

**FRAKSI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KERSEN
(*Muntingia calabura* L.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS
(*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI *Aeromonas hydrophila***

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Perikanan**



Oleh :

**GEDE ANGGA KRISHNA FARIESTHA
NIM. 166080100111019**

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

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**FRAKSI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)
YANG DIINFEKSI *Aeromonas hydrophila***

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

Oleh :
GEDE ANGGA KRISHNA FARIESTHA
NIM. 166080100111019

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 5 Desember 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

Menyetujui:
Komisi Pembimbing,

Ketua Pembimbing



Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS
NIP. 19611106 198602 2 001
Tanggal : 13 DEC 2018

Anggota Pembimbing



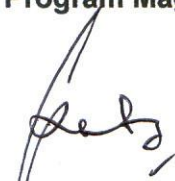
Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.
NIP. 19730404 200212 2 001
Tanggal : 13 DEC 2018

Mengetahui,


Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal : 13 DEC 2018

Ketua
Program Magister


Dr. Ir. Maftuch, M.Si.
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal : 13 DEC 2018

JUDUL TESIS:

FRAKSI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KERSEN
(*Muntingia calabura* L.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS
(*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI *Aeromonas hydrophila*

MAHASISWA

NAMA : GEDE ANGGA KRISHNA FARIESTHA

NIM : 166080100111019

PROGRAM STUDI : BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT : PENYAKIT DAN PENGELOLAAN KESEHATAN IKAN

KOMISI PEMBIMBING

KETUA : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

NIP : 19611106 198602 2 001

ANGGOTA : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.

NIP : 19730404 200212 2 001

KOMISI PENGUJI

PENGUJI 1 : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc.

NIP : 19621014 198701 1 001

PENGUJI 2 : Dr. Ir. Maftuch, M.Si.

NIP : 19660825 199203 1 001

UJIAN KELAYAKAN : RABU, 14 FEBRUARI 2018

SEMINAR PROPOSAL : SELASA, 6 MARET 2018

SEMINAR HASIL : RABU, 7 NOVEMBER 2018

UJIAN TESIS : SENIN, 3 DESEMBER 2018



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Desember 2018



Gede Angga Krishna Fariesta
NIM. 166080100111019

RINGKASAN

Gede Angga Krishna Fariestha, Program Pascasarjana Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. **Tesis. FRAKSI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI *Aeromonas hydrophila***. Komisi Pembimbing, Ketua: Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Anggota: Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.

Budidaya ikan secara intensif memberikan keuntungan yang besar bagi pembudidayanya, namun berdampak negatif apabila tidak ditangani dengan baik terhadap usaha budidaya khususnya terhadap kesehatan ikan yang dibudidaya. Tingginya padat tebar, pakan, dan rusaknya kualitas air menyebabkan ikan sangat rentan terserang penyakit patogen. Salah satu penyakit yang menyerang ikan mas yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*. Patogenitas bakteri *Aeromonas hydrophila* sangat berbahaya untuk ikan. Ikan yang sudah terkena bakteri ini akan terlihat dari gejala-gejala eksternal seperti kulit dan insang tampak keputihan dan pucat, luka pada tubuh ikan, terjadi hemoragik, hipertrofi, hiperflasia dan nekrosis pada tubuh ikan terutama pada organ hati dan terjadinya geripis pada sirip. Setelah terjangkit secara akut, ikan akan kehilangan keseimbangan dan terjadi kematian. Hal ini, perlunya tindakan preventif pada ikan yang terserang bakteri *Aeromonas hydrophila*, yang salah satunya pengobatan.

Berdasarkan pernyataan diatas, maka perlunya penanganan efektif, optimal dan ramah lingkungan yang tidak menyebabkan resistensi bakteri, yaitu menggunakan bahan alami, yang salah satunya menggunakan ekstrak dari daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Beberapa riset yang dilakukan, daun kersen (*Muntingia calabura* L.) memiliki kelebihan dibanding dengan bagian tubuh tumbuhan kersen lainnya karena daunnya mengandung lebih banyak senyawa antibakteri dan antioksidan. Daun kersen memiliki senyawa yang seperti flavonoid, tannin, polifenol, saponin dan komponen-komponen lainnya yang berpotensi sebagai antibakteri serta menjadi antioksidan yang baik untuk penanganan penyakit akibat serangan bakteri.

Penggunaan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diharapkan menjadi salah satu alternatif untuk pengobatan pada kegiatan budidaya perikanan. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pemberian senyawa aktif fraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang memiliki sifat antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila*. Menganalisis daya hambat bakteri yang diaplikasikan senyawa aktif ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) serta menganalisis pengaruh pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*) terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dilihat dari kelulushidupan dan kerusakan histopatologi hati.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2018 sampai Oktober 2018 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Pengembangan Tanaman (Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Kimia Organik (Fakultas Sains dan Teknologi (Saintek), Universitas Islam Negeri Malang) dan Laboratorium Histopatologi (Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang).

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang dilakukan untuk menguji secara langsung hubungan variabel satu dengan variabel lain dan menguji suatu dugaan hubungan sebab-akibat dengan menggunakan rancangan

acak lengkap (RAL). Proses ekstraksi menggunakan tiga pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan kloroform yang bertujuan untuk mengetahui hasil terbaik dalam uji fitokimia dari ketiga pelarut tersebut. Fraksinasi menggunakan eluen metanol:etil asetat (1:8) untuk pengujian kromatografi kolom. Setelah difraksinasi, dicari fraksi terbaik melalui uji cakram. Setelah itu dilakukan karakterisasi dengan instrumen UV-Vis, FT-IR dan GC-MS. Kemudian dilanjutkan dengan bioinformatika. Untuk pengujian *in-vitro* dilakukan pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan uji cakram. Sedangkan uji *in-vivo* diamati gejala klinis ikan, kerusakan histopatologi hati ikan dan kelulushidupan ikan. Untuk kualitas air diuji pengamatan pH, suhu, dan oksigen terlarut.

Hasil yang didapat yaitu ekstrak daun kersen menggunakan etanol 96% sebagai pelarut terbaik karena hasil uji fitokimia didapatkan senyawa flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan alkaloid. Hasil dari fraksinasi ditemukan 5 fraksi ekstrak dan fraksi ke-3 didapatkan terbaik karena mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dengan diameter zona hambat 7,97 mm. Melalui uji UV-Vis, FTIR dan GCMS diketahui fraksi ke-3 mengandung senyawa fenol dan turunannya melalui daerah serapan dan gugus fungsi yang ditemukan dari grafik yang dianalisis. Hasil MIC didapatkan 125 ppm merupakan konsentrasi minimal untuk menghambat bakteri karena nilai arsobansinya mendekati kontrol positif dan melalui uji cakram 175 ppm didapatkan hasil yang terbaik dengan rerata diameter zona hambat 11,22 mm.

Hasil uji LC_{50} didapatkan 200 ppm sudah dikatakan toksik karena membunuh ikan sebelum 24 jam. Uji LD_{50} didapatkan 10^7 sebagai dosis untuk infeksi pada uji *in-vivo*. Hasil gejala klinis kerusakan-kerusakan pada bagian tubuh ikan mas seperti sirip terutama pada sirip ekor dan sirip dorsal, lesi, kerusakan tutup operkulum, insang memucat, sisik mengelupas, perut membuncit, terdapat benjolan yang mengeluarkan nanah, pendarahan, warna pucat dan beberapa bintik/bercak merah di sekitar tubuh ikan. Hasil analisa kelulushidupan didapatkan 175 ppm (perlakuan C) sebagai nilai terbaik yaitu 86,67%. Analisis histopatologi hati ditemukan kerusakan hipertrofi dan nekrosis. Melalui pengobatan didapatkan perlakuan C (175 ppm) dengan nilai terbaik sebagai dosis maksimal, karena didapatkan nilai kerusakan paling rendah dibandingkan dari 2 perlakuan lainnya tanpa menyebabkan kematian yang tinggi pada ikan uji.

Analisa kualitas air didapatkan pH 7-7,6; suhu 22-24,1 °C dan oksigen terlarut sebesar 4,4-5,3 mg/L. Nilai-nilai tersebut masih dikatakan normal sebagai tempat hidup ikan mas yang berasal dari Batu, Malang, Jawa Timur.

Kata Kunci: karakterisasi, antibakteri, *Muntingia calabura* L., pengobatan.

SUMMARY

Gede Angga Krishna Fariestha, Post Graduate Student of Aquaculture, Fisheries and Marine Sciences, University of Brawijaya. **Thesis. FRACTION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF KERSEN (*Muntingia calabura* L.) LEAF EXTRACT ON HISTOPATHOLOGY OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) LIVER WHICH IS INFECTED BY *Aeromonas hydrophila*.** Thesis Adviser: Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS and Co-Adviser: Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.

Intensive fish farming provides great benefits for the cultivators, but has a negative impact if it is not handled properly to the cultivation business, especially to the health of the fish that are cultivated. The high stocking density, feed, and damage to water quality cause fish to be very susceptible to pathogenic diseases. One of the diseases that attacks common carp is *Aeromonas hydrophila*. The pathogenicity of the *Aeromonas hydrophila* is very dangerous affecting on fish. Fish that have been affected by this bacteria will be show external symptoms such as skin and gills that appear whitish and pale, fish body injury, hemorrhagic, hypertrophy, hyperflasia and necrosis of the fish's body, especially in the liver and damage on the fins. After an acute infection, the fish will lose balance and death occurs. This is the need for preventive action on fish attacked by *Aeromonas hydrophila*, one of which is treatment.

Based on the statement above, the need for effective, optimal and environmentally friendly treatment that does not cause bacterial resistance, which uses natural ingredients, one of which uses kersen leaf extracts (*Muntingia calabura* L.). Some research has been done, kersen leaf (*Muntingia calabura* L.) have advantages compared to other body parts of grained plants because the leaves contain more antibacterial and antioxidant compounds. Kersen leaf have compounds such as flavonoids, tannins, polyphenols, saponins and other components that have the potential as antibacterials and become good antioxidants for the treatment of diseases caused by bacterial attacks.

Treatment using kersen leaf extract (*Muntingia calabura* L.) is expected to be an alternative for treatment in aquaculture activities. So this study aims to analyze secondary metabolite compounds of the kersen leaf fraction (*Muntingia calabura* L.) which has antibacterial properties against *Aeromonas hydrophila*. Analyzing bacterial inhibitory power applied to the active compound of kersen leaf extract (*Muntingia calabura* L.) and analyzing the effect of grated leaf extract (*Muntingia calabura* L.) on common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila* bacteria observed by survival rate and liver histopathology damage.

The study was conducted from January 2018 to October 2018 at the Laboratory of Fish Disease and Health (Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Brawijaya University Malang), Laboratory of Plant Taxonomy, Structure and Development (Faculty of Mathematics and Natural Sciences (MIPA), Brawijaya University Malang), Organic Chemistry Laboratory (Faculty of Science and Technology (Saintek), State Islamic University of Malang) and Histopathology Laboratory (Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang).

This study uses an experimental method that is done to directly test the relationship of one variable with another variable and test an alleged causal relationship using a completely randomized design (CRD). The extraction process uses three solvents namely ethanol 96%, ethyl acetate and chloroform which aims to determine the best results in the phytochemical test of the three solvents. Fractionation using methanol: ethyl acetate (1:8) eluent using for

column chromatography. After fractionation, the best fraction is searched through disc test. After that, characterization was carried out with UV-Vis, FT-IR and GC-MS instruments. Then proceed with bioinformatics. For in-vitro testing MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and disc test were carried out. While the in-vivo test observed fish clinical symptoms, histopathological damage to fish liver and survival rate. For water quality, pH, temperature and dissolved oxygen are examined.

The results obtained were the kersen leaf extract using 96% ethanol as the best solvent because the phytochemical test results showed flavonoids, saponins, tannins, triterpenoids and alkaloids. The results of fractionation were found in 5 extract fractions and the 3rd fraction was the best because it was able to inhibit the growth of *A. hydrophila* with a 7.97 mm inhibition zone diameter. Through the UV-Vis, FTIR and GCMS tests, it is known that 3rd fraction contains phenol compounds through absorption and functional groups found from the analyzed graph. MIC results obtained 125 ppm were the minimum concentration to inhibit bacteria because the value of the absorbance approached positive control and through the 175 ppm disc test the best results were obtained with an average inhibition zone diameter of 11.22 mm.

LC₅₀ test results obtained 200 ppm have been said to be toxic because they killed fish before 24 hours. LD₅₀ test was obtained 10⁷ as a dose for infection in the in-vivo test. The results of clinical symptoms of damage to the body parts of common carp such as fins, especially on the caudal and dorsal fins, lesions, operculum lid damage, gills paled, flaky scales, bulging stomachs, there are lumps that emit pus, bleeding, pale color and some red spots around the fish's body. The results of the survival analysis were 175 ppm (treatment C) as the best value was 86.67%. Histopathological analysis of liver found hypertrophy and necrosis damage. Through treatment it was found that treatment C (175 ppm) with the best concentration as the maximum dose, because it obtained the lowest damage value compared to two other treatments without causing high mortality in fish.

Water quality analysis obtained pH 7-7,6; temperatures of 22-24.1 °C and dissolved oxygen of 4.4-5.3 mg / L. These values are still considered normal as a place to live carp originating from Batu, Malang, East Java.

Keyword: characterization, antibacterial, *Muntingia calabura* L., treatment.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa, karena atas limpahan nikmat serta karunia-Nya, maka penyusunan tesis yang berjudul "Fraksi Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Histopatologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*" dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, akan tetapi masih dirasakan banyak kekurangan dan oleh karena itu, bagi penulis, kritik dan saran sangat dibutuhkan untuk menyempurnakan tulisan ini. Penulis mengharapkan tulisan ini bermanfaat bagi pembaca yang memerlukannya.

Malang, Desember 2018

Penulis



RIWAYAT HIDUP



GEDE ANGGA KRISHNA FARIESTHA lahir di Dusun Bunutin pada tanggal 21 Oktober 1993 dari pasangan Wayan Suarnata dan Ni Wayan Yani. Penulis tesis ini merupakan anak pertama dari dua bersaudara, dengan saudara perempuan yang bernama Kadek Cindy Dyah Larasati. Riwayat pendidikan penulis pernah menempuh pendidikan pada Taman Kanak-Kanak Pradnyandari 1, Kerobokan, Kuta Utara pada tahun 1997-1999.

Pendidikan Sekolah Dasar diselesaikan di Sekolah Dasar Negeri 1 Kerobokan pada tahun 1999-2005. Pendidikan Sekolah Menengah Pertama ditempuh di Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Kuta Utara pada tahun 2005-2008. Sekolah Menengah Atas ditempuh di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Kuta Utara pada tahun 2008-2011. Pendidikan Strata 1 (S1) diselesaikan di Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2011-2016 dengan judul Skripsi yang berjudul "PENGARUH EKSTRAK KULIT POHON KETAPANG (*Terminalia catappa*) TERHADAP KELULUSHIDUPAN DAN HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*" dengan memperoleh gelar Sarjana Perikanan (S.Pi). Menempuh Program Magister Perikanan Budidaya Perairan pada tahun 2016 hingga saat ini. Penulis melakukan penelitian tesis tentang "FRAKSI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI *Aeromonas hydrophila*", untuk memperoleh gelar Magister Perikanan (MP).

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan atas terselesaikannya laporan tesis ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas limpahan rahmat serta karunia-Nya.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen Pembimbing 1 dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si selaku dosen Pembimbing 2 yang telah meluangkan waktu, senantiasa selalu memberi saran, motivasi dan dukungan.
3. Bapak Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc. selaku dosen Penguji 1 dan Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si. selaku dosen Penguji 2 yang telah meluangkan waktu, motivasi dan dukungan untuk penyempurnaan laporan Tesis ini.
4. Bapak Wayan Suarnata dan Ibu Ni Wayan Yani selaku orang tua serta Adik tercinta Kadek Cindy Dyah Larasati, atas segala dukungan, motivasi, dan do'anya.
5. Spesial terima kasih buat Bapak M. Chalid Al-Ayyubi, Ibu Yori Turu Toja, Ibu Siti Aisiah, Cucun Herlina dan Endar Riyani yang sangat membantu dalam kegiatan penelitian ini.
6. Teman-teman Magister Budidaya Perairan 2015 (Ganjil dan Genap), 2016 (Ganjil dan Genap) dan 2017 (Ganjil dan Genap) yang telah ikut serta mendukung penyelesaian Tesis ini.
7. Seluruh pihak yang sudah membantu penulis selama penelitian, seperti Balai Perikanan terkait dan Toko Alat Bahan Kimia.

Malang, Desember 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	ix
RIWAYAT HIDUP	x
UCAPAN TERIMA KASIH	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR ISTILAH	xviii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Teoritis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Syarat Hidup	6
2.1.3 Penyakit Pada Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
2.2 Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	7
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	7
2.2.2 Habitat dan Syarat Hidup	8
2.2.3 Kandungan Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	9
A. Fenol	9
B. Flavonoid	10
C. Saponin	10
D. Tannin	11
2.3 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	12
2.3.2 Patologi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
2.4 Ekstraksi	14
2.5 Identifikasi Senyawa Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	16
2.5.1 Skrining Fitokimia	16
2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	17
2.5.3 Kromatografi Kolom	18
2.5.4 Spektrofotometer Ultraviolet (UV-Vis)	19
2.5.5 Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)	19
2.5.6 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)	20
2.6 Sifat Antibakteri	21
2.7 Uji Cakram	22

2.8 Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).....	23
2.9 Histopatologi.....	23
2.9.1 Pengertian Histopatologi	23
2.9.2 Pengujian Histopatologi Hati	24
2.10 Hati dan Fungsinya	25
2.11 Histopatologi Hati	25
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	27
3.1 Landasan Teori	27
3.2 Hipotesis.....	28
3.3 Strategi Publikasi.....	28
3.4 Kerangka Konsep Penelitian.....	29
3.5 Kerangka Operasional Penelitian	30
3.6 Langkah Kerja Penelitian	31
3.7 Kebaruan Penelitian	32
4. METODE PENELITIAN	34
4.1 Materi Penelitian.....	34
4.1.1 Alat Penelitian	34
4.1.2 Bahan Penelitian.....	34
4.2 Pendekatan Penelitian	35
4.3 Metode Penelitian.....	36
4.4 Rancangan Penelitian	37
4.5 Prosedur Penelitian	39
4.5.1 Penelitian Tahap 1 (Ekstraksi, Fraksinasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)).....	39
4.5.1.1 Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	39
4.5.1.2 Ekstraksi Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	40
4.5.1.3 Skrining Fitokimia	40
A. Flavonoid	41
B. Saponin.....	41
C. Tannin.....	41
D. Alkaloid	41
E. Triterpenoid	42
4.5.1.4 Kromatografi Lapis Tipis.....	42
4.5.1.5 Kromatografi Kolom.....	43
4.5.1.6 Uji Cakram Untuk Menentukan Fraksi Terbaik	45
4.5.1.7 Spektrofotometer <i>Ultraviolet-Visible</i>	45
4.5.1.8 Spektrofotometer <i>Fourier Transform-Infrared</i>	46
4.5.1.9 Analisa Gas <i>Chromatography-Mass Spectrophotometry</i>	46
4.5.2 Penelitian Tahap 2 (Analisis Antibakteri Terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> yang Diberi Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) (Secara <i>In-Vitro</i>))	47
4.5.2.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)	47
4.5.2.2 Uji Cakram	48
4.5.3 Penelitian Tahap 3 (Analisis Pemberian Ekstrak Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) pada Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>) yang Diinfeksi <i>Aeromonas hydrophila</i> Secara Terkontrol (Laboratorium) (Pengujian <i>In-vivo</i>)).....	49
4.5.3.1 Persiapan Ikan.....	49
4.5.3.2 Patogenitas <i>A. hydrophila</i> dengan LD ₅₀	49
4.5.3.3 Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Kersen dengan LC ₅₀	50
4.5.3.4 Pengobatan Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) pada Ikan yang Diinfeksi <i>Aeromonas hydrophila</i>	50

4.5.3.5 Pengujian Kelulushidupan (SR)	51
4.5.3.6 Pengujian Histopatologi Hati	52
4.6 Parameter Penunjang Penelitian	53
4.7 Analisis Data	53
4.7.1 Analisis Data Hasil GCMS	54
4.7.2 Analisis Data Kerusakan Histopatologi Hati Ikan Mas	54
4.8 Waktu dan Tempat Penelitian	55
5. HASIL DAN PEMBAHASAN	56
5.1 Penelitian Tahap Pertama. (Ekstraksi, Fraksinasi dan Karakterisasi Fraksi Terbaik Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) yang Bersifat Antibakteri Terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i>)	56
5.1.1 Rendemen Ekstrak Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	56
5.1.2 Analisa Skrining Fitokimia Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	57
5.1.3 Analisa Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	58
5.1.4 Fraksinasi dan Penentuan Kandidat Fraksi Terbaik Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	60
5.1.5 Analisa Spektrofotometer UV-Vis (<i>Ultraviolet-Visible</i>) Fraksi Ke-3	63
5.1.6 Analisa Spektrofotometer FT-IR (<i>Fourier Transform-Infrared</i>) Fraksi Ke-3	64
5.1.7 Analisa GCMS (<i>Gas Chromatography Mass Spectrophotometry</i>) Fraksi Ke-3	65
5.2 Penelitian Tahap Kedua. Analisis Antibakteri Terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> yang Diberi Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) (Pengujian <i>In-vitro</i>)	68
5.2.1 Analisa MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)	68
5.2.2 Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) terhadap Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	71
5.3 Penelitian Tahap Ketiga. Analisis Pemberian Ekstrak Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) pada Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>) yang Diinfeksi <i>Aeromonas hydrophila</i> Secara Terkontrol (Laboratorium) (Pengujian <i>In-vivo</i>)	74
5.3.1 Analisa <i>Lethal Concentration</i> 50% (LC_{50}) Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) pada Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	74
5.3.2 Analisa <i>Lethal Dossage</i> 50% (LD_{50}) Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>) Terhadap Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	75
5.3.3 Analisa Gejala Klinis (<i>Symptom</i>)	77
a. Gejala Klinis Ikan Mas Tanpa Perlakuan (Kontrol Negatif)	77
b. Gejala Klinis Ikan Pasca-Pengobatan	79
5.3.4 Analisa Kelulushidupan (SR) Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	81
5.3.5 Analisa Histopatologi Hati Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	84
a. Hipertrofi	85
b. Nekrosis	88
c. Pembahasan Mekanisme Invasi Bakteri dan Histopatologi Hati	90
5.3.6 Analisa Kualitas Air Pengamatan	94
6. KESIMPULAN DAN SARAN	96
6.1 Kesimpulan	96
6.2 Saran	96

DAFTAR PUSTAKA	97
-----------------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	5
2. (a) Pohon Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) dan (b) Daun Kersen	8
3. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
4. Uji Cakram	22
5. Kerangka Konseptual Penelitian	29
6. Kerangka Operasional Penelitian.....	30
7. Hasil Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang Diamati Melalui Sinar UV 366 nm.....	59
8. Fraksinasi Kromatografi Kolom. (A) Proses Kromatografi Kolom; (B) Hasil Fraksi Kromatografi Kolom.	60
9. Uji Daya Hambat Fraksi Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	61
10. Analisis UV-Vis Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	63
11. Analisis FTIR Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	64
12. Hasil Analisis GC-MS Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	66
13. Struktur Eugenol	66
14. Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Bakteri <i>A. hydrophila</i> dengan Pemberian Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	69
15. Diameter Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.) Terhadap <i>A. hydrophila</i>	71
16. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Daya Hambat	73
17. Kematian Ikan Akibat Terpapar Ekstrak Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.) dengan Konsentrasi 1000 ppm.....	75
18. Gejala Patologi Klinis Tubuh Ikan Mas (<i>C. carpio</i>) yang Terinfeksi <i>A. hydrophila</i>	79
19. Tingkah Laku Ikan Mas Pasca-Pengobatan. Pasif Didasar Media Pada Perlakuan A (125 ppm) Pengamatan Hari Ke-2.....	80
20. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Kelulushidupan Ikan Mas.....	83
21. Hasil Pengamatan Histopatologi Hati Ikan Mas. A. Kontrol (+), B. Kontrol (-), C. Pelakuan A (125 ppm), D. Perlakuan B (150 ppm) dan E. Perlakuan C (175 ppm). Pengamatan Diamati Melalui Mikroskop dengan Perbesaran 1000x.....	85
22. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Hipertrofi.....	87
23. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Nekrosis.....	90

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Strategi Publikasi Jurnal Riset.....	28
2. Penelitian Terdahulu Pengujian Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	32
3. Rendemen Ekstrak Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	56
4. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	57
5. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis Untuk Menentukan Eluen Terbaik yang Akan Digunakan Sebagai Eluen Kromatografi Kolom.....	58
6. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Eluen Metanol : Etil Asetat (1:8).....	59
7. Diameter Zona Hambat Uji Cakram Fraksi Ekstrak Daun Kersen (<i>M. Calabura</i> L.).....	62
8. Data Karakterisasi Sprektotometer FTIR Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	65
9. Profil Senyawa Eugenol yang Terkandung Didalam Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>M calabura</i> L.) Melalui Pengamatan GCMS.....	67
10. Hasil Pengujian MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Dengan Berbagai Konsentrasi Menggunakan Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>M. calabura</i> L.).....	68
11. Pengujian Kultur Bakteri Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) pada Media TSA (<i>Trypticase Soy Agar</i>) yang Diuji Selama 24, 48 dan 72 Jam. (Positif (+) Bakteri Tumbuh dan Negatif (-) Bakteri Tidak Tumbuh).....	69
12. Data Diameter Daya Hambat (mm) Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>M. Calabura</i> L.) Terhadap <i>A. hydrophila</i>	72
13. Analisis Sidik Ragam Nilai Daya Hambat (mm) Uji Cakram.....	72
14. Analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Nilai Daya Hambat (mm) Uji Cakram.....	72
15. Hasil <i>Lethal Concentration 50%</i> (LC_{50}) Ekstrak Kasar Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) terhadap Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>).).....	74
16. Hasil Uji <i>Lethal Dossage 50%</i> (LD_{50}) Ikan Mas (<i>C. carpio</i>) Terhadap <i>A. hydrophila</i>	76
17. Gejala-gejala Klinis Ikan Tanpa Perlakuan Pengobatan.....	77
18. Gejala-gejala Klinis Ikan Pasca-Pengobatan Dengan Perlakuan.....	79
19. Nilai Kelulushidupan (%) Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).....	81
20. Analisis Sidik Ragam Nilai Kelulushidupan Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).....	82
21. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Kelulushidupan IkanMas (<i>C. carpio</i>).....	82
22. Nilai Rata-rata Skoring Kerusakan Hipertrofi.....	86
23. Analisis Sidik Ragam Nilai Hipertrofi Hati Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).....	86
24. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT Hipertrofi Hati Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).	87
25. Nilai Rata-rata Skoring Kerusakan Nekrosis.....	88
26. Analisis Sidik Ragam Nilai Nekrosis Hati Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).	89
27. Analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Nekrosis Ikan Mas (<i>C. carpio</i>).....	89
28. Data Pengamatan Kualitas Air Selama Pemeliharaan 10 Hari.....	94

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Klasifikasi Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.).....	114
2. Sertifikat Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	115
3. Alat Dan Bahan Penelitian.....	117
4. Dokumentasi Penelitian	119
5. Hasil UV-Vis Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.).....	121
6. Hasil GCMS Fraksi Ke-3 Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.).....	122
7. Perhitungan Analisis Sidik Ragam Uji Cakram	126
8. Data Pengamatan Per-Hari dan Perhitungan Kelulushidupan (SR) Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	129
9. Perhitungan Histopatologi Hati Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	133
10. Data Kualitas Air Selama Pemeliharaan 10 Hari	140



DAFTAR ISTILAH

Abnormal	Suatu keadaan menyimpang dari kondisi awalnya.
Abses	Peradangan yang terjadi adanya infeksi oleh mikroorganisme seperti bakteri efek pertahanan diri dari sel darah dan enzim-enzim yang menyebabkan adanya cairan putih (nanah).
Absorbansi	Suatu polarisasi (penyinaran) cahaya yang terserap oleh bahan (komponen kimia) tertentu pada panjang gelombang tertentu sehingga memberikan warna tertentu terhadap bahan tersebut.
Adlibitum	Pemberian makan pada hewan uji hingga kondisi kenyang.
Aklimatisasi	Suatu upaya penyesuaian fisiologis (adaptasi) organisme terhadap lingkungan baru yang akan dimasukinya.
Akut	Suatu kondisi yang menyatakan penyakit atau gangguan sudah dalam keadaan serius.
Antibakteri	Suatu zat yang dapat mengganggu pertumbuhan hingga mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang bersifat merugikan.
Antioksidan	Suatu zat yang berfungsi melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.
Bioinformatika	Teknik komputerisasi untuk menganalisis suatu data berdasarkan informasi secara biologis.
Denaturasi	Sebuah proses di mana protein atau asam nukleat kehilangan struktur akibat adanya tekanan eksternal atau senyawa-senyawa aktif, asam kuat atau basa, garam anorganik terkonsentrasi dan panas.
Derivatif	Turunan dari suatu senyawa.
DO	(Dissolved Oxygen) merupakan oksigen yang terlarut dalam suatu badan air.
Dosis	Kadar dari sesuatu bahan obat yang dapat mempengaruhi suatu organisme secara biologis.
Ekstrak	Suatu sediaan pekat yang didapatkan melalui proses mengekstraksi zat aktif dari tumbuhan atau hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai.
Eluen	Suatu zat pembawa atau pengantar baik zat cair maupun gas sebagai fase gerak dalam proses kromatografi.
Fragmen	Pecahan suatu bahan aktif dari bahan uji.
Fraksi	Suatu fragmen senyawa yang dipisahkan berdasarkan tingkat kepolarannya.
Hemoragik	Pendarahan yang terjadi akibat pecahnya pembuluh darah akibat patogen tertentu.
Hiperflasia	Abnormalitas jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan tertentu yang diakibatkan oleh patogen.

Hipertrofi

Abnormalitas ukuran volume sel maupun jaringan akibat pembesaran komponen sel yang teresang patogen tertentu.

Infeksi

Proses invasif oleh mikroorganisme dan berproliferasi di dalam tubuh yang menyebabkan sakit.

Inhibitor

Zat yang menghambat atau menurunkan laju reaksi kimia dan mikroorganisme.

IUPAC

(*International Union of Pure and Applied Chemistry*) sistem penamaan senyawa kimia dan penjelasan ilmu kimia secara umum.

In vitro

Istilah biologi untuk menyebutkan kultur suatu sel, jaringan, atau organ tertentu didalam wadah terkontrol pada laboratorium.

In vivo

Istilah biologi untuk eksperimen atau pengamatan yang tersirat pada jaringan seluruh organisme hidup dalam lingkungan yang terkontrol.

Koagulasi

Proses penggumpalan suatu cairan atau larutan sehingga terbentuk padatan lunak seperti gel ataupun keras.

Konsentrasi

Ukuran yang menggambarkan banyaknya zat atau bahan di dalam suatu campuran yang dibagi dengan volume total campuran tersebut. Umumnya dipakai untuk pengujian suatu bahan untuk menentukan dosis.

LC₅₀

Suatu pengujian pada konsentrasi berapa ekstrak yang dapat mematikan 50 % dari organisme uji.

LD₅₀

Suatu pengujian dosis bakteri yang digunakan untuk mematikan 50% dari organisme uji.

Lesi

Keadaan jaringan yang abnormal pada tubuh. Umumnya akibat trauma fisik dan akibat infeksi oleh mikroorganisme seperti bakteri.

Lipofilik

Suatu zat yang mampu melarutkan lemak dan bahan non polar lainnya.

Maserasi

Suatu sediaan cair yang dilakukan untuk mengekstraksi bahan alami dengan cara merendam menggunakan suatu pelarut.

Maserat

Hasil penarikan simplisia dengan cara maserasi (perendaman).

Nekrosis

Kematian sel sebagai akibat dari adanya kerusakan sel akut atau trauma akibat adanya respon peradangan akibat patogen tertentu.

nm

(Nanometer) satuan panjang gelombang.

Oportunistik

Perilaku yang mengeksploitasi suatu peluang untuk mendapat keuntungan yang setinggi-tingginya.

Osmoregulasi

Proses mengatur konsentrasi cairan dan menyeimbangkan pemasukan serta pengeluaran cairan tubuh oleh sel, jaringan hingga organisme hidup.

pH	(potensi ¹ Hidrogen) suatu pengukuran untuk mengungkapkan jika larutan bersifat asam atau basa.
Patogen	Agen biologis yang menyebabkan penyakit pada inangnya.
Patogenitas	Kemampuan suatu mikroba untuk menyebabkan penyakit pada organisme inangnya.
Postulat Koch	Rumusan-rumusan kondisi yang harus dipenuhi untuk menduga suatu organisme dianggap sebagai penyebab penyakit.
ppm	Perbandingan konsentrasi zat terlarut dan pelarutnya dengan perbandingan konsentrasi per-satu juta.
Pro Analysis	Suatu bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan penelitian dengan memiliki kemurnian yang sangat tinggi hingga 99%.
Rendemen	Perbandingan jumlah ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal yang digunakan.
Rf	(Retention factor) merupakan rasio jarak tempuh suatu spot (bercak) pada titik awal dibagi jarak tempuh eluen pada titik awal pengamatan.
Septisemia	Merupakan salah satu penyakit serius akibat infeksi bakteri yang dapat mengancam organisme dan bereaksi sangat cepat.
Simplisia	Bahan alami digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami perubahan proses yang umumnya berupa bahan yang telah dikeringkan dan ditepungkan.
Sintesis	Suatu integrasi dari dua atau lebih elemen senyawa yang ada kemudian menghasilkan suatu hasil senyawa yang baru.
SR	(Survival rate) tingkat kelulushidupan suatu organisme budidaya yang dinilai secara terkontrol.
Suhu	Instilah dalam fisika yang menyatakan derajat panas suatu zat.
Visual	Penglihatan secara mata telanjang (tanpa memakai alat pembantu).
Xenobiotik	Zat asing yang masuk dalam tubuh.

1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya ikan secara intensif memberikan keuntungan yang besar bagi pembudidayanya, namun berdampak negatif apabila tidak ditangani dengan baik terhadap usaha budidaya, khususnya pada bidang kesehatan ikan (Lengka *et al.*, 2014). Tingginya padat tebar, pakan, dan rusaknya kualitas air menyebabkan ikan sangat rentan terserang penyakit baik patogen maupun non-patogen (Maftuch dan Dalimunthe, 2013).

Ikan mas merupakan salah satu ikan yang dibudidayakan secara intensif (Khairuman, 2013). Ikan mas merupakan ikan konsumsi populer di Indonesia karena, memiliki sifat mudah dibudidayakan, pertumbuhan yang cukup cepat (Sarjito dan Prayitno, 2014), dan harganya relatif terjangkau untuk masyarakat umum (Erwin, 2013). Namun, jika dibudidayakan secara intensif ikan mas rentan terkena serangan penyakit, salah satunya penyakit yang berasal dari bakteri *Aeromonas hydrophila* (Mohamad dan Abasali, 2010).

Patogenitas bakteri *Aeromonas hydrophila* sangat berbahaya untuk ikan. Ikan yang sudah terkena bakteri ini secara umum akan terlihat dari gejala-gejala eksternal seperti kulit dan insang tampak pucat, luka pada tubuh ikan, terjadi haemoragik pada tubuh, dan sirip geripis (Afrianto *et al.*, 2015). Gejala-gejala internal yang terlihat, yaitu empedu rusak dan mudah pecah, kerusakan hati, ginjal kehitaman dan saluran pencernaan kosong berisi cairan. (Olga, 2012).

Salah satu organ yang terserang oleh bakteri ini adalah hati. Hati merupakan organ yang sangat penting di dalam tubuh ikan yaitu berfungsi sebagai organ yang mengatur metabolisme penting di dalam tubuh ikan, seperti metabolisme lemak, protein dan karbohidrat setelah makanan diolah melalui saluran pencernaan (Cahyono, 2010). Selain itu, hati juga berfungsi melawan

bibit penyakit, pembentukan zat-zat yang berfungsi dalam meningkatkan imunitas dan menangkalkan racun-racun di dalam tubuh (Djing, 2006). Hati ikan secara postulat Koch yang terjangkit akibat bakteri *Aeromonas hydrophila* akan berwarna pucat hingga keputihan dan terjadinya haemoragik, degenerasi, vakuolisasi dan nekrosis. Jika sudah akut, ikan akan terjadi kematian karena ikan tidak bisa menetralkan patogen-patogen yang ada didalam tubuh ikan (Safratilofa, 2017).

Berdasarkan pernyataan diatas, maka perlunya upaya-upaya preventif pada ikan yang terserang patogenitas bakteri ini. Upaya penanggulangan penyakit dengan pemberian antibakteri dan antibiotik yang bersifat kimia memang memberikan hasil yang bagus dan efektif, namun dikhawatirkan akan merusak lingkungan dan membuat jenis bakteri baru yang resisten akan obat (Sumino *et al.*, 2013). Maka dari itu perlu adanya substitusi penanganan bahan kimia yang lebih efektif, optimal dan ramah lingkungan yang tidak menyebabkan resistensi bakteri yaitu menggunakan bahan alami (Haditomo *et al.*, 2014), yang salah satunya menggunakan ekstrak dari daun kersen (*Muntingia calabura* L.) (Zakaria *et al.*, 2010).

Beberapa riset yang dilakukan, daun kersen (*Muntingia calabura* L.) memiliki kelebihan dibanding dengan bagian tubuh tumbuhan kersen lainnya karena daunnya mengandung lebih banyak senyawa aktif dibandingkan ranting, buah, batang maupun akarnya (Murti *et al.*, 2016). Daun kersen memiliki senyawa yang seperti flavonoid, tannin (Isnarianti *et al.*, 2013), polifenol, saponin dan komponen-komponen lainnya yang berpotensi sebagai antibakteri sehingga menjadi antioksidan yang baik untuk penanganan penyakit akibat bakteri (Singh *et al.*, 2017).

Kajian terhadap senyawa aktif dari daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sudah cukup banyak diteliti secara *in-vitro*, akan tetapi pemanfaatan senyawa

aktif daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dalam bidang kesehatan perikanan masih kurang dilakukan penelitian. Maka dari itu, perlunya dikaji lebih dalam tentang senyawa aktif daun terhadap penanganan ikan yang terserang bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in-vitro* sebagai bahan antibakteri dan secara *in-vivo* yang bisa dilihat melalui histopatologi hati ikan, gejala klinis yang timbul sebelum dan sesudah pengobatan serta nilai kelulushidupannya.

1.2 Rumusan Masalah

Serangan penyakit akibat infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan masalah serius yang dialami oleh pembudidaya. Menurut Sarjito dan Prayitno, (2014), penyakit akibat infeksi bakteri ini bersifat patogen yang mengakibatkan menurunnya kesehatan dan pertumbuhan ikan, kerusakan fisik, hingga mematikan ikan sangat cepat dalam waktu singkat. Maka dari itu perlunya bahan alternatif untuk pengobatan bakteri ini, melalui bahan alami dari ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Sehingga perlunya dilakukan penelitian untuk mengetahui dan menganalisis:

- Kandungan senyawa aktif daun kersen (*Muntingia calabura* L.) apakah yang memiliki sifat antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* dilihat melalui fraksi terbaiknya?
- Bagaimanakah daya hambat bakteri yang diaplikasikan senyawa aktif ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.)?
- Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*) terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* jika diamati melalui kerusakan histopatologi hati?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian tesis ini memiliki tujuan adalah sebagai berikut.

- Menganalisis senyawa aktif melalui fraksi terbaik yang diuji menggunakan metode UV-VIS, FTIR dan GCMS daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang memiliki sifat antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila*.
- Menganalisis daya hambat bakteri yang diaplikasikan ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.).
- Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap histopatologi hati ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Manfaat secara teoritis dari hasil penelitian ini ialah memberikan suatu informasi mengenai pemberian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) memiliki kemampuan sebagai bahan alami alternatif untuk pengobatan dibidang perikanan untuk penanganan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan budidaya tawar lainnya, serta memberikan data dosis yang tepat untuk pengobatan yang dilihat melalui gambaran histopatogi hati ikan.

1.4.2 Manfaat Praktis

Melalui hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi penting terhadap perkembangan ilmu pengetahuan pada bidang kesehatan ikan melalui pengobatan ikan yang memanfaatkan bahan-bahan yang mudah didapat, tidak mahal, alami dan ramah lingkungan seperti penggunaan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) untuk pengobatan serangan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Lentera (2002), didasari oleh ilmu taksonomi hewan air, ikan mas dapat diklasifikasikan yaitu.

