glomerulus) dan tubulus.

Glomerulus memiliki fungsi untuk ultrafiltrasi dari plasma yang terbentuk oleh darah. Filtrat kemudian akan masuk ke dalam tubulus ginjal dan akan diubah menjadi urin oleh tubulus. Tubulus terdiri dari distal dan proksimal, pada proksimal terdapat sel epitel kuboid selapis dengan *brush border* yang memiliki sitoplasma berwarna pekat dan pudar serta inti yang berbentuk melingkar atau bulat. Tubulus distal memiliki sitoplasma yang berwarna pucat atau pudar namun tidak memiliki *brush border* (Azani, *et al.*, 2017).

Histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* pada **Gambar 24** menunjukkan terjadinya beberapa kerusakan pada sel – sel ginjal. Kerusakan yang terjadi berupa nekrosis yang ditandai dengan sel yang rusak, rapuh dan membesar, hemoragik yaitu terjadinya pendarahan pada ginjal dan meningkatnya sel melanomakrofas. Mirghead, *et al.* (2018), menyatakan bahwa ginjal yang mengalami kerusakan akan menunjukkan adanya nekrosis pada tubulus dan jaringan hematopoeitik, hiperemi (keadaan dimana darah berlebihan dalam pembuluh darah), edema pada kapsula bowman serta peningkatan agregat melanomakrofas.

Nekrosis merupakan suatu keadaan dimana sel pada jaringan mengalami kematian. Keberadaan nekrosis dapat menyebabkan respon peradangan pada jaringan lain yang masih hidup pada daerah sekitar terjadinya nekrosis. Semakin



banyak jaringan yang terjadi nekrosis maka akan menimbulkan respon peradangan pada jaringan yang berdekatan (Andayani, *et al.*, 2017). Sel yang mengalami nekrosis memiliki ciri terdapat keadaan dimana sel menjadi membesar, pucat dan tidak berbentuk (*karyolisis*), inti sel menjadi padat dan menyusut (*pyknosis*) dan pecahnya inti sel (*pyknosis karyorrhexis*) (Altun, *et al.*, 2017).

Kondisi lain yang mengindikasikan kerusakan pada ginjal adalah hemoragik. Hemoragik merupakan suatu kondisi terjadinya pendarahan baik pada jaringan hematopoietik maupun badan malphigi (Yancheva, *et al.*, 2015). Kondisi hemoragik dapat dicirikan dengan kerusakan endotel kapiler yang disebabkan oleh infeksi yang menyebar pada pembuluh darah. Adanya hemoragik pada ginjal ikan, mengindikasikan bahwa serangan bakteri bersifat septicemia yang dapat merusak pembuluh darah sehingga menyebabkan terjadinya pendarahan pada ginjal (Susanti, *et al.*, 2016).

Melanomakrofag merupakan akumulasi atau kumpulan dari agregat makrofag. Melanomakrofag secara umum dapat dijumpai pada ginjal. Melanomakrofag dapat menyimpan serta memelihara antigen dalam waktu yang lama (Yanuhar, *et al.*, 2012). Struktur dari melanomakrofag yaitu berbentuk oval atau melingkar dengan tiga pigmen yaitu *hemosiderin*, *melanin* dan *lipofuscin*. Meningkatnya melanomakrofag serta terjadinya perubahan ukuran merupakan indikasi atau biomarker kondisi tubuh ikan dalam keadaan tidak baik (Mubarokah, *et al.*, 2016). Peran *melanin* diketahui sebagai perlindungan melawan invasi antigen tertentu pada jaringan (Hadi, *et al.*, 2017).

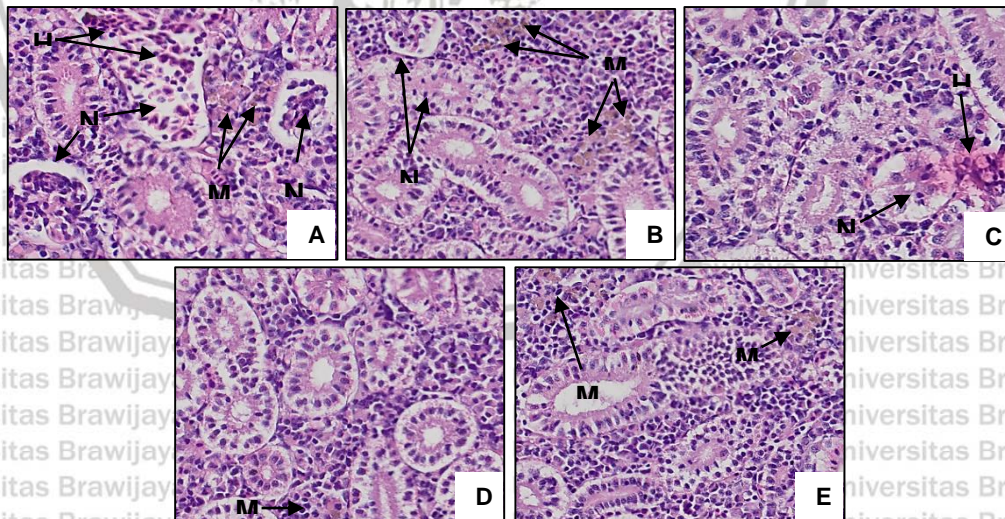
Bakteri *A. hydrophila* memproduksi beberapa eksotoksin diantaranya hemolisin, protease, liectinase, kaseinase, sitotoksin, elastase, lipase, enterotoksin gelatinase dan leucocidin. Protease merupakan enzim yang berfungsi melawan sistem imun dan mengambil persediaan nutrient inang. Lechitinase merupakan enzim yang berfungsi menghancurkan berbagai sel jaringan. Secara umum



eksotoksin akan menyebabkan kematian sel pada jaringan otot. Sedangkan endotoksi *A. hydrophila* yang berupa lipopolisakarida (LPS) akan menyebabkan peradangan (Istikhhanah, *et al.*, 2014).

### 5.3.4.2 Ginjal Ikan Pasca Penambahan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Pasca pengamatan ginjal ikan mas (*C. carpio*) normal dan ginjal ikan terinfeksi bakteri, maka dilakukan pengamatan ginjal ikan yang diberi ekstrak daun sendok (*P. major L.*) pada perlakuan A (75 ppm), B (150 ppm), C (225 ppm), D (300 ppm) dan E (375 ppm) yang disajikan pada **Gambar 25**. Secara visual kerusakan yang terjadi pada histopatologi ginjal ikan dari perlakuan A (75 ppm) semakin berkurang hingga perlakuan D (300 ppm). Namun pada perlakuan E (375 ppm) histopatologi ginjal ikan terlihat mengalami peningkatan kerusakan dalam skala kecil. Hal ini sesuai dengan hasil uji toksisitas ekstrak daun sendok (*P. major L.*), dimana semakin tinggi dosis yang diberikan dapat menyebabkan racun bagi tubuh ikan mas (*C. carpio*).



**Gambar 25.** Histopatologi Ginjal Ikan, (A) dosis 75 ppm; (B) dosis 150 ppm; (C) dosis 225 ppm; (D) dosis 300 ppm dan (E) dosis 375 ppm Perbesaran 400x



Hasil skoring kerusakan yang terjadi pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada **Tabel 19** dan **Lampiran 16**. Dari tabel tersebut didapatkan kerusakan sedang pada perlakuan A, B dan C dengan total kerusakan berturut – turut adalah 48,84%, 40,75% dan 27,68% sedangkan pada perlakuan D dan E didapatkan kerusakan ringan dengan total kerusakan berturut– turut adalah 12,62% dan 19,74%. Kategori kerusakan histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) mengacu pada Sari, *et al.* (2018), yaitu kerusakan ringan dengan nilai 25%, kerusakan sedang dengan nilai 26 – 50%, kerusakan berat dengan nilai 51 – 75% dan kerusakan yang sangat berat dengan nilai lebih besar dan sama dengan 76%.

**Tabel 19.** Hasil Skoring Kerusakan Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*C. carpio*)

Dosis (ppm)	Jenis Kerusakan (%)			Total Kerusakan	Tingkat Kerusakan
	Nekrosis	Hemoragik	Melanomakrofag		
A (75)	22,28	13,26	14,32	49,87	Sedang
	20,16	12,73	16,18	49,07	
	22,03	10,89	14,68	47,59	
<b>Rerata</b>	<b>21,49</b>	<b>12,29</b>	<b>15,06</b>	<b>48,84</b>	
B (150)	19,24	11,65	9,62	40,51	Sedang
	18,80	9,66	13,84	42,30	
	19,07	10,05	10,31	39,43	
<b>Rerata</b>	<b>19,04</b>	<b>10,45</b>	<b>11,26</b>	<b>40,75</b>	
C (225)	14,18	5,97	5,22	25,37	Sedang
	15,43	6,65	6,65	28,72	
	14,72	8,63	5,58	28,93	
<b>Rerata</b>	<b>14,78</b>	<b>7,08</b>	<b>5,82</b>	<b>27,68</b>	
D (300)	6,20	3,10	3,38	12,68	Ringan
	6,59	2,01	3,15	11,75	
	4,93	3,01	5,48	13,42	
<b>Rerata</b>	<b>5,91</b>	<b>2,71</b>	<b>4,00</b>	<b>12,62</b>	
E (375)	6,52	4,51	10,08	21,11	Ringan
	7,34	3,18	8,22	18,75	
	6,70	4,56	8,10	19,36	
<b>Rerata</b>	<b>6,85</b>	<b>4,08</b>	<b>8,80</b>	<b>19,74</b>	

Proses *recovery* yang terjadi pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) diduga disebabkan oleh kandungan zat aktif ekstrak daun sendok (*P. major L.*). Berdasarkan hasil uji fitokimia dalam penelitian ini, daun sendok (*P. major L.*)



mengandung senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Adom, *et al.* (2017), bahwa daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa fenol, flavonoid dan tanin. Sitorus (2017), menambahkan terdapat senyawa saponin dalam ekstrak daun sendok (*P. major L.*)

Menurut Istikhhanah, *et al.* (2014), tanin dapat bersifat antiseptik pada permukaan luka. Senyawa ini merupakan polifenol yang digunakan untuk melawan infeksi kulit, tanin juga dapat mengerutkan dinding sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas. Selain itu flavonoid data bekerja sebagai anti inflamasi dan antibakteri kuat yang dilakukan oleh senyawa seperti kavikol, kavibetol. Liana dan Utama (2018), menambahkan bahwa flavonoid memiliki sifat antiinflamasi yang dapat mengurangi peradangan dan membantu pengurangan rasa sakit saat terjadi pembengkakan serta pendarahan.

Hadaddian, *et al.* (2014), menyatakan bahwa ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dapat menyembuhkan kerusakan dan luka pada jaringan. Goncalves dan Romano (2016), menambahkan ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) dalam beberapa studi diketahui dapat merangsang proliferasi sel dan migrasi sel, semakin tinggi kandungan polifenol maka memiliki efek yang lebih kuat dalam penyembuhan luka. Zubair, *et al.* (2015), memberikan pernyataan serupa bahwa ekstrak etanol daun sendok mengandung polifenol dalam tingkatan lebih tinggi dapat merangsang proliferasi sel atau migrasi sel epitel.

Pada perlakuan E (375 ppm) terjadi peningkatan kerusakan dari perlakuan D (300 ppm) dalam skala kecil hal ini diduga disebabkan oleh penggunaan dosis tinggi ekstrak daun sendok (*P. major L.*). Nazarizadeh, *et al.* (2013), menyatakan bahwa pada dasarnya penggunaan tanaman ini sebagai obat masih tergolong aman, tetapi ekstrak daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa toksik seperti alkaloid, saponin glikosida dan *pyrrolizidine* yang akan sangat berbahaya pada dosis yang berlebihan.



Analisis data dan hubungan pada tiap – tiap kerusakan (nekrosis, hemoragik dan melanomakrofaq) dengan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) adalah sebagai berikut:

**1.) Nekrosis**

Nekrosis merupakan suatu keadaan dimana aktivitas jaringan menurun yang dicirikan dengan jaringan yang mengalami kehilangan beberapa bagan sel.

Nekrosis diawali dengan lisisnya sel serta hipertropi atau keadaan dimana ukuran sel menjadi bertambah besar sehingga antar sel satu dengan lainnya akan saling terlepas. Kondisi ini akan mempengaruhi fungsi ginjal (Mandia, *et al.*, 2013). Hasil skoring rerata nekrosis dalam penelitian ini disajikan pada **Tabel 20**.

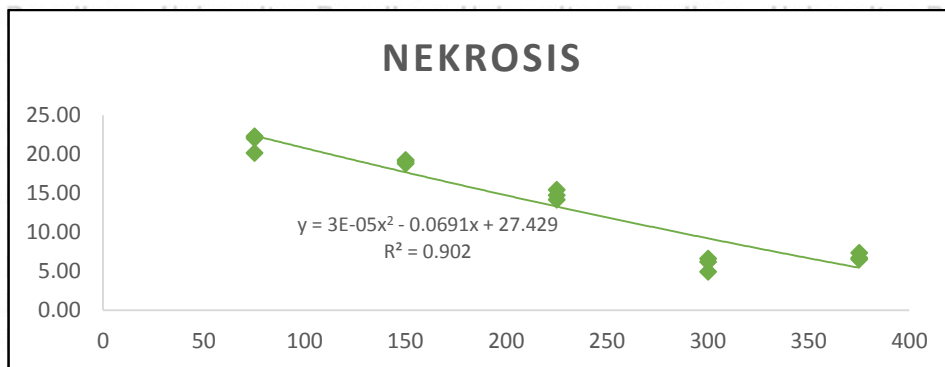
**Tabel 20.** Hasil Skoring Rerata Nekrosis Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*C. carpio*)

Perlakuan (ppm)	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	22,28	20,16	22,03	64,47	21,49 ± 1,16 <sup>d</sup>
B (150)	19,24	18,80	19,07	57,11	19,04 ± 0,22 <sup>c</sup>
C (225)	14,18	15,43	14,72	44,33	14,78 ± 0,63 <sup>b</sup>
D (300)	6,20	6,59	4,93	17,72	5,91 ± 0,87 <sup>a</sup>
E (375)	6,52	7,34	6,70	20,56	6,85 ± 0,43 <sup>a</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh ekstrak daun sendok (*P. major L.*) terhadap total nekrosis pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) adalah berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Kemudian hasil uji Duncan menunjukkan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh yang terbaik, diikuti dengan perlakuan E (375 ppm), C (225 ppm), B (150 ppm) dan A (75 ppm). Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan kerusakan nekrosis histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada **Gambar 26** dan **Lampiran 17**. Dari gambar tersebut diperoleh bahwa nilai nekrosis berbanding terbalik dengan dosis yang diberikan dengan koefisien korelasi ( $R^2$ ) sebesar 0,902.





Gambar 26. Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Nekrosis

## 2.) Hemoragik

Hemoragik pada ginjal merupakan kondisi dimana ikan mengalami keadaan stress yang disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah infeksi bakteri patogen. Kondisi ini diindikasikan dengan keluarnya darah dari pembuluh darah baik keluar jaringan tubuh maupun keluar tubuh. Hemoragik juga dapat berupa pembengkakan pada jaringan yang menyebabkan keluarnya cairan kental (Prameswari, *et al.*, 2013). Hasil skoring rerata hemoragik dalam penelitian ini disajikan pada **Tabel 21**.