Filum : Chordata

Kelas : Osteichthyes

Ordo : Cypriniformes

Famili : Cyprinidae

Genus : *Cyprinus*

Spesies : *Cyprinus carpio*

Ikan mas secara keseluruhan memiliki karakteristik ciri khas bentuk tubuhnya sedikit memanjang, anatomi memipih ke samping dan seluruh bagian tubuh diselubungi oleh sisik bertipe sikloid (Supriatna, 2013). Mulut bertipe protaktil, memiliki dua pasang sungut pada ujungnya dan mempunyai gigi kerongkongan memiliki bentuk gigi geraham sebanyak tiga baris (Bachtiar dan Lentera, 2002). Karena memiliki gigi kerongkongan, ikan mas digolongkan jenis ikan omnivora (Mondol et al., 2013).



Gambar 1. Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Khairuman et al., 2008).

Sirip ikan mas terdapat sirip dorsal, sirip anal, sirip ventral serta sirip ekor yang berjari-jari keras dan ujungnya bergerigi (Khairuman dan Amri, 2008).

Gurat-sisi ikan melintang pada pertengahan badan dari operkulum hingga simetris dengan ujung sirip ekor (Santoso, 1993). Variabel warna, ikan mas memiliki warna kecoklatan-kehijauan, keabu-abuan, kuning dan kemerahan sesuai varietas mereka. Di ujung siripnya kebanyakan berwarna keemasan hingga kekuningan (FAO, 2017).

2.1.2 Habitat dan Syarat Hidup

Cyprinus carpio merupakan ikan asli kawasan Asia yang hampir ditemukan di seluruh Benua terkecuali Antartika (Edward dan Twomey, 1982). Ikan mas dikenal sebagai spesies generalis karena mereka mentolerir berbagai kondisi dan habitat di dalam badan air di suatu perairan (Pestsmart, 2011). Ikan ini termasuk ikan *thermophile* yang mampu beradaptasi dengan baik akibat fluktuasi suhu air yang tidak stabil dengan rentang 4°C hingga 30°C (Djarijah, 2001). Walaupun ikan ini digolongkan air perairan tawar, namun ikan mas juga dapat ditemukan di perairan payau di daerah muara dengan salinitas mencapai 25-30 ppt (Khairuman dan Amri, 2008).

Ikan mas memiliki habitat hidup dengan ketinggian 150-600 meter yang diukur dari atas permukaan laut (Bachtiar dan Lentera, 2002). Ikan mas hidup di perairan tenang tertutup, seperti kolam-kolam air tawar dan perairan tenang terbuka, seperti danau, rawa, waduk dan sungai (Jhingan dan Puliin, 1985).

2.1.3 Penyakit Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Penyakit yang umumnya ditemukan pada ikan mas yaitu MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) yang diakibatkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* (Maftuch et al., 2013). Ikan yang terserang penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) pertumbuhannya terganggu bahkan dapat menyebabkan kematian, sehingga menimbulkan kerugian yang besar. Penyakit mulai dikenal di Indonesia sekitar tahun 1980 (Lukistiyowati dan Kurniasih, 2011). MAS atau

penyakit bercak merah, serangannya dapat mematikan benih ikan dengan tingkat kematian mencapai 80% - 100% dalam waktu 1-2 minggu (Cipriano, 2001).

Penyakit ikan mas lainnya yaitu disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyebabkan septicemia, pendarahan pada bagian mulut, sirip, insang dan organ dalam (Adanir dan Turutoglu, 2007), serangan ektoparasit *Myxobolus* sp., *Trichodina* sp., *Epistylis* sp., *Oodinium* sp., dan *I multifilis* yang menyerang bagian insang dan permukaan tubuh ikan mas (Purwaningsih, 2013).

Menurut Maftuch dan Dalimunthe (2013), penyakit yang mewabah ikan mas lainnya yang disebabkan oleh virus, yaitu KHV (Koi Harpes Virus) yang memiliki gejala klinis yaitu nafsu makan mendadak hilang, gerakan tidak normal, pendarahan pada sirip dan badan, luka melepuh, megap-megap (operculum bergerak cepat), bercak putih pada insang, geripis pada ujung lamella, dan insang membusuk.

2.2 Kersen (*Muntingia calabura* L.)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Kersen merupakan tanaman yang perdu dan umumnya memiliki ukuran yang pendek namun ada yang tumbuh tinggi hingga 12 meter (Kosasih *et al.*, 2013). Pohon kersen bernama latin *Muntingia calabura* L. memiliki batang lurus dan keras, bercabang relatif pendek, pangkal batang sedikit berbanir, dan memiliki buah kecil yang berwarna merah jika sudah matang (Andareto, 2015).

Tanaman ini berbunga dan berbuah sepanjang tahun (Birasal, 2013).

Daun kersen berjenis daun tunggal, memiliki morfologi daun bulat telur, ujung daun lancip, bergerigi pada tepian daun dan berbulu halus, dengan panjang antara 6 hingga 10 cm (Nurhasanah, 2012). Daun berjenis tunggal dan daun berseling pada ranting. Ranting pada tanaman ini berambut halus dan memiliki banyak cabang sehingga disebut tanaman perdu. Bunga kersen berisi

1-3 kuntum yang terletak pada ketiak sebelah atas daun. Bunga berwarna putih dan buahnya berbentuk bulat seperti ceri dengan memiliki diameter 15 mm (Suryowinoto, 1997).

Dilihat melalui sifat-sifat secara morfologi dan taksonomi, menurut Cronquist (1981), klasifikasi kersen yaitu:

Filum : Plantae

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Malvales

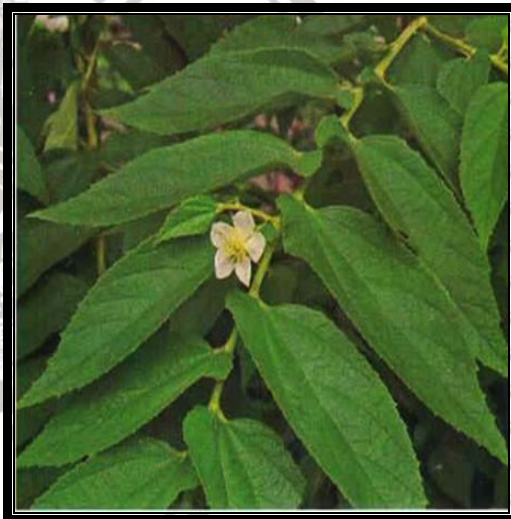
Famili : Elaeocarpaceae

Genus : *Muntingia*

Spesies : *Muntingia calabura* L.



(a)



(b)

Gambar 2. (a) Pohon Kersen (*Muntingia calabura* L.) (Nurhasanah, 2012) dan (b) Daun Kersen (Kosasih *et al.*, 2013).

2.2.2 Habitat

Tumbuhan kersen pada umumnya bukan tanaman budidaya, tetapi tumbuh secara liar biasanya terdapat di tepi jalan (Nurhasanah, 2012). Kersen diketahui berasal dari Amerika bagian tengah hingga bagian selatan yang memiliki suhu lebih hangat dan tropis (Morton, 1987). Kersen dapat menyesuaikan diri dengan tanah yang buruk, mampu mentolerir kondisi tanah yang asam maupun basa dan

kekeringan. Kersen dibawa dari Amerika Latin ke kawasan Asia bagian tenggara pada abad ke-19 dan sejak saat itu telah menjadi tanaman naturalisasi di seluruh Asia Tenggara (Birasal, 2013).

2.2.3 Kandungan Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Kersen memiliki kandungan yang bersifat antioksidan, anti-proliferatif (Zakaria *et al.*, 2011), dan anti-hiperglikemia atau menstabilkan kadar gula dalam darah (Sindhe *et al.*, 2013). Daun kersen mengandung bahan aktif diantaranya komponen fenol (Ragasa *et al.*, 2015), flavonoid, saponin (Yuliani *et al.*, 2014), dan tanin (Huda *et al.*, 2015).

A. Fenol

Fenol merupakan senyawa yang memiliki gugus $-OH$ (hidroksil) baik tunggal ataupun lebih melekat pada cincin aromatik. Rumus kimianya yaitu C_6H_5OH (Sumardjo, 2006). Pada bentuk padat (kristal) fenol berwarna bening / tanpa warna. Fenol sangat mudah dan terlarut dalam air. Fenol murni memiliki titik leleh pada suhu $40,9^{\circ}C$. Walaupun memiliki gugus hidroksil, fenol berbeda dengan alkohol dikarenakan bersifat asam lemah, yang dapat diartikan melepaskan dan menerima ion H^+ dari gugus hidroksil. Fenol sangat cepat terlarut dengan larutan sodium hidroksida, namun tidak bisa larut dalam larutan sodium karbonat (Gardziella *et al.*, 2000). Fenol memiliki gugus hidroksil lebih dari satu disebut polifenol (Indrawati dan Razimin, 2013).

Fenol bersumber alami pada tumbuhan dan mikroorganisme (Hattenschwiler dan Vitousek, 2000). Fenol berfungsi sebagai antioksidan dengan berkemampuan menangkap radikal bebas (Santi dan Sukadana, 2015), antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (Pambayun *et al.*, 2007), sebagai antifungi dari bahan alami yang ramah lingkungan (Ansari *et al.*, 2013), antiseptik dan desinfektan (Fajriputri, 2014).

B. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu dari komponen dari fenol yang paling banyak di temukan di alam dan memiliki 15 atom karbon (Bohm, 1998). Bentuk kerangka dari flavonoid yaitu 1 cincin aromatik A, 1 cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik mengandung oksigen dan bentuk oksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam jenis-jenis variasi dari kelompok flavonoid tersebut (Redha, 2010).

Flavonoid merupakan sumber antioksidan potensial. Sumber flavonoid secara alami didapatkan pada tumbuhan seperti pada dedaunan, buah-buahan dan umbi-umbian (Harlinawati, 2006). Fungsinya sebagai antibakteri, antifungi, antiseptik dan antipiretik. Hal itu dikarenakan bahan aktifnya mempunyai daya hambatan terhadap pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif (Parubak, 2013). Flavonoid juga bisa sebagai antiinflamasi. Mekanismenya melalui menghambat proses metabolisme asam arakhidona, pembentukan prostaglandin, dan melepaskan histamin pada suatu radang (Mardiana, 2012). Fungsi lainnya yaitu menangkal radikal bebas dengan cara kerjanya yaitu, mengurangi radikal bebas sebagai agen reduksi, mengurangi ion metal yang berlebihan yang bisa berpotensi menjadi radikal bebas (Imam, 2004).

C. Saponin

Saponin yaitu senyawa glikosida dengan memiliki karakteristik berbusa bila dilarutkan dengan air (Kar, 2003). Saponin merupakan metabolit sekunder mempunyai aglikon yang berupa sapogenin yang berikatan pada gugus gula (Kristianti, 2007). Dari sifat kimiannya, saponin ada dua jenis yaitu saponin berstruktur triterpenoid dan saponin berstruktur steroid. Dua jenis saponin tersebut dapat larut dalam air maupun etanol (polar), tetapi tidak dengan eter (non-polar) (Robinson, 2015).

Saponin merupakan metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam.

Dilaporkan saponin terdapat pada 500 genus tumbuhan di seluruh dunia (Negi *et al.*, 2013). Fungsi saponin pada tumbuhan masih belum pasti diketahui, namun diyakini sebagai bentuk penyimpanan karbohidrat hasil dari metabolisme tumbuhan (Indrawati dan Razimin, 2013). Pada tumbuh-tumbuhan saponin lebih banyak didapatkan pada daun dan akar. Saponin bermanfaat sebagai antibakteri dan antivirus (Mardiana, 2012). Menurut Yuliana *et al.*, (2015), saponin mampu sebagai antifungi, dikarenakan dapat menghambat pertumbuhan jamur. Saponin juga bisa sebagai antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan, bahkan bila jumlahnya tinggi bisa berpotensi menjadi bahan obat-obatan (Saefudin *et al.*, 2013). Namun bila konsentrasinya tinggi, bisa menyebabkan kematian pada hewan-hewan berdarah dingin, termasuk ikan dikarenakan mengganggu sistem peredaran darah ikan (Pasaribu *et al.*, 2015).

D. Tannin

Tannin merupakan metabolit sekunder memiliki gugus fenolik dan bagian dari senyawa polifenol. Tannin larut dalam air, memiliki sifat koloid serta dapat mengikat protein (Van Soest, 1994). Tannin diklasifikasikan oleh Freudenberg menjadi dua jenis, yaitu tannin hidrolisis dan tannin non-hidrolisis atau disebut tannin kondensasi. Tannin hidrolisis memiliki struktur poliesternya mudah dihidrolisis oleh asam, basa maupun enzim. Setelah terhidrolisis, tannin ini menghasilkan glukosa atau beberapa alkohol polihidrat, asam galat dan asam fenolat. Sedangkan tannin kondensasi memiliki struktur polimer yang lebih rumit. Tannin jenis ini terbentuk dari flavolan. Contohnya proantosianidin yang tersusun atas katekin dan epikatekin. Tannin kondensasi banyak terdapat pada tumbuhan meliputi buah, biji dan lain sebagainya (Salunkhe *et al.*, 2000).

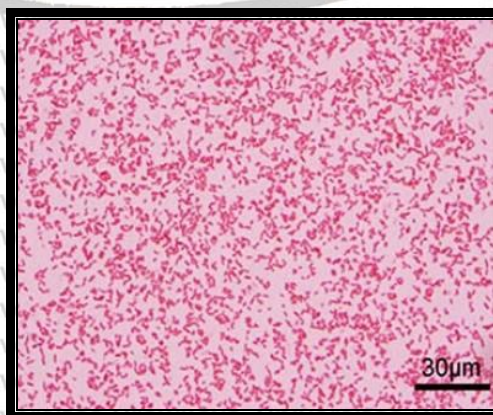
Tannin memiliki fungsi antioksidan yaitu berkemampuan dalam menstabilkan fraksi lipid dan memiliki keaktifan menghambat lipoksinase (Indrawati dan Razimin, 2013), sebagai antibakteri dikarenakan zat ini mengganggu sistem metabolisme sel bakteri (Nuria et al., 2009). Tannin juga berfungsi melancarkan pergerakan makanan di dalam usus sehingga sistem pencernaan di dalam usus menjadi normal (Andareto, 2015). Namun jika zat ini dikonsumsi berlebihan, tannin juga memberi efek negatif memperlambat penyerapan mineral penting, seperti kalsium, zinc dan zat besi. Bahkan ada jenis tannin yang bisa menyebabkan konstipasi, seperti pada daun teh (Somantri dan Tantri, 2011).

2.3 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Zipcodezoo (2006), menjelaskan klasifikasi ilmiah dari bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Aeromonadales
Famili	: Aeromonadaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>



Gambar 3. Bakteri *Aeromonas hydrophila* (Nahar et al., 2016).

A. hydrophila memiliki genus *Aeromonas* (Camus *et al.*, 1998), merupakan bakteri gram negatif dengan ciri utama bakteri berbentuk batang, berukuran sekitar 1-4 x 0,4-1 mikron dan bersifat fakultatif aerobik bakteri (mampu hidup tanpa adanya oksigen) (Kordi, 2004). *Aeromonas* tidak memiliki spora dan dapat dapat bergerak aktif yang memiliki alat gerak berupa flagel. Bakteri ini mampu tumbuh di segala macam perairan baik perairan tawar, laut maupun payau (Afrianto *et al.*, 2015).

Aeromonas tumbuh dalam suhu optimal 28 °C, namun dilaporkan bakteri ini dapat tumbuh dilingkungan perairan yang ekstrim sekalipun seperti perairan *hyperthermal* maupun *hypersaline* (Biamon dan Hazen, 1983). Hampir seperti bakteri lainnya, pertumbuhan *Aeromonas* dapat dipicu oleh keadaan ikan yang stres, perairan yang tercemar bahan organik, ketika kadar oksigen rendah dalam badan air hingga fluktuasi suhu dan pH perairan (Maftuch dan Dalimunthe, 2013).

2.3.2 Patologi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas adalah agen penyebab *motile aeromonas septicemia* (MAS), *motile aeromonas infection* (MAI) dan hemoragi septicemia yang menjangkit berbagai spesies ikan (Camus *et al.*, 1998). Bakteri ini sangat cepat menjangkit inangnya dan mampu mematikan ikan budidaya hingga mencapai 60% selama 12-24 jam setelah terjangkit. *Aeromonas* memiliki ciri khas infeksi pada ikan seperti adanya bercak atau pendarahan pada organ yang terinfeksi hingga menjadi pendarahan serius (Hardi *et al.*, 2014).

Bakteri *A. hydrophila* memiliki sifat infeksi sekunder yang timbul setelah pra-infeksi akibat faktor stersor pada inangnya. Bakteri ini bersifat oportunistik (Mulia, 2003). Serangan *Aeromonas* akan terlihat apabila faktor imunitas ikan menurun dikarenakan stres yang disebabkan oleh penurunan kualitas air dan penanganan ikan yang kurang baik (Kordi, 2004).

Ikan yang terserang bakteri ini akan terlihat lemah dan lemas, bergerak pasif, megap-megap di permukaan air, warna badannya akan menjadi gelap, insanganya berwarna pucat dan mukosa yang berlebihan yang menimbulkan pendarahan (Afrianto *et al.*, 2015), terjadinya haemoragi dan septicemia pada kulit dan otot dengan tanda-tanda; terdapat luka pada kulit, lubang viseral membengkak hingga tahap akut borok parah dan memungkinkan mematikan ikan (Maftuch dan Dalimunthe, 2013).

2.4 Ekstraksi

Dewasa ini penggunaan bahan tanaman sudah banyak digunakan pada aplikasi obat tradisional, farmasi, nutrisi dan kosmetik yang salah satunya dieksploitasi dari metabolit sekundernya (Njila *et al.*, 2017). Langkah yang paling penting dalam eksploitasi metabolit ini adalah proses ekstraksi dan isolasi senyawa aktifnya (Mukhriani, 2014). Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen aktif yang terkandung di dalam tanaman menggunakan berbagai macam pelarut yang sesuai dengan kelarutan komponen senyawa aktifnya yang terkandung di dalam suatu bahan uji (Yuliani dan Satuhu, 2012).

Menurut Tambun *et al.* (2016), faktor-faktor yang mempengaruhi proses dari ekstraksi antara lain sebagai berikut;

- a. **Ukuran Bahan.** Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperluas permukaan bahan sehingga mempercepat penetrasi pelarut ke dalam bahan yang akan diekstrak.
- b. **Suhu Ekstraksi.** Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi, namun dikhawatirkan menghilangkan senyawa aktif dari bahan uji.
- c. **Pelarut.** Larutan yang akan dipakai sebagai pelarut merupakan pelarut pilihan yang terbaik sesuai kepolarannya.

Dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa aktif hasil ekstraksi diantaranya : jenis

pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi (Senja *et al.*, 2012), kecepatan pengadukan, pengaruh volume dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi (Yuniwati *et al.*, 2012).

Metode-metode ekstraksi adalah maserasi, perkolasi, refluks, digesti dan sokletasi (Said, 2007). Maserasi dilakukan dengan perendaman dan beberapa kali pengadukan pada suhu ruang. Metode ini memiliki keuntungan yaitu, mudah dan tidak perlu pemanasan, sehingga kemungkinan bahan alam tidak menjadi rusak (Susanty dan Bachmid, 2016). Metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan keran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk simplisia dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area (Mukhriani, 2014).

Ekstraksi secara refluks merupakan disolusi fisik secara sederhana dengan pemanasan dan pendinginan secara kontinu selama jangka waktu tertentu atau ditentukan. Prosedurnya meliputi pencampuran secara selektif, pemanasan larutan sampel, kondensasi uap ke dalam campuran panas dan kedua proses pemanasan dan pendinginan berlangsung berulang (Jaya, 2017). Ekstraksi digesti yaitu ekstraksi dengan cara maserasi yang dikombinasikan dengan cara pemanasan. Namun metode ini tidak cocok dengan metabolit aktif yang tidak tahan panas (Afifah dan Tim Lentera, 2003). Metode sokletasi yaitu prinsipnya mengekstraksi dengan pemanasan untuk mengekstraksi lemak/minyak dalam sampel dengan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan pelarut konstan dan dinginkan dengan pendingin balik (Kusuma *et al.*, 2017).

Penentuan proses ekstraksi dan pemisahan senyawa aktif pada bahan uji melalui proses ekstraksi dapat dilihat melalui pelarutnya. Sifat polaritas kelarutan metabolit sekunder digolongkan menjadi polar, non polar dan semi polar (Saifudin, 2014). Pelarut polar merupakan pelarut yang mampu bercampur/larut dengan air. Contohnya air dan golongan dari alkohol (metanol dan etanol). Pelarut non polar merupakan pelarut yang bisa tercampur/tersolusi dengan lemak/minyak. Contohnya eter dan kloroform (Arisworo *et al.*, 2006). Terakhir pelarut semi polar merupakan pelarut yang mampu mengikat jenis kelarutan molekul polar serta non polar (Smith, 2015). Etil asetat merupakan jenis pelarut yang bersifat semi polar. Pelarut ini memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77°C (Susanti *et al.*, 2012).

2.5 Identifikasi Senyawa Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

2.5.1 Skrining Fitokimia

Menurut Nugroho (2017), fitokimia dapat didefinisikan senyawa kimia yang dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan atau sering diartikan metabolit sekunder. Sehingga, didefinisikan fitokimia merupakan senyawa kimia non-nutrisi yang diproduksi oleh tumbuh-tumbuhan yang berfungsi sebagai pertahanan diri didalam sel tumbuhan. Maka dari itu, perlunya dilakukan pengujian untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan uji. Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi bahan bioaktif yang masih belum diketahui dengan melakukan suatu pemeriksaan yang dapat dengan memisahkan antara bahan yang mengandung kandungan fitokimia dengan yang tidak memiliki kandungan fitokimia, sehingga memberikan informasi jenis senyawa yang terkandung dalam tanaman (Raaman, 2006).

Pengujian fitokimia bertujuan untuk menentukan ciri bahan aktif memiliki efek racun atau memiliki efek yang menguntungkan, yang ditunjukkan melalui skrining ekstrak bahan alami secara biologis maupun *bioessays*. Pengujian ini

sangat penting dikarenakan sangat membantu untuk mengatasi segala macam penyakit secara alamiah (Sinha *et al.*, 2010). Skrining fitokimia umumnya dilakukan dengan mengamati reaksi warna dengan menggunakan suatu bahan pereaksi warna. Maka dari itu, pemilihan pelarut dan metode yang digunakan untuk mengekstraksi sangat penting untuk menentukan hasil pengamatan (Kristanti *et al.*, 2008). Uji fitokimia dilakukan bukan hanya untuk menganalisis komponen kimia seperti karbohidrat, protein dan lemak, namun juga bahan bahan metabolit lainnya seperti glikosida, tannin, volatil, alkaloid, fenol dan lain sebagainya (Kokate *et al.*, 2008).

2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode kromatografi yang cukup umum, mudah dan sederhana dilakukan. Metode ini merupakan teknik pemisahan komponen menggunakan fase stasioner (fase diam) yang berupa plat dengan bahan iner arsorben yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran tidak volatil (Sherma dan Fried, 2003). KLT hampir mirip dengan metode kromatografi kertas. Perbedaannya pelat yang digunakan terbuat dari plastik maupun gelas, yang telah diberikan lapisan tipis zat penyerap seperti alumina maupun gel silika. Perbedaan lainnya, prosesnya lebih cepat dibandingkan kromatografi kertas (Mikrajuddin *et al.*, 2007).

Pemisahan dengan KLT ini dilakukan beberapa kali dengan menggunakan beberapa eluen dengan tingkat kepolaran berbeda-beda untuk mendapatkan pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik, serta tanda warna atau noda yang bagus. Penentuan golongan-golongan senyawa pengujian KLT dilakukan dengan penyemprotan plat kromatografi dengan pereaksi (Alen *et al.*, 2017). Prinsipnya ketika pelarut naik akibat reaksi kapiler pada arsorben, komponen-komponen sampel terbawa dengan tingkatan kecepatan yang

berbeda-beda dan dilihat dari deretan titik-titik noda pada pelat setelah dikeringkan dan diwarnai atau dilihat dengan cahaya ultraviolet (Sumawinata, 2004).

2.5.3 Kromatografi Kolom

Suatu senyawa yang dipisahkan melalui kromatografi kolom memiliki mekanisme yang serupa dengan jenis kromatografi lainnya, yaitu berkaitan dengan perbedaan antara gaya antar molekul dalam suatu sampel dengan fase gerak antar komponen dengan fase diam (Rubiyanto, 2017). Menurut Harbone (2006), kromatografi kolom adalah metode isolasi pemisahan dengan skala besar yang digabungkan dengan kumpulan fraksi otomatis dan menghasilkan senyawa yang murni dengan memiliki skala gram. Jumlah sampel yang digunakan kromatografi kolom berjumlah lebih banyak dengan menggunakan adsorben pada kolom gelas vertikal.

Prinsip kerjanya, zat cair yang sebagai fase gerak membawa fragmen senyawa mengalir menuju fase diam dan terjadi interaksi adsorpsi senyawa tersebut oleh padatan di dalam kolom. Tingkat kecepatan gerak komponen dalam fragmen tersebut tergantung dari besar atau lama komponen tersebut tertahan dari padatan penyerap pada kolom. Hasil yang didapat yaitu fraksi-fraksi senyawa atau eluat yang tertampung pada bagian bawah kolom (Rubiyanto, 2016). Kromatografi kolom digunakan untuk fraksinasi ekstrak halus maupun kasar. Pemisahan ekstrak halus melibatkan fase diam non polar seperti okta desil, silika ataupun polisakarida seperti sephadex. Sedangkan pemisahan ekstrak kasar fase diam umumnya terbuat dari serbuk silika yang dimasukan ke dalam kolom dalam bentuk larutan dalam pelarut organik atau serbuk kering (Saifudin, 2014).

2.5.4 Spektrofotometer Ultraviolet (UV-Vis)

Spektrofotometer ultraviolet merupakan salah satu instrumen yang digunakan untuk mengukur reflektansi, transmitansi dan absorpsi fungsi panjang gelombang. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer merupakan alat untuk mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi (Perkampus, 1992). Pengukuran menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada hubungan antara berkas radiasi elektromagnetik yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi dengan tebalnya cuplikan dan konsentrasi dari komponen penyerap (Henri *et al.*, 2002).

Prinsip pengukuran spektrofotometer UV-Vis didasarkan dari penyerapan cahaya ultra violet (180–350 nm) dan tampak (350-800 nm) oleh suatu senyawa uji. Penyerapan sinar ultraviolet (UV) dan tampak (visibel) oleh suatu senyawa dibatasi pada sejumlah gugus fungsi yang mengandung elektron valensi dengan tingkat eksitasi yang rendah dengan melibatkan 3 jenis elektron yaitu sigma, phi dan elektron yang tidak berikatan. Bagian molekul yang dapat menyerap sinar disebut sebagai gugus kromofor. Kromofor organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak antara lain yaitu karbonil, alken, azo, nitrat dan karboksil (Yanlinastuti *et al.*, 2012).

2.5.5 Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)

Menurut Sanagi (1998), spektrofotometer inframerah merupakan metode untuk menganalisa kandungan senyawa kimia melalui pancaran radiasi inframerah yang bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat di suatu bahan organik. Analisis menggunakan instrumen ini untuk membandingkan gugus fungsi bahan organik, pita absorbansi yang terbentuk di spektrum inframerah dengan menggunakan tabel kolerasi serta menggunakan spektrum senyawa pembanding yang telah diketahui (Anam *et al.*, 2007).

Posisi tanda dalam spektrum inframerah disajikan dengan jumlah panjang gelombang yang memiliki satuan cm^{-1} . Jenis ikatan yang dapat ditunjukkan pada daerah serapan yaitu: panjang gelombang 1300-800 cm^{-1} (C-C, C-O, C-N), : panjang gelombang 1900-1500 cm^{-1} (C=O, C=N, N=O), : panjang gelombang 2300-2000 cm^{-1} (C≡C, C≡N), dan : panjang gelombang 3000-2200 cm^{-1} (C-H, O-H, N-H) (Silverstain, 1998 dalam Mukhriani, 2014).

2.5.6 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Kromatografi gas spektrometer massa (GC-MS) merupakan salah satu metode yang memadukan antara kromatografi gas dan spektrometer massa untuk menganalisa senyawa secara kuantitatif dan kualitatif dan dapat mengidentifikasi senyawa-senyawa yang berbeda dalam suatu pengujian sampel senyawa organik secara struktur molekuler (Clement dan Taguchi, 1991). Kombinasi ini terdapat dua instrumen yaitu kromatografi gas yang memiliki fungsi sebagai menjadikan senyawa pengujian menjadi tunggal serta spektrometer massa dengan fungsi penditeksian senyawa berdasarkan pola fragmentasi (Stashenko dan Martinez, 2014).

GC-MS banyak digunakan dalam pemisahan, identifikasi dan kuantifikasi campuran kompleks, seperti contoh minyak esensial (Coutinho *et al.*, 2009).

Prinsip kerjanya sampel diinjeksi ke dalam kromatografi gas kemudian akan dirubah menjadi fase uap dan dialirkan dengan melewati kolom kapiler. Karena adanya perbedaan sifat kimia antar-molekul dalam sampel dipisahkan dari molekul dengan cara sampel melewati sepanjang kolom. Pemisahan senyawa kompleks menjadi tunggal terjadi akibat perbedaan sifat kimia dan waktu spesifik (waktu retensi) dari masing-masing senyawa. Kemudian spektrofotometer massa mendeteksi senyawa dengan mekanisme penembakan senyawa oleh elektron menjadi molekul terionisasi dan pencatatan pola fragmentasi yang terbentuk

dibandingkan dengan pola fragmentasi senyawa standard yang diindikasikan dengan presentase Similarity Index. (Xue *et al.*, 2015).

2.6 Sifat Antibakteri

Bakteri patogen merupakan agen yang menyebabkan penyakit pada inangnya apabila terjangkit, hingga menyebabkan manifestasi penyakit klinis (Darmadi, 2008). Pada bidang perikanan, beberapa jenis bakteri patogen yang cukup terkenal sering ditemukan menyerang hewan perairan yaitu *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp, dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri-bakteri tersebut merupakan agen infeksi yang cukup serius (Dwiyitno, 2010). Maka dari itu, perlunya bahan-bahan sebagai agen antibakteri.

Antibakteri merupakan suatu bahan atau agen yang bekerja mencegah atau mengganggu pertumbuhan dan proliferasi bakteri bahkan hingga mematikan. Bahan antibakteri yang efektif digunakan yaitu memiliki sifat bakterisidal (Ivanova dan Crawford, 2015). Bakterisidal merupakan suatu zat antibakteri yang memiliki mekanisme langsung membunuh bakteri yang menyebabkan bakteri tersebut tidak bisa berkembang/proliferasi lagi (Kee dan Hayes, 1996). Berbeda dengan bakteriostatik yang hanya menghambat pertumbuhan/perkembangan bakteri (Amin, 2014).

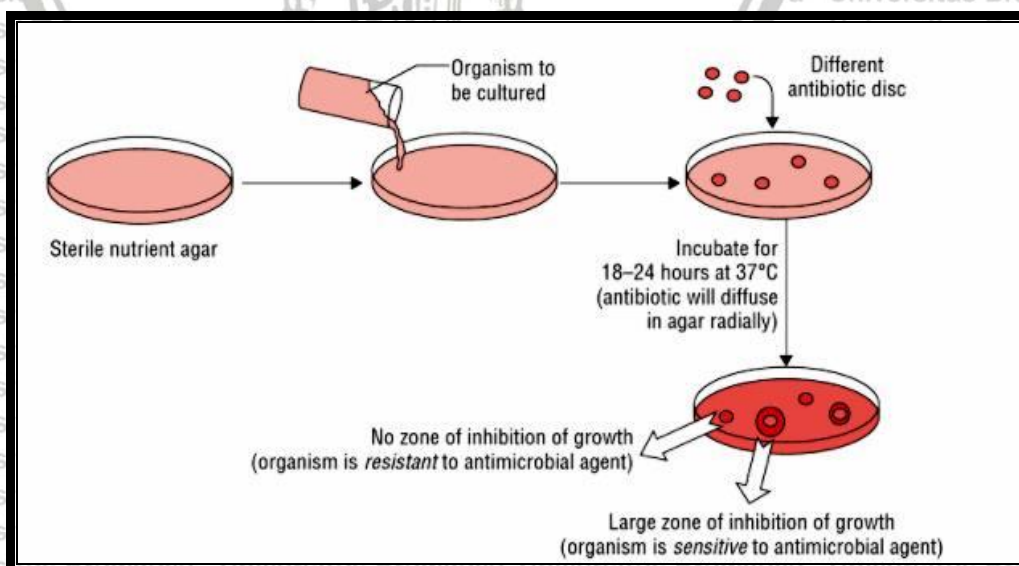
Menurut Kusmiyati dan Agustini (2007), faktor penghambatan pertumbuhan bakteri oleh agen antibakteri yaitu.

- Mampu merusak dinding sel bakteri.
- Mampu menghambat sistem permeabilitas membran sitoplasma, sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel.
- Menghambat sistem kerja enzim bakteri.

2.7 Uji Cakram

Disc diffusion test atau disebut uji cakram adalah suatu pengujian yang umum digunakan di laboratorium untuk mengetahui kerentanan suatu isolat bakteri terhadap bahan aktif, baik bahan alami maupun antibiotik tertentu dengan biakan bakteri diinokulasikan ke pelat agar dan memberikan suatu bahan aktif terdifusi ke media agar (Engleberg *et al.*, 2012).

Pengujiannya, biakan terlebih dahulu organisme uji tertentu di media agar, kemudian kertas cakram diberi antimikroba sesuai dengan dosis yang ditentukan. Tingginya suatu konsentrasi antimikroba ditentukan difusi dari kertas cakram dan pertumbuhan dari organisme uji yang dihambat sebarannya luasnya difusi antimikroba atau bisa disebut zona bening cakram (Soleha, 2015). Setelah diberikan suatu antimikroba pada media agar, pelat agar diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 18-24 jam pada inkubator. Setelah berdifusi, laju difusi antimikroba melalui media agar tergantung dari sifat difusi dan kelarutan bahan aktif dan berat molekul senyawa antimikroba. Jika diameter cakram meluas pada pada pengamatan, maka zat tersebut mampu menghambat pertumbuhan organisme uji (Parija, 2012). Proses uji cakram dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Proses Uji Cakram (Parija, 2012).

2.8 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Dalam ilmu mikrobiologi, *Minimum Inhibitory Concentration* adalah konsentrasi terendah dari suatu zat antimikroba yang mencegah pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme lainnya serta untuk mengetahui mikroba tersebut resisten terhadap antimikroba (Wu, 2008). Dengan pengujian MIC, bisa mengetahui antimikroba uji terhadap mikroba bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal. Bakteriostatik merupakan menghambat atau mematikan pertumbuhan bakteri sehingga jumlah bakteri tersebut stasioner, tidak bisa melakukan berkembang biak namun tidak dimatikan (Rahardjo, 2008).

Sedangkan bakteriosidal ialah antimikroba yang mampu membunuh secara langsung bakteri (Muller, 2016).

Tes MIC memberikan keuntungan untuk penelitiannya seperti mudah dan metode sangat sederhana, sedikit menggunakan isolat dan antimikroba, tepat guna dan sebagai petunjuk dosis untuk penggunaan antimikroba (Parija, 2009).

2.9 Histopatologi

2.9.1 Pengertian Histopatologi

Histopatologi berasal dari ilmu histologi dan patologi. Histologi merupakan ilmu mempelajari bagian dari struktur jaringan secara mikroskopis (Harjana, 2011). Sedangkan patologi pada dasarnya mempelajari abnormalitas fungsi dan struktur yang diakibatkan oleh suatu penyakit yang menyerang organ dan sistem organ suatu makhluk hidup (Rubin dan Strayer, 2008). Histopatologi mempelajari suatu penyakit pada suatu jaringan tertentu untuk menganalisis penyakit yang terjadi pada tubuh (Orchard dan Nation, 2012).

Analisa histopatologi digunakan sebagai biomarker mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi di dalam organ yang menjadi target bahan pencemar. Selain itu, biomarker histopatologi dapat digunakan memonitoring lingkungan yaitu dengan mengamati organ-organ

tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai mendiagnosa awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme (Setyowati *et al.*, 2010).

2.9.2 Pengujian Histopatologi Hati

Pengujian histopatologi pada ikan bertujuan untuk mengetahui adanya perubahan-perubahan terjadi pada jaringan ikan akibat serangan penyakit. Untuk mendiagnosa suatu penyakit, hal yang perlu dilakukan pengamatan pada ikan yaitu tingkah laku ikan dan perubahan-perubahan patologi jaringan maupun organ ikan (Asniatih *et al.*, 2013). Organ maupun jaringan yang umumnya dilakukan pemeriksaan histopatologi meliputi kulit, tulang, kelenjar limfa, jantung, lambung, hati, usus, insang serta organ lainnya yang bisa diamati melalui perubahan-perubahan secara makropatologi (Harmita dan Radji, 2008), ataupun secara mikroanatomi yang mengamati kerusakan tingkat jaringan (Rahmawati *et al.*, 2016).

Pada pengujian histopatologi hati langkah-langkah yang dilakukan, sebelum ikan dibedah dimasukan ke tabung dan diisi dengan kloroform sebagai proses pembiusan (Sipahuntar *et al.*, 2013). Organ hati diambil dengan membelah bagian anus keatas hingga operkulum dengan menggunakan *sectio set*, jika sudah terlihat organnya digunting dan ditarik secara perlahan dengan pinset hingga keluar dari tubuh ikan (Maftuch *et al.*, 2016). Setelah didapatkan organ hati, kemudian dibersihkan dari kotoran maupun darah (*trimming*). Hati difiksasi dengan larutan davidson 10% dengan waktu 48 jam. Kemudian didehidrasi selama satu jam dengan aseton dan di-*clearing* satu jam dengan xilol. Terakhir diinfiltrasi 30 menit dengan parafin dan di-*embedding* dengan parafin dengan suhu kamar hingga terbentuk blok (Aliza, 2014). Kemudian dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μ dan diletakan pada objek

glass. Kemudian dilakukan deparafinasi untuk menghilangkan parafin dengan xilol. Setelah itu diwarnai dengan Haematoksilin Eosin (HE). Terakhir diberi perekat (*mounting*), ditutup dengan objek glass dan siap diamati pada mikroskop (Priosoeryanto *et al.*, 2010).

2.10 Hati dan Fungsinya

Hati merupakan kelenjar pencernaan yang dimiliki oleh ikan. Hati ikan umumnya terletak di depan lambung dari bawah kerongkongan memanjang hingga usus bagian depan (Rahardjo *et al.*, 2011). Hati berwarna merah kecoklatan yang tersusun dari sel-sel hepatosit. Di sekitar hati terdapat kantung kecil berbentuk bulat/oval yang berwarna hijau kebiruan yang disebut kantung empedu (Fujaya, 2008). Hati merupakan organ terpenting di dalam tubuh karena berperan dalam proses metabolisme tubuh serta penetralan zat-zat beracun didalam tubuh untuk dibuang ke luar tubuh dalam sistem ekskresi (Furqonita, 2006).

Hati sangat berperan penting dalam tubuh terutama pada sistem endokrin. Hati berfungsi menstabilkan tugas hormon dalam tubuh, aktivitas xenobiotik (Hester dan Harrison, 1999), mengontrol aktivitas anabolisme (karbohidrat, protein dan lemak) dan katabolisme (siklus nitrogen dan detoksifikasi), berperan dalam reproduksi (proses vitelogenesis), membantu dalam proses pembentukan darah serta imunitas dalam tubuh ikan dan fungsi utamanya adalah membunuh bibit penyakit (parasit, virus dan mikroorganisme) dan menetralkan zat beracun dalam tubuh ikan karena habitatnya sangat rentan pencemaran di dalam badan air (Munshi dan Dutta, 1996).

2.11 Histopatologi Hati

Terganggunya fungsi hati menyebabkan terganggunya sistem organ lainnya karena ada peran aktif hati terhadap sistem organ didalam tubuh

(Furqonita, 2006). Kerusakan hati akibat patogenitas umumnya ditemukan degenerasi lemak, nekrosis, kongesti dan hemoragi (Triadayani *et al.*, 2010). Degenerasi lemak pada hati merupakan abnormalitas fungsi hati akibat sel atau organ dan terjadinya penimbunan lemak atau terjadinya penimbunan lemak didalam sel hepatosit (Farrell *et al.*, 2005). Nekrosis secara patologi merupakan kematian sel karena adanya kerusakan dari sistem membran diakibatkan adanya faktor luar yang mengakibatkan rusaknya membran pembungkus lisozim pada sel (Sudiana, 2008). Kongesti merupakan terganggunya sistem resirkulasi darah yang umumnya terjadi pada pembuluh vena, dimana keadaan darah berakumulasi atau tertimbun didalam vena hati sehingga terjadinya pelebaran (Sudiono *et al.*, 2001). Sedangkan hemoragi merupakan pendarahan akibat pecahnya pembuluh darah akibat suatu peradangan tertentu. Hemoragi berkaitan dengan kongesti dikarenakan terganggunya sistem peredaran darah di dalam tubuh (Cloherty *et al.*, 2008).