Tabel 21. Hasil Skoring Rerata Hemoragik Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*C. carpio*)

Perlakuan (ppm)	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	13,26	12,73	10,89	36,88	12,29 ± 1,24 <sup>c</sup>
B (150)	11,65	9,66	10,05	31,36	10,45 ± 1,05 <sup>c</sup>
C (225)	5,97	6,65	8,63	21,25	7,08 ± 1,38 <sup>b</sup>
D (300)	3,10	2,01	3,01	8,12	2,71 ± 0,61 <sup>a</sup>
E (375)	4,51	3,18	4,56	12,25	4,08 ± 0,78 <sup>a</sup>

Keterangan: angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Hasil uji Anova (*Analysis of varience*) menunjukkan pengaruh ekstrak daun sendok (*P. major L.*) terhadap total hemoragik pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Kemudian hasil uji Duncan menunjukkan perlakuan D dengan dosis 300 ppm memberikan pengaruh yang terbaik, diikuti

dengan perlakuan E (375 ppm), C (225 ppm), B (150 ppm) dan A (75 ppm).

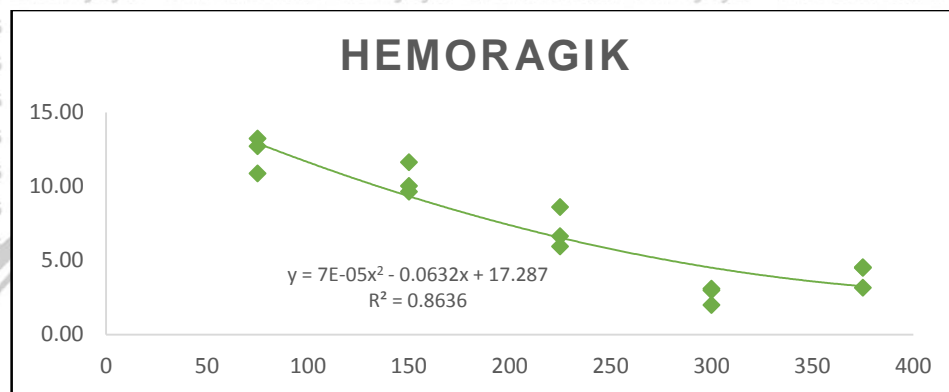
Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan kerusakan hemoragik

histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada **Gambar 27** dan **Lampiran**

**18**. Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan

maka kerusakan yang terjadi semakin berkurang. Hasil regresi polynomial

menunjukkan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,8636.



**Gambar 27.** Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Hemoragik

### 3.) Melanomakrofag

Melanomakrofag merupakan kumpulan agregat makrofag yang berisi seroid, *hemosiderin* dan *lipofuschin* yang hampir serupa dengan pigmen melanin

yang timbul akibat terjadinya peradangan. Secara umum, melanomakrofag

terdapat pada histopatologi ginjal dapat keadaan normal. Namun pada keadaan

setres, sebaran serta kuantitas dari melanomakrofag akan mengalami

peningkatan. Sehingga tingginya kadar melanomakrofag merupakan biomarker

keadaan jaringan tubuh ikan yang mengalami stress kronis (hadi, *et al.*, 2017).

Hasil skoring rerata melanomakrofag dalam penelitian ini disajikan pada **Tabel 22**.



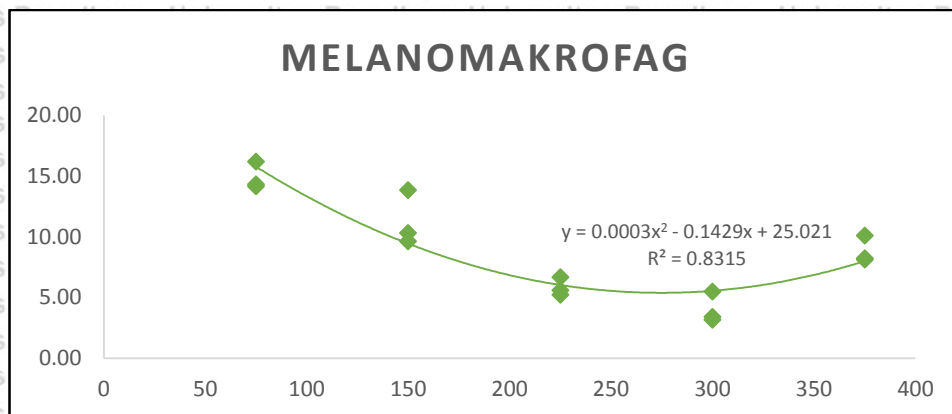
**Tabel 22.** Hasil Skoring Rerata Melanomakrofag Histopatologi Ginjal Ikan Mas (*C. carpio*)

Perlakuan (ppm)	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	14,32	16,18	14,16	44,66	14,89 ± 1,12 <sup>c</sup>
B (150)	9,62	13,84	10,31	33,77	11,26 ± 2,26 <sup>b</sup>
C (225)	5,22	6,65	5,58	17,45	5,82 ± 0,74 <sup>a</sup>
D (300)	3,38	3,15	5,48	12,01	4,00 ± 1,28 <sup>a</sup>
E (375)	10,08	8,22	8,10	26,4	8,80 ± 1,11 <sup>b</sup>

Keterangan : angka yang tertera pada kolom yang sama yang diikuti oleh notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Pengamatan melanomakrofag pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) pada uji Anova (*Analysis of variance*) menunjukkan pengaruh yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Kemudian hasil uji Duncan menunjukkan perlakuan D (300 ppm) memberikan pengaruh yang terbaik, diikuti dengan perlakuan E (375 ppm), C (225 ppm), B (150 ppm) dan A (75 ppm). Hubungan antara ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan kerusakan melanomakrofag histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) disajikan pada **Gambar 28** dan **Lampiran 19**.

Dari gambar tersebut menunjukkan adanya hubungan pengurangan kerusakan melanomakrofag dengan meningkatnya dosis yang diberikan. Hasil regresi *polynomial* menunjukkan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,8135 dengan persamaan  $y = 0,0003x^2 - 0,1429x + 25,02$ . Berdasarkan persamaan tersebut diperoleh bahwa pada dosis 238, 16 ppm, ekstrak daun sendok (*P. major L.*) mampu memberikan pengaruh penurunan melanomakrofag terbaik hingga sebesar 8,00.



Gambar 28. Grafik Hubungan Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*) dengan Melanomakrofag

### 5.2.5. Gejala Klinis Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Pengamatan gejala klinis dilakukan secara deskriptif, dimana gejala klinis yang diamati meliputi respon makan, tingkah laku serta perubahan morfologi.

Pengamatan ini dilakukan mengacu pada modifikasi dari Khaerani, *et al.* (2018).

Hasil pengamatan gejala klinis pada ikan mas (*C. carpio*) yang infeksi bakteri *A. hydrophila* serta pasca pemeliharaan setelah pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) disajikan pada Tabel 23.

Tabel 23. Pengamatan Gejala Klinis Ikan Mas (*C. carpio*)

Ulangan	Perlakuan	Dosis (ppm)						
		K-	A	B	C	D	E	K
1	Pasca Infeksi	a,c	a,b	a,c	a,d	a,c	a,d	h
2		a,c	a,c	a,d,c	a,b	a,b,c	a,c	h
3		a	a,b	a	a,c	a,c	a,d	h
1	Pasca pemeliharaan	a,c	b,e	e,f	e,g	e,f,h	e,g,h	h
2		a,d	c,e	e,d	e,h	e,f,h	e,f,h	h
3		a,c	a,b	e	e,f	e,f,h	e,g,h	h

Keterangan : (a): berenang pasif, nafsu makan berkurang; (b) warna tubuh pucat, kondisi lendir berlebih; (c) sisik mengelupas, kemerahan pada operculum; (d) luka borok, peradangan, pembengkakan hingga tukak; (e) berenang mulai aktif dan nafsu makan kembali normal; (f) kemerahan pada operculum berkurang; (g) peradangan mulai menghilang h: ikan normal



Gejala klinis ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri pada penelitian ini meliputi nafsu makan menjadi berkurang, warna tubuh menjadi pucat, terjadi pengelupasan sisik, operculum memerah, terjadi luka, peradangan, pembengkakan hingga tukak. Mastuti, *et al.* (2017), menyatakan dalam kasus yang serupa, ikan mas (*C. carpio*) akan mengalami beberapa gejala seperti pergerakannya yang menjadi lebih lambat dan tidak teratur, beberapa ikan diketahui berenang mendekati aerasi bahkan meloncat ke permukaan akuarium.

Selain itu bakteri ini dapat menyebabkan timbulnya luka hingga borok, pendarahan dan sirip menjadi geripis.

Salah satu gejala yang terdapat dalam penelitian ini adalah operculum yang memerah. Pratama, *et al.* (2017), menyatakan bahwa tubuh ikan mas (*C. carpio*) yang memerah dapat disebabkan oleh aktivitas dari beberapa enzim bakteri *A. hydrophila*. Salah satu dari enzim tersebut yaitu hemolisin akan menargetkan sel darah merah. Enzim ini akan memecah sel darah merah sehingga akan membuatnya keluar dari pembuluh darah dan menyebabkan timbulnya bercak merah atau kemerahan pada permukaan kulit ikan mas (*C. carpio*).

Selain itu pada pengamatan pasca infeksi bakteri terdapat beberapa ikan yang mengalami peradangan akibat luka. Peradangan tersebut diduga disebabkan oleh toksisitas bakteri *A. hydrophila*. Prasetio, *et al.* (2015), menyatakan bahwa peradangan dapat terjadi akibat toksin bakteri *A. hydrophila*. Toksin tersebut dipercaya mampu mendegradasi jaringan serta organ tubuh ikan. Aboyadak, *et al.* (2015), menambahkan bahwa tanda klinis infeksi bakteri termasuk hemoragik sangat berkaitan erat dengan invasi dan kolonisasi bakteri. Invasi tersebut menghasilkan racun yang atau toksin yang menyebabkan gejala gejala kerusakan tubuh ikan.



Kondisi ikan mas setelah pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dan pasca pemeliharaan menunjukkan terjadi perubahan baik pada tingkah laku, respon makan bahkan morfologi. Perubahan morfologi menjadi lebih baik ditunjukkan pada perlakuan C, D dan E dengan dosis 225, 300 dan 375 ppm. Hal ini diduga akibat pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang dilakukan dengan metode perendaman. Setyani, *et al.* (2018), menyatakan bahwa metode perendaman yang digunakan dalam usaha pengobatan lebih efektif untuk ikan yang berukuran kecil pada skala yang tinggi.

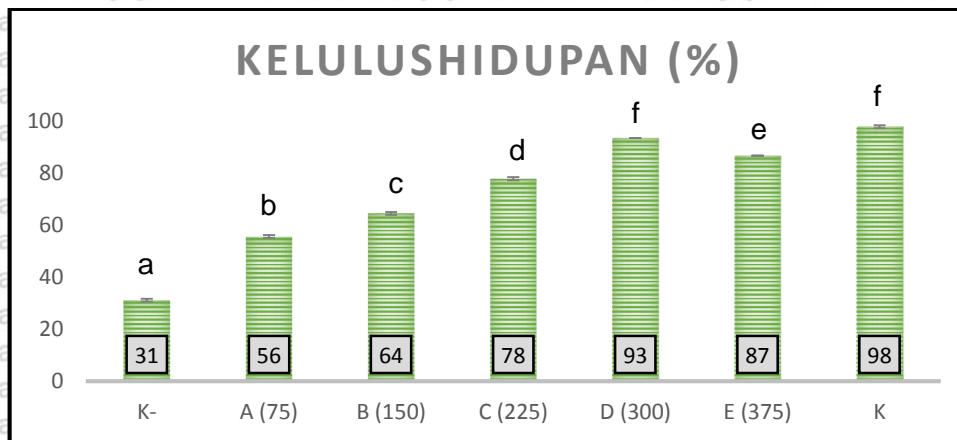
Zubair, *et al.* (2015), menyatakan bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun sendok (*P. major L.*) bertidak secara terpisah maupun sinergis akan meningkatkan poliferasi sel yang diduga menjadi salah satu mekanisme dimana tanaman ini mampu merangsang proses penyembuhan luka. Adom, *et al.* (2017), menambahkan bahwa senyawa flavonoid pada ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang dapat bekerja sebagai antioksidan memiliki peranan dalam penyembuhan luka. Flavonoid akan melindungi sel dari kerusakan mediator inflamasi.

### 5.2.6 Kelulushidupan (SR)

Pemberian dosis ekstrak daun sendok (*P. major L.*) saat awal pemeliharaan tidak mempengaruhi kelulushidupan (SR). Namun pasca infeksi bakteri kelulushidupan berkurang secara drastis. Perlakuan kontrol (-) yang diberi infeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa diberi perlakuan ekstrak daun sendok (*P. major L.*) menunjukkan tingkat kelulushidupan yang rendah yaitu 31%. Hal ini diduga infeksi bakteri *A. hydrophila* memberikan dampak terhadap kesehatan ikan sehingga menyebabkan tingginya kematian. Omar, *et al.* (2016), menyatakan bahwa kematian ikan yang diakibatkan oleh bakteri *A. hydrophila* dikaitkan dengan adanya lebih dari satu gen virulen. Gen virulen diketahui bertanggung jawab untuk memproduksi toksin yang menimbulkan gejala klinis hingga kematian.



Kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) dalam penelitian ini disajikan pada **Gambar 29** dan **Lampiran 20**.



**Gambar 29.** Pola Tingkat Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*)

Dari gambar tersebut diketahui bahwa pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) memberikan pengaruh yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Meningkatnya kelulushidupan pada perlakuan A, B, C, D dan E apabila dibandingkan dengan K (-) diduga disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sendok (*P. major L.*). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan D dengan dosis 300 ppm memberikan hasil kelulushidupan terbaik yang mendekati dengan perlakuan kontrol normal yaitu sebesar 93%, sedangkan untuk perlakuan kontrol normal diperoleh kelulushidupan sebesar 98%. Hal ini diduga disebabkan oleh senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tanin yang terdapat dalam ekstrak daun sendok (*P. major L.*). Suteja, *et al.* (2016), menyatakan bahwa flavonoid sebagai salah satu senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri bekerja dengan berbagai macam cara, diantaranya adalah menghambat DNA gyrase, menghambat metabolisme energi dan pertumbuhan bakteri.

Sedangkan menurunnya kelulushidupan pada perlakuan E diduga disebabkan oleh pemberian dosis yang semakin tinggi. Beberapa senyawa yang diberikan dalam dosis tinggi diduga dapat menyebabkan keracunan. Kaerani, *et al.* (2018), menyatakan bahwa senyawa saponin pada dosis tinggi dapat

menimbulkan busa yang memiliki efek racun pada ikan. Saponin dengan kadar yang tinggi juga diketahui mampu membuat proses pernafasan ikan terganggu.

### 5.2.7 Parameter Penunjang

#### 5.2.7.1 Parameter Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor fatal pada kehidupan ikan mas (*C. carpio*). Parameter kualitas air yang diamati dalam penelitian ini meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO). Dalam mempertahankan dan menjaga kualitas air dilakukan pergantian air sebanyak 30% dari bolume air setiap harinya.

Pengamatan kualitas air ini dilakukan selama 7 hari dari awal penelitian hingga akhir pemeliharaan. Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian disajikan pada

**Tabel 24 dan Lampiran 19.**

**Tabel 24.** Hasil Pengamatan Kualitas Air

No.	Parameter	Rentang Parameter Pemeliharaan	Standar Kualitas Air
1.	Suhu	23 – 25°C	20 – 28°C (Diana, <i>et al.</i> , 2017)
2.	pH	7,42 – 7,51	6,5 – 8,5 (Sehatapy dan Borut, 2018)
3.	DO	6,2 – 7,1 mg/L	6 – 7,9 mg/L (Rousdy dan WlJayanti,2016)

Suhu air selama pemeliharaan dalam penelitian ini berada pada rentang 23 – 25°C, suhu ini dapat dikatakan masih dalam kisaran normal untuk kehidupan ikan. Ikan mas (*C. carpio*) pada dasarnya mampu bertahan hidup dalam air yang mengalami perubahan suhu ekstrim, namun umumnya ikan mas dapat hidup layak pada suhu 14 – 38°C. Walaupun tubuh ikan mas (*C. carpio*) dapat mentolerir perubahan suhu, namun suhu sangatlah berpengaruh terhadap daya tahan tubuh dan juga kemungkinan munculnya serangan penyakit (Mustofa, *et al.*, 2018).