Penyakit lainnya yang terjadi pada hati yaitu hiperflasia dan hipertrofi. Hiperplasia adalah keadaan dimana meningkatnya jumlah sel akibat kerusakan yang mengubah ukuran suatu organ (Redaksi Trubus, 2010). Sedangkan hipertrofi adalah peningkatan organ akibat pembesaran komponen-komponen pada sel yang sakit (Woo, 2006). Penyakit-penyakit yang dijelaskan diatas apabila terjadi pada organ hati akan menyebabkan terganggunya fungsi organ di dalam tubuh ikan, bahkan jika terjadi secara akut akan terjadi kematian.

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Hingga sekarang ini, ikan mas bisa dikatakan ikan air tawar paling populer diantara ikan air tawar lainnya. Sebagai bahan konsumsi ekonomis, ikan ini juga banyak dimanfaatkan sebagai ikan tempat-tempat pemancingan yang diperuntukkan untuk pemancing. Berdasarkan pernyataan ini, maka budidaya ikan mas sangat memberi keuntungan yang cukup menjanjikan (Supriatna, 2013). Tingginya permintaan, sehingga ikan mas banyak dibudidayakan secara intensif. Seiring waktu budidaya intensif memberikan permasalahan dalam budidaya, salah satunya serangan penyakit akibat bakteri *Aeromonas hydrophila* (Haditomo *et al.*, 2014).

Bakteri *A. hydrophila* menyebabkan penyakit MAS (*Motil Aeromonas Septicemia*) atau biasanya sering disebut penyakit bercak-bercak merah, yang mampu mematikan ikan dalam rentang waktu 1-2 minggu (Cipriano, 2001). Serangan bakteri *A. hydrophila* menyebabkan ikan menurunnya imunitas dan kesehatan ikan budidaya, mengalami kerusakan fisik seperti terjadinya pembengkakan dan pendarahan-pendarahan pada tubuh ikan dan menyebabkan menurunnya kuantitas dan kualitas hasil budidaya ikan mas (Arifanto *et al.*, 2014).

Menurut Sumino *et al.* (2013), penanggulangan *A. hydrophila* masih banyak menggunakan antibiotik. Walaupun hasilnya efektif namun bisa memberikan masalah baru seperti rusaknya lingkungan budidaya bahkan menyebabkan bertambahnya bakteri baru yang resisten terhadap antibiotik. Maka dari itu, perlunya bahan yang ramah lingkungan yang baik digunakan jangka panjang yaitu dengan bahan alami dari tumbuh-tumbuhan (fitofarmaka) (Wahjuningrum *et al.*, 2013).

Fitofarmaka alternatif sebagai pengobatan bakteri *A. hydrophila* menggunakan daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Hasil dari beberapa riset menyatakan kersen mengandung senyawa aktif alami seperti fenol, flavonoid, saponin, tanin dan lain-lain (Ragasa et al., 2015). Bahan-bahan aktif ini akan mampu mengurangi dan mematikan bakteri *Aeromonas hydrophila* serta menurunkan jumlah bakteri yang menginfeksi tubuh ikan mas, sehingga dapat memulihkan tubuh ikan dari serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* dan meningkatkan kelulushidupan.

3.2 Hipotesis

- Terdapat senyawa aktif daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang memiliki sifat antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* jika dilihat melalui fraksi terbaiknya.
- Pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) memiliki pengaruh terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat menurunkan kerusakan histopatologi hati ikan.

3.3 Strategi Publikasi

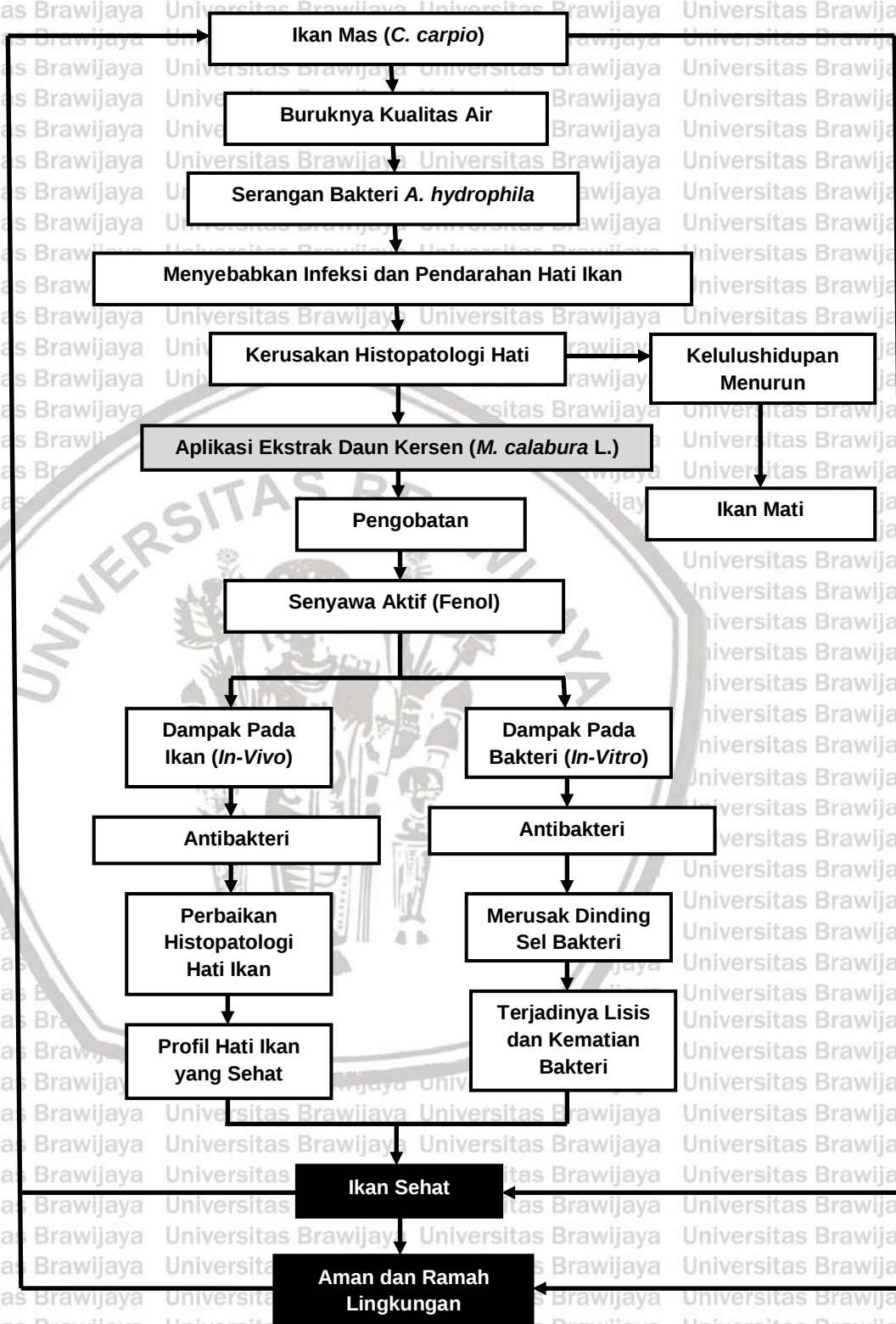
Hasil dari penelitian ini, memiliki strategi publikasi yang dapat dilihat pada

Tabel 1.

Tabel 1. Strategi Publikasi Jurnal Riset

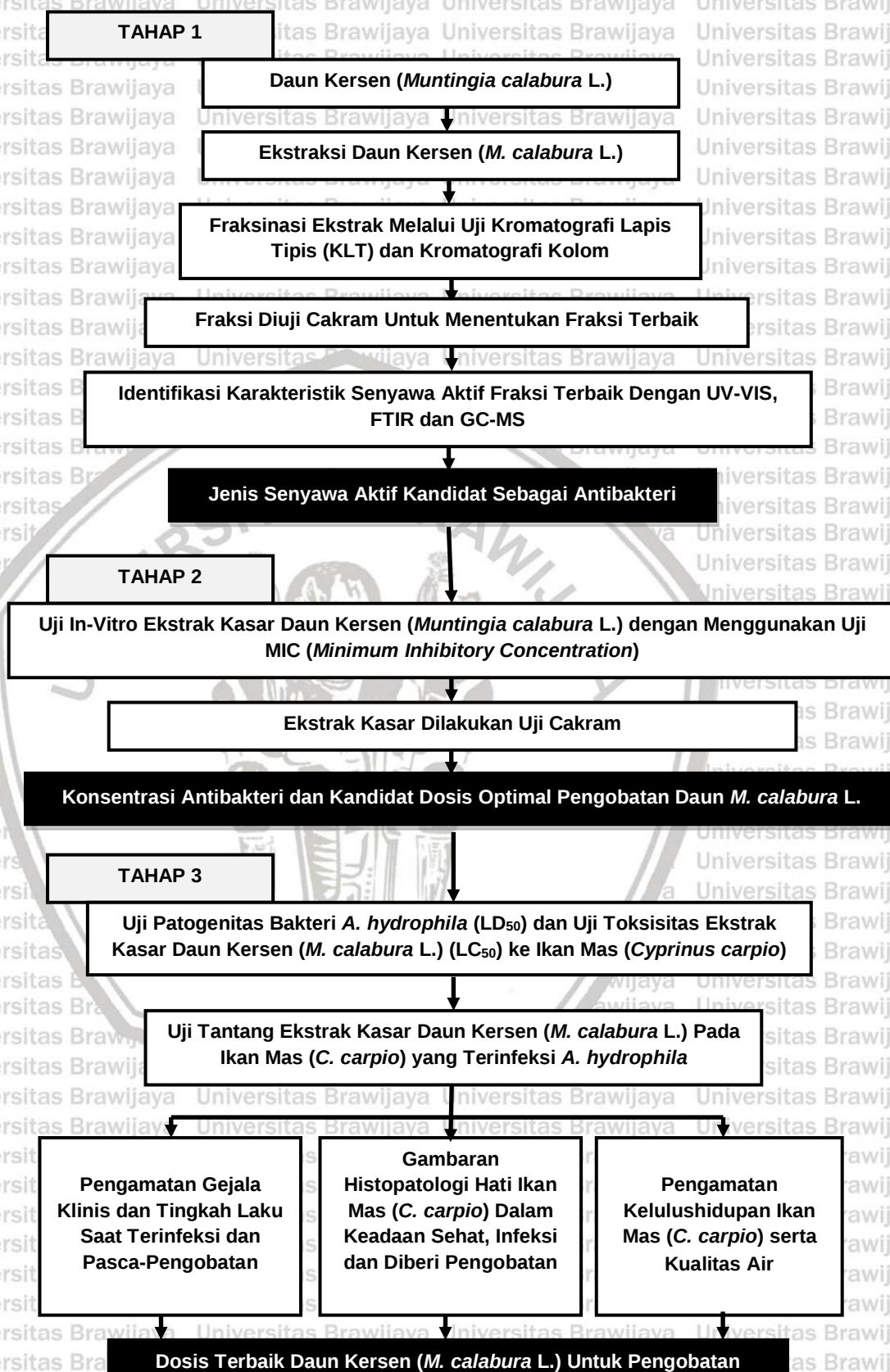
Judul	ANALYSIS OF THE SECONDARY METABOLITE OF KERSEN LEAF EXTRACTS (<i>Muntingia calabura</i> L.) AND ITS POTENTIAL AS ANTI-BACTERIA TO INHIBIT <i>Aeromonas hydrophila</i>
Jurnal	RESEARCH JOURNAL OF LIFE SCIENCE (RJLS) (Jurnal Internasional Rekomendasi Rektor UB SK Rektor No. 69/PER/2016).

3.4 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 5. Kerangka Konseptual Penelitian

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 6. Kerangka Operasional Penelitian

3.6 Langkah Kerja Penelitian

Dari kerangka operasional penelitian pada Gambar 7 di atas, penelitian ini menggunakan tiga tahapan penelitian yang dijelaskan sebagai berikut.

1. Tahap Pertama. Ekstraksi, fraksinasi dan karakterisasi fraksi terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) yang bersifat antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila*.

- Ekstraksi daun kersen (*M. calabura* L.) dengan maserasi 3 pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan kloroform dengan perbandingan 1:7.
- Dihitung rendemen ekstrak kasar dari 3 pelarut tersebut.
- Uji fitokimia ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) dengan pengamatan senyawa aktif flavonoid, saponin, tannin, alkaloid dan triterpenoid.
- Penentuan eluen dengan Kromatografi Lapis Tipis (Metanol:Etil Asetat :Kloroform 1:2:9; Metanol:Etil Asetat 5:1; N-heksan:Etil Asetat 9,5:0,5 dan Metanol:Etil Asetat 1:8)
- Fraksinasi ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) dengan Kromatografi Kolom menggunakan eluen yang didapatkan hasil Kromatografi Lapis Tipis yaitu menggunakan eluen Metanol : Etil Asetat 1:8.
- Pengujian fraksi hasil kromatografi kolom dengan uji cakram dan didapatkan fraksi terbaik.
- Dikarakterisasi fraksi terbaik dengan UV-Vis, FT-IR dan GC-MS.

2. Tahap Kedua. Analisis anti-bakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* yang diberi ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) (Pengujian *In-vitro*).

- Uji ekstrak kasar dari daun kersen (*M. calabura* L.) terhadap daya hambat senyawa aktif yang bersifat antibakteri dengan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) untuk menentukan dosis awal penelitian.
- Uji cakram ekstrak kasar dari daun kersen (*M. calabura* L.) dengan konsentrasi 125 ppm, 150 ppm dan 175 ppm..

3. Tahap Ketiga. Analisis pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) pada ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi *A. hydrophila* secara terkontrol (laboratorium) (Pengujian *In-vivo*).

- Uji patogenitas *A. hydrophila* terhadap ikan mas (*C. carpio*) dengan kepadatan berbeda 10^9 sel/ ml, 10^8 sel/ ml, 10^7 sel/ ml dan 10^6 sel/ml selama 96 jam untuk menentukan nilai LD_{50} (*Lethal Dossage* 50%).
- Uji toksisitas ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) terhadap ikan mas (*C. carpio*) dengan konsentrasi 0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm selama 96 jam dan dinyatakan sebagai nilai LC_{50} (*Lethal Concentration* 50%).
- Ikan mas (*C. carpio*) diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis kepadatan 10^7 selama 48 jam.
- Setelah terjangkit, diberi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dengan konsentrasi yang telah ditentukan dari uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yaitu 125 ppm, 150 ppm dan 175 ppm.
- Setelah pengobatan, ikan dipelihara selama 10 hari.
- Selama 10 hari, ikan diamati gejala klinis, kelulushidupan dan kualitas air (pH, suhu dan DO).
- Dianalisis histopatologinya setelah 10 hari penelitian.
- Didapatkan dosis terbaik ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) untuk pengobatan.

3.7 Kebaruan Penelitian

Berikut ini daftar dari penelitian yang menggunakan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terdahulu dapat disajikan pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Penelitian Terdahulu Pengujian Daun Kersen (*M. calabura* L.).

No.	Peneliti	Tahun	Judul	Jurnal
1	Arum, Y., Supartono dan Sudarmin	2012	Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i>)	Jurnal MIPA

2	Sindhe, A., Y. Bodke and Chandrashekar	2013	Antioxidant and In Vivo Anti-Hyperglycemic Activity of <i>Muntingia calabura</i> Leaves Extrats	Journal of Der Pharmacia Lettre
3	Krishnaveni, M. and R. Dhanalakshmi	2014	Qualitative and Quantitative Study of Phytochemicals in <i>Muntingia calabura</i> L. Leaf and Fruit	World Journal of Pharmaceutical Research
4	Buhian, W., R. Rubio, D. Valle Jr. and J. Martin-Puzon	2016	Bioactive Metabolite Profiles and Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts from <i>Muntingia calabura</i> L. Leaves and Stems	Journal of Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine
5	Handayani, F. dan T. Sentat	2016	Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Pada Kulit Mencit Putih Jantan (<i>Mus musculus</i>)	Jurnal Ilmiah Ibnu Sina
6	Singh, R., Iye S., Prasad S., Deshmukh N., Gupta U., Zanje A., Patil S. and Joshi S.	2017	Phytochemical Analysis of <i>Muntingia calabura</i> Extracts Possessing Anti-Microbial and Anti-Fouling Activities	International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research
7	Fitriyanti, T. Rudiana, A. Iafah, F. Afandi, H. Nurbaiti, I. Dewanti, L. Sururoh, T. Tiara dan Widyaningsih	2017	Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak n-Heksana Tanaman Kersen (<i>Muntingia calabura</i>)	Jurnal ITEKIMA

Pemaparan hasil penelitian terdahulu daun kersen (*M. calabura* L.) sudah dilakukan penelitian antibakteri secara *in-vitro* terhadap beberapa bakteri seperti *E. coli*, *P. aeruginosa* dan lain sebagainya, namun masih sedikit dilakukan penelitian terhadap *A. hydrophila*. Selain itu, pengujian secara *in-vivo* juga masih dilakukan pengujian pada mencit putih (*M. musculus*), belum ada dilakukan pada ikan mas (*C. carpio*). Sehingga, perlunya dikaji lebih mendalam menggunakan daun kersen (*M. calabura* L.) sebagai antibakteri secara *in-vitro* terhadap *A. hydrophila* dan pengobatan pada ikan mas (*C. carpio*) secara *in-vivo*, karena merupakan penelitian yang tergolong baru dilakukan dibidang perikanan.

4. METODE PENELITIAN

4.1 Materi Penelitian

4.1.1 Alat Penelitian

- Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.), yaitu: toples kaca, erlenmeyer bertutup 2000 ml, beaker glass 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 500 ml dan 1000 ml, timbangan digital, magnetik stirer, botol vial, corong, botol kaca dan *rotary vacuum evaporator*.
- Alat-alat yang digunakan untuk fraksinasi dan identifikasi senyawa antibakteri ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah gelas ukur 100 ml, timbangan digital, pipet kapiler, nampan, botol kaca, spatula, erlenmeyer 250 ml, tabung kolom, UV-Vis, FT-IR, dan GC-MS.
- Alat yang diperlukan untuk mengkultur dan pengujian daya hambat bakteri *A. hydrophila* adalah: tabung eppendorf, timbangan digital, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml, nampan, cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, bunsen, *autoclave*, mikro pipet, penggaris, spatula, inkubator dan mikroskop.
- Untuk peralatan yang digunakan untuk pengobatan dan pengambilan organ hati ikan mas (*C. carpio*) adalah: akuarium 30x30x30, aerator, selang aerasi, batu aerasi, alat bedah, seser dan nampan.
- Sedangkan peralatan untuk mengamati kualitas air digunakan pH meter, termometer dan DO meter.

4.1.2 Bahan Penelitian

- Daun kersen didapatkan dari daerah Kerobokan, Badung, Bali dengan nama latin (*Muntingia calabura* L.) dengan pemilihan daun yang masih muda dengan karakteristik berwarna hijau segar dengan ukuran daun 5-10 cm.

Daun sudah dilakukan pengujian klasifikasi di Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang (Lampiran 1).

- Ikan mas (*Cyprinus carpio*) dari petani ikan di daerah kota Batu, Malang, Jawa Timur dipilih ikan yang bebas penyakit dengan ukuran ikan 7-9 cm.
- *Aeromonas hydrophila* yang berasal dari Microbiologics, New Meksiko, Amerika Serikat (Lampiran 2).
- Pelarut etanol 96%, kloroform dan etil asetat (*Pro Analysis*).
- Reagen Dragendroff, Pereaksi Mayer, Pereaksi Bouchardat, HCl dan H₂SO₄.
- Serat fiber (*glass wool*), alumunium foil, kertas saring, pasir halus, kertas KLT, silika gel GF₂₅₄ (plat KLT) dan silika gel G₆₀ (Kromatografi Kolom).
- Bahan-bahan untuk mengkultur *A. hydrophila* adalah media media *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Tryptic Soy Agar* (TSA), sarung tangan, aquades, alkohol 70% dan aquades.
- Bahan-bahan yang digunakan untuk pengujian antibakteri adalah fraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.), *Aeromonas hydrophila*, *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Tryptic Soy Agar* (TSA), kertas cakram diameter 6 mm, aquades, sarung tangan, masker, dan alkohol 70%.
- Sedangkan bahan-bahan untuk pengujian histopatologi adalah Ikan mas (*C. carpio*), air, ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.), *Aeromonas hydrophila*, pakan ikan pelet PF-500, klorin, air sebagai media hidup ikan, sarung tangan, masker, botol film, dan formalin 10 %.

4.2 Pendekatan Penelitian

Sebelum penelitian, dilakukan perencanaan penelitian yang mengacu pada penentuan subyek, tempat penelitian serta pengumpulan-pengumpulan data untuk menentukan jawaban terhadap pertanyaan-pertanyaan yang mendasari

suatu penelitian, dengan kata lain memiliki tujuan untuk mendapatkan hasil yang kredibel, akurat dan keabsahan dari data (Hamdi, 2014). Maka dari itu perlunya menetapkan jenis variabel-variabel dan desain penelitian yang bisa diuji cobakan melalui penelitian pendahuluan (Darmono dan Hasan, 2002).

Metode pendekatan penelitian dilakukan atas hasil dari penelitian pendahuluan (PP) yang dilakukan sebelumnya. Hal ini dilakukan untuk mendapat informasi awal dan landasan atau dasar teori yang dapat menjelaskan suatu hasil penelitian (Adam, 2013). Untuk penelitian selanjutnya, peneliti dapat menentukan dosis yang tepat untuk pengobatan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan mas (*C. carpio*) dengan kepadatan bakteri yang sesuai.

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan eksperimental atau *experimental research* yang merupakan penelitian yang dilakukan untuk menguji secara langsung hubungan variabel satu dengan variabel lain dan menguji suatu dugaan hubungan sebab-akibat (Sukmadinata, 2005). Eksperimental merupakan metode ilmiah yang menyatukan semua kajian bidang ilmu pengetahuan dengan menetapkan suatu hipotesis (dugaan) dan melakukan suatu pengujian untuk menjawab hipotesis yang sudah ditetapkan (Taufiq, 2006).

Peneliti menggunakan metode eksperimen bisa memungkinkan melakukan suatu manipulasi variabel. Maksud dari manipulasi yaitu dapat mengubah sifat-sifat atau nilai dari variabel bebas secara sistematis dan terstruktur yang kuat dari landasan teori yang dilakukan peneliti (Nursalam, 2008). Metode ini dilakukan dengan mengikuti prosedur tertentu dengan tujuan untuk memahami pengaruh suatu kondisi yang sengaja dirancang terhadap kejadian gejala tertentu. Hasil percobaan variabel-variabel eksperimental ini dibandingkan dengan variabel-variabel kontrol perlakuan. Jika perbedaannya nyata hingga

sangat nyata maka dinyatakan variabel tersebut benar menunjukkan pengaruh (Kadji, 2016).

4.4 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan rancangan acak lengkap. Rancangan acak lengkap (RAL) adalah rancangan yang paling sederhana dibandingkan dengan rancangan percobaan lainnya. RAL memberikan keuntungan untuk dilakukan dalam sebuah penelitian karena denah rancangan percobaan lebih mudah, fleksibel dalam jumlah penggunaan, perlakuan dan ulangan penelitian (Pratisto, 2004).

Rancangan acak lengkap digunakan karena memiliki bahan, media dan lingkungan percobaan yang seragam (homogen). Dikarenakan seragam, maka media, bahan dan tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon pada objek yang diamati (Sastrosupadi, 2000). Rancangan acak lengkap digunakan pada penelitian ini karena menggunakan perbedaan kisaran dosis yang dibandingkan dengan kontrol, baik kontrol negatif maupun kontrol positif yang diulang sebanyak tiga kali (Prakosa, 2015). Adapun model dari RAL menurut Hanafiah (2013), adalah sebagai berikut.

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

Keterangan:

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

μ = nilai rerata umum (mean)

T_i = pengaruh faktor perlakuan ke-i

ε_{ij} = pengaruh galat percobaan

Penelitian ini menggunakan 2 kontrol pembanding, yaitu kontrol normal dan infeksi. Kontrol normal yaitu perlakuan sampel tanpa penginfeksi *A. hydrophilla* serta tanpa perendaman ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dan

kontrol infeksi sebagai perlakuan sampel dengan penginfeksian *A. hydrophilla* tanpa pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 15 sampel dengan 3 kali pengulangan. Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Perlakuan A : Perlakuan dengan perendaman ekstrak kasar 125 ppm

Perlakuan B : Perlakuan dengan perendaman ekstrak kasar 150 ppm

Perlakuan C : Perlakuan dengan perendaman ekstrak kasar 175 ppm

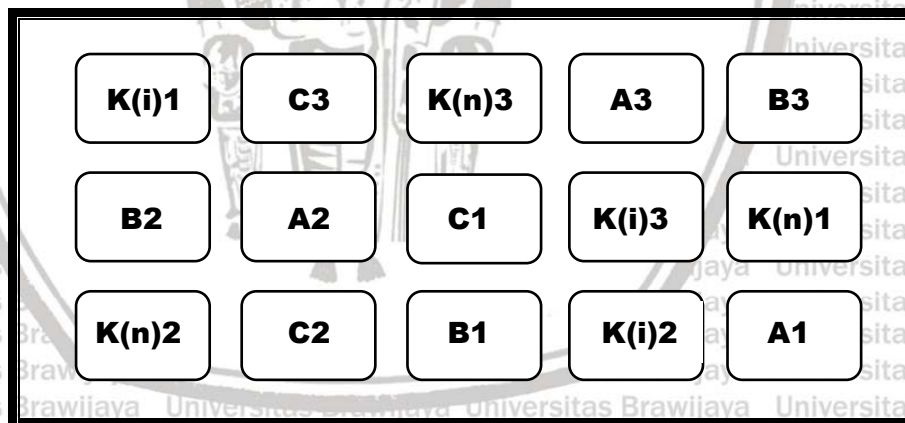
Perlakuan K (n) : Perlakuan sampel tanpa penginfeksian bakteri *A.*

hydrophilla serta tanpa perendaman ekstrak kasar

Perlakuan K (i) : Perlakuan sampel dengan penginfeksian bakteri *A.*

hydrophilla namun tanpa perendaman ekstrak kasar

Adapun denah penelitian dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Denah Penelitian

Keterangan:

A-B-C = Perlakuan Penelitian

K(i) = Kontrol Negatif

K(n) = Kontrol Positif

1-2-3 = Ulangan Perlakuan

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Penelitian Tahap 1 (Ekstraksi, Fraksinasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.))

4.5.1.1 Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Sebelum dilakukan ekstraksi, daun kersen (*M. calabura* L.) diambil dari tegalan daerah Kerobokan, Badung, Bali. Hal ini dimaksudkan agar daun yang diambil terhindar dari radikal bebas dikarenakan lokasi cukup jauh dari jalan raya, didukung dengan pernyataan Sanra *et al.*, (2015), tanaman di pinggir jalan lebih tinggi akan pencemaran radikal bebas oleh asap kendaraan dan lain sebagainya karena senyawa sisa pembakaran bahan bakar kendaraan bermotor akan membentuk partikulat kemudian diserap oleh tumbuh-tumbuhan dan terakumulasi terutama pada daun. Sehingga mutu daun untuk pengobatan ini akan terjaga kualitasnya.

Daun yang digunakan adalah daun yang masih muda. Daun muda berwarna hijau cerah dan memiliki kandungan bahan aktif yang lebih tinggi dibandingkan daun yang sudah tua (Pertama dan Asben, 2017). Penelitian ini menggunakan metode daun dikering-anginkan karena dari beberapa penelitian menunjukkan daun kering angin adalah yang terbaik karena menjaga metabolit sekunder masih di dalam daun, hal ini sesuai dengan pernyataan Marlinda *et al.*, (2012), mengemukakan daun kering angin lebih banyak terdapat senyawa-senyawa metabolit sekunder dibandingkan daun segar baru dipetik yang masih banyak kandungan air di dalamnya.

Daun dikeringkan hingga diperoleh kadar air tidak lebih dari 10% (Zulharmita *et al.*, 2012). Setelah daun kering, kemudian potong kecil-kecil dan terakhir di hancurkan dengan mesin giling atau blender sehingga didapatkan simplisia tepung daun kersen. Penggunaan simplisia tepung dimaksudkan untuk memperkecil ukuran daun dan memperluas permukaan simplisia supaya lebih

mudah dilakukan ekstraksi tanpa menyebabkan kehilangan atau kerusakan senyawa-senyawa aktif didalam daun tersebut (Rivai *et al.*, 2014).

4.5.1.2 Ekstraksi Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Maserasi merupakan metode yang dipakai untuk melakukan ekstraksi daun kersen (*M. calabura* L.). Maserasi merupakan metode yang paling umum dan sederhana, yakni merendam bahan dengan pelarut. Proses maserasi bahan dibutuhkan waktu tertentu dengan pengadukan sesekali (Afifah dan Tim Lentera, 2003). Pelarut ekstrak daun yang digunakan adalah etanol, etil asetat dan kloroform. Penggunaan ketiga pelarut tersebut untuk menguji kandungan fitokimia di dalam kersen (*M. calabura* L.) dengan pelarut etanol sebagai polar (Aziz *et al.*, 2009), etil asetat sebagai semi polar (Romadanu *et al.*, 2014) dan kloroform sebagai non-polar (Saifudin, 2014). Perbandingan yang digunakan adalah 1 : 7 dimana sebanyak 100 gr daun kersen (*M. calabura* L.) direndam dengan 700 ml pelarut pada toples kaca atau erlenmeyer bertutup dengan kapasitas 2000 ml. Setelah itu didiamkan selama 48 jam dan diaduk sesekali untuk melarutkan pelarut dengan bahan. Kemudian maserat dipisahkan dari ampas dan disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan ditampung pada botol. Setelah itu, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* bermerek IKA dengan suhu 45 °C dengan kecepatan putaran 80 rpm hingga didapatkan ekstrak kasar yang kental.

4.5.1.3 Skrining Fitokimia

Dari hasil ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol, etil asetat dan kloroform, kemudian dilakukan uji fitokimia ekstrak. Pengujian fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang ada pada daun kersen (*M. calabura* L.) (Sibi *et al.*, 2012). Adapun langkah kerjanya adalah sebagai berikut.

a. Flavonoid

- 2 ml ekstrak pekat dimasukkan dalam tabung reaksi.
- Dimasukkan 8 ml aquades yang sudah dipanaskan selama ± 10 menit.
- Ditambahkan HCL pekat beberapa tetes kemudian dihomogenkan.
- Dimasukkan sedikit Mg dan dihomogenkan.
- warna merah tua/merah bata menegaskan ekstrak uji positif mengandung flavonoid.

b. Saponin

- 2 ml ekstrak pekat diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- Aquades 2 ml aquades yang sudah dipanaskan dimasukkan.
- Tabung uji dikocok kuat.
- Adanya pembentukan buih terus-menerus selama ± 10 menit tersebut menegaskan adanya senyawa aktif saponin.

c. Tannin

- 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 8 ml air suling panas ke dalam tabung reaksi selama ± 10 menit kemudian filtrat disaring.
- Ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%.
- Terbentuknya warna hijau-kecoklatan atau biru-kehitaman menegaskan adanya tannin didalam sampel uji.

d. Alkaloid

- Disiapkan 2 tabung reaksi untuk uji alkaloid pereaksi reagen Mayer dan pereaksi Dragendrof.
- 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 8 ml air suling panas ke dalam tabung reaksi selama ± 10 menit kemudian filtrat disaring.
- Tabung pertama ditetesi dengan pereaksi reagen Mayer sebanyak 6 tetes.

- Tabung kedua ditetesi dengan pereaksi reagen Dragendrof sebanyak 6 tetes.
- Dihomogenkan.
- Jika terdapat endapan putih pada reagen Mayer dan endapan merah jingga pada reagen Dragendrof ekstrak tersebut positif mengandung alkaloid.

e. Triterpenoid

- 2 ml ekstrak ditambahkan dengan 8 ml air suling panas ke dalam tabung reaksi selama ± 10 menit kemudian filtrat disaring.
- Ditambahkan 3 tetes reagen Bouchadat dan 0,25 ml asam asetat anhidrat.
- Ditambahkan 1 ml H_2SO_4 pekat.
- Terbentuknya lapisan warna jingga kecoklatan atau coklat kemerahan mengindikasikan adanya triterpenoid.

4.5.1.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan beberapa kali menggunakan beberapa eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk mendapatkan pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik serta bercak noda warna yang bagus (Alen *et al.*, 2017). Pelarut yang akan digunakan pada penelitian ini berturut-turut adalah metanol:etil asetat (5:1), metanol:etil asetat (1:8), kloroform:etil asetat (2:6), N-heksan:etil asetat (9,5:0,5) dan metanol: etil asetat:kloroform (1:2:9). Langkah kerjanya adalah sebagai berikut.

- Disiapkan plat KLT (silika gel GF₂₅₄) ukuran 1 x 10 cm sebagai fase diam.
- Ekstak dilarutkan dengan pelarut etanol, kemudian diambil ± 5 μl dengan pipet kapiler dan ditotolkan pada plat KLT mulai dari bawah dengan menempatkan sampel pada titik tengah. Untuk mempermudah pengujian dibuat garis.

- Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* kaca yang telah berisi eluen dengan posisi berdiri tegak, eluen yang digunakan secara bergantian dengan larutan metanol:etil asetat (5:1), metanol:etil asetat (1:8), kloroform:etil asetat (2:6), N-heksan:etil asetat (9,5:0,5) dan metanol: etil asetat:kloroform (1:2:9) sebagai fase gerak.
- *Chamber* ditutup dengan kaca penutup untuk menghindari penguapan.
- Diamati eluen yang bergerak naik dan telah mencapai batas atas maka plat KLT yang ditentukan dengan garis dan diambil menggunakan pinset.
- Bercak pada plat lempeng kromatografi lapis tipis dimonitor di bawah sinar UV panjang gelombang 366 nm.
- Dipilih eluen terbaik yang paling banyak terdapat bercak noda yang terlihat yang mampu ditarik oleh eluen uji.

Hasil pengujian kromatografi lapis tipis difungsikan untuk mengetahui eluen mana yang mampu melarutkan senyawa aktif yang terkandung didalam daun kersen (*M. calabura* L.) yang bisa dilihat melalui noda fragmen terbanyak dibawah sinar UV untuk selanjutnya dipakai untuk pengamatan kromatografi kolom sebagai fase geraknya.

4.5.1.5 Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa aktif ekstrak menjadi beberapa fraksi. Metode kromatografi kolom menggunakan fase diam dan fase gerak. Fase diam berupa *silica gel* G₆₀ dan fase gerak merupakan eluen hasil dari kromatografi lapis tipis yang merupakan perbandingan pelarut antara metanol:etil asetat (1:8). Langkah kerjanya adalah sebagai berikut.

- Disiapkan tabung kolom dan statif.

- *Silica gel* G₆₀ ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dicampurkan dengan eluen metanol : etil asetat 1:8 kedalam *beaker glass* dan dihomogenkan dengan magnetik stirer selama 1 jam.

- Ujung keran tabung kolom diisi kapas *fiberglass* (*glass wool*) kemudian kolom dipasang pada statif.

- Kolom diisi secara perlahan hingga penuh dengan larutan berisi *silica gel* G₆₀ ke dalam kolom sampai tersusun dengan baik antara eluen dengan *silica gel* G₆₀.

- Dihomogenkan supaya *silica gel* G₆₀ dengan eluen tidak berbentuk bata-bata untuk mempermudah pengamatan.

- Didiamkan selama 24 jam supaya fase gerak dan fase diam tersuspensi dengan baik.

- Ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) sebanyak 0,5 gr dilarutkan ke eluen (metanol : etil asetat 1:8) secukupnya dan dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan agar tidak merusak susunan *silica gel* G₆₀ melalui corong.

- Keran kolom dibuka secara perlahan.

- Kemudian akan muncul berbagai warna yang merupakan fraksi ekstrak ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) dan ditampung dalam botol kaca sesuai dengan warna yang bisa dilihat dari *silica gel* G₆₀.

Setelah didapatkan beberapa warna yang berbeda dari fraksi hasil penyaringan kromatografi kolom, kemudian diupkan menggunakan nitrogen dan kerak diambil dan dilakukan pengujian daya hambat bakteri (uji cakram) untuk menentukan fraksi terbaik sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila*.

4.5.1.6 Uji Cakram Untuk Menentukan Fraksi Terbaik

Pengujian daya hambat bakteri (uji cakram) digunakan untuk mencari dan menentukan fraksi terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) yang menghambat bakteri *A. hydrophila*, yang mana fraksi-fraksi tersebut merupakan hasil dari pengujian kromatografi kolom.

Langkah-langkah uji cakram menurut Yanti dan Mitika (2017), diambilkan suspensi bakteri *A. hydrophila* dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang ditambahkan TSA (*Tryptic Soy Agar*) steril. Lalu dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Letakkan kertas cakram dengan menggunakan pinset. Kontrol negatif : menggunakan larutan DMSO, kontrol positif menggunakan kloramfenikol dan perlakuan menggunakan fraksi yang sudah ditentukan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam dan amati pertumbuhan bakteri kemudian ukur zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Menurut Fajeriyati (2017), zona bening dari uji cakram dapat dikategorikan zona hambatnya sebagai berikut. Zona hambat lemah : < 5 mm, zona hambat sedang : 5-10 mm, zona hambat kuat : 10-20 mm dan zona hambat sangat kuat : > 20 mm.

Dari hasil pengujian uji cakram, didapatkan fraksi terbaik ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) untuk menghambat *A. hydrophila*. Fraksi terbaik ini akan dikarakteristikan dengan analisa UV-Vis, FT-IR dan LC-MS untuk mengetahui jenis senyawa-senyawa aktif antibakteri yang terkandung di dalam fraksi tersebut.

4.5.1.7 Spektrofotometer UV-Vis (*Ultraviolet-Visible*)

Analisis spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan cara mengukur spektra panjang gelombang absorbansi dari radiasi ultra violet menggunakan fraksi terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) dengan spektrofotometer beresolusi 1 nm (dari 200-800 nm) pada mangkok kuarsa normal dengan panjang jejak. Fraksi

terbaik hasil kromatografi kolom diambil sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam cuvet, selanjutnya dipindai spektrofotometer dengan panjang gelombang 200 nm (Rizkia *et al.*, 2014).

4.5.1.8 Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infrared*) (Maharani *et al.*, 2016)

Sebanyak 1 mg sampel fraksi terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) digerus dengan 100 mg KBr (Kalium Bromida) secara homogen, kemudian diukur serapan infra-merah pada panjang gelombang 4000–450 cm^{-1} dengan resolusi cm^{-1} dan dianalisa hasilnya.

4.5.1.9 Analisis GCMS (*Gas Chromatography Mass Spectrophotometry*)

Pengujian menggunakan analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry*) menggunakan fraksi ekstrak terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) yaitu.

- Diambil sample fraksi terbaik 0,5 gram dan dilarutkan dalam pelarut (eluen metanol:etil asetat 1:8).
- Diinjekan pada *injection system* dan sampel akan dibawa *carrier gas supply* yang melewati kolom yang sudah terpanaskan oleh oven.
- Sampel akan dianalisis melalui dua instrumen yaitu kromatografi gas dan spektrofotometri massa.
- Komponen akan dibaca oleh detektor dan direkam dalam rekorder berupa data grafik, yang nanti dibaca dari titik puncak (*peak*) didapatkan dari grafik tersebut.

Data hasil pengujian GCMS menggunakan fraksi ekstrak terbaik daun kersen (*M. calabura* L.) nanti dilakukan analisa dengan menggunakan *website* PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk mendapatkan struktur

molekul dan untuk mendukung data perlu ditambahkan dengan perbandingan jurnal.

4.5.2 Penelitian Tahap 2 (Analisis Antibakteri Terhadap *Aeromonas hydrophila* yang Diberi Ekstrak Kasar Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) (Secara *In-Vitro*))

4.5.2.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) (Soelama *et al.*, 2015)

Pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* dilakukan dengan menggunakan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) untuk menganalisis daya hambat terbaik terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dari masing-masing konsentrasi uji. Untuk langkah kerjanya adalah sebagai berikut.

- Mula-mula disiapkan sebanyak 12 tabung reaksi untuk perlakuan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang sudah berisi media TSB (*Tryptic Soy Broth*) steril sebanyak 5 ml.
- Pada 2 tabung reaksi dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi antibakteri sintesis (*Chloramphenicol*) dan kontrol negatif diberi bakteri *A. hydrophila*.
- Untuk perlakuannya, ekstrak kasar dimasukkan pada 10 tabung reaksi dengan konsentrasi yang berbeda setiap tabungnya terdiri dari 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,3 ppm, 15,6 ppm, 7,8 ppm, 3,9 ppm, dan 1,9 ppm. Setiap tabung reaksi diberi isolat bakteri 1 ose.
- Kemudian semua tabung dilabeli dan dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- Media diperiksa kekeruhannya dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dan dicatat nilainya, untuk menentukan konsentrasi terbaik yang menghambat bakteri *A. hydrophila*.

4.5.2.2 Uji Cakram (Rabah et al., 2013)

Untuk pengujian daya hambat bakteri lainnya, dilakukan dengan uji cakram yang menggunakan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) untuk menganalisis daya hambat terbaik terhadap bakteri *A. hydrophila* dari masing-masing bahan uji. Pengujiannya adalah sebagai berikut.

- Disiapkan masing-masing cawan petri untuk perlakuan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang telah diberi media *Tryptic Soy Agar* (TSA).
- Kertas cakram steril diberikan perlakuan direndam ke dalam ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dari hasil MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*).
- Kontrol negatif, kertas cakram direndam dengan antibakteri sintetis (*Chloramphenicol*) dan untuk kontrol positif direndam ke dalam *Dimethylsulfoxide* (DMSO) selama 10-15 menit.
- Bakteri *Aeromonas hydrophila* disebar pada seluruh permukaan lempeng Agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata.
- Setelah 10-15 menit kertas cakram yang telah mengandung ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) diletakkan pada media agar.
- Media yang sudah ditanam bakteri dan diberi kertas cakram diinkubasi pada suhu 30 °C selama 18-24 jam pada inkubator.
- Media diamati hasil dan diukur zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram.
- Pengukuran menggunakan jangka sorong ataupun penggaris dan dibandingkan untuk menentukan konsentrasi terbaik yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila*.

4.5.3 Penelitian Tahap 3 (Analisis Pemberian Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila* Secara Terkontrol (Laboratorium) (Pengujian *In-vivo*))

4.5.3.1 Persiapan Ikan

Persiapan ikan uji yaitu ikan mas (*C. carpio*) yang didapatkan dari petani ikan di Puntan daerah Batu, Malang Jawa Timur. Penggunaan ikan mas dimaksudkan karena ikan ini memiliki kepekaan atau sensitif terhadap perubahan lingkungan yang diakibatkan oleh perubahan kualitas air maupun oleh serangan penyakit (Syawal *et al.*, 2011). Ikan disiapkan yang sehat sebanyak 300 ekor ukuran 7-9 cm kemudian diaklimatisasi selama 7 hari pada media pemeliharaan akuarium. Proses aklimatisasi ini untuk mengetahui ikan yang digunakan adalah ikan yang benar-benar sehat dan telah beradaptasi secara fisiologis dengan lingkungan barunya (Anggraeni *et al.*, 2015). Selama aklimatisasi ikan diberi pakan pelet secara *ad libitum* 2 kali sehari pada pagi hari pukul 09.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB. Penyiponan rutin dilakukan untuk membersihkan akuarium dari sisa pakan dan feses ikan.

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

Pengujian *Lethal Dossege 50* (LD₅₀) ini digunakan untuk menentukan seberapa padat dan berapa lama bakteri *A. hydrophila* dapat membunuh ikan yang diuji sebanyak 50 %. Permulaannya bakteri dikultur pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) sebanyak 10^{10} sel/ml. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat menjadi kepadatan 10^9 sel/ ml, 10^8 sel/ ml, 10^7 sel/ ml, 10^6 sel/ ml, dan 10^5 sel/ ml (Sarjito *et al.*, 2007). Menurut (Maftuch *et al.*, 2016), perhitungan suspensi bakteri dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan

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

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam TSB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

Ikan mas (*C. carpio*) disiapkan sebanyak 6 ekor pada akuarium percobaan.

Kemudian setiap perlakuan direndam dalam air sebanyak 5 liter dengan kepadatan bakteri 10^5 sel/ ml, 10^6 sel/ ml, 10^7 sel/ ml, 10^8 sel/ ml, dan 10^9 sel/ ml, kemudian diamati selama 96 jam. Selama penginfeksi ikan diberi makan 2 kali yakni pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB) secara adlibitum.

4.5.3.3 Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. calabura* L.) dengan LC_{50} (Lethal Concentration 50)

LC_{50} (Lethal Concentration) merupakan konsentrasi yang menyebabkan 50% organisme uji mengalami kematian dari suatu penelitian (Syngai et al., 2016). Pada penelitian ini penentuan nilai LC_{50} menggunakan dosis ekstrak kasar 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm. Ikan mas (*C. carpio*) disiapkan sebanyak 6 ekor dan direndam didalam toples pengamatan dengan kapasitas 20 L yang telah berisi air dengan konsentrasi ekstrak kasar yang telah ditentukan dan diamati berturut-turut selama 24, 48, 72 dan 96 jam (Hedayati dan Darabitar, 2016). Selama pemeliharaan diberi aerasi untuk sumber udara. Pada saat uji toksisitas ikan diberi makan 2 kali yakni pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB) secara adlibitum.

4.5.3.4 Pengobatan Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. calabura* L.) Pada Ikan yang Diinfeksi *A. hydrophila*

Penginfeksi bakteri dilakukan dengan selama 48 jam. Penginfeksi menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman. Perendaman

ikan dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 menggunakan akuarium berukuran 40 x 40 x 40 cm³ yang sudah dilengkapi aerasi.

Perendaman ini dilakukan menggunakan kapasitas air 20 liter.

Perendaman ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dilakukan setelah ikan menunjukkan gejala sakit pasca infeksi *A. hydrophila*. Pemberian ekstrak kasar dilakukan dengan cara akuarium ukuran 40x40x40 cm³ yang diisi air 20 liter dan ditambahkan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dengan dosis (125 ppm, 150 ppm dan 175 ppm) dengan tiga kali pengulangan. Pengobatan dilakukan selama 6 jam.

Setelah ikan diobati, ikan dipelihara kemudian dimasukkan ke dalam akuarium dengan ukuran 40x40x40 cm³ yang telah diberi aerasi. Ikan yang diujikan berjumlah 10 ekor. Pemeliharaan ikan dilakukan selama 10 hari. Dari data yang didapatkan, dianalisis antara perlakuan dilihat dari kontrol normal. Pada saat pemeliharaan ikan diberi makan 2 kali yakni pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB) secara ad libitum, dilakukan sifon sedikitnya dua hari sekali dan dilakukan pengukuran suhu, pH dan DO setiap hari pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB).

4.5.3.5 Pengujian Kelulushidupan (SR)

Setelah pasca-pengobatan bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.), maka ikan mas dipindahkan ke akuarium berukuran 40 x 40 x 40 cm³ yang berisi air 20 liter. Kemudian akuarium tersebut diberi tanda setiap perlakuan seperti K_{normal} (1,2,3), K_{infeksi} (1,2,3), A (1,2,3), B (1,2,3) dan C (1,2,3). Pengamatan dilakukan selama 10 hari masa pemeliharaan. Data yang diambil meliputi gejala klinis dari ikan dan jumlah ikan yang mati selama masa pemeliharaan. Jumlah ikan mati dan hidup kemudian dihitung

dengan menggunakan rumus dari pernyataan Effendie (1979), adalah sebagai berikut.

$$\text{Survival Rate (SR)} = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan:

SR = Nilai kelangsungan hidup (%)

N_t = Jumlah akhir ikan pemeliharaan (ekor)

N_o = Jumlah awal ikan pada saat penebaran (ekor)

Saat pemeliharaan ikan diberi makan 2 kali yakni pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB) secara ad libitum, dilakukan sifon sedikitnya dua hari sekali dan dilakukan pengukuran suhu, pH dan DO setiap hari pada pagi (09.00 WIB) dan sore (15.00 WIB).

4.5.3.6 Pengujian Histopatologi Hati

Setelah pengobatan, hati ikan diambil sebagai sampel untuk pengamatan histopatologi. Sampel hati dimasukkan ke dalam botol film dan diberi bahan pengawet yaitu larutan formalin 10%, dilanjutkan dengan preparasi histopatologi hati (Sudaryatma *et al.*, 2013). Langkah kerjanya menurut Maftuch *et al.* (2016), adalah sebagai berikut.

- **Fiksasi**, sampel jaringan tetap di dalam larutan buffer, formalin (10%) selama 24 jam.
- **Dehidrasi**, air dihilangkan secara bertahap dengan 70%, 80%, 90%, 96% dan alkohol absolut selama 2 jam.
- **Pembersihan**, alkohol dari jaringan dibilas dengan cara merendam jaringan menjadi larutan xilol pertama selama 1 jam, xilol kedua selama 2 jam dan xilol ketiga selama 3 jam.

- **Impregnasi** untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan, dilakukan dengan cara mencelupkan sampel ke parafin cair dengan suhu 56-60°C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali kedalam parafin cair dengan suhu 56-60 °C selama 2 jam.
- **Pengeblokan**, tahapan ini berfungsi untuk memudahkan pemotongan sampel dengan menggunakan alat mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam waterbath dengan suhu 40°C.
- **Pewarnaan**, pewarnaan dilakukan dengan menggunakan haemaktosilin-eosin (HE) dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu deparafinisasi, hidrasi, pewarnaan utama, dehidrasi dan pembersihan.
- **Pemasangan**, sampel ditempelkan menggunakan media pemasangan DPX atau objek *glass*, lalu ditutup dengan penutup kaca (*covering slide*) untuk mencegah terjadinya gelembung. Disimpan pada suhu kamar sampai lem mengering, kemudian diamati di mikroskop.

4.6 Parameter Penunjang Penelitian

Pada penelitian ini, parameter-parameter penunjang yang diamati menurut Effendi (2003), yaitu mengkaji kualitas air yang meliputi :

- pH air, diukur dengan pH-meter.
- Suhu, diukur dengan termometer.
- Oksigen terlarut, diukur dengan DO-meter.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengujian ini

dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel-variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan (Sastrosupadi, 2000). Data hasil dihitung menggunakan Microsoft Excel 2013.

4.7.1 Analisis Data Hasil GCMS

Hasil pengamatan GCMS dapat dianalisis melalui langkah-langkah sebagai berikut.

- Pencarian informasi menggunakan software online PubChem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> untuk mengetahui berat molekul, formula molekul, gugus kimia dan kegunaan dari senyawa target.
- Analisis dengan menggunakan perbandingan jurnal untuk mengetahui fungsi dan kegunaan senyawa target.

4.7.2 Analisis Data Kerusakan Histopatologi Hati Ikan Mas (*C. carpio*)

Pengamatan histopatologi hati ikan mas (*C. carpio*) menggunakan analisis deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan sel pada hati, maka dilakukan pengujian skoring dengan metode semi kualitatif dan kuantitatif. Metode semi kualitatif digunakan untuk menghitung area yang terwarnai dan amati secara manual. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ujung preparat) ke arah kanan kemudian turun ke bawah dan bergeser ke arah ujung kembali (zig zag).

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari tiga luas bidang lapang pandang sehingga mendapatkan hasil yang lebih akurat tingkat kerusakan sel pada jaringan hati. Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan selnya dengan kriteria hipertrofi, hiperplasia dan nekrosis. Menurut Maftuch *et al.* (2016),

persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase Kerusakan} = \frac{\text{Jumlah Sel Rusak}}{\text{Jumlah Sel Dianalisa}} \times 100\%$$

Jika nilai didapatkan, diberi nilai skoring dari angka 1 sampai 4. Angka 1 mempunyai tingkat kerusakan 0 - 5%, angka 2 tingkat kerusakan 6 - 25%, angka 3 tingkat kerusakan 26 - 50% dan angka 4 tingkat kerusakan >50%. Setelah itu didapatkan data yang sesuai dengan tingkat kerusakan.

4.8 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2018 sampai Oktober 2018 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Pengembangan Tanaman (Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Kimia Organik (Fakultas Sains dan Teknologi (Saintek), Universitas Islam Negeri Malang) dan Laboratorium Histopatologi (Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang).

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penelitian Tahap Pertama. (Ekstraksi, Fraksinasi dan Karakterisasi Fraksi Terbaik Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) yang Bersifat Antibakteri Terhadap *Aeromonas hydrophila*)

5.1.1 Rendemen Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Maserasi menggunakan perbandingan simplisia dan pelarut (1:7). Pelarut-pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%, etil asetat dan kloroform. Hasil maserasi menggunakan bahan simplisia sebanyak 300 gr daun kersen (*M. calabura* L.) dengan waktu maserasi selama 3 hari diperoleh ekstrak kasar setelah dievaporasi dengan evaporator kecepatan 80 rpm dengan suhu 45 °C didapatkan ekstrak kasar dengan pelarut etanol 96% 46,89 gr, pelarut etil asetat 19,83 gr dan kloroform 10,37 gr. Hasil ekstrak kasar ini kemudian dihitung redemennya terhadap simplisia dengan menghitung berat akhir ekstrak dibandingkan berat simplisia awal (Wijaya *et al.*, 2018). Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rendemen Ekstrak Daun Kersen (*M. calabura* L.)

Pelarut Ekstrak	Jumlah Pelarut (ml)	Berat Simplisia (gr)	Berat Akhir Ekstrak (gr)	Rendemen (%)
Etanol 96%	2100	300	46,89	15,63
Etil Asetat	2100	300	19,83	6,61
Kloroform	2100	300	10,37	3,46

Berdasarkan hasil data yang didapat yang disajikan pada Tabel 3, diketahui penggunaan pelarut etanol 96% memiliki nilai rendemen lebih tinggi dibandingkan pelarut lainnya. Sehingga dapat diduga bahan organik dan metabolit sekunder yang terkandung didalam daun kersen lebih didominasi oleh golongan polar dibandingkan nonpolarnya. Hal ini didukung oleh pernyataan Sormin (2012), tingginya nilai rendemen dipengaruhi oleh pelarut uji untuk menarik senyawa organik didalamnya. Pelarut polar akan menarik lebih banyak

golongan dari senyawa organik yang bersifat polar dibandingkan semi polar ataupun non polar. Untuk mengetahui senyawa organik yang dapat ditarik oleh pelarut uji, maka selanjutnya dilakukan pengujian fitokimia.

5.1.2 Analisa Skrining Fitokimia Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Hasil skrining fitokimia dengan menggunakan perbandingan 3 pelarut, etanol 96% (polar), etil asetat (semi-polar) dan kloroform (non-polar) dilakukan pengujian senyawa-senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) seperti flavonoid, saponin, tannin, alkaloid dan triterpenoid, didapatkan hasil kandungan senyawa aktif ekstrak daun dengan pelarut etanol 96% lebih baik dibandingkan pelarut etil asetat dan kloroform (Tabel 4). Senyawa aktif yang terkandung dengan pelarut etanol 96% didapatkan senyawa flavonoid, saponin, tannin, alkaloid dan triterpenoid. Sedangkan menggunakan pelarut etil asetat dan kloroform hanya ditemukan tannin dan triterpenoid saja.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kersen (*M. calabura* L.).

Senyawa Aktif	Pelarut		
	Etanol 96%	Etil Asetat	Kloroform
Flavonoid	+	-	-
Saponin	+	-	-
Tannin	+	+	+
Alkaloid	+	-	-
Triterpenoid	+	+	+

Pernyataan diatas, daun kersen (*M. calabura* L.) memiliki kandungan flavonoid, saponin, tannin, alkaloid dan triterpenoid dari hasil skrining fitokimia.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Buhian *et al.*, (2016) dan Ragasa *et al.*, (2015), tumbuhan kersen terdapat kandungan triterpenoid, fenol, alkaloid, flavonoid dan metabolit sekunder lainnya. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut ekstraksi lebih baik dibandingkan menggunakan pelarut etil asetat dan kloroform. Hasil dari pengujian fitokimia pelarut terbaik didapatkan etanol 96% terdapat semua

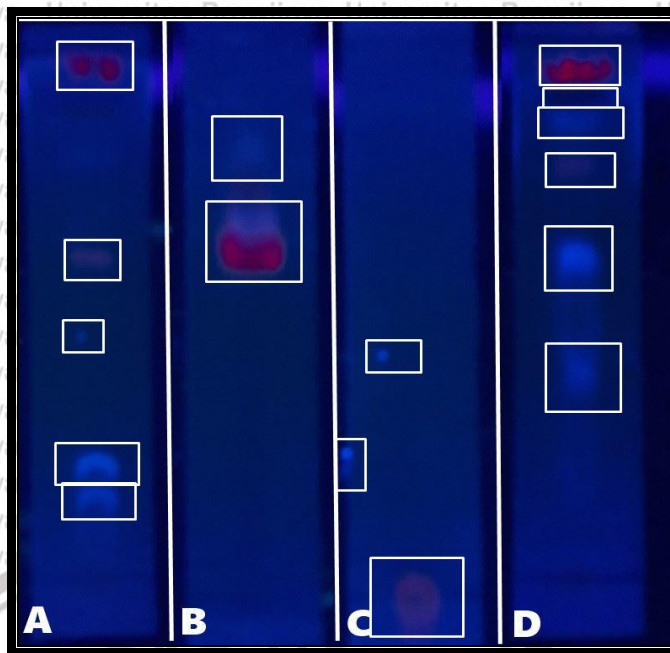
kandungan senyawa aktif uji antara lain flavonoid, saponin, tannin alkaloid dan triterpenoid dibandingkan menggunakan pelarut etil asetat dan kloroform yang hanya didapatkan hasil positif senyawa aktif tannin dan triterpenoid. Hal ini sesuai dengan pernyataan Arifianti *et al.* (2014), penggunaan pelarut etanol 96% lebih baik dibandingkan pelarut lain seperti etil asetat, kloroform dan N-heksan dikarenakan memiliki *extractive power* yang mampu menarik hampir semua senyawa yang memiliki berat molekul rendah seperti alkohol, saponin, flavonoid dan lain sebagainya, sehingga sangat direkomendasi sebagai pelarut untuk pembuatan ekstrak. Data-data yang didapatkan disimpulkan penggunaan pelarut etanol 96% sebagai pelarut uji dan penelitian selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui senyawa-senyawa aktif lebih mendalam (spesifik) yang terkandung di dalam daun kersen (*M. calabura* L.) tersebut.

5.1.3 Analisa Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian kromatografi lapis tipis dilakukan menggunakan bahan adsorben seperti silika gel sebagai fase diam dan pelarut (eluen) sebagai fase gerak (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen uji (A) metanol : etil asetat : kloroform 1:2:9; (B) metanol : etil asetat 5:1; (C) N-heksan : etil asetat 9,5:0,5 dan (D) metanol : etil asetat 1:8 yang diujikan pada plat KLT silika gel 60 F₅₂₄. Hasil dari uji kromatografi lapis tipis (KLT) ini dapat dilihat pada Tabel 5 dibawah ini.

Tabel 5. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis Untuk Menentukan Eluen Terbaik yang Akan Digunakan Sebagai Eluen Kromatografi Kolom.

Perbandingan Pelarut (Eluen)	Spot yang Didapat
Metanol : Etil Asetat : Kloroform 1:2:9	5
Metanol : Etil Asetat 5:1	2
N-heksan : Etil Asetat 9,5:0,5	3
Metanol : Etil Asetat 1:8	6



Gambar 7. Hasil Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang Diamati Melalui Sinar UV 366 nm.

Hasil analisa kromatografi lapis tipis yang terbaik didapatkan sebagai fase gerak yaitu penggunaan eluen metanol : etil asetat (1:8). Hasil kromatografi lapis tipis didapatkan 6 spot fragmen (Gambar 7) yang diamati melalui sinar UV 366 nm. Setelah itu dilakukan perhitungan nilai R_f (*Retardation factor*) kromatografi lapis tipis dan didapatkan spot 1 (0,35 dengan warna biru muda), spot 2 (0,50 dengan warna biru muda), spot 3 (0,72 dengan warna jingga), spot 4 (0,85 dengan warna biru muda), spot 5 (0,90 dengan warna biru gelap) dan spot 6 (0,95 dengan warna merah). Lebih jelasnya bisa dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Eluen Metanol : Etil Asetat (1:8).

Kromatografi Lapis Tipis Analitik		
Spot Fragmen	R_f	Warna
Spot 1	0,35	Biru Muda
Spot 2	0,50	Biru Muda
Spot 3	0,72	Jingga
Spot 4	0,85	Biru Muda
Spot 5	0,90	Biru Gelap
Spot 6	0,95	Merah

Penggunaan perbandingan pelarut (eluen) metanol:etil asetat (1:8) ditetapkan sebagai eluen terbaik untuk pengujian kromatografi kolom karena menghasilkan lebih banyak spot-spot yang diharapkan mampu memecah senyawa-senyawa ekstrak kasar dari daun kersen menjadi fraksi-fraksi yang akan diambil melalui kromatografi kolom. Pengujian kromatografi lapis tipis ini masih belum dilakukan pengujian senyawa karena akan dilakukan lebih spesifik pada tahap selanjutnya.

5.1.4 Fraksinasi dan Penentuan Kandidat Fraksi Terbaik Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Proses fraksinasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan eluen berupa pelarut sebagai fase gerak dan silika gel yang merupakan fase diam yang menggunakan tabung kolom (Rubiyanto, 2016). Fase gerak menggunakan eluen yang berupa metanol:etil asetat 1:8 dan fase diam menggunakan silika gel G_{60} . Pengujian melalui kromatografi kolom didapatkan hasil berupa fraksi-fraksi yang dikeluarkan melalui tabung kolom hasil filtrasi dari fase diam (Leba, 2017). Hasil fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 8.

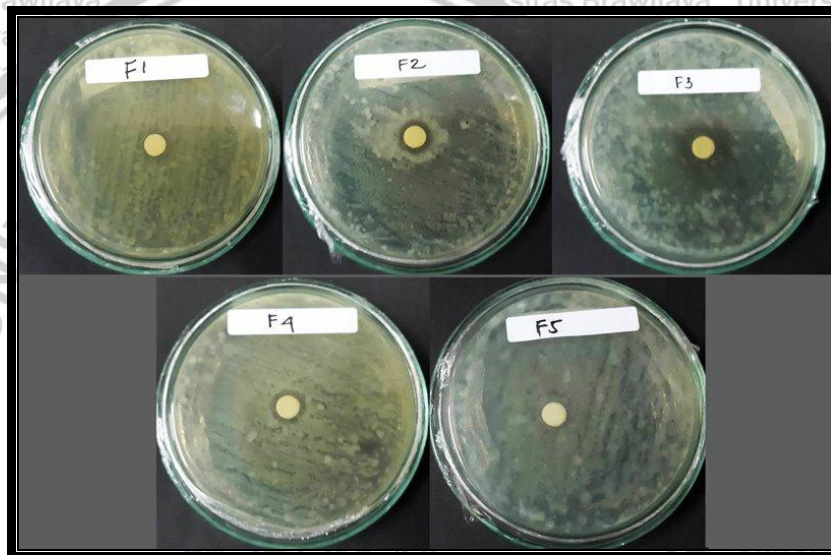


Gambar 8. Fraksinasi Kromatografi Kolom. (A) Proses Kromatografi Kolom; (B) Hasil Fraksi Kromatografi Kolom.

Melalui fraksinasi, didapatkan 5 fraksi dengan warna bervariasi yang bisa dilihat secara visual (Gambar 8B). Fraksi ke-1 menghasilkan warna cokelat kehijauan, fraksi ke-2 menghasilkan warna cokelat pekat (kehitaman), fraksi ke-3

menghasilkan warna cokelat pekat (kekuningan), fraksi ke-4 menghasilkan warna jingga dan fraksi ke-5 menghasilkan warna kuning bening.

Fraksi-fraksi yang didapat melalui kromatografi kolom, kemudian selanjutnya dilakukan uji cakram untuk mengetahui kekuatan daya hambat fraksi-fraksi tersebut dan penentuan kandidat fraksi terbaik. Hasil uji cakram terhadap daya hambat fraksi-fraksi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) untuk dapat menentukan fraksi terbaik yang memiliki sifat sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Uji Daya Hambat Fraksi Daun Kersen (*M. calabura* L.).

Menurut Yanti dan Mitika (2017), melalui zona bening, zona hambat dapat diklasifikasi sebagai berikut.

- < 5 mm dapat dikategorikan lemah/rendah.
- 5-10 mm dapat dikategorikan sedang.
- 11-20 dapat dikategorikan kuat.
- > 20 dapat dikategorikan sangat kuat.

Berdasarkan pernyataan diatas, nilai daya hambat 5 fraksi hasil kromatografi kolom ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat ditentukan pada Tabel 7 dibawah ini.

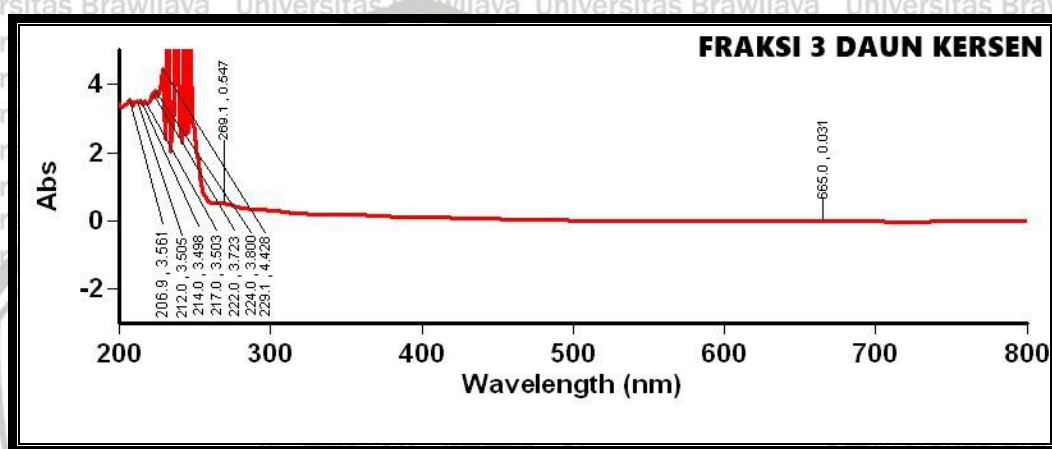
Tabel 7. Diameter Zona Hambat Uji Cakram Fraksi Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.).

Fraksi Daun Kersen <i>M. calabura</i> L.	Daya Hambat (mm)	Jenis Daya Hambat
Fraksi ke-1	0	Tidak Memiliki Sifat Antibakteri
Fraksi ke-2	7,01	Sedang
Fraksi ke-3	8,97	Sedang
Fraksi ke-4	6,68	Sedang
Fraksi ke-5	0	Tidak Memiliki Sifat Antibakteri

Zona bening dari ke-5 fraksi yang diuji didapatkan data zona hambat fraksi terbaik berturut-turut yaitu, fraksi ke-3 (8,97 mm), fraksi ke-2 (7,01 mm), fraksi ke-4 (6,68), fraksi ke-1 dan ke-5 mendapat 0 mm. Fraksi ke-3, ke-2 dan ke-4 berjenis daya hambat sedang, sedangkan fraksi ke-1 dan ke-5 berklasifikasi tidak memiliki sifat antibakteri. Data diatas, didapatkan fraksi ke-3 sebagai fraksi terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Metabolit sekunder dari fraksi ke-3 yang diduga memiliki sifat antibakteri yaitu dari golongan fenolik, diperkuat dengan pernyataan Hendra *et al.*, (2011), metabolit flavonoid yang merupakan derivatif fenol mampu sebagai antibakteri dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri pada gram negatif dan mengganggu sistem kerja metabolisme bakteri seperti enzim. Adanya gugus OH dapat menghambat pertumbuhan bakteri diakibatkan ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein menyebabkan struktur protein pada bakteri menjadi rusak. Ikatan hidrogen juga mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma karena tersusun atas protein. Akibat permeabilitas terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel, sehingga sel menjadi lisis (Rijayanti, 2014). Untuk membuktikan adanya kandungan fenol dan derivatifnya pada fraksi ke-3, selanjutnya diuji secara spesifik dengan menggunakan metode UV-VIS, FTIR dan GC-MS.

5.1.5 Analisa Spektrofotometer UV-Vis (Ultraviolet-Visible) Fraksi Ke-3

Hasil dari pengujian antibakteri dengan kertas cakram didapatkan fraksi ke-3 sebagai fraksi terbaik karena memiliki zona hambat tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Sehingga untuk mengetahui kandungan yang terdapat di dalam fraksi ke-3 dilakukan pengujian selanjutnya yang salah satunya analisa Spektrofotometer UV-Vis. Hasil dari pengujian ditemukan 9 titik (*peak*) panjang gelombang yang bisa dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Analisis UV-Vis Fraksi Ke-3 Daun Kersen (*M. calabura* L.).

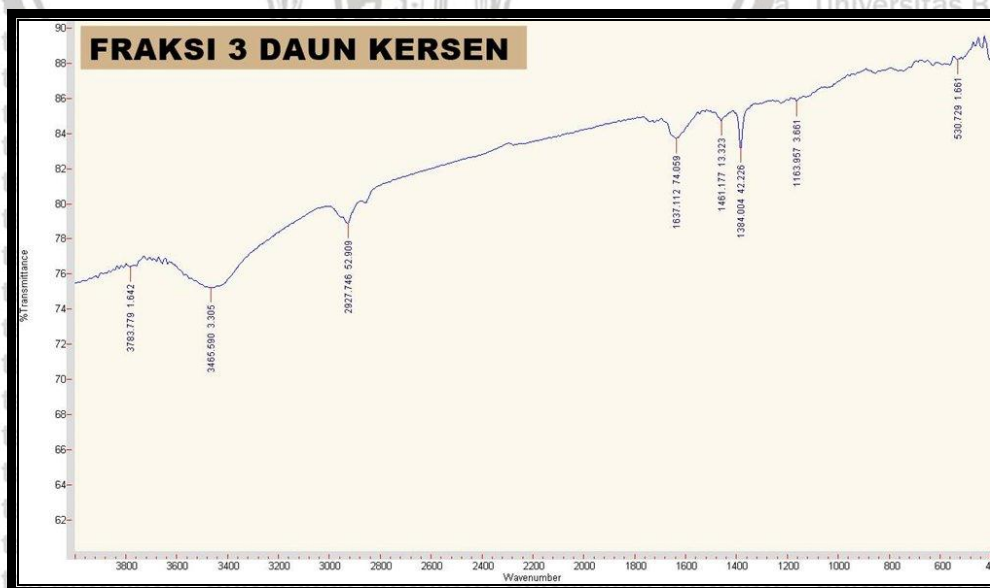
Berdasarkan grafik yang didapatkan melalui pengujian spektrofotometer UV-Vis dapat dianalisa nilai panjang gelombang 206 nm merupakan golongan dari fenol (Janakiraman dan Jeyaprakash, 2015), nilai panjang gelombang 212-269 nm merupakan dari golongan flavonoid. Menurut Ritna *et al.* (2016), isolat yang memiliki spektrum 210-280 nm berasal dari golongan flavonoid. Pernyataan lain dari Harbone (2006), spektra 269 nm merupakan golongan dari senyawa flavonol. Spektrum terakhir dengan panjang gelombang 665 nm merupakan golongan dari flavonoid dan klorofil (Obaseki *et al.*, 2017). Data-data diatas dapat disimpulkan dugaan awal pengujian spektrofotometer UV-Vis fraksi ke-3 dominan berasal dari derivatif fenol yaitu golongan flavonoid. Selanjutnya untuk membuktikan adanya senyawa dari golongan fenol, maka dilakukan pengujian

FTIR (*Fourier Transform-Infrared*) untuk mengetahui golongan dan gugus fungsi yang terdapat pada fraksi ke-3.

5.1.6 Analisa Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infrared*) Fraksi Ke-3

Hasil pengamatan karakterisasi FTIR untuk menganalisis fraksi ke-3 daun kersen (*M. calabura* L.) untuk mengetahui kandungan senyawa dengan melihat nilai serapan yang didapatkan serta gugus fungsi yang ditampilkan oleh grafik. Hasil yang didapatkan yaitu, 8 daerah frekuensi pita serapan dengan gugus fungsi yang berbeda-beda. Lebih jelasnya dapat dilihat dari Gambar 11.

Nilai puncak spektrofotometer FTIR fraksi 3 daun kersen (*M. calabura* L.) dilihat dari panjang gelombang didapat nilai serapan yang dominan pada frekuensi 3465.590 cm^{-1} , 2927.476 cm^{-1} , 1637.112 cm^{-1} dan 1384.004 cm^{-1} . Dilihat dari gugus fungsi, serapan 3465.590 cm^{-1} adanya ikatan hidrogen (alkohol dan fenol), nilai serapan 2927.476 cm^{-1} adanya gugus alkana, nilai serapan 1637.112 cm^{-1} adanya gugus karbonil dan serapan 1384.004 cm^{-1} didapat adanya gugus alkana. Data pita serapan analisa spektrofotometer FTIR fraksi 3 dapat dilihat pada Tabel 8.



Gambar 11. Analisis FTIR Fraksi-3 Daun Kersen (*M. Calabura* L.).

Tabel 8. Data Karakterisasi Sprektofotometer FTIR Fraksi Ke-3 Daun Kersen (*M. calabura* L.).

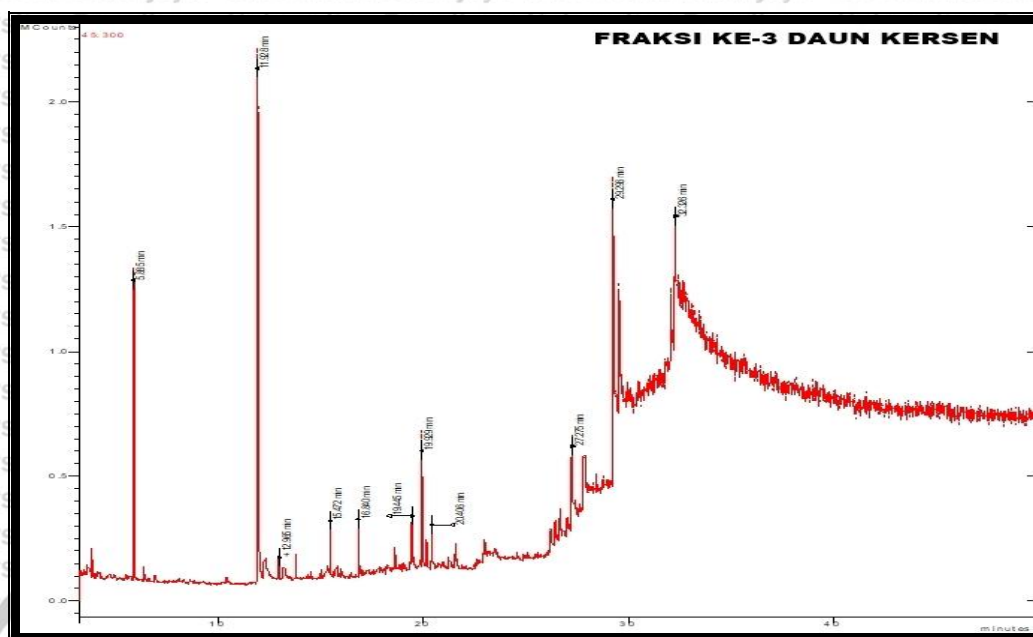
Nilai Puncak Spektrofotometer FTIR (cm^{-1})	Gugus Fungsi	Kelompok
3783.779	O-H	Fenol (Socrates, 2004).
3465.590	O-H	Alkohol dan Fenol (Franco <i>et al.</i> , 2014).
2927.476	C-H	Alkana (Tejada <i>et al.</i> , 2002).
1637.112	C=O	Karbonil (Saputra <i>et al.</i> , 2016)
1461.177	C=C	Aromatik Hidrokarbon (Segneanu <i>et al.</i> , 2012).
1384.004	-C-H	Alkana (Tejada <i>et al.</i> , 2002).
1163.957	O-H	Alkohol dan Eter Alfalitik (Teaca, 2009).
530.729	C-H bending	Alkana (Sari <i>et al.</i> , 2015)

Hasil pengamatan spektrofotometer FTIR ditemukan gugus hidroksil (OH), karena ditemukan pada panjang gelombang 3465 cm^{-1} dengan serapan yang dalam dan melebar yang merupakan senyawa dari golongan fenol (Socrates, 2006). Gugus C=O pada panjang gelombang 1637 cm^{-1} menandakan senyawa fenol didalam sampel (Sariningsih *et al.*, 2015 dan Senthilkumar *et al.*, 2017). Adanya gugus hidroksil (OH) dan gugus aromatik hidrokarbon pada sampel mengindikasikan adanya senyawa fenil propanoid (Harbone, 2006). Pernyataan lain dari Parubak (2013), adanya gugus fungsi OH (hidroksil), C=O, C=C aromatik, CH alfalitik mengindikasikan adanya senyawa flavonoid. Dari pernyataan diatas dapat diduga kandungan yang dominan pada fraksi ke-3 daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah fenol dan derivatifnya yaitu fenil propanoid dan flavonoid.

5.1.7 Analisa GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrophotometry) Fraksi Ke-3

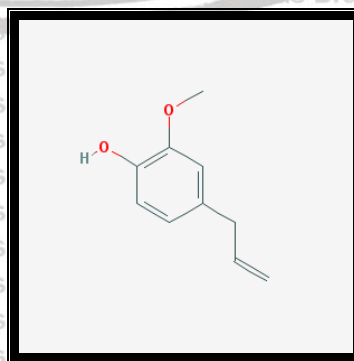
Analisa hasil pengujian GCMS fraksi ke-3 daun kersen (*M. calabura* L.) yang dianalisa secara kualitatif untuk mendeteksi dan mengidentifikasi senyawa aktif dari fraksi ke-3 berdasarkan perbandingan waktu retensi dan berat spektra pada

database library yang sudah teridentifikasi pada alat GCMS. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Hasil Analisa GCMS Fraksi-3 Daun Kersen (*M. Calabura L.*).

Hasil yang didapat grafik didapatkan 12 molekul yang dideteksi senyawa aktif yang terdapat di fraksi ke-3 daun kersen (*M. calabura L.*). Pada grafik didapatkan puncak ke-2 memiliki nilai puncak tertinggi dengan waktu retensi yaitu 11,928 m/z, sehingga dapat diketahui dari puncak tertinggi ini merupakan molekul senyawa aktif yang dominan terdapat didalam fraksi ke-3. Melalui database library pada GCMS didapatkan senyawa *phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)* atau eugenol. Lebih lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 6.



Gambar 13. Struktur Eugenol (Pubchem, 2018)

Data hasil pengujian GCMS diketahui eugenol memiliki berat molekul 164,204 gr/mol, dengan luas area 31,48%, bernama IUPAC *phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)* dengan rumus molekul $C_{10}H_{12}O_2$. Senyawa eugenol berasal dari derivatif fenol (Hernawan *et al.*, 2012 dan Mahboub, 2014), yang merupakan golongan dari fenil propanoid (Fadilah *et al.*, 2017). Fenil propanoid merupakan metabolit sekunder yang dapat mensintesis golongan flavonoid seperti isoflavon (Alimuiddin *et al.*, 2011), golongan flavonol (Yin *et al.*, 2012) dan golongan antosianin (Peng *et al.*, 2008).

Eugenol merupakan senyawa kimia aromatik, larut dalam pelarut-pelarut organik (Andries *et al.*, 2014) seperti alkohol, kloroform, eter dan asam asetat glasial (Rorong, 2008), mudah menguap (Lutfi *et al.*, 2013), berbentuk cairan yang tak berwarna (bening) atau kuning pucat yang berbau spesifik (Putri *et al.*, 2014). Eugenol umumnya merupakan bagian utama dari minyak atsiri (Julianto, 2016). Eugenol terdapat pada daun-daunan, batang, biji dan buah seperti daun basil, lemon balm, kayu manis, buah pala dan cengkeh (Pavithra, 2014). Pada tanaman cengkeh, senyawa ini banyak ditemukan dengan kandungan hingga mencapai 70-96% (Towaha, 2012).

Tabel 9. Profil Senyawa Eugenol yang Terkandung Didalam Fraksi Ke-3 Daun Kersen (*M calabura* L.) Melalui Pengamatan GCMS.

Golongan	Waktu Retensi (m/z)	Luas Area (%)	Berat Molekul (gr/mol)	Karakteristik	Rumus Kimia
Fenol	11,928	31,48	164,204	Aromatik	$C_{10}H_{12}O_2$

Dilihat dari fungsinya, senyawa eugenol memiliki sifat sebagai antibakteri (Paliling *et al.*, 2016), karena senyawa fenil propanoid berfungsi didalam tubuh tumbuhan sebagai mekanisme pertahanan diri dari serangan penyakit (Harbone, 2006). Diperkuat oleh pernyataan Sukandar *et al.* (2010), eugenol mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *B. subtilis*, *B. cereus*, *S.*

aureus, *P. aeruginosa* dan *E. coli* melalui uji zona hambat bakteri. Seperti halnya flavonoid, mekanisme antibakteri eugenol yaitu mengganggu fungsi membran sel bakteri patogen, menginaktivasi atau menghambat metabolisme enzimatis, mengganggu sintesis asam nukleat dan protein serta menghambat produksi energi bakteri (Oyedemi et al., 2008).