Selain itu suhu merupakan salah satu faktor utama yang memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Sebagian besar bakteri akan tumbuh



dengan baik pada suhu antara 25°C hingga 40°C, namun suhu optimum dalam infeksi bakteri *A. hydrophila* terhadap ikan adalah 23°C – 5°C. *A. hydrophila* dapat memproduksi AHL dalam level yang tinggi pada suhu 25°C (Mizan, *et al.*, 2018). Novita, *et al.* (2016) menambahkan bahwa AHL merupakan suatu molekul autoinducer yang digunakan sebagai sinyal dalam quorum sensing untuk faktor virulensi bakteri *A. hydrophila*.

Selain suhu, derajat keasaman atau pH merupakan parameter penting dalam pemeliharaan ikan mas (*C. carpio*). pH air selama pemeliharaan dalam penelitian ini berada pada rentang 7,42- 7,51. Pratama, *et al.* (2018), menyatakan bahwa nilai pH sangat berpengaruh pada proses kimia yang terjadi dalam air. pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi akan menyebabkan ikan mengalami perubahan warna menjadi tampak lebih pucat. Selain itu perubahan pH juga akan mempengaruhi mobilitas ikan (pergerakan menjadi lebih lambat).

DO (*Dissolved Oxygen*) dalam perairan merupakan salah satu parameter utama yang perlu diketahui dalam kualitas air kehidupan ikan (*C. carpio*). DO yang dapat ditelorir oleh tubuh ikan mas (*C. carpio*) berada pada rentang 2,5 – 7,1 mg/L. Namun pada umumnya kandungan oksigen dengan nilai minimum 2 mg/L merupakan kondisi yang cukup untuk mendukung kehidupan organisme perairan (Mustofa, *et al.*, 2018).

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol daun sendok (*P. major L.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sebesar 8,30 mm pada dosis (100 ppm), 9,9 mm (dosis 200 ppm), 11,10 mm (dosis 300 ppm), 12,11 mm (dosis 400 ppm) dan 14 mm (500 ppm).
2. Ekstrak daun sendok (*P. major L.*) mengandung senyawa berupa fenol, flavonoid, saponin dan tanin berdasarkan hasil uji fitokimia, FTIR dan UV-VIS.
3. Pemberian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) pada ikan mas (*C. carpio*) pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* memberikan pengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ) baik pada eritrosit, hemoglobin, hematokrit, leukosit, limfosit, monosit, neutrofil maupun pada histopatologi ginjal ikan mas (*C. carpio*) dengan dosis terbaik pada perlakuan D sebesar 300 ppm.

### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian untuk melihat ekstrak daun sendok (*P. major L.*) dengan pelarut etil asetat pada gambaran darah maupun histopatologi ginjal sebagai pembanding.
2. Perlu dilakukan penelitian ekstrak daun sendok (*P. major L.*) yang memiliki kandungan flavonoid sebagai imunostimulan untuk meningkatkan daya tahan atau kekebalan tubuh ikan mas (*C. carpio*) terhadap invasi bakteri *A. hydrophila*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichman dan S. Pillai. 2016. Basic Immunology: Functions and Disorders of The Immune System. Fifth Edition Elsevier. Terjemahan oleh Kalim, H. 2016. Dasar Imunologi: Fungsi dan Kelainan Sistem Imun. Edisi Kelima Elsevier. Singapore.
- Aboyadak, I. M., N. GMA1, A.A. Goda, W. H Aboelgalagel dan A. Alnokrashy. 2015. Molecular Detection of *Aeromonas hydrophila* as the Main Cause of Outbreak in Tilapia Farms in Egypt. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*. 2 (5).
- Adom, M. B., M. Taher, M. F. Mutalabisin, M. S. Amri, M. B A. Kudos, M. W. A. W. Sulaiman, P. Sengupta dan D. Susanti. 2017. Chemical Constituents and Medical Benefits of *Plantago major*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 96: 348 – 360.
- Adhayanti, I., T. Abdullah dan R. Romantika. 2018. Uji Kandungan Total Polifenol dan Flavonoid Kulit Pisang Raja (*Musa paradisiaca var. sapientum*). *Media Farmasi*. 14 (1): 146 – 152.
- Afifah, B., N. Abdulgani dan G. Mahasri. 2014. Efektifitas Perendaman Benih Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Dalam Larutan Perasan Daun Api – api (*Avicenia marina*) Terhadap Penurunan Jumlah *Tricodina* sp. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 3 (2): 58 – 62.
- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta Timur. 226 hlm.
- Altun, S., S. Ozdemir, H. Arslan. 2017. Histopathological Effects, Responses Of Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis Biomarkers And Alteration Of Gene Expressions Related To Apoptosis, Oxidative Stress, And Reproductive System In Chlorpyrifosexposed Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Enviromental Pollution*. 230:432 – 443.
- Amanu, S., Kurniasih dan S. Indaryulianto. 2014. Identifikasi Penyakit Aeromonad Pada Budi Daya Ikan Air Tawar di Bali. *Jurnal Veteriner*. 15 (4): 474 – 486.
- Anam, C., Sirojudin dan K. S. Firdausi. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin dan Spirtus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Berkala fisika*. 10 (1): 79 – 85.
- Andayani, S., H. Suprastyani, G. D. A. Gumala, U. Oktafa. N. M. Fatikah, M. Wahyudi, A. Farida dan R. Pratama. Pengaruh Pemberian Bakteri *Lactobacillus plantarum* Terhadap Histopatologi dan Hematologi Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal*) yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Fisheries and Marine Science*. 1 (4): 31 – 38.
- Annabi, A., K. Said dan I. Messaoudi. 2013. Cadmium: Bioaccumulation, Histopathology and Detoxifying Mechanisms in Fish. *American Journal of Research Communication*. 1 (4): 60 – 79.
- Andrade, C. G. d., L. M. d. S. Mesquita, D. C. Murador, A. R. C. Braga, V. V. d. Resso, O. J. G. d. Almeida dan W. Vilegas. 2018. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting Associated With Macroscopic and Histological Analysis for *Plantago major* Herbal Infusions Quality Control. *Food Research Internasional*. 107: 314 – 324.
- Andriani, D. D., N. W. Setyanto dan L. W. N. Kusuma. 2017. Desain dan Analisis Eksperimen Untuk Rekrayasa Kualitas. UB Press. 2016 hlm.



- Anugraha, R. S., Subandiyono dan E. Arini. 2014. Pengaruh Penggunaan Ekstrak Buah Nanas Terhadap Tingkat Pemanfaatan Protein Pakan dan Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (4): 238 – 246.
- Arifin, M. Y. 2016. Pertumbuhan dan Survival Rate Ikan Nila (*Oreochromis. Sp*) Strain Merah dan Strain Hitam yang Dipelihara Pada Media bersalininitas. *J. Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*. 16 (1): 159 – 166.
- Arindita, C., Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Pengaruh Penambahan Serbuk Lidah Buaya (*Aloe vera*) Dalam Pakan Terhadap Kelulushidupan Dan Profil Darah Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri "*Aeromonas hydrophila*". *Aquaculture Management and Technology*. 3 (3): 66 – 75.
- Artini, P. E. U. D., K. W. Astuti dan N. K. Warditiani. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber Purpureum Roxb.*) *Farmasi Udayana*. 2 (4): 6 – 12.
- Arwin, M., F. G. Ijong dan R. Tumbol. 2016. Characteristics of *Aeromonas hydrophila* Isolated From Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Science and Management*. 4 (2): 52 – 55.
- Astuti, A. P. K., S. Hastuti dan A. H. C. Haditomo. 2017. The Effect of Extract Curcuma in the Diets as Immunostimulant for Java Barb (*Puntius javanicus*) with Bacterial Challenge Test. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 6(3). 10 – 19.
- Azani, W., Zainuddin dan E. Rahmi. 2017. Gambaran Histologi Sistem Urinaria Ikan Gabus (*Channa striata*). *JIMVET*. 1(14): 709 – 714.
- Azhar, F. 2013. Pengaruh Pemberian Probiotik dan Prebiotik Terhadap Performan Juvenile Ikan Kerapu Bebek (*Comileptes altivelis*). *Buletin Veteriner Udayana*. 6 (1): 1 – 9.
- Baba, E. U. Acar, C. Ontas, O. S. Kesbic dan S. Yilmaz. 2016. The use of Avena sativa extract against *Aeromonas hydrophila* and its effect on growth performance, hematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Italian Journal of Animal Science*. 15 (2): 325 – 333.
- Bastardo, A., C. Ravelo, N. Castro, J. Calheiros dan J. L. Romalde. 2012. Effectiveness of Bivalent Vaccine Against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garviae* Infection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish and Shellfish Immunology*. 32; 756 – 761
- Barros, M.M., D.R. Falcon, R.O. Orsi, L.E. Pezzato, A.C.Fernandes, I.G. Guimaraes, A. Fernandes, C. R. Padovani dan M. M. Sartori. 2014. Non-specific Immune Parameters and Physiological Response of Nile tilapia fed B-glucan and Vitamin C for Different Periods and Submitted to Stress and Bacterial Challenge. *Fish & Shellfish Immunology*.
- Bbosa, G. S., N, Mwebaza, J. Odda, D. B. Kyegombe dan M. Ntale. 2014. Antibiotics/Antibacterial Drug Use, Their Marketing and Promotion During the Post-antibiotic Golden Age and Their Role in Emergence of Bacterial Resistance. *Health*. 6 (5): 410 – 425.
- Bebbahani, B. A., F. T. Yazdi, F. Shahidi, M. A. Haesarinejad, S. A. Mortazavi, M. Mohebbi. 2017. Plantago major Seed Mucilage: Optimization of Extraction and Some Physicochemical and Rheological Aspects. *Carbohydrate Polymers*. 155: 68 – 77.
- Behrooz, A. B., S. Fakhri, T. Y. Farideh, M. S. Ali dan M. Mohebbat. 2017. The Antimicrobial Effect and Interaction Between The Aqueous and Ethanolic Extract *Plantago major* on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*,



- Escherichia coli* and *Pseudomonas Aeruginosa* in Vitro. *Iranian Jurnal of Infectious Disease and Tropical Medicine*. 21 (75): 1 – 8.
- Bhuvaneswari, R., N. Manickam dan P. Santhanam. 2018. Recovery of *Cyprinus carpio* (Ornamental Koi) Experimentally Infected with *Aeromonas hydrophila* Through Phytotherapy. *Aquatic Research and Marine Sciences*. 1 (2): 1 – 14.
- Bontjura, S., Waworuntu, O. A. and Siagian, K. V. (2015) 'Antibacterial effect of leilem leaf extract (*Clerodendrum minahassae* L.) On streptococcus mutans bacteria', *Pharmakon*, 4(4), pp. 96–101.
- Budi, S., R. Intan, N. Leko dan A. G. Tantu. 2013. Pengaruh Ekstrak Cabe Merah *Capasicum annum* Terhadap Pigmentasi Kadar Leukosit dan Pertumbuhan Ikan Cupang Betta Spelndes Pada Dosis yang Berbeda. *Konferensi Akuakultur*. 7 hlm.
- Burhanuddin, A. I. 2015. *Ikhtiologi, Ikan dan Segala Aspek Kehidupannya*. Deepublish. Yogyakarta. 452 hlm.
- Cahyaningrum, D. S. dan A. H. C. Haditomo. 2015. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Cermay (*Phyllanthus acidus* [L.] skeels) Terhadap Kelulushidupan dan Histopatologi Ginjal Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus* yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 4 (1): 40 - 46
- Campbell, T. W. dan C. Ellis 2013. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Blackwell Publishing. US. 287 hlm.
- Cornet, Y. dan E. J. Javaux. 2017. FTIR Micro-Spectroscopy: A Tool to Identify Microfossils. Artikel. University of Liege. Italy.
- Dadiono, M. S. 2017. Karakterisasi Fraksi dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) yang Terinfeksi *Aeromonas salmonicida*. Tesis. Universitas Brawijaya. 138 hlm.
- Dewi, C. S. U., D. Soedharma dan M. Kawaroe. 2012. Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif Dari Lamun *Enhalus Acoroides* dan *Thalassia Hemprichii* dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. *Teknologi Perikanan dan Kelautan*. 3 (2): 23 – 27.
- Dian, R., Fatimawali and Fona, B. (2015) 'Test Resistance Of *Escherichia Coli* Bacteria Isolated From Dental Plakes To Mercury And Antibiotics Cloramfenicol', *Biomedik*, 3(April), pp. 59–63.
- Dianti, L., S. B. Prayitno, R. W. Ariyanti. 2013. Nonspesific Imunne *Cyprinus carpio* Soaked in Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Leaf Extract Infected by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 2 (4): 63 – 71.
- DJPB KKP, 2017. *Data dan Statistik Perikanan Budidaya Nasional 2015 – 2019*. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Dwicahyani, T., Sumardianto and Rianingsih, L. (2018) 'Bioactivity Test of Sea Cucumber *Holothuria atra* Extracts as Antibacterial Agent for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Tiara', *J. Peng % Biotech.*, 7(1), pp. 15–24.
- Erlin, P. (2016) 'Effectiveness of Lemongrass Active Antibacterial (*Cymbopogon citratus*) on Streptococcus mutans Bacteria Introduction Caries is a dental disease', *Syifa MEDIKA*, 6(2).
- Esmaeili, H. R., B. W. Coad, H. R. Mehraban, M. Masoudi, R. Khaefi, K. Abbasi, H. Mostafavi dan S. Vatandoust. 2014. An Update Checklist of Fishes of The Caspian Sea Basin of Iran With a Note Their Zoogeography. *Jurnal Ichtyol*. 1 (3): 152 – 184.