5.2 Penelitian Tahap Kedua. Analisis Antibakteri Terhadap *Aeromonas hydrophila* yang Diberi Ekstrak Kasar Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) (Pengujian *In-vitro*)

5.2.1 Analisa MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

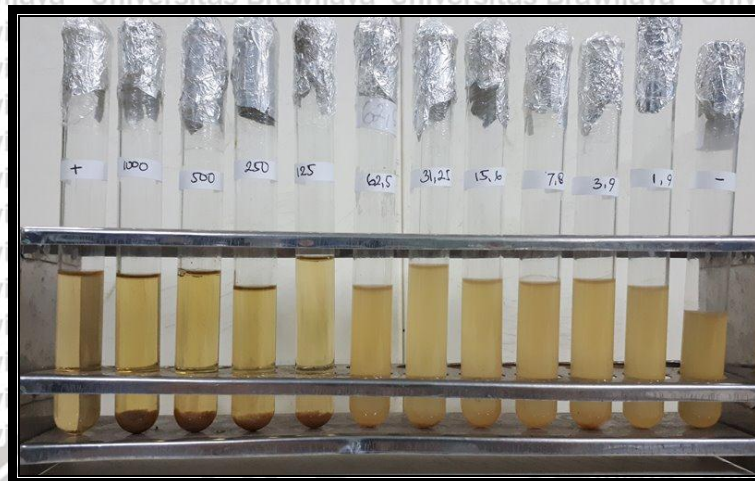
Data pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) menggunakan berbagai macam konsentrasi uji ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) terhadap bakteri *A. hydrophila* dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm didapatkan hasil data yang disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Dengan Berbagai Konsentrasi Menggunakan Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. calabura* L.).

Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi	Warna Media
1000 ppm	0,125	Bening
500 ppm	0,121	Bening
250 ppm	0,114	Bening
125 ppm	0,102	Bening
62,5 ppm	0,289	Bening
31,5 ppm	0,516	Keruh
15,6 ppm	1,102	Keruh
7,8 ppm	1,233	Keruh
3,9 ppm	1,241	Keruh
1,9 ppm	1,344	Keruh
Kontrol Positif (<i>Chloramphenicol</i>)	0,025	Bening
Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan)	2,286	Keruh

Hasil dari pengujian MIC didapatkan hasil dari media TSB yang didapatkan, konsentrasi 125 ppm didapatkan yang terbaik karena media jika dilihat dari visual warnanya bening (Gambar 14) dan nilai absorbansinya mendekati kontrol positif

(Chloramphenicol). Akan tetapi, jika dilihat dari konsentrasi 125 ppm, semakin tinggi konsentrasinya (hingga 1000 ppm), maka semakin naik nilai arsobansinya.



Gambar 14. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Bakteri *A. hydrophila* dengan Pemberian Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. calabura* L.).

Untuk mengetahui ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) tersebut sebagai penghambat pertumbuhan bakteri, maka dilakukan pengujian dengan cara menumbuhkan bakteri pada cawan petri yang bermediakan TSA (*Tryptic Soy Agar*). Hasil dan data pengamatan dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Pengujian Kultur Bakteri Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) pada Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) yang Diuji Selama 24, 48 dan 72 Jam. (Positif (+) Bakteri Tumbuh dan Negatif (-) Bakteri Tidak Tumbuh).

KONSENTRASI (ppm)	WAKTU PENGAMATAN (jam)		
	24	48	72
1000 ppm	-	+	+
500 ppm	-	+	+
250 ppm	-	+	+
125 ppm	-	+	+
62,5 ppm	+	+	+
31,25 ppm	+	+	+
15,6 ppm	+	+	+
7,8 ppm	+	+	+
3,9 ppm	+	+	+
1,9 ppm	+	+	+
Kontrol Positif (K+)	-	-	-
Kontrol Negatif (K-)	+	+	+

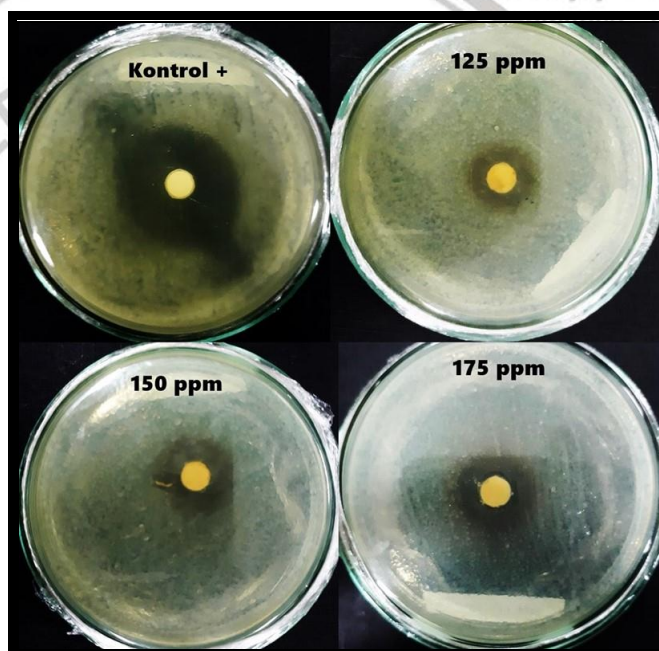
Data yang didapat melalui uji media TSA (*Tryptic Soy Agar*) pada cawan petri didapatkan konsentrasi 125–1000 ppm bakteri tidak tumbuh selama pengamatan 24 jam. Hal ini berarti kekeruhan warna pada uji MIC pada tabung reaksi masih belum akurat menentukan daya hambat akibat bakteri atau akibat warna ekstrak. Menurut Putri *et al.*, (2008), spektrofotometer masih belum bisa membandingkan kekeruhan akibat ekstrak maupun akibat bakteri uji, karena hanya mencatat nilai kekeruhan. Karena warna ekstrak kasar juga mempengaruhi kekeruhan media jika semakin tinggi konsentrasinya. Konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) 125 ppm bisa dikatakan konsentrasi minimal yang mampu sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hal ini didukung dengan pernyataan Talib *et al.* (2012), bakteri terhambat pertumbuhannya diakibatkan adanya senyawa aktif seperti fenol sebagai antiproliferasi bakteri. Proliferasi merupakan aktivitas pertumbuhan bakteri yang sangat cepat (Glick *et al.*, 1999). Antiproliferasi menunjukkan aktivitas antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal. Untuk mengetahui adanya sifat antibakteri maka pengujian dilakukan selama 72 jam.

Setelah diuji ke media TSA (*Tryptic Soy Agar*), ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) dengan konsentrasi minimal 125 ppm mampu menghambat pertumbuhan bakteri selama 24 jam dan bersifat bakteriostatik karena hanya mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* selama 24 jam dan bakteri mulai tumbuh pada pengamatan 48 jam. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Amin (2014), antibakteri dikatakan bakteriostatik jika hanya menghambat pertumbuhan atau perkembangan bakteri tanpa mematikan bakteri, berbeda dengan bakterisidal yang merupakan suatu zat antibakteri yang memiliki mekanisme langsung membunuh bakteri yang menyebabkan bakteri tersebut tidak bisa berkembang/proliferasi lagi (Kee dan Hayes, 1996). Pengujian selanjutnya dilakukan uji cakram untuk mengetahui daya hambat ekstrak kasar daun kersen

(*M. calabura* L.) terhadap bakteri *A. hydrophila* berdasarkan diameter zona hambatnya.

5.2.2 Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Setelah dilakukan pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), konsentrasi yang digunakan untuk uji cakram yaitu 125 ppm sebagai konsentrasi terendah diikuti konsentrasi 150 ppm dan 175 ppm. Data diolah dan dianalisis dengan menggunakan Microsoft Excel 2016. Hasil visual uji cakram didapat dilihat pada Gambar 15 dan data reratanya disajikan pada Tabel 12.



Gambar 15. Diameter Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. Calabura* L.) Terhadap *A. hydrophila*.

Data yang tersaji pada Tabel 12 didapatkan nilai tertinggi dari uji cakram didapatkan menggunakan konsentrasi 175 ppm pada perlakuan C memiliki nilai diameter rerata perlakuan paling tinggi yaitu 11,22 mm diikuti perlakuan B (150 ppm) dengan nilai 10,21 mm, dan perlakuan A (125 ppm) memiliki nilai rerata 9,82 mm. Setelah data didapatkan, kemudian dilakukan perhitungan analisis sidik ragam untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura*

L.) yang berbeda terhadap nilai uji cakram pada pengamatan terhadap *A. hydrophilla*.

Tabel 12. Data Diameter Daya Hambat (mm) Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. Calabura* L.) Terhadap *A. hydrophilla*.

Perlakuan	Ulangan (mm)			Total	Rerata (mm)
	1	2	3		
A (125 ppm)	9,89	9,94	9,63	29,46	9,82
B (150 ppm)	10,09	9,97	10,56	30,62	10,21
C (175 ppm)	11,36	11,32	10,99	33,67	11,22
Kontrol Positif (+)	19,18	18,67	18,43	56,28	18,76
Kontrol Negatif (-)	0	0	0	0	0

Tabel 13. Analisis Sidik Ragam Nilai Daya Hambat (mm) Uji Cakram.

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	3,15	1,58	28,46**	5,14	10,92
Acak	6	0,33	0,06			
Total	8	3,48	-			

** : Berbeda sangat nyata.

Data tabel sidik ragam menunjukkan F hitung > F5% dan F1%, sehingga dapat dikatakan dari penelitian pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari nilai uji cakram terhadap *A. hydrophilla*. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak yang berbeda, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Nilai Daya Hambat (mm) Uji Cakram.

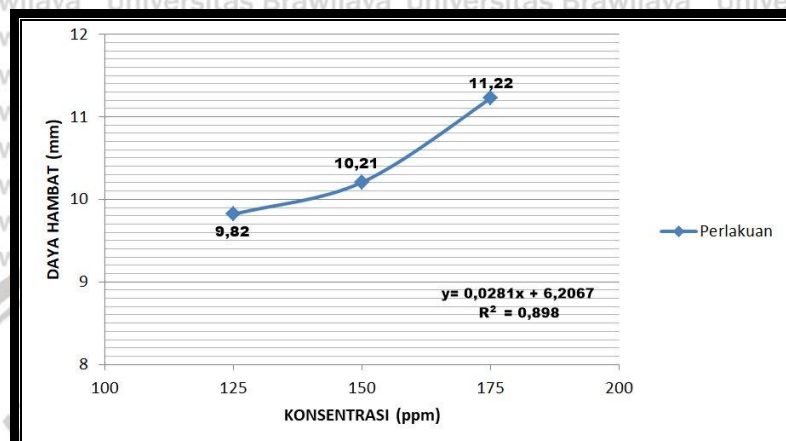
Perlakuan		A	B	C	Notasi
	Rerata	9,82	10,21	11,22	
A (125 ppm)	9,82	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	10,21	0,39*	0 ^{ns}		b
C (175 ppm)	11,22	1,40**	1,02*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Data tabel diatas diketahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda dari perlakuan A, B dan C memiliki pengaruh yang berbeda-beda daya hambat uji cakram yang bisa dilihat melalui notasi yang ditimbulkan, sehingga selanjutnya dilakukan pengujian *polynomial orthogonal* yang dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Daya Hambat.

Gambar diatas menunjukkan bahwa hubungan antara rerata nilai daya hambat dan konsentrasi ekstrak yang diberikan berbanding lurus, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka nilai daya hambatnya semakin tinggi. Nilai persamaan $y = 0,0281x + 6,2067$ yang memiliki koefisien determinasi (R^2) yakni 0,898 menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berpengaruh terhadap nilai daya hambat melalui uji cakram karena nilai mendekati 1.

Hasil pengujian diatas didapatkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin tinggi daya hambat yang dihasilkan yang dilihat melalui diameter uji cakram. Kandungan-kandungan yang terdapat pada ekstrak kasar daun kersen mampu sebagai anti-bakteri melawan *A. hydrophila*. Melalui karakterisasi diketahui senyawa fenol memiliki sifat sebagai anti-bakteri. Fenol sebagai metabolit anti-bakteri memiliki mekanisme dalam menghambat pertumbuhan bakteri terjadinya proses kerusakan membran sitoplasma dan

terjadinya denaturasi membran protein pada sel bakteri, sehingga bakteri akan terganggu sistem metabolismenya karena aktivitas-aktivitas metabolisme sel bakteri dipengaruhi oleh enzim yang merupakan protein (Zare *et al.*, 2014).

5.3 Penelitian Tahap Ketiga. Analisis Pemberian Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila* Secara Terkontrol (Laboratorium) (Pengujian *In-vivo*)

5.3.1 Analisa *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}) Ekstrak Kasar Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Hasil pengamatan *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}) tahap pertama dengan menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi dari ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) berturut-turut 0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm dengan jumlah ikan awal sebanyak 6 ekor didapatkan hasil kematian ikan terjadi sebelum 24 jam pengamatan melalui data pada Tabel 15.

Tabel 15. Hasil *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}) Ekstrak Kasar Daun Kersen (*M. calabura* L.) terhadap Ikan Mas (*C. carpio*).

Konsentrasi (ppm)	Keterangan (Tingkah Laku) Pengamatan
0	Ikan normal, berenang seperti biasanya, makan normal dan rakus. Tidak terjadi kematian pada ikan uji selama pengamatan.
100	Ikan umumnya berenang normal, berenang cenderung agresif dan makan pakan normal. Terjadi kematian ikan beberapa ekor selama pengamatan 24 jam.
200	Ikan berenang tidak normal, dan ikan lebih sering berenang dipermukaan sebelum terjadi kematian. Terjadi kematian semua ikan selama 18 jam pengamatan.
400	Tingkah laku ikan berenang cepat, berkumpul dipermukaan dan operkulum terbuka cepat. Terjadi kematian masal 4 jam setelah pemberian ekstrak.
600	Ikan berenang berputar-putar, lemas beberapa saat setelah pemberian ekstrak. Terjadi kematian masal 2 jam setelah pemberian ekstrak kasar.
800	Ikan bergerak agresif pada awal pemberian ekstrak, berenang berputar-putar dan terjadi kematian. Terjadi kematian masal 1 jam setelah pemberian ekstrak.
1000	Ikan sangat agresif, lompat dari media, berenang berputar-putar, dan terjadi kematian secara masal. Terjadi kematian ikan sebelum 1 jam setelah pemberian ekstrak.

Tabel diatas didapatkan data hasil pemaparan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dilihat dari konsentrasi terkecil 200 ppm sudah bisa dikatakan toksik dikarenakan menyebabkan kematian ikan mas (*C. carpio*) sebelum 24 jam dari pengamatan dengan kematian terjadi pada waktu 18 jam waktu pengamatan. Sedangkan dengan konsentrasi tertinggi 1000 ppm, ikan uji terjadi kematian sangat cepat yaitu sebelum 1 jam setelah pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) dengan ciri-ciri ikan berenang sangat agresif dan ikan berenang berputar-putar setelah itu ikan pasif dan terjadi kematian. Kondisi kematian ikan akibat pemaparan 1000 ppm dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Kematian Ikan Akibat Terpapar Ekstrak Daun Kersen (*M. calabura* L.) dengan Konsentrasi 1000 ppm.

Hasil pengamatan diduga kandungan metabolit sekunder akan bersifat toksik apabila terakumulasi secara berlebihan, seperti fenol yang bila jumlahnya melebihi batas bisa terjadi keracunan, iritasi (Tranggono dan Latifah, 2007), menyebabkan gangguan respirasi, menyebabkan ketidakseimbangannya sistim osmoregulasi dan ion-ion penting di dalam tubuh ikan, mengganggu sistim kerja imun dan menyebabkan kerusakan-kerusakan organ (Sari et al., 2014).

5.3.2 Analisa Lethal Dossage 50% (LD_{50}) Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Uji LD_{50} ikan mas yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* didapatkan hasil 10^7 yang terbaik karena rerata ikan mati mencapai setengahnya dari 6 ekor ikan uji

(Tabel 16). Sedangkan kepadatan bakteri *A. hydrophila* 10^{10} dan kepadatan 10^9 terjadi kematian ikan hingga mencapai 100% selama 96 jam uji.

Tabel 16. Hasil Uji *Lethal Dossage* 50% (LD_{50}) Ikan Mas (*C. carpio*) Terhadap *A. hydrophila*.

Kepadatan Bakteri	Keterangan
10^{10}	Selama 24 jam sudah terjadi kematian. Ikan berenang tidak normal (berenang berdiri), banyak ditemukan bercak-bercak merah, beberapa ikan terjadi kerusakan pada sirip, operkulum luka, makan normal sebelum 24 jam namun responnya menurun setelah 24 jam bahkan cenderung tidak memakan pakan. Ikan mati 100% selama diuji 96 jam.
10^9	Selama 24 jam telah terjadi kematian ikan. Ikan cenderung pasif didasar dan berkumpul di area aerasi. Gerakan ikan tidak normal. Bercak-bercak merah timbul setelah 24 jam. Respon makan menurun setelah 24 jam pengamatan. Ikan mati 100% setelah diuji selama 96 jam
10^8	Selama 24 jam terjadi kematian ikan. Ikan berenang agresif pada media pemeliharaan. Ditemukan luka pada operkulum dan bercak merah di beberapa lokasi tubuh. Respon makan menurun setelah 24 jam. Ikan dominan mati setelah diuji 96 jam.
10^7	Selama 24 jam belum ada kematian ikan. Ikan berenang tidak normal, bercak-bercak merah timbul setelah 48 jam, respon makan cenderung normal dan menurun setelah 48 jam. Ikan mati setengahnya dari 6 ekor ikan uji setelah diuji 96 jam.
10^6	Selama 24 jam belum ada kematian ikan. Ikan berenang cenderung normal, respon makan normal dan menurun setelah 48 jam. Terjadi kematian ikan setelah 72 jam. Ikan uji yang mati lebih sedikit dibandingkan semua perlakuan.

Hasil pengujian *Lethal Dossage* 50% (LD_{50}) Ikan Mas (*C. carpio*) Terhadap *Aeromonas hydrophila* dengan dosis $10^6 - 10^{10}$ didapatkan data semakin tinggi kepadatan bakteri yang menginfeksi, maka semakin tinggi nilai kematian. Dosis $10^8 - 10^{10}$ umumnya ditemukan gejala klinis yang hampir serupa, yaitu terjadinya penurunan nafsu makan setelah 24 jam, pergerakan pasif cenderung lebih banyak didasar media, dan ditemukan gejala-gejala seperti timbulnya bercak merah pada tubuh ikan, beberapa ikan terjadi kerusakan pada sirip terutama sirip dorsal, terjadi pendarahan pada bagian badan dan ada rusak bagian operkulum.

Untuk pengujian 10^7 ikan masih terlihat normal pada 24 jam pertama, namun

setelah 24 jam mulai tanda tidak normal seperti lebih pasif, nafsu makan mulai menurun. Ikan uji mati setengahnya dari 6 ekor ikan uji selama pengujian 96 jam.

Terakhir pengujian 10^6 ikan mati lebih sedikit dari semua pengujian dan ditemukan beberapa gejala klinis yang hampir sama dengan pengujian *Lethal Dossage* lainnya setelah 48 jam. Sesuai dengan pernyataan Mangunwardoyo *et al.* (2010), secara postulat koch infeksi *A. hydrophila* adapun gejala-gejala yang timbul berupa perubahan tingkah laku ikan yang signifikan yang menjadi lemah, tidak aktif, beberapa kerusakan pada sirip, bercak-bercak merah timbul pada badan yang diikuti oleh kematian ikan. Terjadinya kematian ikan pada pengujian *Lethal Dossage* pada umumnya dari hari pertama hingga hari keempat. Infeksi akan bertambah sejalan dengan pertumbuhan bakteri pada media dari hari ke hari. Karena 10^7 ikan mati setengah dari ikan uji maka digunakan sebagai dosis infeksi yang digunakan pada penelitian inti.

5.3.3 Analisa Gejala Klinis (*Symptom*)

a. Gejala Klinis Ikan Mas Tanpa Perlakuan (Kontrol Negatif)

Berikut tabel gejala klinis yang ditemukan ikan tanpa perlakuan pengobatan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura L.*) yang dipelihara selama 10 hari.

Tabel 17. Gejala-gejala Klinis Ikan Tanpa Perlakuan Pengobatan.

Hari Ke-	Keterangan (Tingkah Laku dan Gejala Klinis)
1 dan 2	▪ Respon makan mulai menurun setelah 24 jam. ▪ Ikan ada yang berenang agresif dan ada yang pasif di dasar media pemeliharaan. ▪ Ikan lebih sering mendekati sumber udara. ▪ Bukaam operkulum masih normal. ▪ Kondisi tubuh masih normal belum ditemukan bercak merah maupun kerusakan.
3 dan 4	▪ Ikan mulai pasif lebih banyak berada di dasar media. ▪ Respon makan sangat menurun. ▪ Bukaam operkulum mulai cepat terlihat. ▪ Mulai ditemukan bercak merah pada tubuh ikan dan dibeberapa ikan sudah terjadi lesi hingga pendarahan. ▪ Mulai terjadi kematian pada ikan.

	▪ Mukus ikan sangat banyak ditemukan pada ikan yang mati dan berbau sangat amis.
5 dan 6	▪ Ikan tetap pasif, kadangkala megap-megap dipermukaan. ▪ Respon makan sangat menurun. ▪ Mulai ditemukan kerusakan pada sirip, kerusakan tutup operkulum, perut membuncit, dan ada ikan terdapat benjolan di area perut. ▪ Terjadi kematian masal pada ikan. ▪ Warna darah pada ikan yang mati sangat gelap. ▪ Warna ikan banyak memucat.
7 dan 8	▪ Ikan terlihat lumpuh tergeletak didasar media (Gambar 18). ▪ Ada ikan berenang berdiri dan terlihat lumpuh pada sirip ekor karena tidak bergerak (Gambar 18). ▪ Ikan cenderung tidak mau makan pakan. ▪ Warna ikan dan insang sangat pucat. ▪ Banyak ikan yang masih bertahan hidup sisiknya mengelupas.
9 dan 10	▪ Ikan sudah tidak mau makan pakan. ▪ Ikan sangat pasif dan banyak tergeletak di dasar perairan. ▪ Banyak terjadi kematian pada ikan. ▪ Busa/buih banyak ditemukan pada permukaan air.

Gejala klinis yang ditemukan pada pemeliharaan ikan mas setelah diinfeksi bakteri *A. hydrophila* tanpa adanya pengobatan ekstrak, pengamatan secara visual ditemukan kerusakan-kerusakan pada bagian tubuh ikan mas seperti sirip terutama pada sirip ekor dan sirip dorsal, lesi, kerusakan tutup operkulum, insang memucat, sisik mengelupas, perut membuncit, terdapat benjolan yang mengeluarkan nanah, pendarahan, warna pucat dan beberapa bintik/bercak merah di sekitar tubuh ikan (Gambar 18). Tingkah laku ikan diamati abnormal seperti bukaan operkulum dan mulut cepat, gerakan ikan cenderung pasif dari awal hingga akhir pengamatan, bahkan ikan pada hari ke-7 ditemukan ikan yang tergeletak di dasar media dan berenang berdiri (Gambar 17). Melalui data yang didapatkan, sesuai dengan pernyataan Al-Yahya *et al.* (2017), ikan yang terserang *Aeromonas hydrophila* akan menyebabkan ikan lemah, lebih pasif dalam pergerakan dari biasanya, terjadinya inflamasi, nekrosis dan pendarahan-pendarahan di area tubuh ikan. Secara visual menurut Hardi *et al.* (2014), akibat septicemia aeromonas terlihat ikan lambat/pasif, adanya bercak-bercak merah,

perubahan warna yang memucat, hingga kerusakan-kerusakan yang terjadi pada sirip dan bagian tubuh lainnya.



Gambar 18. Gejala Patologi Klinis Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila*.

b. Gejala Klinis Ikan Pasca-Pengobatan

Berikut tabel gejala klinis yang ditemukan pada ikan yang diberi perlakuan pengobatan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) melalui perendaman dengan konsentrasi 125 ppm, 150 ppm dan 175 ppm yang sebelumnya diinfeksi bakteri *A. hydrophila* selama 24 jam kemudian dipelihara selama 10 hari.

Tabel 18. Gejala-gejala Klinis Ikan Pasca-Pengobatan Dengan Perlakuan.

Hari Ke-	Keterangan (Tingkah Laku dan Gejala Klinis)
1 dan 2	▪ Respon makan menurun. ▪ Ikan cenderung pasif. ▪ Ikan megap-megap dipermukaan. ▪ Bukaan operkulum cepat. ▪ Ada ikan terdapat bercak merah setelah 48 jam.
3 dan 4	▪ Respon makan normal. ▪ Ikan berenang cenderung agresif. ▪ Bukaan operkulum dan mulut normal. ▪ Ikan cenderung berada didasar. ▪ Terjadi kematian pada ikan. ▪ Banyak mukus dan buih ditemukan pada media pemeliharaan.
5 dan 6	▪ Respon makan normal dan lahap. ▪ Pergerakan normal kadang agresif. ▪ Bercak merah pada ikan sudah tidak terlihat. ▪ Ada ditemukan kematian pada ikan
7 dan 8	▪ Respon makan meningkat. ▪ Tidak ditemukan kerusakan pada badan ikan.

- | | |
|----------|--|
| 9 dan 10 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ada ditemukan kematian pada ikan. ▪ Ikan berenang normal. ▪ Warna ikan dari awal hingga akhir pengamatan tidak memucat. ▪ Ikan bergerak cenderung pasif berada di dasar media dan didekat aerasi. ▪ Respon makan normal. ▪ Tidak ditemukan kerusakan dari fisik luar secara visual bahkan insang masih terlihat normal dari beberapa sampel yang diamati. ▪ Ditemukan kematian ikan. |
|----------|--|

Pasca-pengobatan ikan terlihat pasif pada hari ke-1 dan ke-2 ditandai dengan berkumpul didasar media (Gambar 19). Ikan mulai terlihat normal pada hari ke-3. Ikan terlihat normal setelah hari ke-5 yang ditandai dengan makan normal (rakus) dan bukaan operkulum normal juga. Bercak merah yang ditemukan pada ikan juga menghilang pada hari ke-5. Selama pemeliharannya tidak ditemukan perubahan warna pucat pada ikan. Hingga akhir penelitian tidak ditemukan kerusakan-kerusakan pada tubuh ikan bahkan warna insang masih terlihat normal. Namun pada akhir penelitian ditemukan kematian pada ikan.



Gambar 19. Tingkah Laku Ikan Mas Pasca-Pengobatan Pasif Didasar Media Pada Perlakuan A (125 ppm) Pengamatan Hari Ke-2.

Data pengamatan setelah hari ke-10 ditemukan kembali bercak-bercak merah pada tubuh ikan, sehingga diduga bakteri kembali menyerang ikan. Hal ini karena ekstrak daun kersen hanya bersifat bakteriostatik yang hanya menghambat bakteri tanpa mematikan bakteri (Muller, 2016). Perlunya

pendaman kembali dengan ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) setelah hari ke 10 untuk pengobatan supaya gejala-gejala klinis ataupun penyakit akibat bakteri *A. hydrophila* tidak timbul kembali terjadi pada ikan mas.

5.3.4 Analisa Kelulushidupan (SR) Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Hasil analisis kelulushidupan ikan mas yang dipelihara selama 10 hari, kemudian dilakukan uji sidik ragam. Data diolah dengan menggunakan Microsoft Excel 2016. Hasil data nilai kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) dari masing-masing perlakuan dihitung dalam bentuk persentase (%) disajikan pada Tabel 19 dan data nilai kelulushidupan per-harinya dapat dilihat pada Lampiran 8.

Tabel 19. Nilai Kelulushidupan (%) Ikan Mas (*C. carpio*).

Perlakuan	Ulangan (%)			Total	Rerata (%)
	1	2	3		
A (125 ppm)	60	70	60	190	63,33
B (150 ppm)	80	80	80	240	80
C (175 ppm)	80	90	90	260	86,67
Kontrol Positif (+)	100	100	90	290	96,67
Kontrol Negatif (-)	40	20	00	60	20

Data diatas diketahui nilai kelulushidupan tertinggi didapatkan dengan menggunakan konsentrasi 175 ppm pada perlakuan C dengan nilai rerata perlakuan hingga 86,67%, diikuti dengan perlakuan B dengan konsentrasi 150 ppm memiliki nilai 80%, dan terakhir perlakuan A dengan konsentrasi uji 125 ppm memiliki persentase nilai kelulushidupan sebesar 63,3%. Setelah didapatkan data kemudian dilakukan perhitungan analisis sidik ragam untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda terhadap kelulushidupan ikan mas yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

Data tabel sidik ragam menunjukan nilai F hitung > F5% dan F 1%, sehingga dapat dikatakan dari penelitian pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M.*

calabura L.) berpengaruh sangat nyata terhadap kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophilla*. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak yang berbeda, dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), yang dilihat pada Tabel 21.

Tabel 20. Analisis Sidik Ragam Nilai Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	866,67	433,33	19,50**	5,14	10,92
Acak	6	133,3	22,22			
Total	8	1000	-			

** : Berbeda sangat nyata.

Tabel 21. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Kelulushidupan Ikan Mas (*C. carpio*).

Perlakuan		A	B	C	Notasi
	Rerata	63,33	80	86,67	
A (125 ppm)	63,33	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	80	16,67*	0 ^{ns}		b
C (175 ppm)	86,67	23,33**	6,67*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

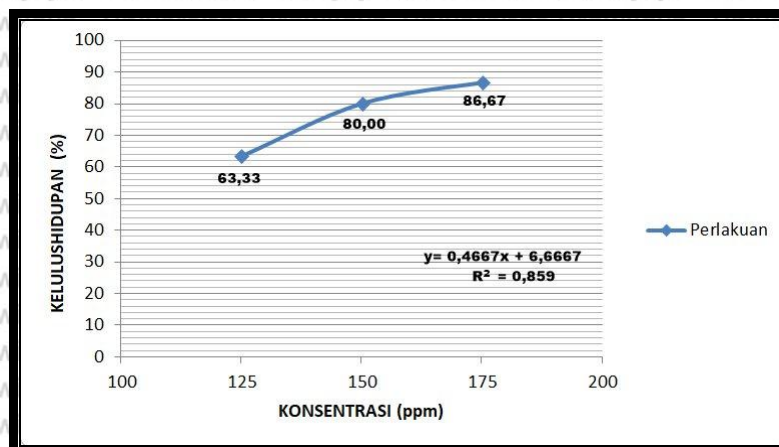
(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Data tabel diatas diketahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda dari perlakuan A, B dan C memiliki pengaruh yang berbeda-beda terhadap kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) yang bisa dilihat melalui notasi yang didapat, sehingga selanjutnya dilakukan analisa *polynomial orthogonal* yang ditunjukkan pada Gambar 20.

Grafik diatas menunjukan bahwa hubungan antara rata-rata nilai kelulushidupan dan konsentrasi ekstrak berbanding lurus, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka tingkat kelulushidupan semakin tinggi dan didapatkan persamaan $y = 0,4667x + 6,6667$ yang memiliki koefisien determinasi (R^2) yakni 0,859 menunjukan konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M.*

calabura L.) yang berpengaruh terhadap persentase kelulushidupan ikan mas (*C. carpio*) karena nilai mendekati 1.



Gambar 20. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Kelulushidupan Ikan Mas.

Hasil-hasil pengujian diatas didapatkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin tinggi pula nilai kelulushidupan. Kandungan-kandungan yang terdapat pada ekstrak kasar daun kersen mampu sebagai anti-bakteri yang baik terhadap bakteri *A.hydrophila*. Hasil dari pengujian fitokimia didapatkan senyawa yang terkandung pada daun kersen yaitu flavonoid yang merupakan senyawa anti-bakteri. Menurut Cushnie dan Lamb (2005), senyawa flavonoid yang merupakan golongan fenol sebagai anti-bakteri mampu menghambat fungsi membran sitoplasma dan menghambat semua sumber-sumber energi dalam proses metabolisme yang menjadi sumber kehidupan bakteri. Zat anti-bakteri menghalangi fungsi penting membran plasma yang dapat mengakibatkan kematian sel sehingga bakteri tidak mampu tumbuh dan berkembang. Membran plasma bakteri bersifat semipermeabel yang mengatur substansi keluar dan masuk kedalam sel. Kerusakan membran menjadikan ion organik penting, koenzim, dan asam amino merembes keluar dari sel. Kerusakan membran plasma ini menghambat atau merusak kemampuan bakteri bertindak sebagai penghalang terjadinya proses osmosis didalam tubuh bakteri (Afifi dan Erlin, 2017).

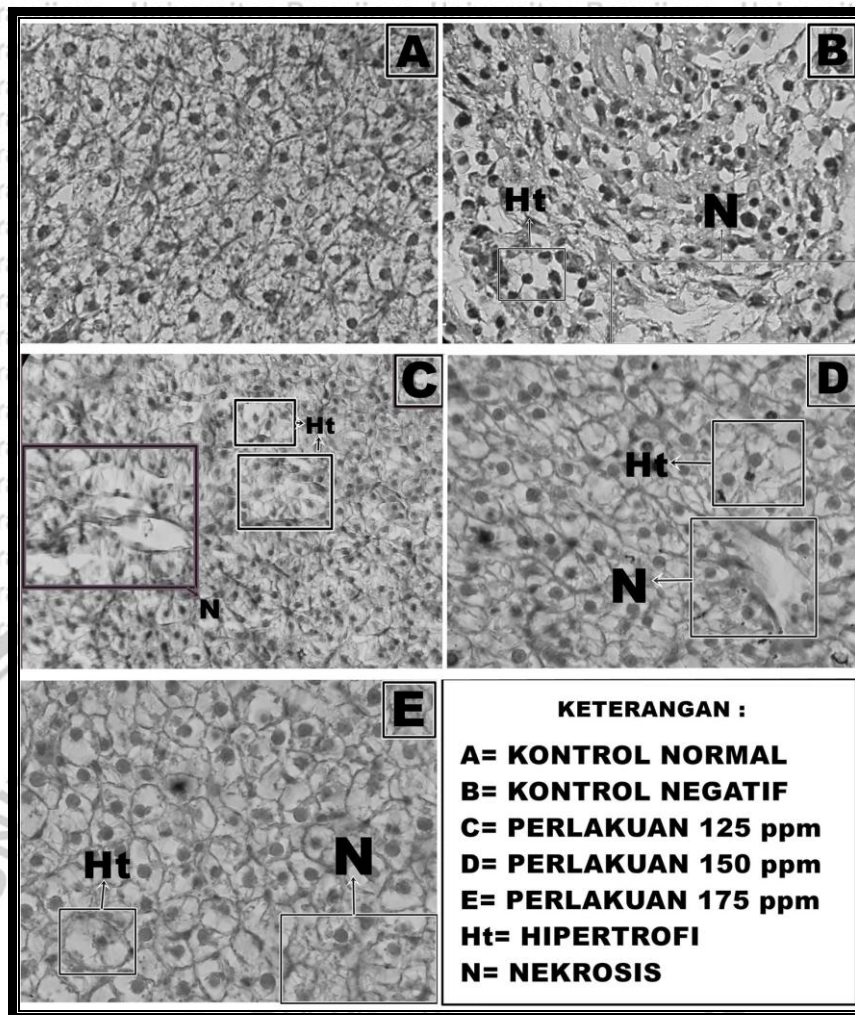
5.3.5 Analisa Histopatologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Histopatologi merupakan suatu pengujian untuk mengidentifikasi kerusakan-kerusakan tertentu akibat suatu infeksi dengan menguji jaringan atau sel yang memiliki hubungan terhadap penyakit yang sedang dialami (Gupta *et al.*, 2009).

Pemeriksaan histopatologi pada ikan dapat memberikan informasi adanya perubahan akibat terinfeksi oleh patogen dengan mendeteksi adanya perubahan abnormal ditingkat jaringan (Safratilofa, 2017). Kerusakan histologi disebabkan oleh banyak faktor, yang salah satunya oleh bakteri. Bakteri yang menyebabkan kerusakan histologi umumnya yang menyerang ikan di perairan yaitu *Aeromonas hydrophila* (Sukarni *et al.*, 2012).

Hati merupakan organ yang sangat rentan mengalami kerusakan histologi akibat bakteri *Aeromonas hydrophila*. Patologi hati yang teramati meliputi kerusakan-kerusakan nekrosis dan hipertrofi (Firdaus, 2017 dan Talwani *et al.*, 2011). Adapun pengamatannya dapat dilihat pada Gambar 21.

Penelitian ini dilakukan pengamatan tentang gambaran jaringan hati ikan mas (*C. carpio*) yang diberi konsentrasi pengobatan yang berbeda melalui perendaman yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini menggunakan konsentrasi A (125 ppm), B (150 ppm) dan C (175 ppm). Ikan dipelihara selama 10 hari. Hari ke-10 dilakukan pembedahan dan diambil organ hati ikan untuk dilakukan preparasi. Setelah dilakukan preparasi dan pewarnaan dengan Hemaktosilin Eosin (HE) pada preparat kaca (*object glass*), organ hati dilakukan skoring yang dapat dilihat pada Lampiran 9 untuk menganalisis histopatologi hati ikan. Analisis data kerusakan pada jaringan hati yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan dengan pemberian perendaman ekstrak kasar daun kersen (*M. callabura* L.) yang dilihat melalui kerusakan hipertrofi dan nekrosis adalah sebagai berikut.



Gambar 21. Hasil Pengamatan Histopatologi Hati Ikan Mas. A. Kontrol (+), B. Kontrol (-), C. Perlakuan A (125 ppm), D. Perlakuan B (150 ppm) dan E. Perlakuan C (175 ppm). Pengamatan Diamati Melalui Mikroskop dengan Perbesaran 1000x.

a. Hipertrofi

Kerusakan hati akibat hipertrofi merupakan peningkatan volume atau ukuran sel, dimana jumlah selnya tetap (Bhattacharya, 2009). Dampak ini secara tidak langsung diakibatkan oleh bakteri terjadinya sindrom seperti sepsis (keadaan dimana tubuh bereaksi hebat terhadap serangan bakteri), sehingga terjadinya pembentukan abses (nanah) akibat adanya komplikasi infeksi bakteri yang masif (Talwani *et al.*, 2011).

Melalui pernyataan diatas, maka dilakukan pengamatan histopatologi terhadap kerusakan akibat hipertrofi yang terjadi pada jaringan hati ikan mas (C.

carpio). Untuk menghirung kerusakan dilakukan skoring. Kemudian dilakukan uji sidik ragam. Data diolah dengan menggunakan Microsoft Excel 2016. Rata-rata nilai kerusakan hati akibat hipertrofi dapat dilihat pada Tabel 22.

Tabel 22. Nilai Rata-rata Skoring Kerusakan Hipertrofi.

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	2,33	2,00	2,33	6,66	2,22
B (150 ppm)	2,00	1,67	1,67	5,34	1,78
C (175 ppm)	1,33	1,33	1,67	4,33	1,44
Kontrol Positif (+)	1,00	1,00	1,33	3,33	1,11
Kontrol Negatif (-)	3,00	3,33	3,00	9,33	3,11

Data pada tabel didapatkan nilai rata-rata kerusakan skoring hipertrofi terendah didapatkan perlakuan C (175 ppm) yaitu 1,44, diikuti dengan perlakuan B dengan konsentrasi 150 ppm memiliki nilai 1,78, dan terakhir perlakuan A (125 ppm) memiliki nilai rerata sebesar 2,22. Setelah data didapatkan kemudian dilakukan perhitungan analisis sidik ragam untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda terhadap nilai hipertrofi ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

Tabel 23. Analisis Sidik Ragam Nilai Hipertrofi Hati Ikan Mas (*C. carpio*).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	0,910	0,455	12,28**	5,14	10,92
Acak	6	0,222	0,037			
Total	8	1,132	-			

** : Berbeda sangat nyata.

Data tabel sidik ragam menunjukkan nilai F hitung > F5% dan F 1%, sehingga dapat dikatakan dari penelitian pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) berpengaruh sangat nyata terhadap nilai hipertrofi hati ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophilla*. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak yang berbeda terhadap perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), yang dilihat pada Tabel 24.

Tabel 24. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Hipertrofi Hati Ikan Mas (*C. carpio*).