- Fadziriyah, N. C. H. 2018. Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Daun Delima (*Punica granatum* L.) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Brawijaya. 60 hlm.
- Fitriani, U., D. Ardiyanto dan T. A. Mana. 2017. Evaluasi Keamanan dan manfaat Ramuan Jamu Untuk Hiperurisemia. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 45 (4): 227 – 232.
- Flajšhans, M. dan Hulata, G. 2007. Common Carp – *Cyprinus carpio*. *Genimpact Final Scientific Report*. 8 hlm.
- Flores, R. G., C. L. Calderon, L. W. Scheibel, P. T. Guerra, C. R. Padilla, R. T. Guerra dan R. J. Weber. 2000. Immunoenhancing Properties of *Plantago major* Leaf Extract. *Phytotherapy Research*. 14: 617 – 622.
- Galal T. M. dan H. S. Shehata. 2014. Bioaccumulation and Translocation of Heavy Metals by *Plantago major* L. Grow in Contaminated Soils Under The Effect of Traffic Pollution. *Ecological Indicators*. 48: 244 – 251.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. 2018. Spektroskopi Molekuler Untuk Analisis Farmasi. UGM Press: Yogyakarta. 173 hlm.
- Gober, H. S., M. A. El-Kasheif, S. A. Ibrahim dan M. M. N. Authman. 2013. Effect of Water Pollution In El-Rahawy Drainage Canal on Hematology and Organs of Freshwater Fish *Clarias gariepinus*. *World Applied Science Journal*. 21 (3): 329 – 341.
- Gonçalves, S. dan A. Romano. 2016. The Medicinal Potential of Plants from The Genus *Plantago* (*Plantaginaceae*). *Industrial Corps and Products*. 83: 213 – 226.
- Grant, K. R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim*. 18: 83 – 103.
- Gunawan, B. dan C. D. Azhari. 2012. Karakterisasi Spektrofotometri IR dan Scanning Electron Microscopy (SEM) Sensor Gas Dari Bahan Polimer Poly Ethelyn Glycol (PEG). *Jurnal Sains dan Teknologi*. 3 (2): 1 – 17.
- Gupita, Y. R., D. Sellogounder, M. Kannan, S. Deepa, B. Senthilkumaran, Y. Basavaraju. 2016. Effect of copper nanoparticles exposure in the physiology of the common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical, histological and proteomic approaches. *Aquaculture and Fisheries*. 1: 15 – 23.
- Hadi, N., D. Aliza dan R. Daud. 2017. The Amount of Melanomacrophage centres (MMC) in Liver and Kidneys of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Maintained in Various Population Density. *Medika Veterina*. 11 (2): 77 -81.
- Hanson, I. A., M. R. Liles, M. J. Hossain, M. j. Griffin dan W. G. Hamstreet. 2014. Motile *Aeromonas* Septicemia In: Fish Health Section Blue Book Edition 2014, Section 1.2.9. American Fisheries Society-Fish Health Section. Bethesda, Maryland.
- Hamed, S. B., M. J. T. Ranzani-Paiva, L. Tachibana, D. C. Dias, C. M. Ishikawa dan M. A. Esteban. 2018. Fish Pathogen Bacteria: Adhesion, Parameters Influencing Virulence and Interaction With Host Cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 80: 550 – 562.
- Hariati, S. et al. (2018) 'Antibacterial Activities Of The Sea Extract *Nodulisporium* Sp. Kt29 Against *Vibrio Harveyi*', *JPHPI*, 21(2), pp. 250–257.
- Haryani, A., R. Grandiosa, I. D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji Efektivitas Daun Pepaya (*Carica papaya*) Untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3 (3): 213 – 220.



Harborne, J. B. 2006. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menggunakan Analisis Tumbuhan. ITB Bandung: Bandung. 354 hlm.

Hasrati, E. dan R. Rusnawati. 2011. Kajian Penggunaan Daging Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.) Terhadap Tekstur dan Cita Rasa Bakso Daging Sapi. *Agromedia*. 29 (1).

Hazzuli, N. J., A. Setyawan dan E. Harpeni. 2015. Imugenitas Kombinasi Vaksin Inaktif Whole Cell *Aeromonas salmonicida* Dan Vitamin C Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *E-Jurnal Rekrayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 3(2): 359 – 366.

Hidayat, N., I. A. Dewi dan D. A. Hardian. 2015. Ekstraksi Minyak Melati (*Jasminum sambac*) (Kajian Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Industria*. 4 (2): 82 – 88.

Huu, H. D., H. M. Sang dan N. T. T. Thuy. 2016. Dietary b-glucan improved growth performance, Vibrio counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. *Fish and Shellfish Immunology*. 54: 402 – 410.

Husniya, L., A. Gofur dan D. Listyorini. 2016. Pengaruh Jenis Pakan Terhadap Pertambahan Bobot dan Kelulushidupan Benih Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Strain Punten. *Artikel*. Universitas malang. Malang. 8 hlm.

Igbibinosa, I. H., E. U. Igumbor, F. Aghdasi, M. Tom dan A. I. Okoh. 2012. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. *Scientific World Journal*. 13 hlm.

Indriatmoko, D. D., S. Kumala dan Kusmardi. 2017. Activities Of Red Power Fruit (*Pandanus conoideus* Lam.) Extract On Poliferation Of Lymphocytes And Mammary Gland Tumor Cells In Vitro. *Farmagazine*. (6)2: 1 – 13.

Istikhanah, Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. The Effect of Dyeing *Piper betle* Linn. Extract to Mortality And Histopathology Kidney Of Carp Which It Was Infected By *Aeromonas hydrophila* Bacteria. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (3): 51 – 57.

Juliani et al. (2016) 'Analysis Of A-Glucosidase And Antioxidant Inhibitors From Kumis Cat With Metabolomic Approach Based On Ftir', *J. Tech and Food Industry*, 27(1), pp. 17–30. doi: 10.6066/jtip.2016.27.1.17.

Kainde, A. R., D. H. C. Pangemanan dan B. S. P. Hutagalung. 2016. Uji Efektivitas Daun Sendok (*Plantago major* L.) Terhadap Waktu Pendarahan Pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Jurnal e-GiGi (eG)*. 4 (2): 271 – 276.

Karima, S., S. Farida dan Z. M. Mihoub. 2015. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Plantago major*. *J. Pharm Sci*.

Karmila, U., Karina, S. and Yulvizar, C. (2017) 'Tumeric Curcuma Domestica Extract As Anti Bacteria For *Aeromonas Hydrophila* In Fish Patin Pangasius Sp.', *Marine and Fisheries Scientific Journal Unsyiah*, 2(1), pp. 150–157.

Kawashty, S. A. et al. (1994) 'Flavonoids of *Plantago* species in Egypt', *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(7), pp. 729–733. doi: 10.1016/0305-1978(94)90058-2.

Kiswandono, A. A. et al. (2015) 'Study Of Ftir Spectry In Coopoly Membrane (Eugenol-Divinilbenzena), Co-Edvb As A Community Carrier For Fenol Transports', *SNPS*, pp. 543–554.

Khaerani, L. R., S. B. Prayitno dan A. H. C. Haditomo. 2018. Pengaruh Perendaman Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Avverhoa blimbi* L.) Untuk Mengobati Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 7 (1): 99 – 106.



- Kilawati, Y. dan D. Afrianti. Iktiologi Modern. UB Press. Malang. 158 hlm.
- KKP. 2018. Produktivitas Perikanan Indonesia. Indonesia. Jakarta. 49 hlm.
- Kuiper, P.J. C. dan M. Bos. 2012. Plantago: A Multidisciplinary Study. Springer Science and Business Media. Heidelberg. 368 hlm.
- Kumar, M. V. 2016. Morphometric studies of blood cells in *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys molitrix* cultured fish in west Godavari region of Andhra Pradesh. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4 (5): 489 – 493.
- \_\_\_\_\_, R., V. Pande, L. Singh, L. Sharma, N. Saxena, D. Thakuria, A. K. Singh dan P. K. Sahoo. Pathological Findings of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Golden Mahseer (*Tor putitora*). *Fish and Aquaculture Journal*. 7: 1.
- Kurniawan, A., S. B. Prayitno, Sarjito dan A. L. Mariana. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Profil Darah dan Kelulushidupan Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus* Var. *Sangkuriang*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Aquaculture Management and Technology*. 2 (4): 50 – 62.
- \_\_\_\_\_, Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Pada Pakan Terhadap Kelulushidupan dan Profil Darah Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Management and Technology*. 3 (3): 76 – 85.
- Kuvendziev, S., J. Lisichkov, Z. Zekovic, M. Marinkovski dan Z. H. Musliu. 2018. Supercritical Fluid Extraction of Fish Oil From Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. *Journal of Supercritical Fluids*. 133: 52 – 534.
- Lavabetha, A. R. R. R., Hidayaturrehman, Muhamat dah H. S. Budi. 2015. Profil Darah Ikan Timpakul (*Periophthalmodon schlosseri*) Dari Muara Sungai Barito Kalimantan Selatan. *Bioscientia*. 12 (1): 78 – 89.
- Liana, Y. dan Y. A. Utama. 2018. Efektifitas Pemberian Ekstrak Daun Betadine (*Jatropha multifida* Linn) Terhadap Ketebalan Jaringan Granulasi Dan Jarak Tepi Luka Pada Penyembuhan Luka Sayat Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *JKK*. 5 (3): 114 – 123.
- Liebel, S., M. E. M. Tomotake dan C. A. Olivera Ribeiro. 2013. Fish Histopathology Biomarker To Evaluate Water Quality. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8(2): 9 – 15.
- Liu, D. 2017. Laboratory Models for Foodborn Infections. CRC Wordpress. Broken Sound Parkway NW: hlm. 238.
- Lubis, D. M., Sukiya, T. Harjana dan H. Nurcahyo. 2017. Toksisitas Limbah Ciri Nata De Coco Terhadap Mortalitas dan Struktur Histologi Ginjal Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Jurnal Prodi Biologi. 6(5).
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen *Aerolysin* dari *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. *J. Veteriner*. 13 (1): 43 – 50.
- Lumbessy, M., J. Abidjuju dan J. J. E. Paendong. 2015. Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mongoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal Mipa Unsrat*. 2 (1): 50 – 55.
- Lusiastuti, A. M., M. F. Ulkhaq, Widanarni dan T. H. Prihadi. 2016. Evaluasi Pemberian Probiotik *Bacillus* Pada Media Pemeliharaan Terhadap Laju Pertumbuhan dan Perubahan Histopatologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias*



- gariepinus*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Riset Akuakultur*. 11 (2): 171 – 179.
- Mahasri, G., P. Widyastuti dan L. Sulmartiwi. 2011. Gambaran Leukosit Darah Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi *Ichtyoptirus multifilis* Pada Derajat Infestasi yang Berbeda Dengan Metode Kohabitasi. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. (3) 1: 91 – 96.
- Maligan, J. M., V. T. Widayanti dan E. Zubaidah. 2015. Identification of Antimicrobial Compounds of Microalgae *Tetraselmis chuii* Extract (Study the Maceration Extraction Method, Type of Solvent, and Extraction Time). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 16 (3): 195 – 206.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji Patogenitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Melalui Postulat Koch. 5 (2): 245 – 255.
- Mandia, S., N. Marusin dan P. Santoso. 2013. Analisis Histologis Ginjal Ikan Asang (*Osteochilus hasseltii*) di Danau Maninjau dan Singkarak, Sumatera Barat. *J. Bio. UA*. 2 (3): 194 – 200.
- Manopo, H. dan M. E. F. Kolopita. 2015. Supplementation of Beker's Yeast in Feed Enhance Nonspecific Immune Response and Growth of Nile Tilapia. *Veteriner*. 16 (2): 204 – 211.
- Margaretta, S., S. D. Handayani, N. Indraswati dan H. Hindarso. 2011. Ekstraksi Senyawa *Phenolic pandanus amaryllifolius* Roxb. Sebagai Antioksidan Alami. *Widya Teknik*. 10 (1): 21 – 30.
- Marliana, E. dan C. Saleh. 2011. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari siceraria* (Molina) Sandi). 8 (2): 63 – 69.
- Martono, T., G. Haryono, D. Gustinah dan F. A. Putra. 2012. Ekstraksi Tannin Sebagai Bahan Pewarna Alami Dari Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) Menggunakan Pelarut Organik. *Reaktor*. 14 (1): 39 – 45.
- Matofani, A. Y., S. Hastuti dan F. Basuki. 2013. Blood Profile of Tilapia Kunti (*Oreochromis niloticus*) Injected by *Streptococcus agalactiae* with Different Density. *Aquaculture Management and Technology*. 2 (2): 64 – 72.
- Minaka, A., Sarjito dan S. Hastuti. 2012. Identifikasi Agensia Penyebab dan Porfil Darah Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) yang Terserang Penyakit Bakteri. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 1 (1): 249 – 263.
- Mizan, M. F. R., I. K. Jahid, S. Y. Park, J. L. Silva, T. J. Kim, J. Myoung dan S. D. Ha. 2018. Effects of Temperature on Biofilm formation and Quorum Sensing of *Aeromonas hydrophila*. *Ital. J. Food. Sci.* 30: 456 – 466.
- Metiner, K., O. Ozkan dan S. Ak. 2012. Antibacterial Effects of Ethanol dan Aceton extract of *Plantago major* L. on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Research Article*. 18 (3): 503 – 505.
- Monica, W. S., H Mahatmi dan K. Besung. 2013. Pola Resistensi Salmonella typhi yang Diisolasi dari Ikan Serigala (*Hoplias malabricus*) Terhadap Antibiotik. *Jurnal Ilmu Kesehatan Hewan*. 1 (2): 64 – 69.
- Mudlofar, F., E. Yurisinthae dan A. Santoso. 2013. Enlargement of Carp (*Cyprinus carpio*) Business Analysis in The Floating Net Cage in Parit Mayor Village Sub-District East Pontianak. *Eksos*. 9 (3): 153 – 175.
- Mubarokah, L., W. Tjahjaningsih dan L. Sulmartiwi. 2016. Immunotoxic Effect of Heavy Metal Mercury Chloride (HgCl<sub>2</sub>) on Size of Melano Macrophage



- From Common Carp Kidney. *Journal of Aquaculture and Fish Health*. 5(3): 126 – 133.
- Mulia, D. 2010. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri *Aeromonas* sp. Penyebab Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) Pada Gurami. *J. Sains Akuatik*. 13 (2): 9 – 17.
- Mustofa, A., S. Hastuti dan D. Rachmawati. 2018. Pengaruh Periode Pemuasaan Terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan, Pertumbuhan Dan Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Pena Akuatika*. 17 (2):41 – 58.
- Najib, A., G. Alani dan M. Halidin. 2012. Isolation and Identification of Antibacterial Compound From Diethyl Eter Extract of *Plantago major* L. *Phog J*. 4 (31): 59 – 62.
- Nazarizadeh. A., P. Mikaili, M. Moloudizargari, S. Aghanjanshakeri dan S. Javaherypour. 2013. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of *Plantago major* L. and its Active Constituents. *J. Basic. Appl. Sci. Res*. 3 (9).
- Ngajow, M., J. Abidjulu dan V. S. Kamu. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*pometia pinnata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal MIPA UNSRAT*. 2 (2): 128 – 132.
- Nielsen, M. E., L. Hei, A. S. Schmidt, D. Qian, T. Shimada, J. Y. Shen dan J. L. Larsen. 2001. Is *Aeromonas hydrophila* The Dominant Motile *Aeromonas* Species That Causes Disease Outbreaks in Aquaculture Production in The Zhejiang Province of China. *Disease of Aquatic Organisms*. 46: 23 – 29.
- Nirwana, A. P. and Susilowati, I. T. (2017) 'Antibacterial Potency of Dendrophloe petandra Ethanol and Ethyl Asetat Leaves Extract against ESBL Producing *Klebsiella pneumonia*'. *Biomedika*, 10(1).
- Noerchoclis, A., M. A. Muslim dan Maftuch. 2013. Ekstraksi Fitur Roundness Untuk Menghitung Jumlah Leukosit Dalam Citra Sel Darah Ikan. *Jurnal EECCIS*. 7 (1): 35 – 40.
- Noor, Juliansyah. 2016. Metodologi Penelitian: Skripsi, Tesis, disertasi dan Karya Ilmiah. Prenada Media. Jakarta. 313 hlm.
- Novita, W. (2016) 'Antibacterial Activities of Sired Leaf Fraction (*Piper betle* L) on in vitro Installation of Streptococcus Mutans Bacteria', *JMJ*, 4, pp. 140–155.
- Nugroho, R. A. dan F. M. Nur. 2018. Potensi Bahan Hayati Sebagai Immunostimulan Hewan Akuatik. Budi Utama. Yogyakarta. 124 hlm.
- Nuraini, D. N. 2013. Dahsyatnya Pengobatan Hewan. Buana Ilmu Populer. Jakarta. 214 hlm.
- Nursatia, Sarjito dan sA. H. C. Haditomo. 2017. Garlic Extract Administration In Diets a Immunostimulant On Survival Rate And Blood Profile of Catfish (*Pangasius* sp.). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 6 (3): 234 – 241.
- Ode, I. 2011. Identifikasi Ekspresi Protein Reseptor Organ Otak Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Pada Infeksi Vibriosis. *Bimafika*. (3): 216 – 224.
- Omar, A. A. E., E. M. Moustafa dan M. M. Zayed. 2016. Identification and Characterization of Virulence-Associated Genes from Pathogenic *Aeromonas Hydrophila* Strains. *World Vet J*. 6(4): 185 – 192.
- Prameswari, W., A. D. Sasanti dan Muslim. 2013. Populasi Bakteri, Histologi, Kelangsungan Hidup Dan Pertumbuhan Benih Ikan Gabus (*Channa striata*) Yang Dipelihara Dalam Media Dengan Penambahan Probiotik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 1 (1): 76 – 89.