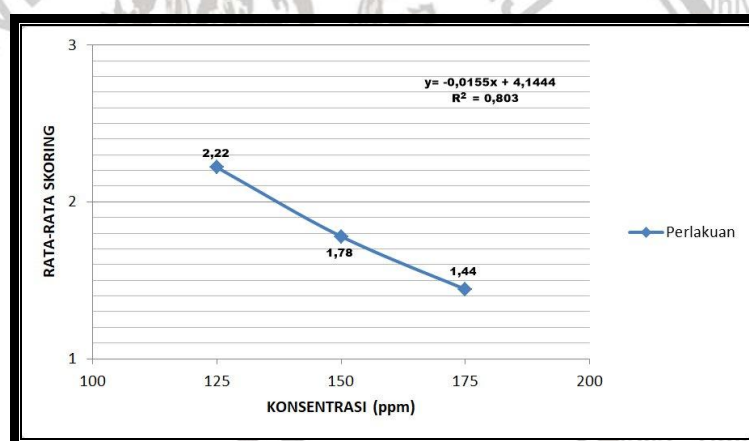
Perlakuan		C	B	A	Notasi
	Rerata	1,44	1,78	2,22	
C (175 ppm)	1,44	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	1,78	0,34*	0 ^{ns}		b
A (125 ppm)	2,22	0,78**	0,44*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Data tabel diatas diketahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda dari perlakuan A, B dan C memiliki pengaruh yang berbeda-beda terhadap nilai hipertrofi hati ikan mas (*C. carpio*) yang bisa dilihat melalui notasi yang didapat, sehingga selanjutnya dilakukan analisa *polynomial orthogonal* yang ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Hipertrofi.

Grafik diatas menunjukkan bahwa hubungan antara rata-rata nilai kerusakan hipertrofi hati ikan dengan konsentrasi ekstrak berbanding terbalik, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka tingkat kerusakan hipertrofi semakin rendah dan didapatkan persamaan $y = -0,0155x + 4,1444$ yang memiliki koefisien determinasi (R^2) yakni 0,803 menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berpengaruh terhadap persentase tingkat kerusakan akibat hipertrofi hati ikan mas (*C. carpio*) karena nilai mendekati 1.

b. Nekrosis

Nekrosis merupakan proses kematian atau kerusakan sel akibat faktor eksternal seperti infeksi ataupun cedera yang tersengaja oleh suatu patogen (Supriyadi, 2009). Nekrosis yang umumnya terjadi akibat adanya infeksi bakteri yaitu nekrosis koagulatif dan nekrosis likuefaktif (Tambayong, 2000). Nekrosis koagulatif terjadi dimana suatu jaringan mengalami kerusakan akibat kekurangan suplai darah yang ditandai dengan pembentukan seperti gel (gelatin, albumin dan protein lainnya). Koagulasi terjadi akibat denaturasi yang menyebabkan albumin menjadi keras (Rubin dan Strayer, 2008). Nekrosis likuefaktif adalah tipe nekrosis respon akibat serangan mikroorganisme seperti bakteri pada suatu jaringan sebagai reaksi leukosit polimorfonuklear adanya inflamasi akut yang mengandung hidrolase kuat yang mampu mencerna kerusakan sel atau sel mati pada jaringan yang mengalami kerusakan. Dari kerusakan tersebut maka terbentuknya rongga yang berisikan nanah (abses) (Rubin dan Reisner, 2009).

Data rata-rata nilai kerusakan hati akibat nekrosis dapat dilihat pada Tabel 25.

Tabel 25. Nilai Rata-rata Skoring Kerusakan Nekrosis.

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	2,33	2,33	2,67	7,33	2,44
B (150 ppm)	2,00	2,33	2,00	6,33	2,11
C (175 ppm)	1,67	1,33	1,67	4,67	1,56
Kontrol Positif (+)	1,33	1,00	1,00	3,33	1,11
Kontrol Negatif (-)	3,66	3,00	3,33	9,33	3,33

Melalui pengamatan skoring Tabel 25 didapatkan nilai rata-rata kerusakan skoring nekrosis terendah didapatkan perlakuan C (175 ppm) yaitu 1,44, diikuti dengan perlakuan B dengan konsentrasi 150 ppm memiliki nilai 2,11, dan terakhir perlakuan A (125 ppm) memiliki nilai rerata sebesar 2,33. Setelah data didapatkan kemudian dilakukan perhitungan analisis sidik ragam untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (M.

calabura L.) yang berbeda terhadap nilai nekrosis ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*.

Tabel 26. Analisis Sidik Ragam Nilai Nekrosis Hati Ikan Mas (*C. carpio*).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	1,203	0,602	15,92**	5,14	10,92
Acak	6	0,227	0,038			
Total	8	1,430	-			

** : Berbeda sangat nyata.

Data tabel sidik ragam menunjukkan nilai F hitung > F5% dan F 1%, sehingga dapat dikatakan dari penelitian pemberian ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) berpengaruh sangat nyata terhadap nilai nekrosis hati ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophilla*. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak yang berbeda terhadap perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), yang dilihat pada Tabel 27.

Tabel 27. Analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Nekrosis Ikan Mas (*C. carpio*).

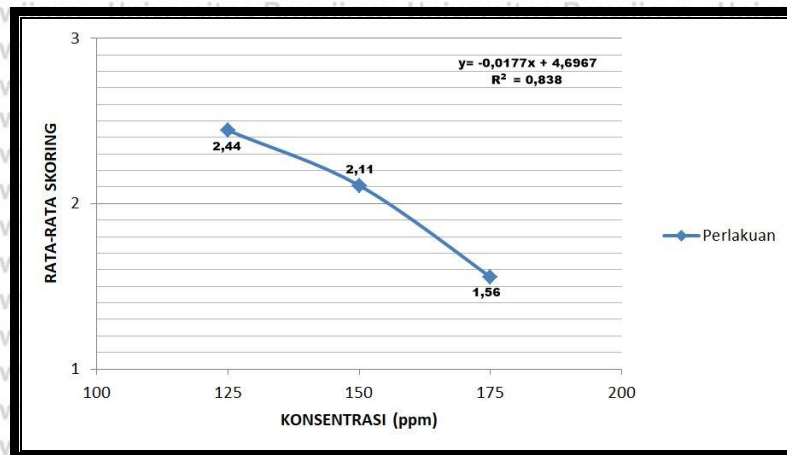
Perlakuan	C				Notasi
	Rerata		B	A	
C (175 ppm)	1,56	0 ^{ns}		2,44	a
B (150 ppm)	2,11	0,55*	0 ^{ns}		b
A (125 ppm)	2,44	0,89**	0,33*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Data tabel diatas diketahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berbeda dari perlakuan A, B dan C memiliki pengaruh yang berbeda-beda terhadap nilai nekrosis hati ikan mas (*C. carpio*) yang bisa dilihat melalui notasi yang didapat, sehingga selanjutnya dilakukan analisa *polynomial orthogonal* yang ditunjukkan pada Gambar 23.



Gambar 23. Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Nekrosis.

Grafik menunjukkan hubungan antara rata-rata nilai kerusakan nekrosis hati ikan dengan konsentrasi ekstrak berbanding terbalik, yakni semakin tinggi ekstrak yang diberikan, maka tingkat kerusakan hipertrofi semakin rendah dan didapatkan persamaan $y = -0,0177x + 4,6967$ yang memiliki koefisien determinasi (R^2) yakni 0,838 menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) yang berpengaruh terhadap presentase tingkat kerusakan akibat nekrosis hati ikan mas (*C. carpio*) karena nilai mendekati 1.

c. Pembahasan Mekanisme Invasi Bakteri dan Histopatologi Hati

Mekanisme penyerangan *Aeromonas hydrophila* umumnya sebagai infeksi kedua atau penyerangan akibat rusaknya kualitas air pemeliharaan, ikan terkena parasit dan terjadi luka akibat ikan bergesekan. Bakteri menyerang tubuh ikan diawali dengan melekatnya pada badan ikan dengan menggunakan fili, flagela dan kait yang menempel kuat pada lapisan luar ikan yaitu sisiknya. Kemudian bakteri ini menghasilkan enzim-enzim yang salah satunya enzim kitinase yang merusak lapisan kitin pada sisik dan permukaan kulit ikan sehingga mudah masuk ke tubuh ikan (Mangunwardoyo *et al.*, 2010). Faktor inilah yang membuat adanya tanda bercak-bercak merah pada tubuh ikan, karena sifatnya

mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inangnya (Baehaki *et al.*, 2004).

Aeromonas masuk kedalam tubuh ikan melalui mulut, darah maupun operkulum dan insang. *Aeromonas* berkembang biak, membentuk koloni dan tumbuh pada organ-organ pencernaan terutama pada usus ikan (Afrianto *et al.*, 2015). Menurut Olga (2012), untuk menyerang inangnya, bakteri ini

menghasilkan bermacam-macam toksin antara lain eksotoksin, seperti hemolisin dan endotoksin. Eksotoksin yang dihasilkan bakteri berupa hemolisin α dan β merupakan enzim bersifat toksik, yang dapat melisis sel darah merah, berperan dalam meningkatkan permeabilitas sel, sehingga sel lebih mudah rusak dan rentan terhadap agen infeksi (Khusnan *et al.*, 2012). Endotoksin yang dihasilkan bakteri berupa LPS (lipopolisakarida) yang menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi seperti interleukin-1 dan tumor nekrosis faktor- α dan mengaktifkan komplemen yang menyebabkan terjadinya peradangan dan kerusakan-kerusakan jaringan hingga faktor koagulasi (Takahashi *et al.*, 2012).

Metabolit toksin yang dihasilkan oleh *Aeromonas* inilah yang menyebabkan kerusakan-kerusakan organ dalam pada pencernaan yang salah satunya adalah organ hati ikan dengan merusak sel hepatosit (Haryani *et al.*, 2012). Kerusakan hepatosit yang serius akan menyebabkan kerusakan jaringan seperti ditemukan hipertrofi dan nekrosis (Kim *et al.* 2008).

Dilihat melalui kerusakan hati yang terjadi pada perlakuan kontrol negatif atau ikan hanya diinfeksi *A. hydrophila* tanpa adanya pengobatan, kerusakan nekrosis lebih tinggi terjadi dibandingkan kerusakan hipertrofi (Lampiran 9), dan kerusakan nekrosis yang banyak ditemukan yaitu bertipe nekrosis likuefaktif.

Nekrosis likuefaktif merupakan tipe kerusakan jaringan yang paling umum terjadi pada ikan, karena ketika terjadi kerusakan di dalam jaringan, enzim akan merusak/menghilangkan sel yang terjadi nekrosis dan mengganti isi kekosongan

sel tersebut dengan meninggalkan luka ulseratif. Hal ini dilakukan untuk bertahan dari serangan bakteri patogen di dalam air untuk selanjutnya. Semakin tinggi abses terjadi maka semakin tinggi perlawanan terhadap bakteri. (Plumb dan Hanson, 2011).

Hasil pengamatan penggunaan ekstrak kasar daun kersen (*M. calabura* L.) konsentrasi 125 ppm, 150 ppm dan 175 ppm sebagai pengobatan terhadap histopatologi hati ikan mas (*C. carpio*) yang dilakukan penginfeksi bakteri *A. hydrophila* ditemukan hipertrofi dan nekrosis. Kerusakan hipertrofi dan nekrosis pada hati ikan diketahui semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, maka semakin menurun nilai kerusakan yang terjadi. Dari hasil yang dianalisa mengemukakan bahwa perlakuan C (175 ppm) mendapatkan nilai rerata kerusakan paling rendah dibandingkan 2 perlakuan lainnya. Dilihat dari nilai kelulushidupan konsentrasi 175 ppm mendapatkan nilai tertinggi dibandingkan dengan 2 perlakuan lainnya yang dilihat melalui grafik pengamatan (Gambar 19). Sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi 175 ppm dapat menurunkan kerusakan histopatologi hati ikan mas (*C. carpio*) dan merupakan dosis maksimal sebagai pengobatan. Menurut Priharjo (1995), dosis maksimal merupakan suatu dosis yang memberikan efek pengobatan yang cukup tinggi berpengaruh tanpa adanya efek samping *lethal* (kematian).

Hasil pengujian melalui karakterisasi dan fitokimia diketahui golongan fenol dominan di dalam daun kersen (*M. calabura* L.) dan berpotensi memiliki sifat sebagai antibakteri. Fenol merupakan suatu senyawa aromatik yang banyak ditemukan di alam terutama pada tumbuh-tumbuhan yang bisa di temui pada semua bagian tumbuhan seperti daun, batang, akar, buah dan biji-bijian (Lestari et al., 2018). Pada penelitian ini derivatif-derivatif fenol yang ditemukan pada daun kersen senyawa flavonoid, tanin dan fenil propanoid dari golongan eugenol.

Senyawa fenol diketahui sebagai antibakteri bersifat lipofilik yang mampu merusak dan menghambat fungsi kerja membran plasma mikroba (Kurniawati, 2015). Sesuai dengan pernyataan Purwantiningsih et al. (2014), mekanisme gugus OH pada senyawa fenol sebagai antibakteri mengganggu sistem kerja enzimatis bakteri serta mendenaturisasi protein sehingga terjadinya kerusakan pada dinding sel dan merusak membran plasmanya karena penurunan dari permeabilitasnya. Akibat bocornya dan perubahan permeabilitas membran sitoplasma maka terganggunya sistem transportasi ion-ion penting ke dalam sel sehingga terganggunya pertumbuhan atau proliferasi bakteri hingga terjadinya kematian sel.

Sebagai pengobatan, eugenol dan flavonoid yang merupakan derivatif fenol dapat menekan sitokin dan radikal bebas atau racun, yang merupakan agen penyebab peradangan akibat infeksi patogen dan bertindak sebagai antioksidan alami (Utami dan Puspaningtyas, 2013). Fungsi eugenol sebagai antioksidan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan (patogen) sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Rorong, 2008). Pemutusan rantai radikal bebas diperlukan untuk mencegah dan mengurangi dampak negatif radikal baru yang dapat menyebabkan kerusakan-kerusakan pada tubuh (Sayuti dan Yenrina, 2015). Penyebab kerusakan sel diakibatkan tidak seimbangnya antara radikal bebas yang disebabkan oleh patogen dengan antioksidan alami di dalam tubuh (enzim dan vitamin) sehingga terjadinya stres oksidatif pada sel hingga peradangan dan kerusakan. Fungsi flavonoid sendiri membantu kekurangan antioksidan alami yang dihasilkan tubuh melawan patogen, sehingga terjadinya proses regenerasi sel dengan baik dan melindungi sel tersebut (Simajuntak, 2012).

Berdasarkan pernyataan-pernyataan diatas, diketahui kandungan fenol dan derivatifnya didalam ekstrak daun kersen (*M.calabura* L.) mampu sebagai bahan

alami untuk pengobatan dilihat dari uji histopatologi hati ikan mas (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

5.3.6 Analisa Kualitas Air Pengamatan

Data penunjang penelitian yaitu dilakukan pengujian parameter kualitas air pada media air pemeliharaan ikan mas. Parameter-parameter yang diujikan pada penelitian ini yaitu, pH, suhu dan oksigen terlarut yang diukur menggunakan termometer, pH-meter dan DO-meter. Parameter kualitas air tersebut sudah cukup mewakili parameter lainnya karena termasuk parameter yang mempengaruhi kehidupan didalam badan air. Data-data penelitian tersebut tersajikan pada Tabel 28.

Tabel 28. Data Pengamatan Kualitas Air Selama Pemeliharaan 10 Hari.

Parameter Kualitas Air Pengamatan	Data Kualitas Air Pengamatan
pH	7 - 7,6
Suhu	22 – 24,1 °C
Oksigen Terlarut	4,4 – 5,3 mg/L

Penelitian yang dilakukan selama 10 hari didapatkan data kisaran pH 7 - 7,6 nilai suhu didapatkan kisaran nilai 22 - 24,1 °C dan oksigen terlarut didapatkan nilai 4,4 – 5,3 mg/L. Nilai-nilai tersebut masih dikatakan normal untuk tempat hidup ikan mas. Santoso (1993), mengemukakan suhu yang normal untuk habitat hidup ikan mas yaitu kisaran 20 - 25 °C. Nilai pH yang baik untuk kelangsungan hidup ikan yaitu diantara kisaran 6,5 – 9, bila terlalu rendah/tinggi akan mengganggu sistem metabolisme ikan (Boyd dan Tucker, 1998). Nilai oksigen terlarut yang baik untuk ikan mas yaitu kisaran 4 – 5 ppm, bahkan dalam kondisi darurat (ekstrim) ikan mas mampu hidup pada air yang berkadar oksigen <2 ppm (Tim Agriminakultura, 2014).

Sebagai bakteri oportunistik *A. hydrophila* mampu hidup disegala suhu, pH dan oksigen terlarut pada media perairan, dari yang optimal hingga yang ekstrim

sekalipun. Sesuai dengan pernyataan Rouf dan Rigney (1971), sebagai bakteri gram negatif *Aeromonas hydrophila* mampu beradaptasi dengan segala temperatur yang terjadi diperairan. *Aeromonas* mampu hidup pada suhu minimum 0°C dan suhu maksimum 55°C dengan suhu optimal 15-35 °C. Dilihat dari kadar pH-nya *Aeromonas* mampu hidup pada pH ekstrim hingga 4,8 (Hunt *et al.*, 1981). Oksigen terlarut dibawah 5 ppm membuat bakteri ini menjadi lebih oportunistis pada inangnya karena bakteri ini mampu hidup didalam perairan dengan kelarutan oksigen hingga titik terendah (Doyle, 1989). Melalui hasil pengujian kualitas air yang didapat diketahui media tempat pemeliharaan ikan mas (*C. carpio*) yang dilakukan penginfeksi cukup optimal, sehingga mampu menginvasi inangnya.



6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian, maka diperoleh kesimpulan yaitu:

- Melalui uji karakterisasi didapatkan hasil daun kersen mengandung dominan metabolit fenol yang dilihat dari fraksi ke-3 sebagai fraksi terbaik dalam uji antibakteri dan melalui serangkaian uji UV-Vis, FTIR dan GCMS. Metabolit fenol ini juga memiliki pengaruh sebagai anti-bakteri terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Hasil uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) didapatkan hasil 125 ppm sebagai konsentrasi minimum untuk daya hambat terhadap *Aeromonas hydrophila*. Melalui uji cakram menggunakan konsentrasi (A) 125 ppm, (B) 150 ppm dan (C) 175 ppm didapatkan perlakuan 175 ppm memiliki diameter daya hambat terbaik dengan rerata nilai daya hambat 11,22 mm.
- Analisis histopatologi hati ditemukan kerusakan hipertrofi dan nekrosis. Hasil dari pengobatan didapatkan perlakuan C (175 ppm) dengan nilai terbaik sebagai dosis maksimal, karena didapatkan nilai paling rendah dari 2 perlakuan lainnya terhadap kerusakan akibat nekrosis dan hipertrofi tanpa menyebabkan kematian yang dibuktikan melalui nilai kelulushidupan yang tinggi yaitu sebesar 86,67%.

6.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dengan dosis 175 ppm, diharapkan dilakukan pengujian histopatologi selain hati ikan mas dan dilakukan perendaman kembali ekstrak daun kersen (*M. calabura* L.) setelah 10 hari untuk pengobatan dikarenakan kembali ditemukan gejala klinis akibat *Aeromonas hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. 2013. Peran Ekstrak Kasar Fenol *Glacilarila verrucosa* Untuk Meningkatkan Respon Imun Non Spesifik Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Tesis. Program Pasca Sarjana Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Adanir, D. and H. Turutoglu. 2007. Isolation and Antibiotic Susceptibility Of *Aeromonas hydrophila* In A Carp (*Cyprinus carpio*) Hatchery Farm. *Bulletin Vet Inst Pulawy*. 51, 361-364.
- Afifi, R. Dan E. Erlin. 2017. Uji Anti Bakteri Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) Terhadap Zona Hambat Bakteri Jerawat *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 17(2): 321-330.
- Afifah, E. dan Tim Lentera. 2003. Khasiat & Manfaat Temulawak: Rimpang Penyembuh Aneka Penyakit. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 68 hlm.
- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris dan Henri. 2015. Penyakit Ikan. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 220 hlm.
- Alen, Y., F. Agresa dan Y. Yuliandra. 2017. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas *Antihiperurisemia* Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 3(2): 146-152.
- Alimuddin, A., M. Mardjan, S. Matsjeh, C. Anwar, Mustofa and E. Sholikhah. 2011. Synthesis 7-Hydroxy-3',4'-Dimethoxyisoflavon From Eugenol. *Indo Journal Chem*. 11(2): 163-168.
- Aliza, D. 2014. Gambaran Perilaku dan Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Mengalami Stres Kepadatan. *Jurnal Medika Veterinaria*. 8(1): 80-83.
- Al Yahya, S., F. Ameen, K. Al-Niameen, B. Al-Sa`adi, S. Hadi dan A. Mostafa. 2017. Histopathological Studies of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Blue Tilapia, *Oreochromis aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25(2018): 182-185.
- Amin, L. 2014. Pemilihan Antibiotik yang Rasional: Medical Review. *MEDICINUS*. 27(3): 40-45.
- Anam, C., Sirojudin dan F. Sofjan. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji Bensin dan Spritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Berkala Fisika*. 10(1): 79-85.
- Andareto, O. 2015. Apotik Herbal di Sekitar Anda (Solusi Pengobatan 1001 Penyakit Secara Alami dan Sehat Secara Efek Samping. Pustaka Ilmu Semesta. Jakarta. 192 hlm.
- Andries, J., P. Gunawan dan A. Supit. 2014. Uji Efek Anti Bakteri Ekstrak Bunga Cengkeh Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Secara In Vitro. *Jurnal e-GiGi*. 2(2): 1-8.
- Anggraeni, D., Qomariyah dan Khalidah. 2015. Penyebaran Dan Budidaya Ikan Air Tawar Di Pulau Jawa Berbasis Web. *Prosiding SNST ke-6 Tahun 2015 Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang*. E17. 101-105.

- Ansari, M., A. Anurag, Z. Fatima and S.Hameed. 2013. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. *Formatex*. 1(1): 1189-1195.
- Arifianti, L., R. D. Oktarina dan I. Kusumawati. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Plant Husada*. 2(1): 1-4.
- Arisworo, D., Yusa dan N. Sutresna. 2006. IPA Terpadu (Biologi, Kimia, Fisika). Grafindo Media Pratama. Bandung. 317 hlm.
- Arum, Y., Supartono dan Sudarmin. 2012. Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal MIPA*. 35(2): 165-174.
- Asniatih, Idris M., dan Sabilu K. 2013. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. 3(12), 13-21.
- Aziz, T., R. Cindo dan A. Fresca. 2009. Pengaruh Pelarut Heksana dan Etanol, Volume Pelarut, dan Waktu Ekstraksi Terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Kopi. *Jurnal Teknik Kimia*. 1(16): 1-8.
- Bachtiar, Y. dan Lentera. 2002. Pembesaran Ikan Di Kolam Pekarangan. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 80 hlm.
- Baehaki, A., T. Nurhayati dan M. Suhartono. 2004. Karakterisasi Protease Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. 8(2): 65-79.
- Bhattacharya, G. 2009. Concise Pathology For Exam Preparation. Elsevier. India. 550 pp.
- Biamon, E. and T. Hazen. 1983. Survival and Distribution of *Aeromonas hydrophila* in Near-Shore Coastal Water of Puerto Rico Receiving Rum Distillery Effluent. *Journal of Water Res*. 17(3): 319-326.
- Birasal, N. 2013. Jamaica Cherry is the Best Tree to Grow on Roadsides: Brought From Tropical America is Naturalized Throughout Southeast Asia. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*. 2(1): 1-2.
- Bohm, B. 1998. Introduction to Flavonoids. Harwood Academic Publisher. The Netherlands. 479 pp.
- Boyd, C. and C. Tucker. 1993. Pond Aquaculture Water Quality Management / Edition 1. Kluwer Academic Publisher. Springer US. 700 pp.
- Buhian, W., R. Rubio, D. Valle Jr. and J. Martin-Puzon. 2016. Bioactive Metabolite Profiles and Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts from *Muntingia calabura* L. Leaves and Stems. *Journal of Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(8): 682-685.
- Burn, D.J., C. R. Tomson, J. Seviour and G. Dale. 1989. Strychnine Poisoning As An Unusual Cause Of Convulsions. *Postgraduate Medical Journal*. 65, 563-564.
- Cahyono, S. 2010. Hepatitis B. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 143 hlm.
- Camus, A., R. Durborow, W. Hemstreet, R. Thune and J. Hawke. 1998. *Aeromonas* Bacterial Infections - Motile Aeromonad Septicemia. SRAC Publication No. 478. 4 pp.
- Cipriano, R. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. *Disease Leaflet*. Washington DC. 20 pp.

Clement, R. and V. Taguchi. 1991. Techniques for The Gas Chromatography - Mass Spectrometry Identification of Organic Compounds in Effluents. Laboratory Services Branch. Copyright: Queen's Printer for Ontario, 1991. 49 pp.

Cloherty, J., E. Eichenwald and A. Stark. 2008. Manual of Neonatal Care. Lippincott Williams & Wilkins Publisher, A Wolter Kluwer Business. Philadelphia. 1024 pp.

Coutinho, I., C. A. Cardozo, N. Re-Poppi, A. Melo, M. Vieira, N. Honda and R. Coelho. 2009. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45(4): 767-776.

Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Press: New York. 1262 pp.

Cushnie, T. and A. Lamb. 2005. Review: Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (2005): 343–356.

Dadiono, M. 2016. Karakterisasi Fraksi dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Program Pasca Sarjana Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Darmadi. 2008. Infeksi Nosokomial. Penerbit Salemba Medica. Jakarta. 170 hlm.

Darmono dan A. Hasan. 2002. Menyelesaikan Skripsi Dalam Satu Semester. Gramedia Widiasarana Indonesia. Jakarta. 104 hlm.

Djarjah, A. 2001. Pembenuhan Ikan Mas. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 87 hlm.

Djing, O. G. 2006. Terapi Pijat Telinga. Penebar Swadaya. Jakarta. 158 hlm.

Doyle, M. 1989. Foodborne Bacterial Pathogens. CRC Press. New York. 816 pp.

Dwiyitno. 2010. Identifikasi Bakteri Patogen Pada Produk Perikanan Dengan Teknik Molekuler. *Squalen*. 5(2): 67-78.

Edwards, E. A., and K. A. Twomey. 1982. Habitat Suitability Index Models: Common Carp. Department of the Interior Fish and Wildlife Service Washington, DC. 27 pp.

Effendi, H. 2003. Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 249 hlm.

Effendie, M. 1979. Metode Biologi Perikanan. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 112 hlm.

Engleberg, N., V. Diritia and T. Dermody. 2012. Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publisher, A Wolter Kluwer Business. Philadelphia. 484 pp.

Erwin, L. 2013. 25 Cita Rasa Ikan Mas & Mujair. PT Gramedia Pustaka Utama. 58 hlm.

Fadilah, F., A. Yanuar, A. Arisanti and R. Andrajati. 2017. Phenylpropanoids, Eugenol Scaffold, and Its Derivatives as Anticancer. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(3): 41-46.

- Fajeriati, A. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L.) Pada Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. *Journal of Current Pharmaceutical Sciences*. 1(1): 36-41.
- Fajriputri, H. 2014. Uji Koefisien Fenol Produk Antiseptik dan Desinfektan yang Mengandung Senyawa Aktif Benzalkonium Klorida. *Skripsi*. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Farrell, G., J. George, P. Hall, A. Mc Cullough, J. Wiley and Sons. 2005. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Blackwell Publishing. UK. 336 pp.
- Firdaus, M. 2017. *Diabetes dan Rumput Laut Coklat*. UB Press. Malang. 150 hlm.
- Fitriyanti, T. Rudiana, A. Iafah, F. Afandi, H. Nurbaiti, I. Dewanti, L. Sururoh, T. Tiara dan Widyaningsih. 2017. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak n-Heksana Tanaman Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal ITEKIMA*. 1(1): 58-68.
- Fujaya, Y. 2008. *Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknik Perikanan*. PT. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hlm.
- Furqonita, D. 2006. *Seri IPA BIOLOGI*. Penerbit Quadra. Jakarta. 174 hlm.
- FAO, 2017. *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). http://www.fao.org/fishery/cultured-species/Cyprinus_carpio/en. Diakses 10 September 2017.
- Franco, A., Shenbagavinayagamoorathi N., and Venkatesan A. 2014. FT-IR Determination of Free FattyAcids in *Sardinella longiceps* Fish Oil and its Performance and Emission characteristics in DI Diesel Engine. *International Journal of ChemTech Research*. 6(7): 3776-3783.
- Gardziella, A., L. A. Pillato, and A. Knop. 2000. *Phenolic Resins: Chemistry, Applications, Standardization, Safety and Ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. 535 pp.
- Ginting, M. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Dalam Urin Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, Dan Xilena. *Skripsi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Depok.
- Glick, B., C. Patten, G. Holguin and D. Penrose. 1999. *Biochemical And Genetic Mechanisms Used By Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press. London. 276 pp.
- Gupta, E., P. Bhalla, N. Khurana and T. Singh. 2009. Histopathology For The Diagnosis of Infectious Diseases. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27(2): 100-106.
- Haditomo, A., Widanarni, dan A. Lusiastuti. 2014. Perkembangan *Aeromonas hydrophila* Pada Berbagai Media Kultur. *Seminar Nasional Ke-III : Hasil-Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*. 1(1): 357-364.
- Hamdi, A. 2014. *Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi dalam Pendidikan*. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 171 hlm.
- Hanafiah, K. 2013. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi Edisi 3*. PT Raja Grafindo Prasada. Jakarta. 259 hlm.

- Handayani, F. dan T. Sentat. 2016. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Pada Kulit Mencit Putih Jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 1(2): 131-142.
- Harbone, J. 2006. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawina. Penerbit ITB. Bandung. 345 hlm.
- Hardi, E., C.A. Pebrianto, T. Hidayanti dan R. Handayani. 2014. Infeksi *Aeromonas hydrophila* Melalui Jalur Yang Berbeda Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Loa Kulu Kutai Kertanegara Kalimantan Timur Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8(2): 130-133.
- Harjana, T. 2011. Buku Ajar Histologi. Jurusan Pendidikan Biologi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta. 49 hlm.
- Harlinawati, Y. 2006. Terapi Jus Untuk Kolesterol. Penerbit Puspa Swara. Jakarta. 106 hlm
- Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati, Edisi 3. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 167 hlm.
- Haryani, A., R. Grandinosa, I. 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.
- Hattenschwiler, S. and P. M. Vitousek. 2000. The Role of Polyphenols in Terrestrial Ecosystem Nutrient Cycling. *Trends in Ecology & Evolution*. 15(6): 238-243.
- Hedayati, A. and F. Darabitar. 2016. Effect of Lethal Concentration of Commercial Gasoline on Common Roach (*Rutilus rutilus*). *Research Article AJEHE*. InPress: e5409. 1-5.
- Hendra, R., S. Ahmad, A. Sukari, M. Shukor and E. Oskoueian. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *Int. J. Mol. Science*. 12; 3422-3431.
- Henry, A., Suryadi M. dan A. Yanuar. 2002. Analisis Spektrofotometri Uv-Vis Pada Obat Influenza Dengan Menggunakan Aplikasi Sistem Persamaan Linier. *Proceedings, Komputer dan Sistem Intelijen (KOMMIT 2002) Auditorium Universitas Gunadarma, Jakarta*. A1-A11.
- Hernawan, B. Purwono and T. Wahyuningsih. 2012. Synthesis Of 2-Methoxy-4,6-Di(Prop-1-Enyl) Phenol From Eugenol And Its Activity As An Antioxidant. *Indo Journal Chem*. 12(2): 178-183.
- Hester, R. and R. M. Harrison. 1999. Endocrine Disrupting Chemicals; Issues in Environmental Science and Technology (Book 12) . Royal Society of Chemistry. UK. 151 pp.
- Huda, S. A. Sahputra, W. Anggono, dan R. Wahyuni. 2015. Pemanfaatan Daun Kersen (*Muntingia calabura*) Sebagai Permen Jelly Terhadap Daya Terima Konsumen. *Jurnal Teknologi Pangan*. 6(1): 12-18.
- Hunt, L., T. Overman and R. Otero. 1981. Role of pH in Oxidase Variability of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 13(6): 1054-1059.

Imam, S. 2004. Penyakit Jantung Koroner dan Serangan Jantung Panduan bagi Masyarakat Umum. Gramedia Pustaka Umum. Jakarta. 600 hlm.

Indrawati, N. L., dan Razimin. 2014. Bawang Dayak: Si Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 132 hlm.

Isnarianti, R., I. Wahyudi dan R. Puspita. 2013. *Muntingia calabura* L Leaves Extract Inhibits Glucosyltransferase Activity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry Indonesia*. 20(3): 59-63.

Ivanova, E. and R. J. Crawford. 2015. Antibacterial Surfaces. Springer. London. 172 pp.

Janakiraman, M. and K. Jeyaprakash. 2015. Evaluation of Phytochemical Compounds in Leaf Extract of *Vitex Negundo* L. Using TLC, UV-VIS and FTIR Analysis. *International Journal of Health Sciences and Research*. 5(8): 289-295.

Jaya, F. 2017. Produk-produk Lebah Madu dan Hasil Olahannya. UB Press. Malang. 132 hlm.

Jhingan, V. and R.S. Pullin. 1985. A Hatchery Manual for The Common, Chinese and Indian Major Carp. Asian Development Bank. Manila. 119 hlm.

Julianto, T. 2016. Minyak Atsiri Bunga Indonesia. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 197 hlm.

Kadji, Y. 2016. Metode Penelitian Ilmu Administrasi. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 176 hlm.

Kar, A. 2003. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. New Age International Publisher. New Delhi. 900 pp.

Kee, J. dan E. Hayes. 1996. Farmakologi: Pendekatan Proses Keperawatan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 802 hlm.

Khairuman, S. P. 2013. Budi Daya Ikan Mas. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 88 hlm.

_____, S. P. dan K. Amri. 2008. Buku Pintar Budi Daya 15 Ikan Konsumsi. Coremap Lipi. Jakarta. 358 hlm.

_____, S. P., D. Sudenda, dan B. Gunadi. 2008. Budi Daya Ikan Mas Secara Intensif (Revisi). PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 100 hlm.

Khusnan, W. Prihtiantoro dan M. Slipranata. 2012. Identification and Phenotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Originated from Bumblefoot and Arthritis Cases of Broiler. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 6(2): 102-104.

Kim, R., J. Kim, G. Watanabe, D. Mohuczy and K. Behrns. 2008. Liver Regeneration and the Atrophy-Hypertrophy Complex. *Seminars in Interventional Radiology*. 25(2): 92-103.

Kokate, C. K., A. Purohit dan S. Gokhale. 2008. Pharmacognosy. Nirali Prakashan. India. 340 pp.

Kordi, K. M. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakitnya. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hlm.

_____, K. M. 2010. Nikmat Rasanya, Nikmat Untungnya - Pintar Budidaya Ikan di Tambak Secara Intensif. Lily Publisher. Yogyakarta. 262 hlm.

Kosasih, A., S. Hut, E. Ana, dan Encu. 2013. Informasi Singkat Benih Talok/Kersen *Muntingia calabura* L. Balai Perbenihan Tanaman Hutan Jawa dan Madura. 2 hlm.

Krishnaveni, M. and R. Dhanalakshmi. 2014. Qualitative and Quantitative Study of Phytochemicals in *Muntingia calabura* L. Leaf and Fruit. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 3(6): 1687-1696.

Kristanti, A., N. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Airlangga University Press. Surabaya. 174 hlm.

Kristianti, P. 2007. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Saponin Pada Herba Krokot (*Portulaca oleracea* L.). *Skripsi*. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.

Kumar, S., M. Suresh, S. Kumar and P. Kalaiselvi. 2014. Bioactive Compounds, Radical Scavenging, Antioxidant Properties and FTIR Spectroscopy Study of *Morinda citrifolia* Fruit Extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(2): 28-42.

Kurniawati, E. 2015. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Tunas Bambu Apus Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Jurnal Wiyata*. 2(2): 193-199.

Kusmiyati dan N. W. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. 8(1): 48-53.

Kusuma, S., A. Kurniawati, Y. Rahmi, I. Rusdan dan R. Widyanto. 2017. Pengawasan Mutu Makanan. UB Press. Malang. 116 hlm.

Leba, M. A. 2017. Buku Ajar: Ekstraksi dan Real Kromatografi. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 112 hlm.

Lengka, K., H. Manoppo dan M. Kolopita. 2013. Peningkatan Respon Imun Non Spesik Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) Melalui Pemberian Bawang Putih (*Allium Sativum*). *Jurnal Budidaya Perairan*. 1(2): 21-28.

Lentera. 2002. Pembesaran Ikan Mas di Kolam Air Deras. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 100 hlm.

Lestari, D., N. Mahmudati, Sukarsono, Nurwidodo dan Husamah. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenol Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb). *Biosfera*. 35(1): 37-43.

Lutfi, M., W. Jati dan A. Purbasari. 2013. Peningkatan Kadar Eugenol Pada Minyak Atsiri Cengkeh dengan Metode Saponifikasi-Destilasi Vakum. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2(2): 198-203.

Maftuch dan S. Dalimunthe. 2013. Penyakit Hewan Akuakultur. UB Press. Malang. 151 hlm.

Maftuch, G. A. Fariestha and H. Suprastyani. 2016. The Influence of Ketapang (*Terminalia catappa*) Bark Extract on Survival Rate and Histopathology of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Liver Which is Infected by *Aeromonas hydrophilia*. *Omni-Akuatika*. 12(2): 11-16.

Maharani, T., D. Sukandar dan S. Hermanto. 2016. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra Cauliflora* L.) yang Memiliki Aktivitas Antibakteri. *Jurnal Kimia VALENSI: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*. 2(1): 55-62.

- Mahboub, R. 2014. Structural Conformational Study of Eugenol Derivatives Using Semiempirical Methods. *Hindawi Advances in Chemistry*. 2014(1): 1-5.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji Patogenisitas Dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *Jurnal Ris. Akuakultur*. 5(2): 245-255.
- Mardiana, L. 2012. Daun Ajaib Tumpas Penyakit. Penebar Swadaya. Jakarta. 172 hlm.
- Marlinda, M., M. Sangi dan A. Wuntu. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) *Jurnal MIPA Unstrat Online*. 1(1): 24-28.
- Mikrajuddin, A., Saktiyono dan Lutfi. 2007. IPA Terpadu SMP dan MTS Jilid 1A. Penerbit Erlangga. Jakarta. 248 hlm.
- Mohamad, S. dan H. Abasali. 2010. Effect of Plant Extracts Supplemented Diet on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Agricultural Journal*. 5(2): 119-127.
- Morton, J. 1987. Jamaica Cherry. In: Fruits of Warm Climates. Miami, pp: 65–69.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2): 361-367.
- Mulia, D.S. 2003. Pengaruh Vaksin Debris Sel *Aeromonas hydrophila* Dengan Kombinasi Cara Vaksinasi dan Booster Terhadap Respons Imun dan Tingkat Perlindungan Relatif Pada Lele Dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell). Tesis. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Muller, M. 2016. Clinical Pharmacology: Current Topics and Case Studies. Springer. Austria. 401 pp.
- Munshi, J. S. and H. Dutta. 1996. Fish Morphology. A.A. Balkema Publisher. Brookfield. 300 pp.
- Murti, F., S. Amarwati dan N. Wijayahadi. 2016. Pengaruh Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*) Terhadap Gambaran Mikroskopis Hepar Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Etanol Dan Soft Drink. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 5(4): 871-883.
- Nahar, S., M. Rahman, G. Ahmed and M. A. Faruk. 2016. Isolation, Identification, and Characterization of *Aeromonas hydrophila* From Juvenile Farmed Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4(4): 52-60.
- Negi, J., P. Negi, G. Pant, M. Rawat and S. K. Negi. 2013. Naturally Occurring Saponins: Chemistry and Biology. *Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research*. 1(1): 1-6.
- Njila, M., E. Mahdi., D. Lembe, Z. Nde and D. Nyonseu. 2017. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences (ACBES-2017). 67-72.
- Ngajow, M., J. Abidjulu dan V. Kamu. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In-vitro. *Jurnal Mipa Unsrat Online*. 2(2): 128-132.

Nugroho, A. 2017. Buku Ajar. Teknologi Bahan Alam. Lambung Mangkurat University Press, Banjarmasin. 155 hlm.

Nurhasanah, N. 2012. Isolasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* Linn.). Skripsi. Jurusan Farmasi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jenderal Achmad Yani. Cimahi.

Nuria, M., A. Faizatul dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, Dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediargo*. 5(2): 26-37.

Nursalam. 2008. Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan; Pedoman Skripsi, Tesis, dan Instrumen Penelitian Keperawatan Edisi 2. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 276 hlm.

Obaseki, O., J. Olugbuyiro, D. De and O. Kesinro. 2017. Analysis of UV Spectra of Some Natural Plant Dyes Applicable in Fabrication of Grätzel Cells. *Journal of Scientific and Engineering Research*. 4(9): 418-424.

Olga. 2012. Patogenesis Bakteri *Aeromonas hydrophila* ASB01 Pada Ikan Gabus (*Ophicephalus striatus*). *Sains Akuatik*. 14(1): 33-39.

Orchard, G. and B. Nation. 2012. Histopathology. Oxford University Press Inc., New York. 388 pp.

Oyedemi, S., A. Okoh, L. Mabinya, G. Pirochenva and A. Afolayan. 2008. The Proposed Mechanism Of Bactericidal Action of Eugenol, α -terpinol and γ -terpinene Against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. 8(7) : 1280-1286.

Paliling, A., J. Posangi dan P. Anindita. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Jurnal e-GiGi*. 4(2): 229-234.

Pambayun, R., M. Garjito, S. Sudarmaji dan K. Rahayu. 2007. Kandungan Fenol dan Sifat Antibakteri dari Berbagai Jenis Ekstrak Produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Majalah Farmasi Indonesia*. 18(3): 141-146

Parija, S. 2009. Textbook of Microbiology & Immunology. Elsevier. New Delhi. 669 pp

_____. 2012. Textbook of Microbiology & Immunology 2nd Edition. Elsevier. New Delhi. 684 pp.

Parubak, A. 2013. Senyawa Flavonoid yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys beccariana* Gibbs). *Journal Chem. Prog*. 6(1): 34-37.

Pasaribu, W., S. N. Londong dan J. D. Mudeng. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) Untuk Meningkatkan Respon Imun Non Spesifik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Budidaya Perairan*. 3(1): 83-92.

Pavithra, B. 2014. Eugenol-A Review. *J. Pharm. Sci and Res*. 6(3): 153-154.

Peng, M., D. Hudson, A. Schofield, R. Tsao, R. Yang, H. Gu, Y. Bi and S. Rothstein. 2008. Adaptation of *Arabidopsis* to Nitrogen Limitation Involves

- Induction of Anthocyanin Synthesis Which is Controlled by the NLA Gene. *Journal of Experimental Botany*. 59 (11): 2933–2944.
- Perkampus, H. 1992. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. Springer. Germany. 237 pp.
- Pestsmart. 2011. Carp (*Cyprinus carpio*). https://www.pestsmart.org.au/wp-content/uploads/2012/02/CPFS4_AboutCarp.pdf. Diakses 10 September 2017.
- Pertama, D. dan A. Asben. 2017. Karakteristik dan Senyawa Bioaktif Ekstrak Kering Daun Kluwih Dari Posisi Daun yang Berbeda. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. 21(2): 79-85.
- Plumb, J. and L. Hanson. 2011. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes; Third Edition. Wiley Blackwell Publisher. US. 400 pp.
- Pubchem. 2018. Eugenol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314#section=Top>. Diakses 27 Oktober 2018.
- Prakosa, D. G. 2015. Pengaruh Ekstrak *Curcuma zedoria* (Quercetin) Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Program Pasca Sarjana Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Prasisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan Dengan SPSS 12. PT Elex Media Komputindo. Jakarta. 292 hlm.
- Priharjo, R. 1995. Teknik Dasar Pemberian Obat bagi Perawat. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 93 hlm.
- Priosoeryanto, B., I. M. Ersu, R. Tiuria dan S. U Handayani. 2010. Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang Berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Indonesian Journal of Veterinary Science & Medicine*. 11(1): 1-8.
- Purwantiningsih, T., Y. Suranindiyah dan Widodo. 2014. Aktivitas Senyawa Fenol Dalam Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Sebagai Antibakteri Alami Untuk Penghambatan Bakteri Penyebab Mastitis. *Buletin Peternakan*. 38(1): 59-64.
- Putri, R., N. Hidayat dan N. Rahmah. 2014. Eugenol Purification From Clove Leaf Oil With Strong Alkaline Reactants of KOH and Ba(OH)₂ (Study on the Concentration of the Reactants). *Jurnal Industria*. 3(1): 1-12.
- Putri, R., W. Tjajaningsih dan D. Handijatno. 2008. Daya Antibakteri Pigmen Pyocyanin Dari Isolat *Pseudomonas aeruginosa* Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara *In-vitro*. *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*. 3(1): 65-73.
- Raaman, N. 2006. Phytochemical Techniques. New India Publishing Agency. New Delhi. 306 pp.
- Rabah, B., T. Lograda, M. Ramdani, P. Chalard and G. Fegiredo. 2013. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Ziziphora hispanica* L. *Global Journal Res. Med. Plants & Indigen. Med*. 2(2): 73-80.

- Ragasa, C., Maria C. S. Tan, I. D. Chiong, and Chien-Chang S. 2015. Chemical Constituents of *Muntingia calabura* L. *Der Pharma Chemica*. 7(5):136-141.
- Rahardjo, M., D. Sjafei, R. Affandi dan Sulistiono. 2010. Iktiologi. CV. Lubuk Agung. Bandung. 396 hlm.
- Rahardjo, R. 2008. Kumpulan Kuliah Farmakologi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 818 hlm.
- Rahman, F., T. Heniastuti dan T. Utami. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol daun sirsak (*Annonamuricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 3(1): 1-7.
- Rahmawati, Z., U. Yanuhar dan D. Arfiati. 2016. Analisis Histopatologi Otot Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV) pada Kolam Pemeliharaan Ikan Mas. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan 2016*. 1(1): 290-294.
- Redaksi Trubus. 2010. Kegemukan Pergi dan Tak Kembali. Trubus Swadaya. Depok. 128 hlm.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202.
- Rijayanti, R. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Naskah Publikasi*. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Rivai, H., P. Nanda dan H. Fadhilah. 2014. Pembuatan dan Karakterisasi Ekstrak Kering Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.). *Jurnal Farmasi Higea*. 6(2): 133-144.
- Ritna, A., S. Anam dan A. Khumaidi. 2016. Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia* sp.) Asal Kabupaten Morowali Utara. *GALENKA Journal of Pharmacy*. 2(2): 83-89.
- Rizkia, P., A. Jannah dan H. Hasanah. 2014. Uji Efektivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70 %, Ekstrak Dan Isolat Senyawa Flavonoid Dalam Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Jurnal Alchemy*. 3(2): 154-162.
- Robinson, T. 2015. The Organic Constituents of Higher Plants: Their Chemistry and Interrelationships. Bibliolife DBA of Bibilio Bazaar II LLC. South Carolina. 316 pp.
- Romadanu, S. Rachmawati dan S. Lestari. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal Fishtech*. 3(1): 1-7.
- Rorong, J. 2008. Uji Aktivitas Antioksidan Dari Daun Cengkeh (*Eugenia Carryophyllus*) Dengan Metode DPPH. *Chem. Prog*. 1(2): 111-116.
- Rouf, M and M. Rigney. 1971. Growth Temperatures and Temperature Characteristics of *Aeromonas*. *Applied Microbiology*. 22(4): 503-506.

Rubin, E. and H. Reisner. 2009. Essential of Rubin's Pathology. 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Baltimore. 634 pp.

Rubin, R. and D. S. Strayer. 2008. Rubin's Pathology; Clinicopathologic Foundations of Medicine Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Baltimore. 1279 pp.

Rubiyanto, D. 2016. Teknik Dasar Kromatografi. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 130 hlm.

_____. 2017. Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 149 hlm.

Saefudin, S. Marusin dan Chairul. 2013. Aktivitas Antioksidan Pada Enam Jenis Tumbuhan Sterculiaceae (Antioxidan Activity on Six Species of Sterculiaceae Plants). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*. 31(2): 103-109.

Safratilofa. 2017. Histopatologi Hati Dan Ginjal Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*) Yang Diinjeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Sungai dan Danau*. 2(2): 83-88.

Saifudin, A. 2014. Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 113 hlm.

Said, A. 2007. Khasiat dan Manfaat Temulawak. PT. Sinar Wadja Lestari. Jakarta. 59 hlm.

Salunkhe, D., J. K. Chavan and S. Kadam. 2000. Dietary Tannins: Consequences and Remedies. CRC Press. Boca Raton, Florida. 195 pp.

Sanagi, M. M. 1998. Teknik Pemisahan Dalam Analisis Kimia. Penerbit Universiti Teknologi Malaysia. Johor Darul Ta'zim. 257 pp.

Sanra, Y., T. Hanifah dan S. Bali. 2015. Analisis Kandungan Logam Timbal Pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) Yang Ditanam Di Pinggir Jalan Raya Kecamatan Aur Birugo Tigo Baleh Bukittinggi. *Jom FMIPA*. 2(1): 136-144.

Santi, S. dan M. Sukadana. 2015. Aktivitas Antioksidan Total Flavonoid dan Fenol Kulit Batang Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb). *Jurnal Kimia*. 9(2): 160-168.

Santoso, B. 1993. Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 80 hlm.

Saputra, A., S. Andayani dan H. Nursyam. 2016. Total Quantity of Phenol and Isolation Methanol Tannin of Extract of Red Betel Leaf (*Piper croctatum*). *International Journal of PharmTech Research*. 9(7): 146-153.

Sari, A., Y. Risjani dan A. P. Marhendra. 2014. Efek Konsentrasi Sublethal Fenol Terhadap Total Haemocyte Count (THC) dan Histologi Insang Kepiting Bakau (*Scylla serata*). *Journal of Experimental Life Science*. 2(2): 82-88.

Sari, I., T. Miranda dan Sadli. 2016. The Cytotoxic Activity Of N-Hexane Extract Of Kersen (*Muntingia calabura* linn.) Leaves Using The Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Jurnal Natural*. 16(2): 37-44.

Sari, P., W. Rita dan N. M. Puspawati. 2015. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Tanin dari Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea saman* (Jacq.)

Merr) Sebagai Antibakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). *Jurnal Kimia*. 9(1): 27-34.

Sariningsih, P., W. Rita dan 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, O. Radjasa, A. Haditomo dan S. Prayitno. 2013. Causative Agent Motile Aeromonas pada Ikan Lele (*Clarias gariepinus*) Sentra Produksi Provinsi Jawa Tengah. *Konfrensi Akuakultur Indonesia 2013*. 146-152.

_____, S. Prayitno, O. Radjasa dan S. Hutabarat. 2007. Karakterisasi dan Patogenitas Agensia Penyebab Vibriosis pada Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karimun Jawa. *Jurnal Aquacultural Indonesiana*. 8(2): 89 – 95.

_____, dan S. 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*". *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(3): 66-75.

Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.

Sayuti, K. dan R. Yenrina. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. Andalas University Press. Padang. 104 hlm.

Segneanu, I. Gozescu, A. Dabici, P. Sfirloaga and Z. Szabadai. 2012. Organic Compounds FT-IR Spectroscopy, Macro To Nano Spectroscopy. Dr. Jamal Uddin (Ed.), ISBN: 978-953-51- 0664-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/macro-to-nanospectroscopy/organic-compounds-ft-ir-spectroscopy>.

Senja, R., E. Issusilaningtyas, A. Nugroho dan E. Setyowati. 2014. The Comparison of Extraction Method And Solvent Variation on Yield and Antioxidant Activity of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* Extract. *Tradional Medicine Journal*. 19(1): 43-48.

Senthilkumar, S., T. Sivakumar, K. Arulmozhi and N. Mythili. 2017. FT-IR analysis and Correlation Studies on the Antioxidant Activity, Total Phenolics and Total Flavonoids of Indian Commercial Teas (*Camellia sintesis* L.)- A Novel Approarch. *International Research Journal of Biological Sciences*. 6(3): 1-7.

Setyowati, A., D. Hidayati, P. Awik dan N. Abdulgani. 2010. Studi Histopatologi Hati Ikan Belanak (*Mugil cephalus*) Di Muara Sungai Aloo Sidoarjo. *Jurnal Akuakultur*. 1(1): 1-10.

Setyowati, E., S. Prayitno dan Sarjito. 2014. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*. L) Terhadap Kelulushidupan dan Histologi Hati Ikan Patin (*Pangasius hypophtalamus*) yang Diinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(4): 174-182.

Sherma, J. and B. Fried. 2003. Handbook of Thin-Layer Chromatography (Chromatographic Science) 3rd Edition. Marcel Dekker, Inc. New York. 1295 pp.

- Sibi, G., R. Naveen, K. Dhananjaya, K. Ravikumar and H. Mellesha. 2012. Potential Use of *Muntingia calabura* L. Extracts Against Human and Plant Pathogens. *Pharmacognosy Journal*. 4(34): 44-47.
- Simajuntak, K. 2012. Peran Antioksidan Flavonoid Dalam Meningkatkan Kesehatan. *Bina Widya*. 23(3): 135-140.
- Sindhe, A.M., Bodke Y., and Chandrashekar A. 2013. Antioxidant and In Vivo Anti-hyperglycemic Activity of *Muntingia calabura* Leaves Extracts. *Der Pharmacia Lettre*. 5(3): 427-435.
- Singh, R., Iye S., Prasad S., Deshmukh N., Gupta U., A. Patil and Joshi S. 2017. Phytochemical Analysis of *Muntingia calabura* Extract Possessing Anti-Microbial and Anti-Fouling Activities. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9(6): 826-832.
- Sinha, M. K., J. Munshi and J. S. Munshi. 2010. Eco-toxicology of Biocidal Plants. Mittal Publications. New Delhi. 280 pp.
- Sithara, N., Komathi and Rajalakshmi. 2017. Identification of Bioactive Compounds Using Different Solvents Through FTIR Studies and GCMS Analysis. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 5(2): 192-194.
- Smith, B. 2015. Remington Education: Physical Pharmacy. Pharmaceutical Press. UK. 192 pp.
- Socrates, G. 2004. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester. 343 pp.
- Soelama, H., B. Kepel dan K. Siagian. 2015. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) Ekstrak Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal e-GiGi* (eG). 3(2): 374-379.
- Soleha, T. 2015. Uji Kepekaan Antibiotik. *Juke Unila*. 5(9): 119-123.
- Somantri, R. dan Tantri K. Kisah dan Khasiat Teh. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 117 hlm.
- Sormin, R. 2012. Eksplorasi dan Karakterisasi Bahan Aktif Dari Rumput Laut Jenis *Porphyra marcosii* Serta Efektifitasnya Sebagai Antibakteri. *Disertasi*. Program Doktor Ilmu Pertanian. Fakultas Pertanian. Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya Malang.
- Stashenko, E. and J. Martin. 2015. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *InTech*. 38 pp.
- Sudaryatma, P., N. Eriawati, I. Panjaitan dan N. Sunarsih. 2013. Histopatologi Insang Ikan Lele (*Clarias bathracus*) yang Terinfestasi *Dactylogorgus* sp. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 1(2): 75-80.
- Sudiana, K. 2008. Patobiologi Molekul Kanker. Penerbit Salemba Kanker. Jakarta. 104 hlm.
- Sudiono, J., B. Kurniadhi, A. Hendrawan dan B. Djimantoro. 2001. Penuntun Praktikum Patologi Anatomi. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 107 hlm.
- Sukandar, D., N. Radiastuti dan Khoeriyah. 2010. Karakterisasi Senyawa Aktif Anti Bakteri Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*). *JKTI*. 12(1): 1-7.

- Sukarni, Maftuch dan H. Nursyam. 2012. Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Experimental Life Sciences*. 2(1): 6-12.
- Sukmadinata, N. 2005. Metode Penelitian Pendidikan. PT Remaja Rosdakarya. Bandung. 326 hlm
- Sumardjo, D. 2006. Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Kedokteran Bioeksakta. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 650 hlm.
- Sumawinata, N. 2004. Senarai Istilah Kedokteran Gigi. Penerbit EGC. Jakarta. 248 hlm.
- Sumino, A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Jurnal Sain Veteriner*. 31 (1): 79-88.
- Supriatna, Y. 2013. Budi Daya Ikan Mas di Kolam Hemat Air. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 78 hlm.
- Supriyadi. 2009. Evaluasi Apoptosis Sel Odontoblas Akibat Paparan Radiasi Ionisasi. *Indonesian Journal of Dentistry*. 15(1): 71-76.
- Suryowinoto. 1997. *Flora Eksotika*: Tanaman Peneduh. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 224 hlm.
- Susanti, A., D. Ardiana, G. Gumelar dan Y. Bening. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glutinosa*). *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS-2012*. K8-K14.
- Susanty dan F. Bachmid. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*. 5(2): 87-93.
- Suteja, I K., W. Rita dan I W. Gunawan. 2016. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Trembesi (*Albizia saman* (Jacq.) Merr) sebagai Antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia*. 10(1): 141-148.
- Syawal, H., N. Kusumorini, W. Manalu dan R. Affandi. 2011. Respons Fisiologis dan Hematologis Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) pada Suhu Media Pemeliharaan yang Berbeda. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 12(1): 1-11.
- Syngai, G., S. Dey and R. Bharali. 2016. Evaluation of Toxicity Levels of The Aqueous Extract of *Allium sativum* and Its Effects On The Behavior of Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(3): 417-421.
- Talib, W., M. Zarga and A. Mahasneh. 2012. Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*. 17; 3291-3303.
- Talwani, R., B. Gilliam and C. Howell. 2011. Infectious Diseases and the Liver. *Clin Liver Dis*. 15(1): 111-130.
- Takahashi, N., K. Tanabe, M. Wake, T. Sugamori, A. Endo, H. Yoshitori, Y. Ishibashi, A. Shono and T. Oda. 2012. Fatal Septicemia and Endotoxic

- Shock Due to *Aeromonas hydrophila*. *American Journal of Case Reports*. 13:72-74.
- Tambayong, J. 2000. Patofisiologi Untuk Keperawatan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 211 hlm.
- Tambun, R., H. Limbong, C. Pinem dan E. Manurung. Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu Dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol Dari Lengkuas Merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 5(4): 53-56.
- Taufiq, M. I. 2006. Panduan Lengkap dan Praktis Psikologi Islam. Gema Insani Press. Jakarta. 732 hlm.
- Teaca, R. B. 2009. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Thermal Analysis of Lignocellulose Fillers Treated With Organic Anhydrides. *Rom. Journ. Phys.* 54(1): 93-104.
- Tejada, M., J. Duran, A. Ortega, M. Jimenez, P. Carpio and E. Chibowski. 2002. Investigation of alumina/(+)-catechin System Properties. Part I: A Study of the system by FTIR-UV-Vis Spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 24(2002): 297-308.
- Tim Agriminakultura. 2014. Sukses Bisnis & Budidaya Ikan Mas. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 130 hlm.
- Towaha, J. 2012. The Benefits of Cloves Eugenol in Various Industries in Indonesia. *Perspektif*. 11(2): 79-90.
- Tranggono, R. dan F. Latifah. 2007. Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 234 hlm.
- Triadayani, A., R. Aryawati dan G. Diansyah. 2010. Pengaruh Logam Timbal (Pb) Terhadap Jaringan Hati Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*). *Maspari Journal*. 1(2010): 42-47.
- Utami, P. dan D. Puspaningtyas. 2013. The Miracle of Herbs. PT AgroMedia Pustaka. Jakarta. 208 hlm.
- Van Soest, P. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant: Second Edition. Cornell University Press. New York. 488 pp.
- Wahjuningrum, D., R. Astrini dan M. Setiawati. 2013. Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Benih Ikan Lele *Clarias* sp. yang Berumur 11 Hari Menggunakan Bawang Putih *Allium sativum* dan Meniran *Phyllanthus niruri*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 12(1): 94-104.
- Waksmundzka-Hanos, M., J. Sherma and T. Kowalska. 2008. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 896 pp.
- Wijaya, H., A. Syahrani dan S. Jubaidah. 2018. Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 4(1): 79-83.
- Woo, P. T. 2006. Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infection Second Edition. CABI Publisher. Oxfordshire UK. 755 pp.
- Wu, H. 2008. Statistical Inference for Minimum Inhibitory Concentration Data. *Theses*. Department of Statistics and Actuarial Science, Simon Fraser University, Burnaby, Canada.

- Xue, Z., L. Duan and X. Qi. 2015. Chapter 2 Gas Chromatography Mass Spectrometry Coupling Techniques. *Plant Metabolomics*. Springer. 319 pp.
- Yanlinastuti, D., Novianti dan Masrukan. 2012. Analisis Zr dalam Paduan UZr (6%) Melalui Pengukuran Senyawa Zr-Arsenazo III Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Urania*. 18(2): 59-68.
- Yanti, Y. dan S. Mitika. 2017. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2 (1): 158-168.
- Yin, R., B. Messner, T. Faus-Kessler, T. Hoffmann, W. Schwab, M. Hajirezaei, V. Paul, W. Heller and A. Schäffner. 2012. Feedback Inhibition of The General Phenylpropanoid and Flavonol Biosynthetic Pathways Upon a Compromised flavonol-3-O-glycosylation. *Journal of Experimental Botany*. 63(7): 2465–2478.
- Yuliana, P., E. Laconi, E. Wina dan Jayanegara. 2014. Extraction of Tannins and Saponins From Plant Sources And Their Effects On In Vitro Methanogenesis And Rumen Fermentation. *Journal of Indonesian Tropical Animal and Agriculture*. 39(2): 91-97.
- Yuliani, R., R. Munawarch, E. P. Setyadngsih, dan A. Janrrartie. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami (SPBOA) PERHIPBA XVI & Mukhtar PERHIPBA XII*. Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Yuliani, S. dan S. Satuhu. 2012. Panduan Lengkap Minyak Asiri. Penebar Swadaya. Jakarta. 204 hlm.
- Yuniwati, M., A. Kusuma dan F. Yunanto. 2012. Optimasi Kondisi Proses Ekstraksi Zat Pewarna Dalam Daun Suji Dengan Pelarut Etanol. *Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains & Teknologi (SNAST) Periode III*. ISSN: 1979-911X. A257-A263.
- Zakaria, Z., A. Sufian, K. Ramasamy, N. Ahmat, M. Sulaiman, A. Arifah, A. Zuraini and M. Somchit. 2010. In-vitro Antimicrobial Activity of *Muntingia calabura* Extract and Fraction. *African Journal of Microbiology Research*. 4(4): 304-308.
- Zakaria, Z., Mohamed A.M., Jamil N.S., Rofiee M.S., Hussain M.K., Sulaiman M.R., Teh L.K. and Salleh M. 2011. In Vitro Antiproliferative and Antioxidant Activities Of the Extracts of *Muntingia calabura* Leaves. *The American Journal of Chinese Medicine*. 39(1): 183-200.
- Zare, K., H. Nazemyeh, F. Lotfipour, S. Farabi, M. Ghiamirad and A. Barzegari. 2014. Antibacterial Activity and Total Phenolic Content of the *Onopordon acanthium* L. Seeds. *Pharmaceutical Sciences*. 20(1): 6-11.
- Zipcodezoo. 2006. *Aeromonas hydrophila* Bacteria. http://zipcodezoo.com/index.php/Aeromonas_hydrophila_hydrophila. Diakses 19 Oktober 2017.
- Zulharmita, U. Kasypiah dan H. Rivai. 2012. Pembuatan Dan Karakterisasi Ekstrak Kering Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.). *Jurnal Farmasi Higea*. 4(2): 147-157.

LAMPIRAN
Lampiran 1. SERTIFIKAT KLASIFIKASI DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.)

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841
<http://biologi.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0223/UN10.F09.42/03/2018

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Gede Angga Krishna Fariestha (NIM 166080100111019)

Instansi : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 401, diidentifikasi sebagai:

Familia : **Muntingiaceae**
Genus : **Muntingia**
Species : **Muntingia calabura** L.
Nama lokal : Kersen

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 16 Januari 2018

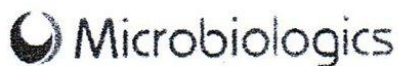
Kepala Laboratorium



LABORATORIUM Dr. Jati Batoro, M.Si
TAKSONOMI NIP. 19570425.198601.1.001

Microbiologics

Specifications Microorganism Name: Aeromonas hydrophila Catalog Number: 0910 Lot Number: 910-40 Reference Number: ATCC® 35654™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2013/05 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2011/7/20	
Performance			
Macroscopic Features: Medium, gray with white centers, round, convex, entire edge, and smooth with beta hemolysis. Microscopic Features: Gram negative straight rods with rounded ends to coccoid.		Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)	
Vitek GN (1)		Other Features/ Challenges: Results	
Phenotypic Features	Results	(1) Oxidase (Kovacs): positive Voges Proskauer (VP): positive	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+		
ADONITOL	-		
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-		
L-ARABITOL	-		
D-CELLOBIOSE	-		
BETA-GALACTOSIDASE	+		
H2S PRODUCTION	+		
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+		
Glutaryl Arylamidase pNA	-		
D-GLUCOSE	+		
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+		
FERMENTATION/GLUCOSE	+		
BETA-GLUCOSIDASE	+		
D-MALTOSE	+		
D-MANNITOL	+		
D-MANNOSE	+		
BETA-XYLOSIDASE	-		
BETA-Alanine arylamidase pNA	-		
L-Proline ARYLAMIDASE	+		
LIPASE	+		
PALATINOSE	-		
Tyrosine ARYLAMIDASE	+		
UREASE	-		
D-SORBITOL	-		
SACCHAROSE/SUCROSE	-		
D-TAGATOSE	-		
D-TREHALOSE	-		
CITRATE (SODIUM)	+		
MALONATE	-		
5-KETO-D-GLUCONATE	-		
L-LACTATE alkalization	+		
ALPHA-GLUCOSIDASE	-		
SUCCINATE alkalization	+		
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-		
ALPHA-GALACTOSIDASE	-		
PHOSPHATASE	-		
Glycine ARYLAMIDASE	-		
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-		
LYSINE DECARBOXYLASE	-		
L-HISTIDINE assimilation	-		
COURMARATE	+		
BETA-GLUCORONIDASE	-		
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+		
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	+		
L-MALATE assimilation	+		
ELLMAN	-		
L-LACTATE assimilation	-		



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Aeromonas hydrophila Catalog Number: 0910 Lot Number: 910-40 Reference Number: ATCC® 35654™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2013/05 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2011/7/20
---	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

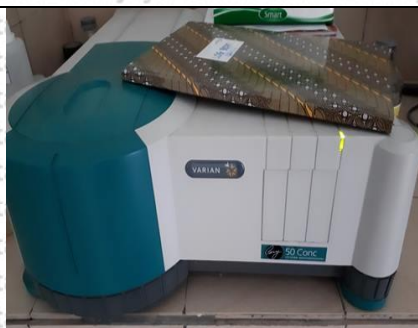


TESTING CERT #2655.01

Lampiran 3. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN.



Evaporator



UV-VIS Spektrofotometer



UV 254 / 366 nm



FTIR Spektrometer



GCMS



Mikroskop Binokuler



Section Set (Alat Bedah)



Ekstrak Daun Kersen
(Pelarut Etanol 96%, Etil Asetat dan Kloroform)



Ikan Mas Ukuran 7-9 cm



Organ Hati Ikan Mas



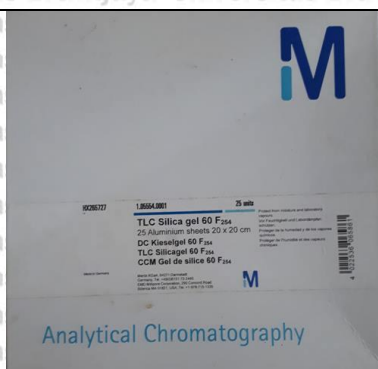
Aeromonas hydrophila



Jangka Sorong



Silika Gel G₆₀



Plat KLT



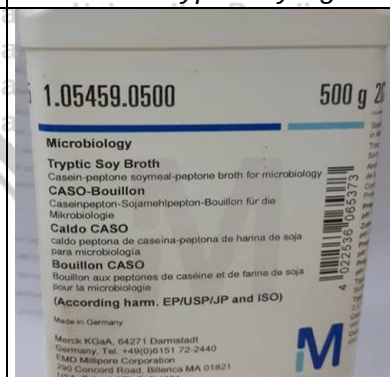
Media Tryptic Soy Agar



Media Plate Count Agar



Ethanol 96%



Media Tryptic Soy Broth

Lampiran 4. DOKUMENTASI PENELITIAN.



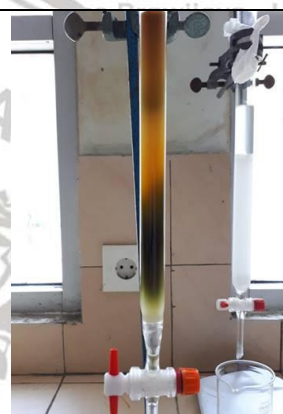
Penjemuran Daun Kersen Kering Angin



Maserasi Daun Kersen dengan Etanol 96%



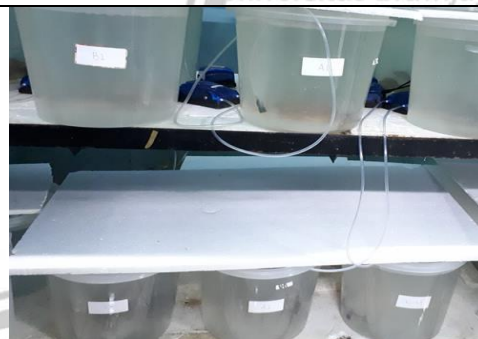
Evaporasi Ekstrak Daun Kersen



Uji Kromatografi Kolom



Uji LC₅₀ (Lethal Concentration 50%)



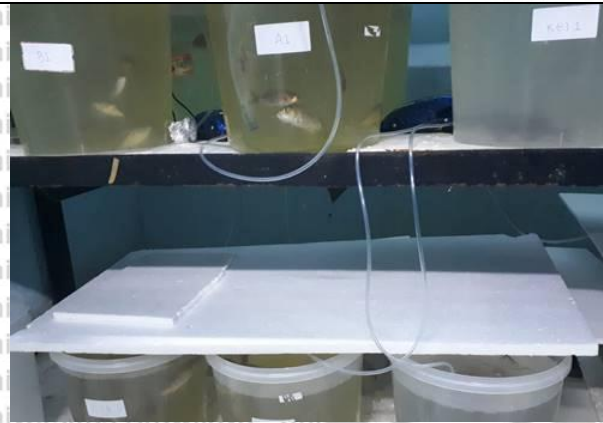
Uji LD₅₀ (Lethal Dossage 50%)



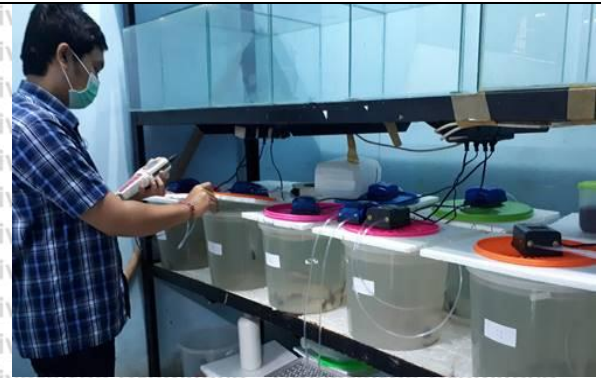
Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



Uji Cakram



Pengobatan Ikan Mas Dengan Ekstrak Daun Kersen yang Diinfeksi *A. hydrophila*



Pengamatan Kualitas Air Setiap Pagi dan Sore Hari



Pembedahan Ikan Mas

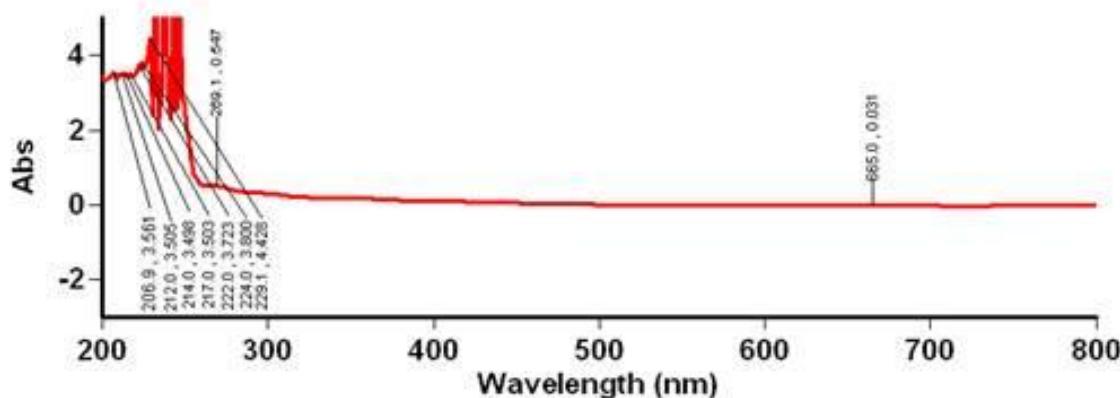


Pengamatan Histopatologi Hati di Mikroskop

Lampiran 5. HASIL UV-VIS FRAKSI KE-3 DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.)

Lamdha Maks Fraksi 3

Tanggal Analisa : 27 April 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Fri 27 Apr 09:56:06 AM 2018

Method:

Batch: D:\Layanan Analisa\UB\Gede Angga Krishna\Lamdha Maks Fraksi 3 Ulang (27-04-2018).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: Rika

Sample Name: Fraksi 3

Collection Time 4/27/2018 9:56:37 AM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm) Abs

665.0	0.031
269.1	0.547
247.1	10.000
243.0	10.000
238.9	10.000
233.0	10.000
229.1	4.428
224.0	3.800
222.0	3.723
217.0	3.503
214.0	3.498
212.0	3.505
206.9	3.561

LAMPIRAN 6. HASIL GCMS FRAKSI KE-3 DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.)

Chromatogram Plot

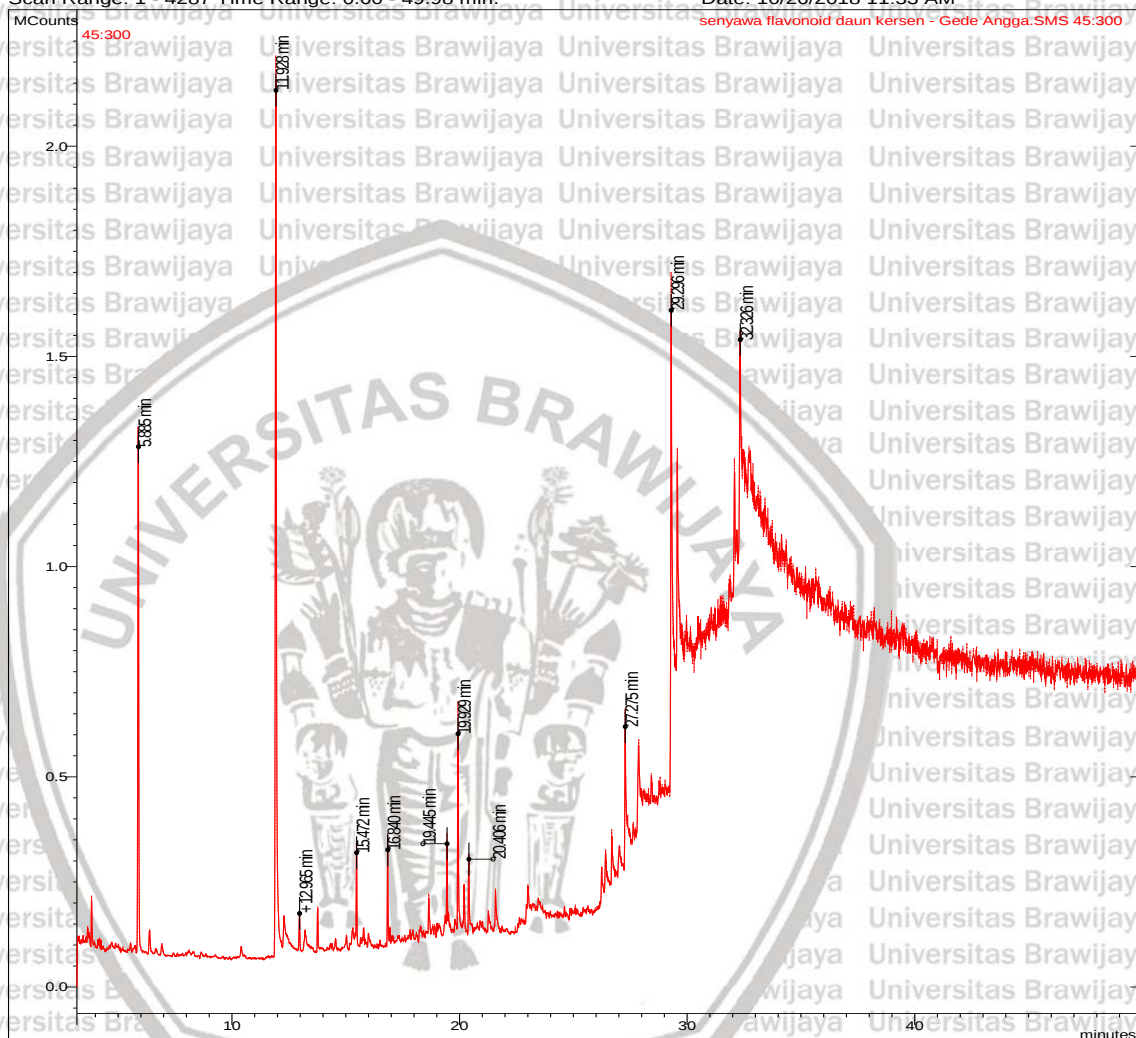
File: ...nws\data_xyz\analisa\senyawa flavonoid daun kersen - gede angga.sms

Sample:

Operator: mei

Scan Range: 1 - 4287 Time Range: 0.00 - 49.98 min.