- Praseno, O., H. Krettiawan, S. Asih dan A. Sudrajat. 2010. Uji Ketahanan Salinitas Beberapa Strain Ikan Mas yang Dipelihara Di Aquarium. Prosiding Forum Invasi Teknologi Akuakultur: hlm. 93 – 100.
- Pratama, M. A., Subandiyono dan Pinandoyo. 2015. Pengaruh Berbagai Resiko E/P pakan Berkadar Protein 30% Terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan dan Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 4 (4): 74 – 81.
- Pratama, R. C., Rosidah, Sriati dan I. Rustikawati. 2017. Efektivitas Ekstrak Biji Rambutan Dalam Mengobati Benih Ikan Mas yang Terinfeksi Bakteri *A. hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 8 (1): 130 – 138.
- Pratama, D. R., H. W. Maharani dan H. Yulianto. 2018. Pengaruh Warna Wadah Pemeliharaan Terhadap Peningkatan Intensitas Warna Ikan Guppy (*Poecilia reticulata*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 7(1): 775 – 782.
- Pratiwi, W., L. T. Suwanti dan W. H. Satyantini. 2016. Perendaman Ekstrak *Spirulina Plantesis* Terhadap Ig-M, Jaringan Limpa dan Diferensial Leukosit Ikan Mas Setelah Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 18 (3).
- Putra, A. A. B., N. W. Bgoriani, N. P. Diantariani dan N. L. U. Sumadewi. 2014. Ekstraksi Zat Warna Alam Dari Bonggol Tanaman Pisang (*Musa paradisiaca* L.) Dengan Metode Maserasi, Refluks dan Sokletasi. *Jurnal Kimia*. 8(1): 113 – 119.
- Putri, A. A. dan N. Hidajati. 2015. Activity Antioxidant Test of Phenolic Compound Methanol Extract From Stem Bark Nyeri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry*. 4 (1): 37 – 42.
- \_\_\_\_\_, R. R., Hasanah, R. and Kusimaningrum, I. (2016) 'Anti-bacterial Activity Test and Phytochemical Test Extract of Mangrove Leaves *Sonneratia alba*', *J. Aquawarman.*, 2(April), pp. 43–50.
- \_\_\_\_\_, R. 2018. Potensi Fraksi Etanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) Terhadap Peningkatan Respon Imun Non Spesifik Seluler Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Thesis. Universitas Brawijaya: Malang. 108 hlm.
- Radulović, N. S., P. D. Blagojević, Z. Z. Stojanović-Radić dan N. M. Stojaović. 2013. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Medicinal Chemistry*. 20: 932 – 952.
- Rahman, I. S., Maftuch, E. Sanoesi. 2018. Efektifitas Imunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biki (*Psidium gujava*) Terhadap Histopatologi Hati Ikan Patin (*Pangasius* sp.) Yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Fisheries and Marine Science*. 2(2): 47 – 55.
- Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Deepublish: Yogyakarta. 373 hlm.
- Rahmiyani, I., Mulyono dan R. Mardiana. 2015. Inventarisasi dan Skrining Fitokimia Tumbuhan Obat Berkhasia Antiinflamasi yang Digunakan Oleh Masyarakat Kampung Naga. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 13(1): 54 – 62.
- Ramadhani, S., A. T. Sutanahji dan B. R. Widiatmono. 2013. Perbandingan Efektivitas Tepung Biji Kelor (*Moringa oleifera* Lamk), Poly Aluminium Chloride (PAC), dan Tawas sebagai Koagulan untuk Air Jernih. *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*. 1 (13): 186 – 193.



Rascovic, B., V. Poleksic, I. Zivic dan M. Spasic. 2010. Histology of Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Gills and Pond Water Quality in Semiintensif Production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 16 (3): 253 – 262.

\_\_\_\_\_, I. Javic, V. Koko, M. Spasic, Z. Dulic, Z. Markovic dan V. Poleksic. 2013. Histopathological Indicators: A Useful Fish Health Monitoring Tool in Common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) Culture. *Cent. Eur. J. Biol.* 8 (10): 975 – 985.

Rempe, C. S. et al. (2017) 'The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics', *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), p. 422. doi: 10.3389/fmicb.2017.00422.

Rousdy, D. W. dan N. Wijayanti. 2016. Profil Hematologi Dan Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.) Pada Pemberian Asam Humat Tanah Gambut Kalimantan. *Prosiding Semirata Bidang MIPA BKS-PTN Barat*. Hal 135 – 144.

Rasmussen-Ivey, C. R. R., M. J. Figueras, D. McGarey dan M. R. Lilies. 2016. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1 – 10.

Rasyada, A., E. Nasrul dan Z. Edward. 2014. Hubungan Hematokrit Terhadap Jumlah Trombosit Pada Penderita Demam Berdarah Dengue. *Jurnal Kesehatan andalas*. 3 (3): 343 – 347.

Raziq, B. M. A., H. A. Hasan dan M. K. Murtadha. 2012. The Study of Antibacterial Activity of *Plantago major* and *Ceratonia Silqua*. *Iraqi Postgraduate Medical Journal*. 11 (1): 130 – 135.

Reddy, P. B. dan Rawat, S. S. 2013. Assessment of Aquatic Pollutionn Using Histopathology in Fish As A Protocol. *International Research Journal of Environment Science*. 2 (8), 79 – 82.

Romeh, A. L. 2014. Phytoremediation of Chyanophos Insecticide by *Plantago major* L. in Water. *J. Environmental Health Science and Engineering*. 12 (38): 1 – 8.

Rosmawaty, R. Rosidah dan E. Liviawaty. 2016. Pemanfaatan Ekstrak Kulit Jengkol Dalam Pakan Ikan Untuk Meningkatkan Imunitas Benih GURame (*Osphronemus gourami*) Terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Kelautan*. 8(1): 14 – 22.

Royan, F., S. Rejeki dan A. H. C. Haditomo. 2014. Pengaruh Salinitas yang Berbeda Terhadap Profil Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (2): 109 – 117.

Saka, B. A., Adeyeno, O. K dan Odeseye, A. O. 2017. Multiple Antibiotic Resistance Indices of *Aeromonas Hydrophila* Isolates of Muscle of Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822), From Selected Markets in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 18 (2): 73 – 78.

Samsundari, S. 2008. Pengujian Ekstrak Temulawak dan Kunyit Terhadap Resistensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang Menyerang Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *GAMMA*. 3 (1): 71 – 83.

\_\_\_\_\_, dan G. A. Wirawan. 2013. Analisis Penerapan Biofilter Dalam Sistem Resirkulasi Terhadap Mutu Kualitas Air Budidaya Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*). *Jurnal Gamma*. 8 (2): 86 – 97.

Santos, A. C., F. J. Sutili, B. M. Heinzmann, M. A. Cunha, I.C.M. Brusque, Be. Baldisserotto dan C. C. Zeppenfeld. 2017. Aloysia Triphylla Essential Oil As Additive In Silver Catfish Diet: Blood Response And Resistance Against



- Aeromonas hydrophila* Infection. Fish and Shellfish Immunology. doi: 10.1016/j.fsi.2017.01.032.
- Sari, R., E. R., W. Tjahjaningsih dan Kismiyati. 2018. Perubahan Histopatologi Jaringan Kulit Ikan Komet (*Carassius auratus auratus*) Akibat Infestasi *Argulus japonicas*. *JIPK*. 10(1): 1 – 7.
- Sariningsih, P., W. S. Rita dan N. M. Puspawati. 2015. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) Sebagai Pengendali Jamur *Fusarium* sp. Pada Tanaman Buah Naga. *Jurnal Kimia*. 9(1): 20 – 26.
- Sarjito, R. S., A. Harjuno dan C. Haditomo. 2018. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Cermay (*Phyllanthus acidus* [L] Skeels) Terhadap Total Eritrosit dan Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 7 (1): 114 – 119.
- Schmelzer, G. H., G. H. Schmelzer dan A. Gurib-Fakim. 2008. Plant Resources of Tropical Africa: Medicinal Plants. PROTA. Netherlands. 790 hlm.
- Sehatapy, J. M. F. dan R. R. Borut. 2018. The Effect of Different Surfactant to Frequency of Openings Operculum and Survival Rate of Grass Carp (*Cyprinus carpio*). *Triton*. 14 (1): 35 – 40.
- Septiana, A. T. dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek*. 6. (1). 22 – 28.
- Septriani, E. Harpeni dan Wahdiyarto. 2012. Effect Different Time of Probiotic Administration to Non-specific Immune Response of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Against *Aeromonas hydrophila*. *E-JRTBP*. 1 (1): 39 – 46.
- Shabira, A., Rosidan Y. Mulyani dan W. Lili. 2019. Effect of Types Isolated Lactic Acid Bacteria on Hematocrit and Differential Leukocytes Fingerling Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Infected with *Aeromonas hydrophila* bacteria. *World News of Natural Sciences*. 24: 22 – 35.
- Shahi, N., L. Ardo, G. Fazekas, E. Goeza, S. Kumar, N. Revesz, Z. J. Sandor, Z. Molnar. G. Janey dan Z. Janey. 2017. Immunogene Expression in Head Kindney and Spleen of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Following Thermal Stress and Challenge With Gram-Negative Bacterium, *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Int*. 26 (3): 727 – 741.
- Shirley, K. P., J. Windsor, G. J. Eckert dan R. L. Gregory. 2015. In Vitro of *Plantago major* Extract, Aucubin and Baicalein on *Candida albicans* Biofilm Formation, Metabolic Activity and Cell Surface Hydrophobicity. *Journal of Prosthodontics*. 1 – 8.
- Sitorus, R. N. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Sendok (*Plantago major* L.) Terhadap Bakteri *Escherchia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. USU. Medan. 76 hlm.
- Sirisidhi, K., P. Kosai, K. Jiraungkoorskul dan W. Jiraungkoorskul. 2015. Review of Structure and Coloration of Ornamental Koi (*Cyprinus carpio*) Scale and Its Significance. *Advances in Environmental Biology*. 9 (11): 86 – 94.
- Smith, B. 2005. The State of The Art: A Synopsis of Information on Common Carp (*Cyprinus carpio*) In Australia. South Australian Research and Development Institute (Aquatic Science). Adelaide. 68 hlm.
- Soltani, M., S. M Moghimi, E. H. Mousavi, K. Abdi dan E. Soltani. 2016. Isolation, Phenotypic and Molecular Characterization of Motile *Aeromonas* Species,



- The Cause of Bacterial Hemorrhagic Septicemia in Affected Farmed Carp in Iran. *J. of Veterinary Medicine*. 10 (3): 209 – 216.
- Stroz, J. F. Hemoglobin: Insights Into Protein Structure, Function and Evolution. Oxford University Press. UK. 272 hlm.
- Sugiyarto, A. D. Setyawan dan A. Pitoyo. 2006. Estimasi Kelimpahan dan Distribusi *Plantago major* L. di Gunung Lawu. *Biodiversitas*. 7 (2): 143 – 146.
- Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan dan S. R. Marunduh. 2014. Profil Tumor Necrosis Factor (Tnf-A) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (Imt) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *Biomedik*. 3 (2): 40 – 643.
- Supriatnam Y. 2013. Budi Daya Ikan Mas di Kolam Hemat Air. Cetakan Pertama. Agromedia Pustaka. Jakarta Selatan. 78 hlm.
- Supriyono, E., Yosmaniar, K. Nirmala dan Sukenda. 2013. Toksisitas Moluskisida Niklosamida Terhadap Pertumbuhan Dan Kondisi Histopatologi Juwana Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 13 (1): 77 – 84.
- Susanti, W., A. Indrawati dan F. H. Pasaribu. 2016. Kajian patogenisitas bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada ikan patin *Pangasionodon hypophthalmus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 15 (2): 99 – 107.
- Suteja, I. K. P., Rita, W. S. and Gunawan, I. W. G. (2016) 'Identification And Test Of Activities Of Flavonoid Compounds From Trembesi Leaf Extract (*Albizia Saman* (Jacq.) Merr) As An Antibacteria Of *Escherichia Coli*'. *Chemical journal*. 10(1), pp. 141–148.
- Suwarno, Y. F., Sajito dan S. B. Prayitno. 2014. Sensitifitas Bakteri yang Berasosiasi Dengan Penyakit Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Terhadap Berbagai Macam Obat Ikan yang Beredar di Kabupaten Pati. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (4): 134 – 141.
- Syawal, H., N. Kusumorini, W. Manalu dan R. Affandi. 2011. Physiological and Hematological Response of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Different Temperatures of Media. *Iktiologi Indonesia*. 12 (1): 1 – 11.
- Syahrial, A., T. R. Setyawati dan S. Khotimah. 2013. Tingkat Kerusakan Jaringan Darah Ikan Mas (*C. carpio*) yang Dipaparkan Pada Media Zn-Sulfat (ZnSO<sub>4</sub>). *Protobiont*. 2 (3): 181 – 185.
- Witeska, M., K. Lugowska dan E. Kondera. 2016. Renference Values of Hematological Parameter for Juvenile *Cyprinus carpio*. *Bull. Eur. Fish. Pathol*. 36 (4): 169 – 178.
- Tantu, W., Tumbol, R. A., & Longdong, S. N. J. 2013. Deteksi Keberadaan Bakteri *Aeromonas* sp Pada Ikan Nila Yang Dibudidayakan Di Karamba Jaring Apung Danau Tondano. *Budidaya Perairan*, 1(3), 74–80.
- Tatangindatu, F., O. Kalesaran dan R. Rompas. 2013. Studi Parameter Fisika Kimia Air Pada Areal Budidaya Ikan di Danau Tondano, Desa Paleloan, Kabupaten Minahasa. *Budidaya Perairan*. 1 (2): 8 – 19.
- Taylor, P. W. 2013. Alternative Natural Sources for a New Generation of Antibacterial Agents. *J. of Antimicrobial Agents*. 4(3): 195 – 201.
- Thrall, M. A., G. Weiser, R. Allison dan T. Campbell. 2012. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Blackwell. US. 776 hlm.
- Triyaningsih, Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Patogenitas *Aeromonas hydrophila* yang Diisolasi dari Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Berasal dari Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (2): 11 – 17.



Utami, D. T., S. B. Prayitno, S. Hastuti dan A. Santika. 2013. Hematological Performances in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) was Given by DNA Vaccine Streptococcus iniae With The Different Doses. *Aquaculture Management and Technology*. 2 (4): 7 – 20.

Vlizzi, L. 2012. The Common Carp, *Cyprinus carpio*, in The Mediterranean Region: Origin, Distribution, Economic Benefits, Impacts and Management. *Fisheries Management and Ecology*. 19: 93 – 110.

Witeska, M., K. Lugowska dan E. Kondera. 2016. Reference Values of Hematological Parameter for Juvenile *Cyprinus carpio*. *Bull. Eur. Fish. Pathol.* 36 (4): 169 – 178.

Wulandari, S., R. Jumadi dan F. F. Rahmawati. 2018. Efektivitas Serbuk Daun Tanaman Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) Terhadap Diferensial Leukosit Dan Aktivitas Fagositosis Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Diinfeksi *Streptococcus agalactiae*. *Jurnal Perikanan Pantura*. 1 (1): 41 – 49.

Wonglapsuwan, M., P. Kongmee, N. Suanyuk dan W. Chotigeat. 2016. Roles of Phagocytosis Activating Protein (PAP) in *Aeromonas hydrophila* Infected *Cyprinus carpio*. *Developmental and Comparative Immunology*. 59: 25 – 33.

Xu, Z. dan L. Chang. 2017. Identification and Control of Common Weeds: Volume 3. Zhejiang University Press. China. 944 hlm.

Yancheva, V., I. Velcheva, S. Soyanova, E. Georgieva. 2015. Histological Biomarkers In Fish As A Tool In Ecological Risk Assessment And Monitoring Programs: A Review. *Ecological and Environmental Research*. 14 (1): 47 – 75.

Yanuhar, U. 2006. Potomekanisme Molekuler Faktor Virulensi Pili *Vibrio alinolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus *Cromileptes altivelis*. *Aquacultura Indonesiana*. 7 (1): 11 – 17.

\_\_\_\_\_, U., A. Maizar dan I. S. Fitria. Fungsi Sel Imun Interleukin-4 (IL-4) Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Dengan Induksi Protein Immunogenik *Vibrio harveyi*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 4 (2): 73 – 79.

Yamin, M., Burhanudin, Jamaluddin dan Nasruddin. 2018. Pengobatan dan Obat Tradisional Suku Sasak di Lombok. *Biologi tropis*. 18(1): 1 – 12.

Zhang, D., D. H. Xu dan C. Shoemaker. 2016. Experimental Induction of Motile *Aeromonas* Septicemia in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) by Waterborne Challenge With Virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*. 3: 18 – 23.

Zirconia, A., Kurniasih, N. and Amalia, V. (2015) 'Identification Of Flavonoid Compounds From Kembang Bulan Leaves (*Tithonia Diversifolia*) Using Shape Action Method', *Kimiya*, 2(1), pp. 9–17.

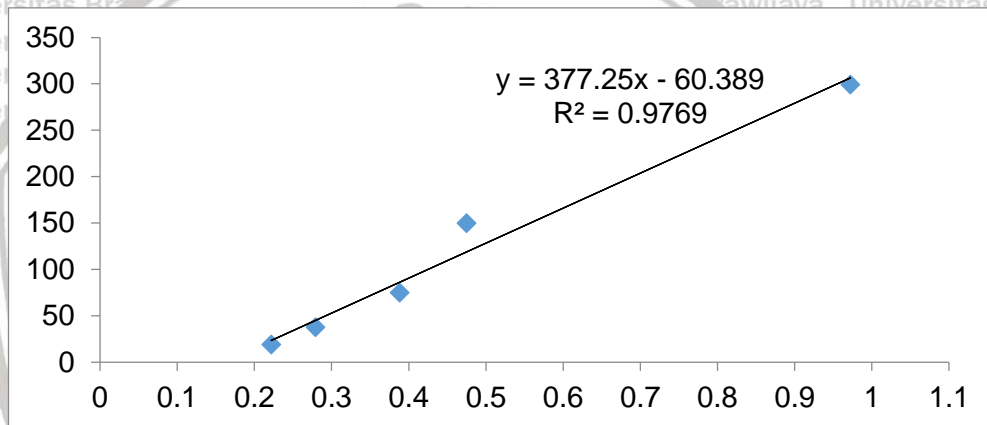


LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengukuran Nilai OD dan Perhitungan Kepadatan Bakteri *A. hydrophila*

No	OD (Optical Density)	TPC (Total Plate Count) 10 <sup>8</sup>
1	0,972	299
2	0,475	149,5
3	0,388	74,75
4	0,279	37,37
5	0,222	18,69
6	0,144	9,34

• Grafik Kurva Regresi



Perhitungan:

$$\begin{aligned}
 y &= 377,5 (x) - 60,389 \\
 &= 377,5 (0,728) - 60,389 \\
 &= 234,6205 \times 10^8 \\
 &= 2,35 \times 10^{10}
 \end{aligned}$$

Pengenceran V1 x N1 = V2 x N2

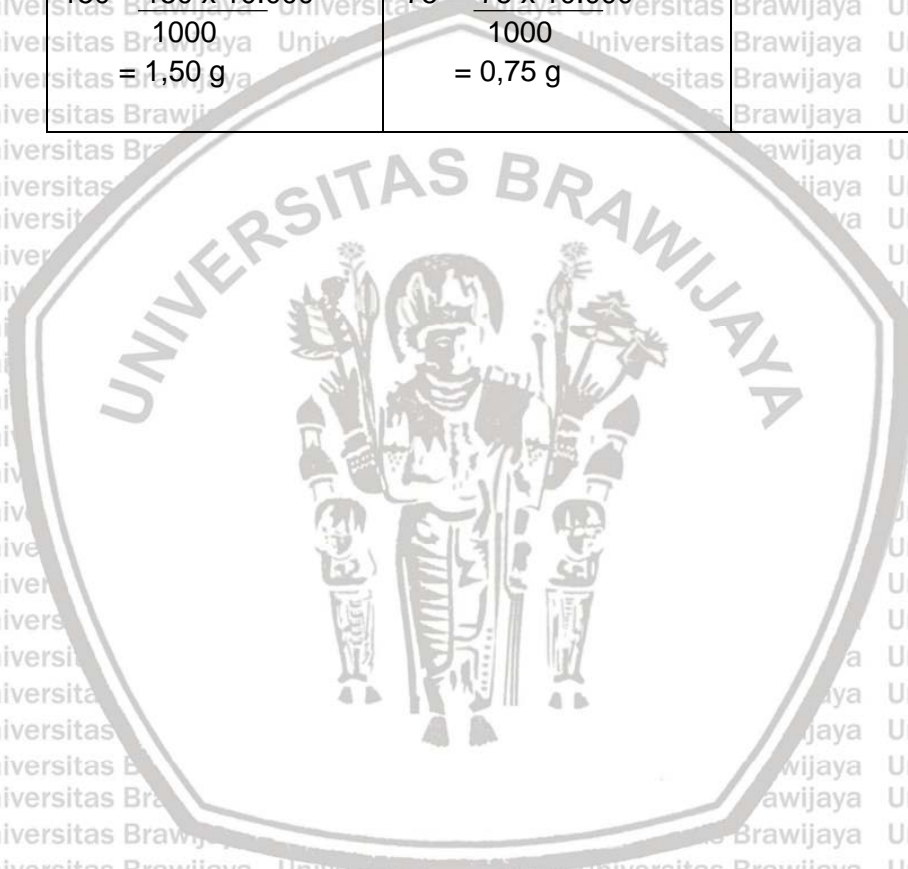
$\frac{10^8 = 10^8 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$	$\frac{10^7 = 10^7 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$	$\frac{10^6 = 10^6 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$	$\frac{10^5 = 10^5 \times 10.000}{2,35 \times 10^{10}}$
$= \frac{100}{2,35}$	$= \frac{10}{2,35}$	$= \frac{1}{2,35}$	$= \frac{0,1}{2,35}$
$= 43 \text{ ml}$	$= 4,3 \text{ ml}$	$= 0,43 \text{ ml}$	$= 0,043 \text{ ml}$





Lampiran 2. Perhitungan Konsentration Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

E (375 ppm)	D (300 ppm)	C (225 ppm)
$375 = \frac{375 \times 10.000}{1000}$ $= 3,75 \text{ g}$	$300 = \frac{300 \times 10.000}{1000}$ $= 3,00 \text{ g}$	$225 = \frac{225 \times 10.000}{1000}$ $= 2,25 \text{ g}$
B (150 ppm)	A (75 ppm)	
$150 = \frac{150 \times 10.000}{1000}$ $= 1,50 \text{ g}$	$75 = \frac{75 \times 10.000}{1000}$ $= 0,75 \text{ g}$	





### Lampiran 3. Klasifikasi Tanaman Daun Sendok



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

65313

Nomor : 074 / ..... A / 102.7 / 2018  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Daun Sendok**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ANNISA FARHANA DEWI  
NIM : 176080100111006  
Fakultas : FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. Perihal determinasi tanaman daun sendok

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)  
Sub Kelas : Asteridae  
Ordo : Lamiales  
Famili : Plantaginaceae  
Genus : Plantago  
Spesies : *Plantago major* L.  
Sinonim : *Plantago asiatica* auct. non L. = *P. halophila* E.P. Bicknell =  
*P. hasskarlii* Decne

Nama Umum : Ki urat ceuli, ceuli uncal (Sunda); meloh kiloh, otot-ototan, sangka buah, sangka buah, sangkuwah, sembung otot, suri panduk (Jawa); daun urat, daun urat-urat, ekor angin, dan kuping menjangan (Melayu); torongoat (Minahasa, Sulawesi Utara).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250b-266b-267b-273b-276b-278b-279b-282a.

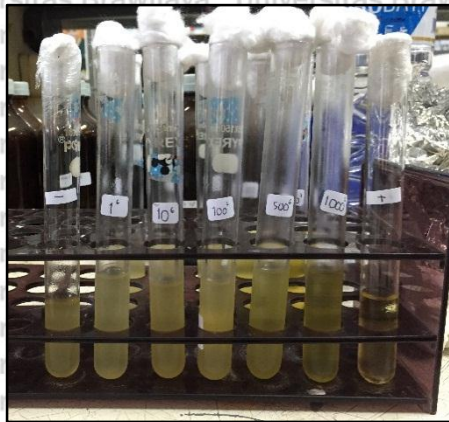
2. Morfologi : Habitus: Herba, semusim, tinggi 6-50 cm. Batang: Pendek, bulat, coklat. Daun: Tunggal, bulat telur sampai lanset, ujung tumpul, pangkal meruncing, tepi bergerigi, roset dari akar, panjang 3-32 cm, lebar 1-20 cm, permukaan licin, tangkai 1-25 cm, pertulangan melengkung, hijau muda sampai hijau. Bunga: Majemuk, bentuk bulir, panjang ± 40 cm, tangkai bulir 4-27 cm, kecil, panjang tajuk 1,5 mm, putih. Buah: Kotak, berisi 2-4 biji, hijau. Biji: Kecil, masih muda coklat setelah tua hitam. Akar: Serabut, putih kotor.

3. Nama Simplesia : Plantagii Folium/ Daun urat.
4. Kandungan Kimia : Daun mengandung saponin, flavonoida dan polifenol.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka

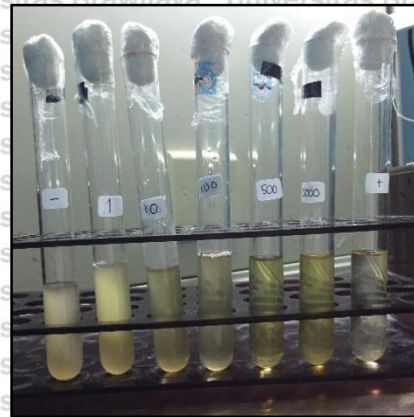
- Anonim. <http://eol.org/pages/579221/names/synonyms>, diakses 23 Desember 2014.
- Anonim. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=1024>, diakses 23 Desember 2014.
- Anonim. [http://www.warintek.ristek.go.id/pangan\\_kesehatan/tanaman\\_obat/depkes/1-233.pdf](http://www.warintek.ristek.go.id/pangan_kesehatan/tanaman_obat/depkes/1-233.pdf), diakses 23 Desember 2014.
- Wijayakusuma, HMH dan S. Dalimartha. 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jakarta, Pustaka Kartini.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.



#### Lampiran 4. Hasil Uji MIC



Hasil uji MIC ekstrak etil asetat daun sendok (*P. major* L.)



Hasil uji MIC ekstrak etanol daun sendok (*P. major* L.)



Dokumentasi Hasil MBC



Lampiran 5. Hasil Uji Fitokimia Daun Sendok (*P. major* L.)



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

65313

Nomor : 074 / 109D / 102.7 / 2018  
Sifat : Biasa  
Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

- Identitas Pemohon
  - Nama : Annisa Farhana Dewi
  - NIM : 176080100111006
  - Instansi : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
  - Alamat Instansi : Malang
  - Nomor Telp. Instansi : 081216462446
- Identitas Sampel
  - Nama daerah sampel : Daun Sendok
  - Nama latin : *Plantago major*

Asal sampel : UPT Materia Medica Batu  
Tanggal penerimaan : 01 Oktober 2018  
Tanggal pemeriksaan : 02 Oktober 2018

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Alkaloid	Meyer	Endapan Putih
		Dragendrof	Endapan Jingga
		Bouchardat	Endapan Cokelat
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman	Positif
4.	Terpenoid	Steroid	Hijau Kebiruan
		Triterpenoid	Orange, Jingga Kecokelatan
		Fenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman
5.	Fenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman	Positif
6.	Saponin	Busa Permanen	Positif

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Daun Sendok ( <i>Plantago major</i> )				
Nama Sampel	Tanin	Terpenoid	Fenol	Saponin
Daun Sendok ( <i>Plantago Major</i> )				



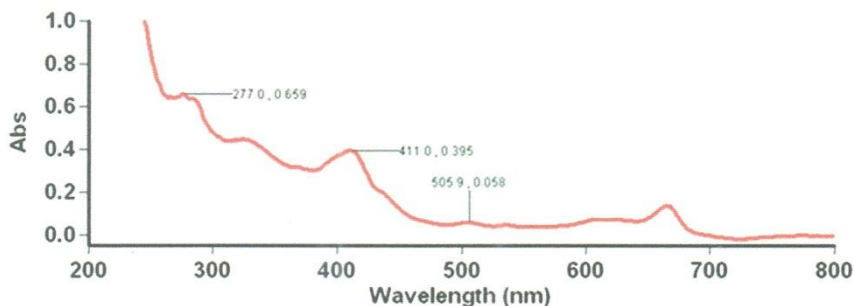
### Lampiran 6. Hasil Uji UV-VIS Ekstrak Daun Sendok (*P. major* L.)

5/12/2019

**Laboratorium Kimia – Fakultas Saintek**  
**Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang**

### Lamdha Maks Daun Sendok Etanol

Tanggal Analisa : 15 Maret 2019



### Scan Analysis Report

Report Time : Fri 15 Mar 10:37:22 AM 2019  
Method:  
Batch: D:\Layanan Analisa\UB\Annisa\Lamdha Maks Daun Sendok Etanol (15-03-2019).DSW  
Software version: 3.00(339)  
Operator: Rika

### Sample Name: Daun Sendok Etanol

Collection Time 3/15/2019 10:38:00 AM

Peak Table  
Peak Style Peaks  
Peak Threshold 0.0100  
Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
666.0	0.136
612.9	0.074
505.9	0.058
411.0	0.395
277.0	0.659
236.0	1.484
233.9	1.847
232.1	1.808
230.0	1.989
222.0	3.301
220.0	3.301
217.0	3.348
210.1	3.524
205.0	3.624





Lampiran 7. EPA Probit Analisis Toksisitas Ekstrak Daun Sendok (*P. major L.*)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> dosis	3.591	2.090	1.718	.086	-506	7.687
Intercept	-9.165	5.479	-1.673	.094	-14.644	-3.686

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Cell Counts and Residuals

	Number	dosis	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
PROBIT	1	2.000	10	1	.940	.060
	2	2.301	10	2	2.422	-.422
	3	2.477	10	5	4.371	.629
	4	2.602	10	6	6.017	-.017
	5	2.699	10	7	7.222	-.222

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df <sup>b</sup>	Sig.	
PROBIT	Pearson Test	Goodness-of-Fit	.286	2	.867 <sup>a</sup>

Confidence Limits

Probability	Estimate	95% Confidence Limits for dosis		95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>a</sup>	
		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	80.261	.	1.905	.
	.020	95.593	.	1.980	.
	.030	106.806	.	2.029	.
	.040	116.100	.	2.065	.
	.050	124.253	.	2.094	.
	.060	131.642	.	2.119	.
	.070	138.481	.	2.141	.
	.080	144.906	.	2.161	.
	.090	151.008	.	2.179	.
	.100	156.851	.	2.195	.
	.150	183.551	.	2.264	.
	.200	207.976	.	2.318	.
	.250	231.505	.	2.365	.
	.300	254.895	.	2.406	.
	.350	278.674	.	2.445	.
	.400	303.285	.	2.482	.
	.450	329.164	.	2.517	.
	.500	356.788	!	2.552	!
	.550	386.730	.	2.587	.
	.600	419.730	.	2.623	.
	.650	456.799	.	2.660	.
	.700	499.413	.	2.698	.
	.750	549.871	.	2.740	.