Date: 10/26/2018 11:33 AM

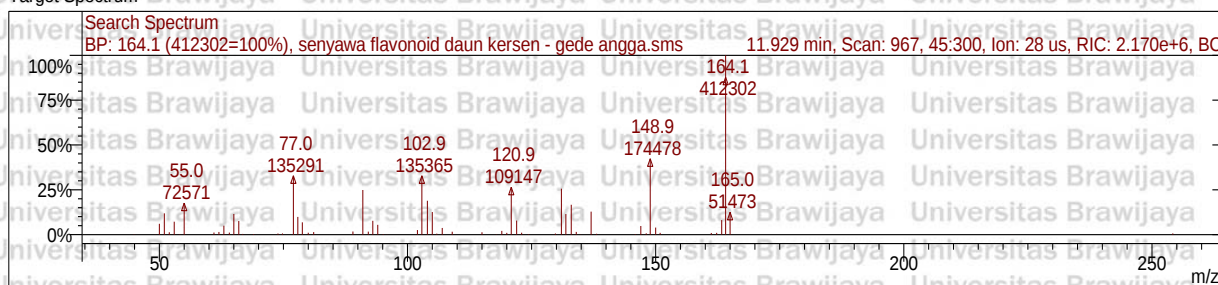


Target Compounds

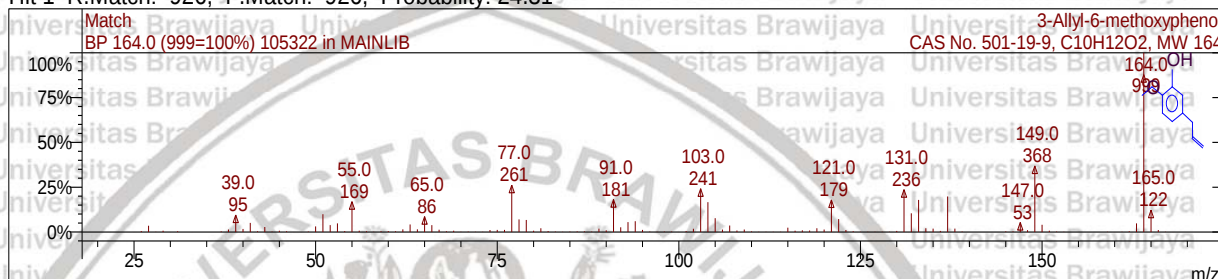
Cmpd. Number	RT (min)	Peak Name	Area	Amount/RF
1	5.885	senyawa 1	1.560e+6	1559784
2	11.928	senyawa 2	1.427e+6	1426890
3	12.965	senyawa 3	33208	33208
4	13.768	senyawa 4	23857	23857
5	15.472	senyawa 5	220465	220465
6	16.840	senyawa 6	49260	49260
7	19.445	senyawa 7	45272	45272
8	19.929	senyawa 8	117851	117851
9	20.406	senyawa 9	43956	43956
10	27.275	senyawa 10	201137	201137
11	29.296	senyawa 11	608795	608795
12	32.326	senyawa 12	200998	200998

Best 10 Hits of Search NIST Libraries for Spectrum

Target Spectrum



Hit 1 R.Match: 926, F.Match: 926, Probability: 24.31



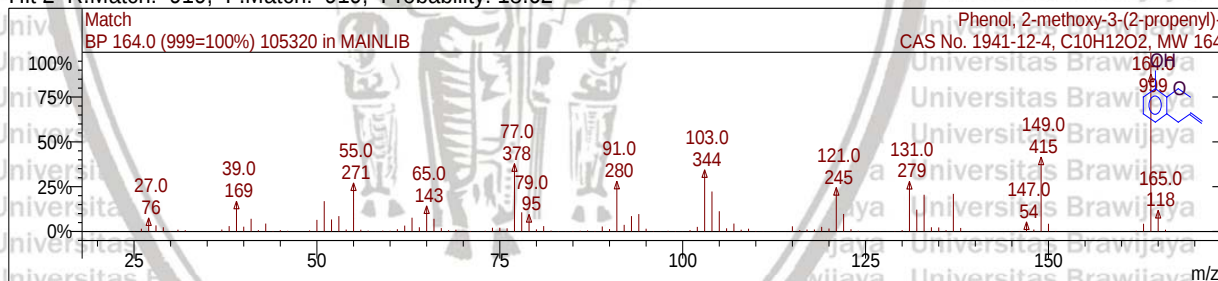
Spectrum 105322 from MAINLIB Library

Name: 3-Allyl-6-methoxyphenol

Pair Count: 130 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 501-19-9 Acquired Range: 25.0 - 168.0 m/z

Hit 2 R.Match: 919, F.Match: 919, Probability: 18.62



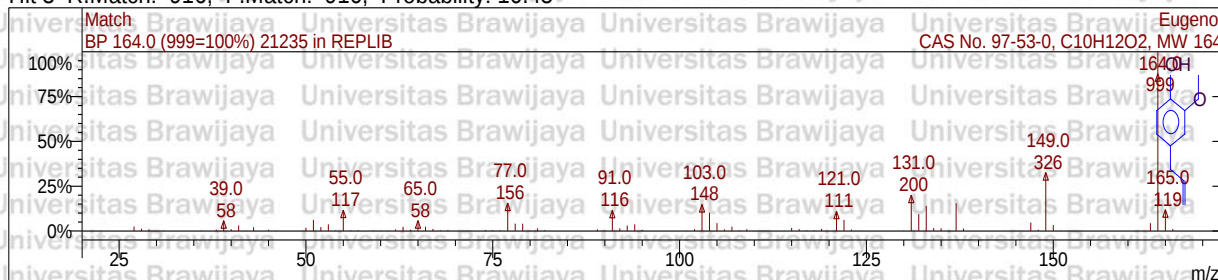
Spectrum 105320 from MAINLIB Library

Name: Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-

Pair Count: 135 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 1941-12-4 Acquired Range: 25.0 - 167.0 m/z

Hit 3 R.Match: 916, F.Match: 916, Probability: 16.45



Spectrum 21235 from REPLIB Library

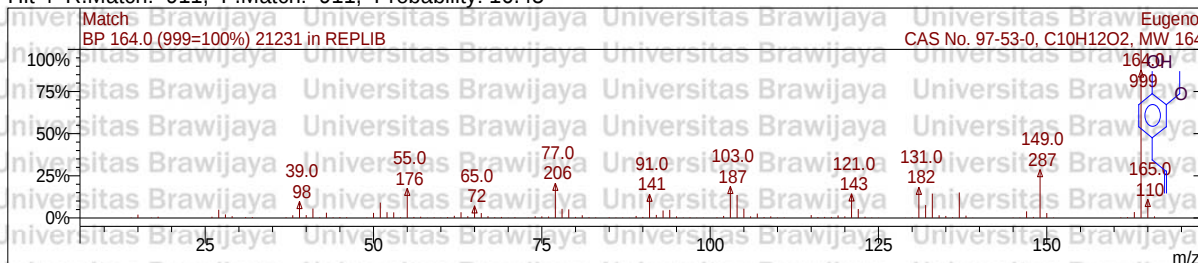
Name: Eugenol

Pair Count: 86 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 97-53-0 Acquired Range: 27.0 - 166.0 m/z

Best 10 Hits of Search NIST Libraries for Spectrum - Page 2

Hit 4 R.Match: 911, F.Match: 911, Probability: 16.45



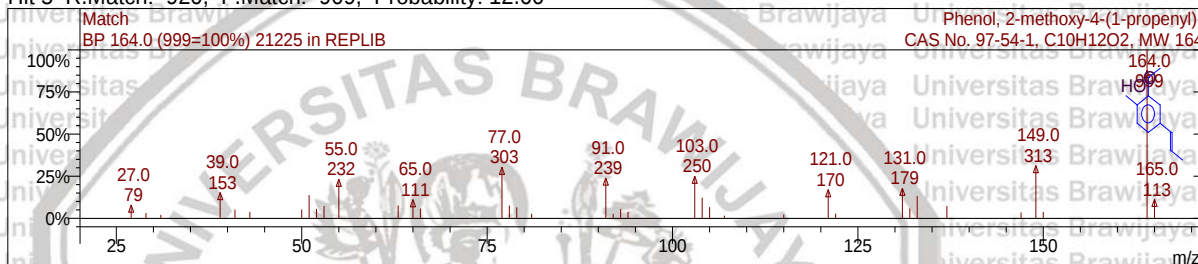
Spectrum 21231 from REPLIB Library

Name: Eugenol

Pair Count: 115 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 97-53-0 Acquired Range: 14.0 - 166.0 m/z

Hit 5 R.Match: 920, F.Match: 909, Probability: 12.60



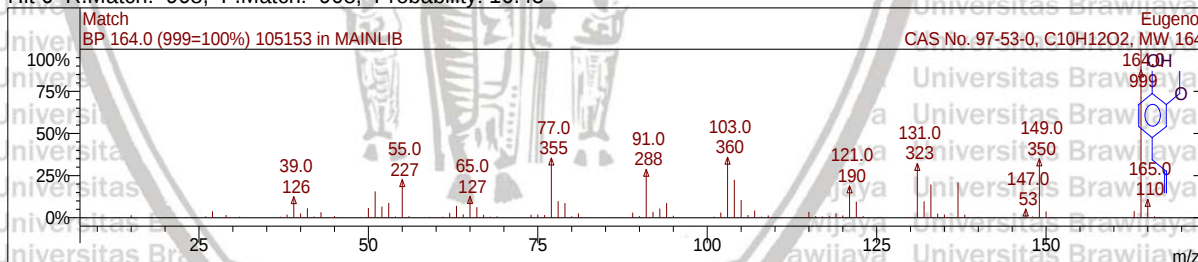
Spectrum 21225 from REPLIB Library

Name: Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-

Pair Count: 38 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 97-54-1 Acquired Range: 27.0 - 165.0 m/z

Hit 6 R.Match: 908, F.Match: 908, Probability: 16.45



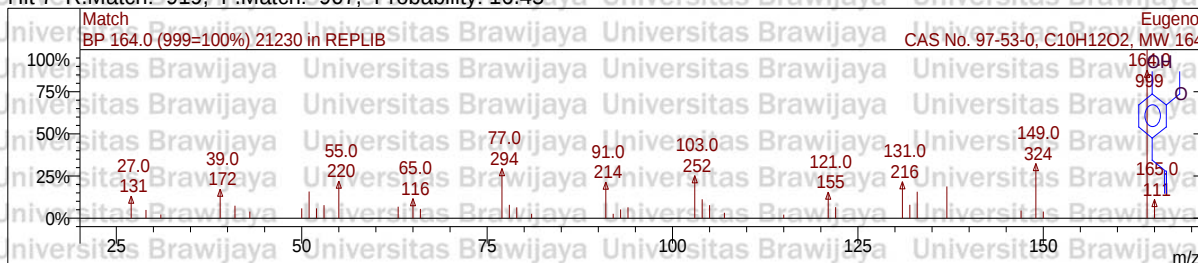
Spectrum 105153 from MAINLIB Library

Name: Eugenol

Pair Count: 91 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 97-53-0 Acquired Range: 15.0 - 166.0 m/z

Hit 7 R.Match: 919, F.Match: 907, Probability: 16.45



Spectrum 21230 from REPLIB Library

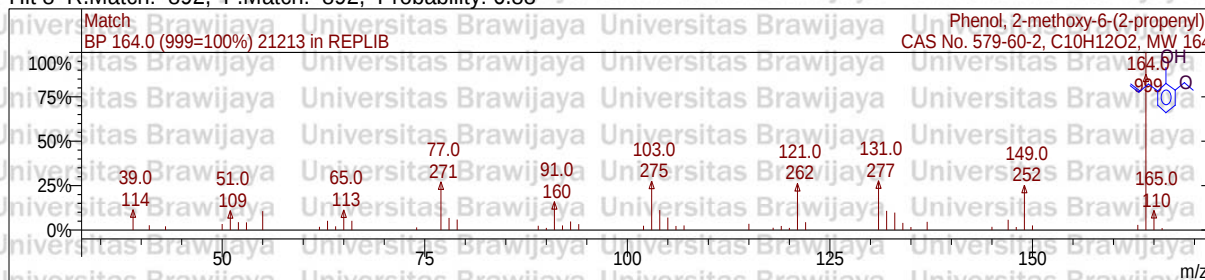
Name: Eugenol

Pair Count: 38 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 97-53-0 Acquired Range: 27.0 - 165.0 m/z

Best 10 Hits of Search NIST Libraries for Spectrum - Page 3

Hit 8 R.Match: 892, F.Match: 892, Probability: 6.88



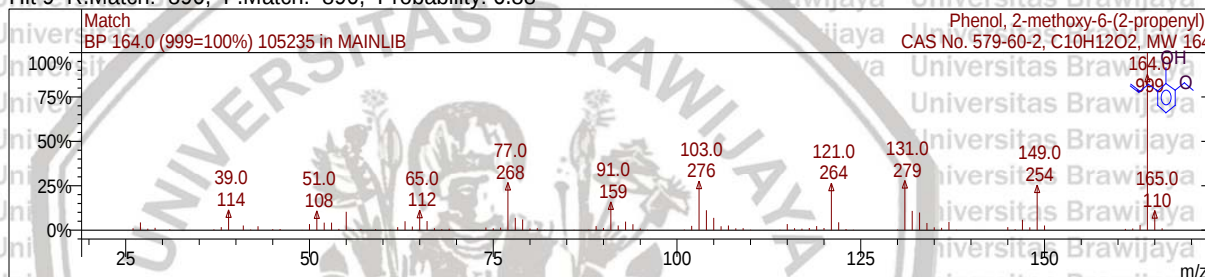
Spectrum 21213 from REPLIB Library

Name: Phenol, 2-methoxy-6-(2-propenyl)-

Pair Count: 50 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 579-60-2 Acquired Range: 39.0 - 166.0 m/z

Hit 9 R.Match: 890, F.Match: 890, Probability: 6.88



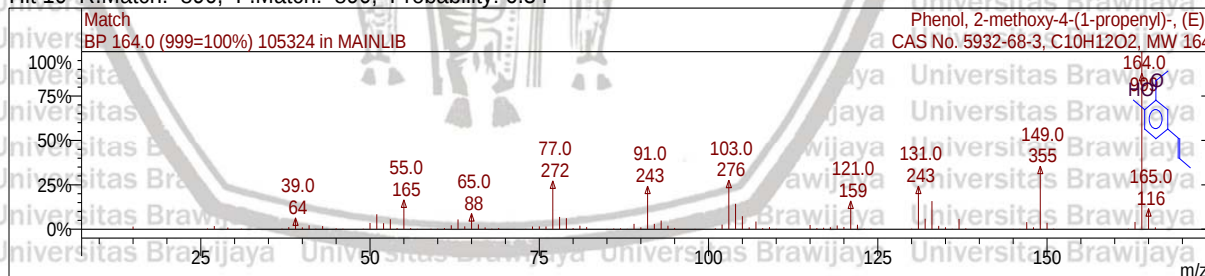
Spectrum 105235 from MAINLIB Library

Name: Phenol, 2-methoxy-6-(2-propenyl)-

Pair Count: 96 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 579-60-2 Acquired Range: 26.0 - 166.0 m/z

Hit 10 R.Match: 890, F.Match: 890, Probability: 6.34



Spectrum 105324 from MAINLIB Library

Name: Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, (E)-

Pair Count: 109 MW: 164 Formula: C₁₀H₁₂O₂

CAS No: 5932-68-3 Acquired Range: 15.0 - 167.0 m/z

LAMPIRAN 7. PERHITUNGAN ANALISIS SIDIK RAGAM UJI CAKRAM**1. Perhitungan Nilai Uji Cakram (mm)**

$$\text{Total A} = 9,89 + 9,94 + 9,63$$

$$\text{A rata-rata} = 29,46/3$$

$$= 9,82$$

$$= 9,82$$

$$\text{Total B} = 10,09 + 9,97 + 10,56$$

$$\text{B rata-rata} = 30,62/3$$

$$= 10,21$$

$$= 10,21$$

$$\text{Total C} = 11,36 + 11,32 + 10,99$$

$$\text{C rata-rata} = 33,67/3$$

$$= 11,22$$

$$= 11,22$$

2. Tabel Rerata Nilai Uji Cakram (mm)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	9,89	9,94	9,63	29,46	9,82
B (150 ppm)	10,09	9,97	10,56	30,62	10,21
C (175 ppm)	11,36	11,32	10,99	33,67	11,22
Jumlah				93,75	31,25

3. Perhitungan Sidik Ragam

$$\begin{aligned} \text{a. Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\ &= 93,75^2/9 \\ &= 976,56 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Jumlah Kuadrat (JK Total)} &= (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + C_3^2) - FK \\ &= (9,89^2 + 9,94^2 + 10,56^2 + \dots + 10,99^2) - 976,56 \\ &= 980,05 - 976,56 \\ &= 3,48 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK Perlakuan} &= \frac{\sum (T \times t)^2}{r} - FK \\ &= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2)}{r} - FK \\ &= (29,46^2 + 30,62^2 + 33,67^2)/3 - 976,56 \\ &= 973,41 - 976,56 \end{aligned}$$

Lampiran 7. (Lanjutan)

$$\begin{aligned} \text{d. JK galat/acak} &= \text{JK Total} - \text{JK perlakuan} \\ &= 3,48 - 3,15 \\ &= 0,33 \end{aligned}$$

4. Analisa Sidik Ragam Nilai Uji Cakram

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	3,15	1,58	28,46**	5,14	10,92
Acak	6	0,33	0,06			
Total	8	3,48	-			

Keterangan (**) = Berbeda Sangat Nyata

Dikarenakan nilai F hitung > F tabel 5% dan F tabel 1%, maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Beda Nyata Terkecil (BNT).

5. Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \text{ KT}_{\text{acak}}}{r}} \\ &= 0,19 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= T \text{ tabel 5\% (db}_{\text{acak}}) \times \text{SED} \\ &= 2,45 \times 0,19 \\ &= 0,47 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= T \text{ tabel 1\% (db}_{\text{acak}}) \times \text{SED} \\ &= 3,71 \times 0,19 \\ &= 0,71 \end{aligned}$$

6. Tabel Nilai Beda Nyata Terkecil

Perlakuan	Ulangan	1	2	3	Notasi
	Rerata	9,82	10,21	11,22	
A (125 ppm)	9,82	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	10,21	0,39*	0 ^{ns}		b
C (175 ppm)	11,22	1,40**	1,02*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Lampiran 7. (Lanjutan)

Berdasarkan hasil perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil yang diperoleh berbeda sangat nyata, dalam hal ini maka dilakukan perhitungan lanjutan dengan menggunakan *Polynomial Orthogonal*.

7. Perhitungan *Polynomial Orthogonal*

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	16,93	-1	1
B	20,63	0	-2
C	21,46	1	1
$Q = \sum (Ci * Ti)$		4,21	1,89
$\sum Ci^2$		2,00	6,00
$KR = \sum (Ci^2) * r$		6,00	18,00
JK Regresi		2,95	0,20
Total JK regresi		3,48	

8. Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	FH	F 5%	F 1%
Perlakuan	2,00	3,15				
Linier	1,00	2,95	2,95	53,33	5,14	10,92
Kuadratik	1,00	0,20	0,20	3,58	5,14	10,92
Acak	6,00	0,33	0,06			
Total	8,00	3,48				

R^2 Linier	0,898874638
--------------	-------------

Lampiran 8. DATA PENGAMATAN PER-HARI DAN PERHITUNGAN KELULUSHIDUPAN (SR) IKAN MAS (*Cyprinus carpio*).

Hari Ke-	Perlakuan	Jumlah Ikan (Ekor)			Hari Ke-	Perlakuan	Jumlah Ikan (Ekor)		
		1	2	3			1	2	3
Rabu, 18 Juli 2018	K. Positif	10	10	10	Senin, 23 Juli 2018	K. Positif	10	10	10
	K. Negatif	10	10	10		K. Negatif	5	6	3
	A (125 ppm)	10	10	10		A (125 ppm)	8	8	9
	B (150 ppm)	10	10	10		B (150 ppm)	9	10	10
	C (175 ppm)	10	10	10		C (175 ppm)	10	9	9
Kamis, 19 Juli 2018	K. Positif	10	10	10	Selasa, 24 Juli 2018	K. Positif	10	10	10
	K. Negatif	10	10	10		K. Negatif	5	5	1
	A (125 ppm)	10	10	10		A (125 ppm)	8	8	9
	B (150 ppm)	10	10	10		B (150 ppm)	9	9	10
	C (175 ppm)	10	10	10		C (175 ppm)	9	9	9
Jumat, 20 Juli 2018	K. Positif	10	10	10	Rabu, 25 Juli 2018	K. Positif	10	10	9
	K. Negatif	8	9	7		K. Negatif	4	5	1
	A (125 ppm)	9	10	10		A (125 ppm)	7	8	8
	B (150 ppm)	10	10	10		B (150 ppm)	9	9	10
	C (175 ppm)	10	10	10		C (175 ppm)	9	9	9
Sabtu, 21 Juli 2018	K. Positif	10	10	10	Kamis, 26 Juli 2018	K. Positif	10	10	9
	K. Negatif	8	8	6		K. Negatif	4	3	0
	A (125 ppm)	9	8	10		A (125 ppm)	7	7	6
	B (150 ppm)	9	10	10		B (150 ppm)	9	8	9
	C (175 ppm)	10	10	10		C (175 ppm)	8	9	9
Minggu, 22 Juli 2018	K. Positif	10	10	10	Jumat, 27 Juli 2018	K. Positif	10	10	9
	K. Negatif	6	6	4		K. Negatif	4	2	0
	A (125 ppm)	9	8	9		A (125 ppm)	6	7	6
	B (150 ppm)	9	10	10		B (150 ppm)	8	8	8
	C (175 ppm)	10	9	10		C (175 ppm)	8	9	9

Lampiran 8. (Lanjutan)

1. Nilai Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Perlakuan	Ulangan	Σ Ikan Awal Penelitian	Σ Ikan Akhir Penelitian	Kelulushidupan (%)	Rata-rata (%)
Kontrol Positif	1	10	10	100	96,67
	2	10	10	100	
	3	10	9	90	
Kontrol Negatif	1	10	4	40	20
	2	10	2	20	
	3	10	0	0	
A (125 ppm)	1	10	6	60	63,33
	2	10	7	70	
	3	10	6	60	
B (150 ppm)	1	10	8	80	80
	2	10	8	80	
	3	10	8	80	
C (175 ppm)	1	10	8	80	86,67
	2	10	9	90	
	3	10	9	90	

2. Perhitungan Nilai Kelulushidupan dalam Persentase (%)

$$\text{Total A} = 60 + 70 + 60$$

$$= 190$$

$$\text{Total B} = 80 + 80 + 80$$

$$= 240$$

$$\text{Total C} = 80 + 90 + 90$$

$$= 260$$

$$\text{A rata-rata} = 190/3$$

$$= 63,33$$

$$\text{B rata-rata} = 240/3$$

$$= 80$$

$$\text{C rata-rata} = 260/3$$

$$= 86,67$$

3. Tabel Rerata Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)(%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	60	70	60	190	63,33
B (150 ppm)	80	80	80	240	80
C (175 ppm)	80	90	90	260	86,67
Jumlah				690	230

Lampiran 8. (Lanjutan)

4. Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) $= \frac{C^2}{N}$
 $= 690^2/9$
 $= 52900$
- Jumlah Kuadrat (JK Total) $= (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + C_3^2) - FK$
 $= (60^2 + 70^2 + 60^2 + \dots + 90^2) - 52900$
 $= 53900 - 52900$
 $= 1000$
- JK Perlakuan $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2)}{r} - FK$
 $= (190^2 + 240^2 + 260^2)/3 - 52900$
 $= 161300/3 - 52900$
 $= 53766 - 52900$
 $= 867$
- JK galat/acak $= JK \text{ Total} - JK \text{ perlakuan}$
 $= 1000 - 867$
 $= 133$

5. Analisa Sidik Ragam Kelulushidupan

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	866	433	19,50**	5,14	10,92
Acak	6	133	22			
Total	8	1000	-			

Keterangan (**) = Berbeda Sangat Nyata

Dikarenakan nilai F hitung > F tabel 5% dan F tabel 1%, maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Beda Nyata Terkecil (BNT).

Lampiran 8. (Lanjutan)

6. Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil

$$SED = \sqrt{\frac{2 K T_{acak}}{r}}$$

$$= 3,85$$

$$BNT 5\% = T \text{ tabel } 5\% (db_{acak}) \times SED$$

$$= 2,45 \times 3,85$$

$$= 9,42$$

$$BNT 1\% = T \text{ tabel } 1\% (db_{acak}) \times SED$$

$$= 3,71 \times 3,85$$

$$= 14,27$$

7. Tabel Nilai Beda Nyata Terkecil Kelulushidupan

Perlakuan	Ulangan	1	2	3	Notasi
	Rerata	63,33	80	86,67	
A (125 ppm)	63,33	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	80	16,67*	0 ^{ns}		b
C (175 ppm)	86,67	23,33**	6,67*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil yang diperoleh berbeda sangat nyata, dalam hal ini maka dilakukan perhitungan lanjutan dengan menggunakan *Polynomial Orthogonal*.

8. *Polynomial Orthogonal*

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	190	-1	1
B	240	0	-2
C	260	1	1
Q = $\sum (Ci * Ti)$		70	-30
$\sum Ci^2$		2	6
KR = $\sum (Ci^2) * r$		6	18
JK Regresi		817	50
Total JK regresi		1000	

R ² Linier	0,859649123
-----------------------	-------------

Lampiran 9. PERHITUNGAN HISTOPATOLOGI HATI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

1. Data Skoring Kerusakan Histopatologi Hati

Nama Kerusakan Patologi	Sampel	Ulangan	Bidang Pandang (Skoring)			Rerata Bidang Pandang	Rerata Kerusakan
			1	2	3		
Nekrosis	Kontrol Positif	1	2	1	1	1,33	1,11
		2	1	1	1	1,00	
		3	1	1	1	1,00	
	Kontrol Negatif	1	3	4	4	3,66	3,33
		2	3	3	3	3,00	
		3	4	3	3	3,33	
	A (125 ppm)	1	2	2	3	2,33	2,44
		2	3	3	1	2,33	
		3	3	2	3	2,67	
	B (150 ppm)	1	1	3	2	2,00	2,11
		2	3	2	2	2,33	
		3	2	2	2	2,00	
	C (175 ppm)	1	1	2	2	1,67	1,56
		2	1	1	2	1,33	
		3	1	2	2	1,67	
Hipertrofi	Kontrol Positif	1	1	1	1	1,00	1,11
		2	1	1	1	1,00	
		3	1	2	1	1,33	
	Kontrol Negatif	1	3	3	3	3,00	3,11
		2	3	3	4	3,33	
		3	3	3	3	3,00	
	A (125 ppm)	1	2	3	2	2,33	2,22
		2	2	2	2	2,00	
		3	3	3	1	2,33	
	B (150 ppm)	1	2	2	2	2,00	1,78
		2	1	2	2	1,67	
		3	1	2	2	1,67	
	C (175 ppm)	1	1	2	1	1,33	1,44
		2	1	1	2	1,33	
		3	2	2	1	1,67	

Keterangan : - 1 (tingkat kerusakan 0-5%)
 - 2 (tingkat kerusakan 6-25%)
 - 3 (tingkat kerusakan 26-50%)
 - 4 (tingkat kerusakan >50%)

Lampiran 9. (Lanjutan)

2. Nekrosis

a. Perhitungan Rerata Skoring Nekrosis

$$\begin{aligned}
 \text{Total A} &= 2,33+2,33+2,67 & \text{A rata-rata} &= 7,33/3 \\
 &= 7,33 & &= 2,44 \\
 \text{Total B} &= 2,00+2,33+2,00 & \text{B rata-rata} &= 6,33/3 \\
 &= 6,33 & &= 2,11 \\
 \text{Total C} &= 1,67+1,33+1,67 & \text{C rata-rata} &= 4,67/3 \\
 &= 4,67 & &= 1,56
 \end{aligned}$$

b. Tabel Rerata Nilai Skoring Nekrosis

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	2,33	2,33	2,67	7,33	2,44
B (150 ppm)	2,00	2,33	2,00	6,33	2,11
C (175 ppm)	1,67	1,33	1,67	4,67	1,56
Jumlah				18,33	6,11

c. Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{N}$
 $= 18,33^2/9$
 $= 37,33$
- Jumlah Kuadrat (JK Total) $= (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + C_3^2) - FK$
 $= (2,33^2 + 2,33^2 + 2,67^2 + \dots + 1,67^2) - 37,33$
 $= 38,76 - 37,33$
 $= 1,43$
- JK Perlakuan $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{n} - FK$
 $= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2)}{3} - FK$
 $= (7,33^2 + 6,33^2 + 4,67^2)/3 - 37,33$
 $= 115,60/3 - 37,33$
 $= 38,53 - 37,33$
 $= 1,20$

Lampiran 9. (Lanjutan)

$$\begin{aligned} \bullet \text{ JK galat/acak} &= \text{JK Total} - \text{JK perlakuan} \\ &= 1,43 - 1,20 \\ &= 0,23 \end{aligned}$$

d. Analisa Sidik Ragam Skoring Nekrosis

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	1,20	0,602	15,92**	5,14	10,92
Acak	6	0,23	0,038	**		
Total	8	1,43	-			

Keterangan (**) = Berbeda Sangat Nyata

Dikarenakan nilai F hitung > F tabel 5% dan F tabel 1%, maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Beda Nyata Terkecil (BNT)

e. Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil

$$\text{SED} = \sqrt{\frac{2 \text{ KT}_{\text{acak}}}{r}}$$

$$= 0,159$$

$$\text{BNT 5\%} = T \text{ tabel 5\% (db}_{\text{acak}}) \times \text{SED}$$

$$= 2,45 \times 0,159$$

$$= 0,39$$

$$\text{BNT 1\%} = T \text{ tabel 1\% (db}_{\text{acak}}) \times \text{SED}$$

$$= 3,71 \times 0,159$$

$$= 0,59$$

f. Tabel Nilai Beda Nyata Terkecil Nekrosis

Perlakuan	3	2	1	Notasi
Rerata	1,56	2,11	2,44	
C (175 ppm)	1,56	0 ^{ns}		a
B (150 ppm)	2,11	0,55*	0 ^{ns}	b
A (125 ppm)	2,44	0,89**	0,33*	0 ^{ns}
				c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(^{ns}) = Tidak Berbeda Nyata

Lampiran 9. (Lanjutan)

Berdasarkan hasil perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil yang diperoleh berbeda sangat nyata, dalam hal ini maka dilakukan perhitungan lanjutan dengan menggunakan *Polynomial Orthogonal*.

g. *Polynomial Orthogonal*

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	7,33	-1	1
B	6,33	0	-2
C	4,67	1	1
$Q = \sum (Ci * Ti)$		-2,66	-0,66
$\sum Ci^2$		2,00	6,00
$KR = \sum (Ci^2) * r$		6,00	18,00
JK Regresi		1,18	0,02
Total JK regresi		1,43	

h. Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	FH	F 5%	F 1%
Perlakuan	2,00	1,20				
Linier	1,00	1,18	1,18	31,21	5,14	10,92
Kuadratik	1,00	0,02	0,02	0,64	5,14	10,92
Acak	6,00	0,23	0,04			
Total	8,00	1,43				

R^2 Linier	0,838738739
--------------	-------------

3. Hipertrofi

a. Perhitungan Rerata Skoring Hipertrofi

Total A = 2,33+2,33+2,00 = 6,66	A rata-rata = 6,66/3 = 2,22
Total B = 2,00+2,33+2,00 = 6,33	B rata-rata = 5,34/3 = 1,78
Total C = 1,67+1,33+1,33 = 4,33	C rata-rata = 4,33/3 = 1,44

Lampiran 9. (Lanjutan)

b. Tabel Rerata Nilai Skoring Hipertrofi

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (125 ppm)	2,33	2,00	2,33	6,66	2,22
B (150 ppm)	2,00	1,67	1,67	5,34	1,78
C (175 ppm)	1,33	1,33	1,67	4,33	1,44
Jumlah				16,33	5,44

c. Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{N}$
 $= 16,33^2/9$
 $= 29,63$
- Jumlah Kuadrat (JK Total) $= (A^2 + A^2 + A^2 + \dots + C^2) - FK$
 $= (2,33^2 + 2,00^2 + 2,33^2 + \dots + 1,67^2) - 29,63$
 $= 30,76 - 29,63$
 $= 1,13$
- JK Perlakuan $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2)}{r} - FK$
 $= (6,66^2 + 5,34^2 + 4,33^2)/3 - 29,63$
 $= 91,62/3 - 29,63$
 $= 30,54 - 29,63$
 $= 0,91$
- JK galat/acak $= JK \text{ Total} - JK \text{ perlakuan}$
 $= 1,13 - 0,91$
 $= 0,22$

Lampiran 9. (Lanjutan)

d. Analisa Sidik Ragam Skoring Hipertrofi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	0,91	0,46	12,28**	5,14	10,92
Acak	6	0,22	0,04			
Total	8	1,13	-			

Keterangan (**) = Berbeda Sangat Nyata

Dikarenakan nilai F hitung > F tabel 5% dan F tabel 1%, maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Beda Nyata Terkecil (BNT)

e. Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil

$$SED = \sqrt{\frac{2 \text{ KT}_{\text{acak}}}{r}}$$

$$= 0,157$$

$$\text{BNT } 5\% = T \text{ tabel } 5\% (db_{\text{acak}}) \times SED$$

$$= 2,45 \times 0,157$$

$$= 0,38$$

$$\text{BNT } 1\% = T \text{ tabel } 1\% (db_{\text{acak}}) \times SED$$

$$= 3,71 \times 0,157$$

$$= 0,58$$

f. Tabel Nilai Beda Nyata Terkecil Hipertrofi

Perlakuan	Ulangan	3	2	1	Notasi
	Rerata	1,44	1,78	2,22	
C (175 ppm)	1,44	0 ^{ns}			a
B (150 ppm)	1,78	0,34*	0 ^{ns}		b
A (125 ppm)	2,22	0,78**	0,44*	0 ^{ns}	c

Keterangan (*) = Berbeda Nyata

(**) = Berbeda Sangat Nyata

(ns) = Tidak Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil yang diperoleh berbeda sangat nyata, dalam hal ini maka dilakukan perhitungan lanjutan dengan menggunakan *Polynomial Orthogonal*.

Lampiran 9. (Lanjutan)

g. *Polynomial Orthogonal*

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	6,66	-1	1
B	5,34	0	-2
C	4,33	1	1
$Q = \sum (Ci * Ti)$		-2,33	0,31
$\sum Ci^2$		2,00	6,00
$KR = \sum (Ci^2) * r$		6,00	18,00
JK Regresi		0,90	0,01
Total JK regresi		1,13	

h. Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	FH	F 5%	F 1%
Perlakuan	2,00	0,91				
Linier	1,00	0,90	0,90	24,43	5,14	10,92
Kuadratik	1,00	0,01	0,01	0,14	5,14	10,92
Acak	6,00	0,22	0,04			
Total	8,00	1,13				

R^2 Linier	0,802794824
--------------	-------------

Lampiran 10. DATA KUALITAS AIR SELAMA PEMELIHARAAN 10 HARI

Hari Ke-	Kualitas air	Waktu	KONTROL						PERLAKUAN								
			Positif			Negatif			A (125 ppm)			B (150 ppm)			C (175 ppm)		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	pH	Pagi	7	7,1	7	7	7,2	7,1	7	7,4	7	7	7	7,3	7,2	7,2	7,1
		Sore	7	7	7	7,1	7,1	7,2	7	7	7,3	7	7,2	7,3	7,2	7,3	7,1
	Suhu (°C)	Pagi	22,2	22,6	22	22	22,5	22	22,2	23	22,3	22	22,6	22	22,2	22,2	22
		Sore	24	24	23,8	23	23,7	23	24	22,3	23,3	24,1	23,9	23,4	24,1	23	23,4
	DO (mg/L)	Pagi	4,4	4,5	4,7	4,4	4,4	5,2	4,5	4,9	4,5	4,8	4,4	4,5	4,7	4,5	4,7
		Sore	4,7	5,3	4,5	5	4,5	4,6	5,1	5	4,5	4,7	4,9	4,5	4,8	4,6	5,3
2	pH	Pagi	7,2	7,1	7,4	7,2	7,1	7	7	7,4	7	7,3	7,1	7,2	7,2	7	7,3
		Sore	7	7,4	7	7	7,2	7,1	7,2	7,4	7,1	7,2	7,1	7	7,4	7,3	7,1
	Suhu (°C)	Pagi	22	22	22,2	22	22,1	22	22	22,5	22,2	22,4	22	22	22,5	22,1	22,3
		Sore	23,9	24	24,1	23,9	23,7	24,1	24,1	23,4	23,3	24,1	22,9	24,1	23,6	24	24,1
	DO (mg/L)	Pagi	4,8	4,4	5	4,6	4,5	4,9	4,7	4,8	4,5	4,7	5,1	5,2	5,3	4,7	5
		Sore	4,9	4,7	5	4,9	4,6	4,7	4,8	4,7	4,4	5	5,1	4,5	4,9	4,6	4,8
3	pH	Pagi	7	7,2	7,1	7,2	7,5	7,1	7,2	7,4	7	7,4	7,2	7,2	7	7,2	7
		Sore	7,2	7	7,5	7,2	7,5	7,2	7,3	7,4	7,2	7	7,2	7,3	7,4	7,3	7,4
	Suhu (°C)	Pagi	22	22,1	22,3	23,2	22,5	22,3	22	22,2	22,6	22,3	22,5	22	22,1	22	22
		Sore	24,1	24,1	23	24	23,7	24	23,1	23,7	24,1	23,4	23,7	24,1	24,1	22,6	23,5
	DO (mg/L)	Pagi	4,4	4,8	5	4,8	4,7	4,5	4,9	5,1	5,2	4,7	4,8	4,9	5	5,3	4,6
		Sore	4,9	4,4	4,7	4,8	4,7	4,6	5	5,2	5,1	4,8	4,7	5,3	5	4,9	4,8
4	pH	Pagi	7	7,2	7	7	7,4	7	7,2	7,1	7,5	7,2	7,1	7,1	7,3	7,2	7,2
		Sore	7,5	7,4	7,1	7,2	7,3	7	7,5	7,5	7,2	7,1	7,2	7,3	7,3	7,3	7,4
	Suhu (°C)	Pagi	22	22,1	22,3	22,1	22,2	22,3	22,3	22,1	22	22	22	22,3	22,5	22,1	22
		Sore	24,1	24	23,7	23	23,7	23,8	24	24	24,1	24,1	24,1	23,7	24,1	24	23,7
	DO (mg/L)	Pagi	4,6	4,7	4,4	4,6	5	5	4,8	4,4	4,4	4,6	4,6	4,5	4,7	4,9	4,8
		Sore	4,8	4,6	4,7	4,5	4,9	5	5	5,2	4,9	4,6	4,7	5,2	5,2	5	5
5	pH	Pagi	7	7	7	7	7,5	7,2	7,4	7,3	7	7,2	7,3	7,5	7	7,1	7,1
		Sore	7,5	7,4	7,1	7,1	7,2	7,1	7,2	7	7	7,3	7	7,2	7,1	7,3	7
	Suhu (°C)	Pagi	22,6	22,3	22	22	22,3	22,1	22,3	22,3	22,5	22,4	22	22,1	22,3	22,5	22
		Sore	23,7	24,1	24	22,9	24	24	23	23,4	23,1	24	23,7	22,7	22,9	23,7	23,7

6	DO (mg/L)	Pagi	4,5	4,6	4,5	5	5	5,1	5,2	4,5	5,3	4,8	4,7	4,5	5	5	5
		Sore	4,9	4,4	4,8	4,6	4,7	4,9	4,8	4,7	4,6	4,6	4,9	4,8	4,6	4,7	5,3
	pH	Pagi	7	7,1	7	7,2	7,4	7,3	7,2	7,1	7,4	7	7,2	7,3	7,5	7,1	7,5
		Sore	7,2	7,2	7,4	7,4	7,5	7,3	7,3	7,2	7,4	7,1	7,1	7,5	7,4	7,1	7,3
	Suhu (°C)	Pagi	22	22,1	22,3	22	22,5	22,1	23	22	22,1	22	22,1	22,6	23	22,4	22
		Sore	23,7	23,9	23,7	24,1	24	24,1	23,7	24,1	24	23,4	24	23,7	24	24,1	23,7
7	DO (mg/L)	Pagi	5	4,6	4,8	4,5	4,8	4,4	4,9	4,5	4,6	4,8	4,7	4,9	4,8	5	5,2
		Sore	5,1	4,9	4,8	4,6	4,4	4,9	4,8	4,4	4,4	4,4	4,8	4,7	5,2	5,1	5,2
	pH	Pagi	7,1	7,1	7,1	7	7,3	7,2	7,2	7	7,4	7,5	7,2	7,1	7,3	7,1	7
		Sore	7	7,2	7,3	7,2	7,5	7,5	7,5	7,1	7,5	7,4	7,2	7,2	7,4	7,2	7,1
	Suhu (°C)	Pagi	22	22,6	22,1	22,3	22,1	22	22,6	22	22,1	22,1	22,2	22	22,3	22,6	22
		Sore	23,7	24	23,8	24,1	24,1	23,4	24	23,4	24	23,9	23,4	23,8	24,1	24,1	24
8	DO (mg/L)	Pagi	4,6	4,5	4,5	4,8	5	5	5,1	5,3	5,3	5,2	4,4	4,7	4,4	4,8	4,9
		Sore	4,4	4,4	4,5	4,6	4,5	4,8	4,7	4,9	5,3	5	5	5	5,3	5,2	5
	pH	Pagi	7,1	7,1	7,2	7	7,1	7,1	7,4	7,4	7	7,1	7	7,2	7	7,2	7,5
		Sore	7	7,5	7,3	7,1	7	7,3	7,5	7,5	7,1	7,2	7,1	7,2	7,2	7,3	7,4
	Suhu (°C)	Pagi	22	22	22,1	22,2	22,3	22	22	22,1	22,3	22	22,3	22,2	22,1	22	22,8
		Sore	24,2	23	24,1	23,9	23,4	24,1	25,7	23,7	23,5	24	24	24	23,9	23,8	24,1
9	DO (mg/L)	Pagi	4,8	4,6	4,4	4,7	4,5	4,4	4,6	5	5	5	4,9	5	5,1	4,6	4,6
		Sore	5	5	4,4	4,6	4,4	4,7	4,8	4,7	4,8	4,9	4,6	5,2	5,2	5,3	4,8
	pH	Pagi	7,1	7,2	7,1	7,3	7,4	7,5	7,3	7,4	7,5	7	7	7,5	7,3	7,1	7,1
		Sore	7	7,1	7,1	7,1	7	7,1	7,2	7,4	7,5	7,1	7,2	7,4	7,4	7,2	7,4
	Suhu (°C)	Pagi	22,1	22,2	22,3	22,2	22	22,1	22,3	22	22,1	22,3	22	22,2	22,1	22,3	22,1
		Sore	24	23,5	23,7	23,5	24,1	23,5	24	24,1	23,7	23,8	24,1	23,7	24,1	24	24
10	DO (mg/L)	Pagi	4,4	4,8	4,5	5	5,1	5	4,9	5	5,2	5,1	5	4,8	4,8	4,9	5,1
		Sore	5	4,7	4,4	5	5	4,8	4,7	4,8	4,4	4,9	4,5	4,7	5,1	5	5,3
	pH	Pagi	7,4	7,2	7,1	7,2	7	7	7,5	7	7	7,5	7,3	7,1	7,1	7,1	7,1
		Sore	7,1	7	7,1	7,1	7,1	7	7,3	7,1	7,2	7,5	7,2	7	7	7,1	7
	Suhu (°C)	Pagi	22,3	22	22,1	22,1	22,2	22,1	22,3	22,1	22	22	22,2	22,8	22,3	22	22,4
		Sore	24	23	23,8	24	23,2	23,4	24	23,4	23,8	24	23,9	23,8	24,1	23,6	24
	DO (mg/L)	Pagi	4,5	4,8	4,7	4,9	5	5	5,1	5,1	5,3	4,5	4,4	4,8	4,8	4,6	5
		Sore	4,5	4,6	5	4,9	4,7	4,8	4,9	5	5,1	4,4	4,4	4,5	4,6	4,6	5,1