.800	612.081	.	.	2.787	.	.
.850	693.530	.	.	2.841	.	.
.900	811.582	.	.	2.909	.	.
.910	842.988	.	.	2.926	.	.
.920	878.484	.	.	2.944	.	.
.930	919.242	.	.	2.963	.	.
.940	967.001	.	.	2.985	.	.
.950	1024.507	.	.	3.011	.	.
.960	1096.454	.	.	3.040	.	.
.970	1191.863	.	.	3.076	.	.
.980	1331.667	.	.	3.124	.	.
.990	1586.049	.	.	3.200	.	.

a. Logarithm base = 10.





Lampiran 8. EPA Probit Analisis Patogenitas Bakteri *A. hydrophila*

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> Konsenterasi	1.257	.590	2.131	.033	.101	2.413
Intercept	-8.882	4.395	-2.021	.043	-13.277	-4.488

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

PROBIT	Pearson Test	Goodness-of-Fit	Chi-Square	df <sup>b</sup>	Sig.

a. Since the significance level is greater than .500, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	Konsenterasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
PROBIT	1	5.000	10	1	1.064	-.064
	2	6.000	10	2	1.831	.169
	3	7.000	10	5	5.213	-.213
	4	8.000	10	9	8.921	.079

Confidence Limits

Proba bility	95% Confidence Limits for Konsenterasi			95% Confidence Limits for log(Konsenterasi) <sup>a</sup>			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	.010	164260.888	.000	2264527.987	5.216	-20.167	6.355
	.020	270640.984	.000	2997201.164	5.432	-17.475	6.477
	.030	371521.455	.000	3589269.266	5.570	-15.768	6.555
	.040	471506.569	.000	4116960.937	5.673	-14.484	6.615
	.050	572374.325	.000	4608323.638	5.758	-13.441	6.664
	.060	675058.013	.000	5077369.247	5.829	-12.553	6.706
	.070	780142.134	.000	5532338.073	5.892	-11.775	6.743
	.080	888040.691	.000	5978621.645	5.948	-11.079	6.777
	.090	999075.470	.000	6420034.608	6.000	-10.446	6.808
	.100	1113515.222	.000	6859448.483	6.047	-9.864	6.836
	.150	1744592.057	.000	9095024.249	6.242	-7.456	6.959
	.200	2492710.867	.000	11524938.387	6.397	-5.548	7.062
	.250	3385550.105	.000	14311293.859	6.530	-3.917	7.156
	.300	4456860.540	.003	17657586.326	6.649	-2.459	7.247
	.350	5750038.503	.076	21880656.266	6.760	-1.117	7.340
	.400	7322492.138	1.398	27542937.733	6.865	.145	7.440
	.450	9252011.739	22.380	35770852.131	6.966	1.350	7.554
	.500	11646702.097	322.675	49167332.119	7.066	2.509	7.692

a. Logarithm base = 10

Lampiran 9. Uji Anova, Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Eritrosit

**ANOVA**

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.515	6	.253	74.489	.000
Within Groups	.047	14	.003		
Total	1.563	20			

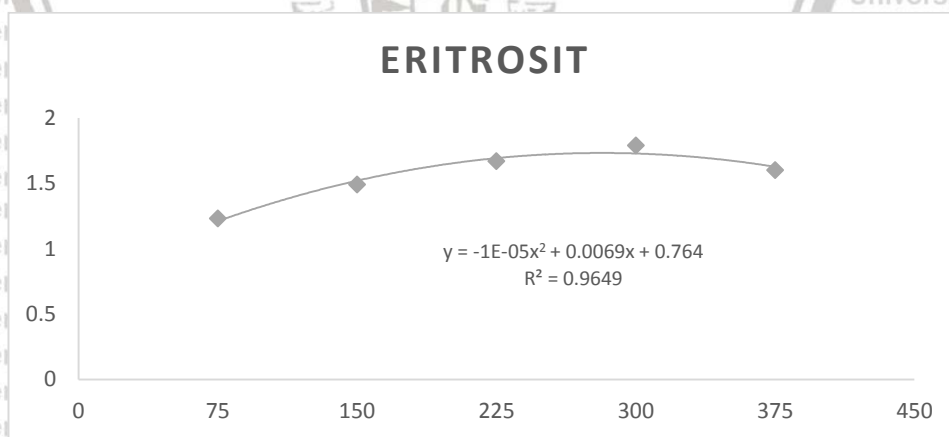
Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K-	3	1.0667				
	A	3		1.2300			
	B	3			1.4900		
	E	3				1.6033	
	C	3					1.6667
	D	3					1.7867
	K+	3					1.8600
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.204	.145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Eritrosit	Nilai			X opt	Y opt
$y = -1E-05x^2 + 0.0069x + 0.764$ $R^2 = 0.9649$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (-0.00001*(X^2)) + (0.0069*X) + 0.764$
	-0.00001	0.0069	0.764	345	1.954



Lampiran 10. Uji Anova, Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Hemoglobin

**ANOVA**

hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.583	6	1.430	81.189	.000
Within Groups	.247	14	.018		
Total	8.830	20			

Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

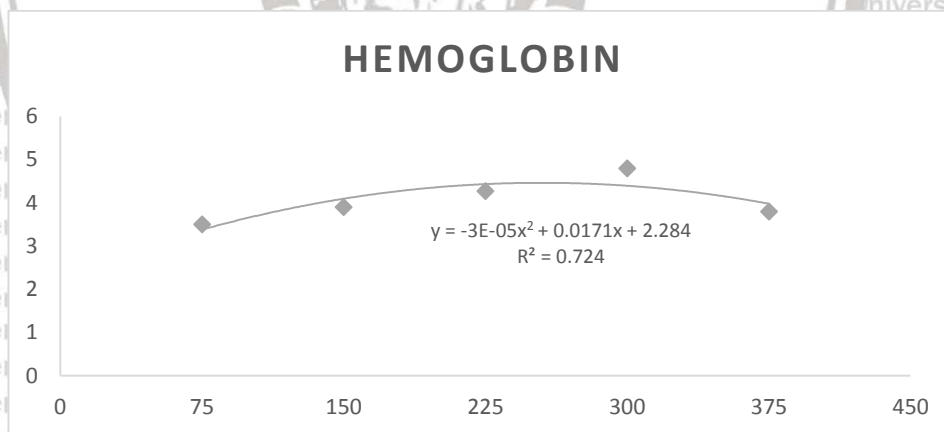
**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K-	3	2.9000			
	A	3		3.5000		
	E	3			3.8000	
	B	3			3.9000	
	C	3				4.2667
	D	3				4.8000
	K	3				4.8000
	Sig.		1.000	1.000	.372	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Hb	Nilai			X opt	Y opt
$y = -3E-05x^2 + 0.0171x + 2.284$ $R^2 = 0.724$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (-0.00003*(X^2)) + (0.0171*X) + 2.284$
	-0.00003	0.0171	2.284	285	4.721

Lampiran 11. Uji Anova, Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Hematokrit

**ANOVA**

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	867.238	6	144.540	178.549	.000
Within Groups	11.333	14	.810		
Total	878.571	20			

Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

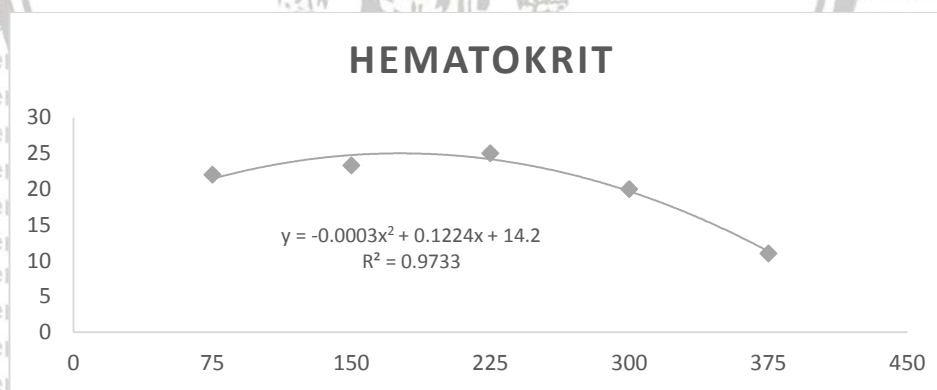
**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K-	3	10.6667				
	E	3	11.0000				
	D	3		20.0000			
	A	3			22.0000		
	B	3			23.3333		
	C	3				25.0000	
	K+	3					29.0000
	Sig.		.657	1.000	.091	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Hematokrit	Nilai			X opt	Y opt
$y = -0.0003x^2 + 0.1224x + 14.2$ $R^2 = 0.9733$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (-0.0003*(X^2)) + (0.1224*X) + 14.2$
	-0.0003	0.1224	14.2	204	26.685



## Lampiran 12. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Leukosit

### ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.519	6	5.420	128.926	.000
Within Groups	.589	14	.042		
Total	33.107	20			

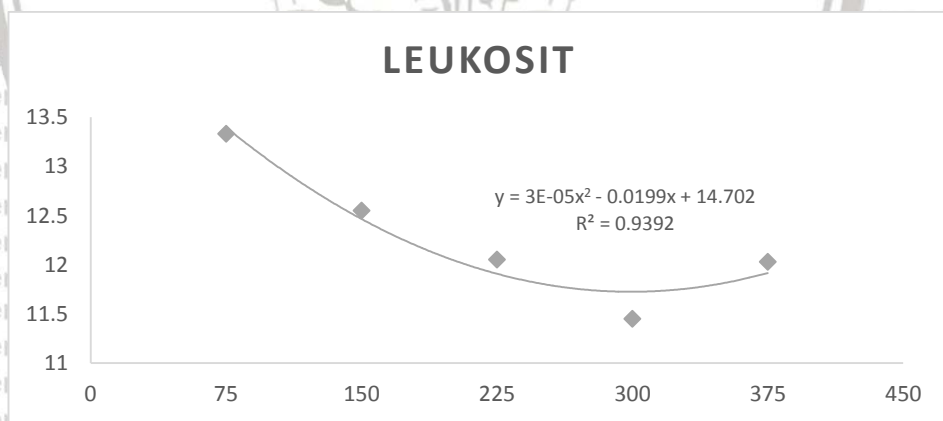
Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

### Homogeneous Subsets

Duncan <sup>a</sup>	K+	3	10.5033				
	D	3		11.4467			
	E	3			12.0300		
	C	3			12.0467		
	B	3				12.5467	
	A	3					13.3267
	K-	3					14.6800
	Sig.		1.000	1.000	.922	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Polinomial Orthogonal



### Nilai Optimum X dan Y

Leukosit	Nilai			X opt	Y opt
$y = 3E-05x^2 - 0.0199x + 14.702$ $R^2 = 0.9392$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (0.00003*(X^2)) - (0.0199*X) + 14.702$
	0.00003	-0.0199	14.702	331.6667	11.402

Lampiran 13. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Limfosit

**ANOVA**

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1049.143	6	174.857	102.000	.000
Within Groups	24.000	14	1.714		
Total	1073.143	20			

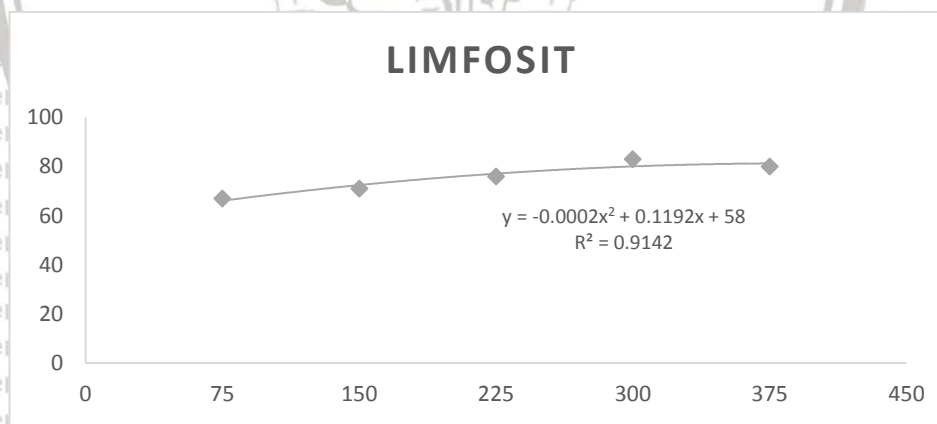
Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K-	3	66.0000				
	A	3	67.0000				
	B	3		71.0000			
	C	3			76.0000		
	E	3				80.0000	
	D	3					83.0000
	K+	3					85.0000
	Sig.		.365	1.000	1.000	1.000	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Limfosit	Nilai			X opt	Y opt
$y = -0.0002x^2 + 0.1192x + 58$ $R^2 = 0.9142$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (-0.0002*(X^2)) + (0.1192*X) + 58$
	-0.0002	0.1192	58	298	75.761



Lampiran 14. Uji Anova, Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Neutrofil

**ANOVA**

Hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	302.571	6	50.429	50.429	.000
Within Groups	14.000	14	1.000		
Total	316.571	20			

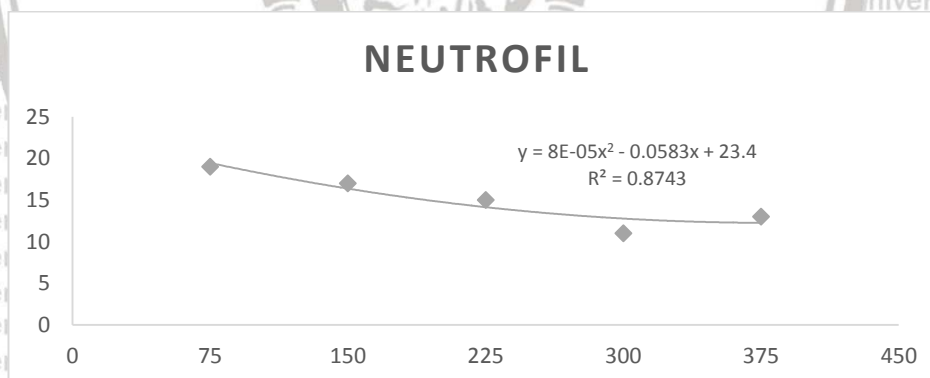
Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K+	3	10.0000					
	D	3	11.0000					
	E	3		13.0000				
	C	3			15.0000			
	B	3				17.0000		
	A	3					19.0000	
	K-	3						21.0000
	Sig.		.241	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Neutrofil	Nilai			X opt	Y opt
$y = 8E-05x^2 - 0.0583x + 23.4$ $R^2 = 0.8743$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (0.00008*(X^2)) - (0.0583*X) + 23.4$
	0.00008	-0.0583	23.4	364.375	12.778

Lampiran 15. Uji Anova, Duncan dan Polynomial Orthogonal Monosit

**ANOVA**

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	233.143	6	38.857	38.857	.000
Within Groups	14.000	14	1.000		
Total	247.143	20			

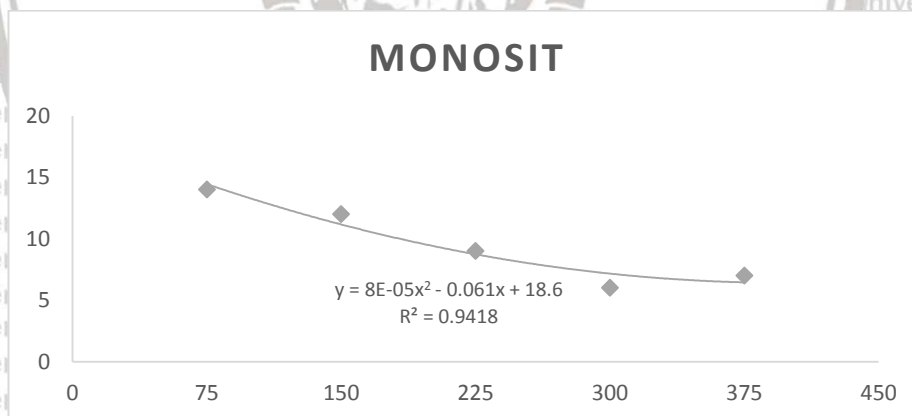
Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>	K+	3	5.0000			
	D	3	6.0000	6.0000		
	E	3		7.0000		
	C	3			9.0000	
	B	3				12.0000
	K-	3				13.0000
	A	3				14.0000
	Sig.		.241	.241	1.000	.241

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**



**Nilai Optimum X dan Y**

Monosit	Nilai			X opt	Y opt
$y = 8E-05x^2 - 0.061x + 18.6$ $R^2 = 0.9418$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (0.00008*(X^2)) - (0.061*X) + 18.6$
	0.00008	-0.061	18.6	381.25	6.972



**Lampiran 16. Skoring Kerusakan Histopatologi Ginjal**

Perlakuan A	Kerusakan			Total
	Nekrosis	Hemoragi	Melanomakrofag	
	84	50	54	188
	76	48	61	185
	87	43	58	188
Persen (%)	22.28	13.26	14.32	49.87
	20.16	12.73	16.18	49.07
	22.03	10.89	14.68	47.59

Perlakuan B	Kerusakan			Total
	Nekrosis	Hemoragi	Melanomakrofag	
	76	46	38	160
	72	37	53	162
	74	39	40	153
Persen (%)	19.24	11.65	9.62	40.51
	18.80	9.66	13.84	42.30
	19.07	10.05	10.31	39.43

Perlakuan C	Kerusakan			Total
	Nekrosis	Hemoragi	Melanomakrofag	
	57	24	21	102
	58	25	25	108
	58	34	22	114
Persen (%)	14.18	5.97	5.22	25.37
	15.43	6.65	6.65	28.72
	14.72	8.63	5.58	28.93

Perlakuan D	Kerusakan			Total
	Nekrosis	Hemoragi	Melanomakrofag	
	22	11	12	45
	23	7	11	41
	18	11	20	49
Persen (%)	6.20	3.10	3.38	12.68
	6.59	2.01	3.15	11.75
	4.93	3.01	5.48	13.42

Perlakuan E	Kerusakan			Total
	Nekrosis	Hemoragi	Melanomakroflag	
	26	17	38	81
	29	12	31	72
	28	18	32	78
Person (%)	6.52	4.51	10.08	21.11
	7.34	3.18	8.22	18.75
	6.70	4.56	8.10	19.36





Lampiran 17. Uji Anova, Uji Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Nekrosis

**ANOVA**

HASIL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9586.400	4	2396.600	748.938	.000
Within Groups	32.000	10	3.200		
Total	9618.400	14			

Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>						
D	3	5.9067				
	375.00	3	6.8533			
C	3		14.7767			
B	3			19.0367		
A	3				21.4900	
Sig.		.147	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	22.28	20.16	22.03	64.47	21.49
B (150)	19.24	18.80	19.07	57.11	19.04
C (225)	14.18	15.43	14.72	44.33	14.78
D (300)	6.20	6.59	4.93	17.72	5.91
E (375)	6.52	7.34	6.70	20.56	6.85

Lampiran 18. Uji Anova, Uji Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Hemoragik

**ANOVA**

HASIL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	199.100	4	49.775	44.861	.000
Within Groups	11.095	10	1.110		
Total	210.195	14			

Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>					
D	3	2.7067			
E	3	4.0833			
C	3		7.0833		
B	3			10.4533	
A	3				12.2933
Sig.		.141	1.000	.058	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	13.26	12.73	10.89	36.88	12.29
B (150)	11.65	9.66	10.05	31.36	10.45
C (225)	5.97	6.65	8.63	21.25	7.08
D (300)	3.10	2.01	3.01	8.12	2.71
E (375)	4.51	3.18	4.56	12.25	4.08

**Nilai Optimum X dan Y**

Hemoragik	Nilai		X opt	Y opt
$y = 7E-05x^2 - 0,0632x + 17,287$	a	b	c	$X = -b/2a$ $y = (0.00007*(X^2)) - (0.0632*X) + 17.287$
	0.00007	-0.0632	17.287	451.4286
				3.022



Lampiran 19. Uji Anova, Uji Duncan dan *Polynomial Orthogonal* Melanomakrofag

**ANOVA**

HASIL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	224.623	4	56.156	28.594	.000
Within Groups	19.639	10	1.964		
Total	244.262	14			

Posthoc= Duncan Alpha (0.05).

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>					
D	3	4.0033			
C	3	5.8167			
E	3		8.8000		
B	3		11.2567		
A	3			14.8867	
Sig.		.144	.057	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (75)	14.32	16.18	14.16	44.66	14.89
B (150)	9.62	13.84	10.31	33.77	11.26
C (225)	5.22	6.65	5.58	17.45	5.82
D (300)	3.38	3.15	5.48	12.01	4.00
E (375)	10.08	8.22	8.10	26.4	8.80

**Nilai Optimum X dan Y**

Melanomakrofag	Nilai			X opt	Y opt
$y = 0,0003x^2 - 0,1429x + 25,02$	a	b	c	$X = -b/2a$	$y = (0,0003*(X^2)) - (0,1429*X) + 25,021$
	0.0003	-0.1429	25.021	238.1667	8.004

Lampiran 20. Data Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*) selama pemeliharaan

Hari	Perlakuan																				
	K-1	K-2	K-3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	K1	K2	K3
1	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
2	14	13	14	14	14	15	14	13	14	15	15	14	15	15	15	15	14	15	15	15	15
3	12	13	10	13	13	14	13	12	13	14	14	13	15	15	15	15	13	14	15	15	15
4	10	9	9	12	11	13	11	12	13	13	13	13	15	15	15	14	13	14	15	14	15
5	9	8	8	11	10	12	10	11	12	12	13	12	14	14	14	13	13	14	15	14	15
6	6	7	6	9	9	9	10	11	11	11	13	12	14	14	14	13	13	13	15	14	15
7	4	5	5	8	8	9	9	10	10	11	12	12	14	14	14	13	13	13	15	14	15
RATA2	10	10	10	12	11	12	12	12	13	13	14	13	15	15	15	14	13	14	15	14	15

**ANOVA**

hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10099.526	6	1683.254	159.004	.000
Within Groups	148.207	14	10.586		
Total	10247.733	20			

**Homogeneous Subsets**

Duncan <sup>a</sup>								
	K-	3	31.1100					
	A	3		55.5533				
	B	3			64.4467			
	C	3				77.7767		
	E	3					86.6700	
	D	3						
	K	3						
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	





**Lampiran 21. Data Kualitas Air Selama Pemeliharaan**

**Pengukuran Suhu**

Hari	Perlakuan Dosis																					
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	K1	K2	K3	K-1	K-2	K-3	
1	24	24	24	23	24	24	24	24	23	25	24	23	24	25	23	24	23	24	23	24	23	
2	24	24	24	24	24	23	23	23	24	23	23	24	25	24	24	24	24	24	24	24	25	23
3	24	24	23	24	24	24	25	25	23	23	24	24	24	23	24	24	24	24	24	25	23	
4	23	23	24	24	24	24	25	25	24	25	24	24	24	23	24	24	24	24	24	24	25	
5	24	24	24	24	25	23	24	23	24	24	24	23	24	24	25	24	24	25	24	24	24	
6	24	24	25	24	24	23	24	23	24	24	25	24	24	24	23	25	24	23	24	24	24	
7	24	24	24	24	24	24	23	24	24	24	23	24	24	24	23	24	24	24	24	25	24	
Rerata	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
STD	0.4	0.4	0.6	0.4	0.4	0.5	0.8	0.9	0.5	0.8	0.7	0.5	0.4	0.7	0.8	0.4	0.4	0.6	0.4	0.5	0.8	
min	23	23	23	23	24	23	23	23	23	23	23	23	24	23	23	24	23	23	23	24	23	
max	24	24	25	24	25	24	25	25	24	25	25	24	25	25	25	25	24	25	24	25	25	

**Pengukuran pH**

Hari	Perlakuan Dosis																				
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	K1	K2	K3	K-1	K-2	K-3
1	7.43	7.42	7.43	7.45	7.45	7.46	7.45	7.43	7.46	7.47	7.46	7.47	7.45	7.43	7.47	7.46	7.45	7.45	7.46	7.45	7.46
2	7.45	7.46	7.48	7.48	7.47	7.47	7.47	7.46	7.47	7.46	7.48	7.46	7.47	7.46	7.48	7.46	7.46	7.46	7.45	7.45	7.48
3	7.49	7.49	7.49	7.48	7.49	7.48	7.46	7.48	7.49	7.46	7.49	7.46	7.46	7.46	7.47	7.48	7.47	7.46	7.45	7.45	7.45
4	7.47	7.47	7.48	7.49	7.48	7.49	7.46	7.48	7.48	7.48	7.49	7.46	7.47	7.46	7.47	7.46	7.47	7.48	7.45	7.45	7.45
5	7.51	7.50	7.49	7.48	7.49	7.48	7.46	7.46	7.49	7.48	7.49	7.48	7.46	7.46	7.48	7.48	7.48	7.46	7.45	7.46	7.46
6	7.49	7.49	7.48	7.46	7.47	7.46	7.48	7.46	7.48	7.49	7.48	7.48	7.48	7.47	7.47	7.47	7.48	7.47	7.46	7.48	7.46
7	7.48	7.49	7.48	7.46	7.47	7.48	7.48	7.48	7.48	7.49	7.48	7.47	7.48	7.48	7.48	7.48	7.48	7.47	7.47	7.47	7.46
Rerata	7.47	7.47	7.48	7.47	7.47	7.47	7.47	7.46	7.48	7.48	7.48	7.47	7.47	7.46	7.47	7.47	7.47	7.46	7.46	7.46	7.46
STD	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.0	0.0	0.0
min	7.4	7.42	7.4	7.45	7.45	7.46	7.45	7.43	7.46	7.46	7.46	7.46	7.45	7.43	7.47	7.46	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45
max	7.5	7.5	7.5	7.49	7.49	7.49	7.48	7.48	7.49	7.49	7.49	7.48	7.48	7.48	7.48	7.48	7.48	7.48	7.47	7.48	7.48

Lanjutan Lampiran 19. Data Kualitas Air Selama Pemeliharaan








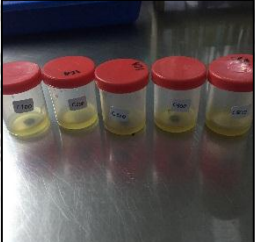


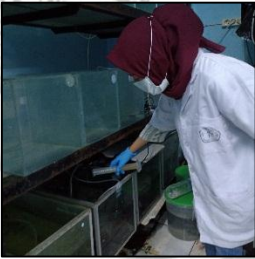




Pengukuran DO

Hari	Perlakuan Dosis																				
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	K1	K2	K3	K-1	K-2	K-3
1	6.20	6.30	6.50	6.60	6.30	6.30	6.40	6.50	6.50	6.60	6.50	6.70	6.60	6.30	6.30	6.70	6.40	6.20	6.70	6.60	6.60
2	6.20	6.30	6.30	6.50	6.50	6.30	6.50	6.40	6.60	6.60	6.40	6.70	6.60	6.40	6.60	6.80	6.70	6.50	6.80	6.60	6.50
3	6.40	6.40	6.40	6.50	6.50	6.20	6.30	6.30	6.70	6.70	6.60	6.80	6.70	6.50	6.70	6.80	6.50	6.50	6.80	6.70	6.50
4	6.20	6.40	6.20	6.40	6.40	6.50	6.50	6.50	6.70	6.80	6.60	6.80	6.90	6.50	6.80	6.90	6.50	6.70	6.90	6.80	6.40
5	6.30	6.30	6.40	6.50	6.60	6.60	6.60	6.70	6.80	6.90	6.90	6.50	7.00	6.70	6.60	7.00	6.80	6.60	7.00	6.90	6.50
6	6.50	6.40	6.30	6.50	6.60	6.70	6.70	6.80	6.90	6.90	6.90	6.50	7.00	6.80	6.60	7.00	6.80	6.80	7.00	6.90	6.50
7	6.70	6.60	6.40	6.90	6.50	6.80	6.90	7.00	7.00	7.10	7.00	6.50	7.00	6.80	6.50	6.60	6.70	7.00	6.60	7.10	6.90
Rerata	6.36	6.39	6.36	6.56	6.49	6.49	6.56	6.60	6.74	6.80	6.70	6.64	6.83	6.57	6.59	6.83	6.63	6.61	6.83	6.80	6.56
STD	0.19	0.11	0.10	0.16	0.11	0.23	0.20	0.24	0.17	0.18	0.23	0.14	0.19	0.20	0.16	0.15	0.16	0.25	0.15	0.18	0.16
min	6.2	6.3	6.2	6.4	6.3	6.2	6.3	6.3	6.5	6.6	6.4	6.5	6.6	6.3	6.3	6.6	6.4	6.2	6.6	6.6	6.4
max	6.7	6.6	6.5	6.9	6.6	6.8	6.9	7	7	7.1	7	6.8	7	6.8	6.8	7	6.8	7	7	7.1	6.9





Lampiran 22. Dokumentasi Kerja

		
Serbuk Daun Sendok	Proses penyaringan	Hasil Maserasi
		
Proses evaporasi	Ekstrak Daun Sendok	Bakteri <i>A. hydrophila</i>
		
Pembuatan Media Bakteri	Persiapan Dosis Cakram	Pengerjaan MIC dan Cakram
		
Persiapan Ekstrak Untuk Proses Perendaman	Infeksi Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> )	Penambahan Ekstrak Daun Sendok Pada Ikan
		
Pemeliharaan Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> )	Gejala Klinis Ikan Mas Pasca Infeksi	Pengambilan Darah Ikan Mas ( <i>C. carpio</i> )



Lanjutan Lampiran 20.



Proses Pembedahan Ikan Mas (*C. carpio*)



Proses Penimbangan Ekstrak



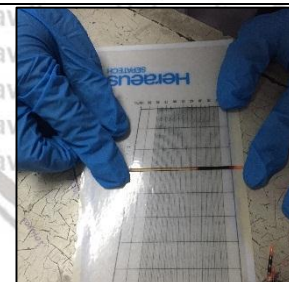
Proses Pengerjaan Diferensial Leukosit



Pengamatan Darah Ikan Mas (*C. carpio*)



Pengukuran Hemoglobin



Pengukuran hematokrit



Perhitungan Koloni Bakteri



Supervisi Dosen



Supervisi Dosen