

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Uji LD-50

Uji LD-50 merupakan uji patogenitas yang dilakukan untuk mengetahui kepadatan bakteri yang akan digunakan pada tahap uji *in vitro* dan uji *in vivo*. Hasil uji patogenitas dengan menghitung nilai LD-50 dari bakteri *A. salmonicida* dengan metode Reed dan Muench (Lampiran 2), didapatkan kepadatan bakteri *A. salmonicida* yang dapat menyebabkan kematian ikan 50% adalah 10^7 cfu/ml.

2. Uji *In Vitro*

Uji MIC dengan menggunakan metode *dillution tube* dilakukan untuk mengetahui nilai minimum dari konsentrasi ekstrak daun ketapang yang dapat menghambat pertumbuhan *A. salmonicida*. Nilai MIC yang didapat adalah ekstrak daun ketapang dengan konsentrasi 50 mg/ml. Sehingga nilai MIC tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi yang berada di atasnya dalam uji *in vivo* (75 dan 100 mg/ml).

Finegold dan Ellen, 1986 dalam Wardiyanto dan Eko (2008), menyebutkan bahwa Metode *dillution tube* digunakan untuk menentukan nilai MIC, dinyatakan ada pertumbuhan bila tabung sampel mempunyai kekeruhan yang sama dengan tabung

kontrol bakteri. Dinyatakan ada hambatan pertumbuhan apabila kekeruhannya sama dengan tabung kontrol bahan. Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dicatat sebagai MIC

3. Uji *In Vivo*

3.1 Respon makan ikan

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa pada semua perlakuan yaitu A, B, dan C ikan patin menunjukkan tidak ada respon makan selama satu hari setelah penyuntikan pada hari ke -0. Akan tetapi pada hari berikutnya hingga akhir penelitian ikan memberikan respon makan yang sangat baik

Pada kontrol positif, ikan uji mengalami respon makan yang baik pada hari ke -3 hingga hari ke -1 sebelum ikan di injeksi *A. salmonicida*. Pada hari ke -0, yaitu pada saat ikan diinjeksi (*A. salmonicida* untuk kontrol positif) ikan tidak memberikan respon makan selama dua hari hingga hari ke-1. Pada kontrol positif, ikan memberikan respon makan walaupun hanya sedikit (kurang) pada hari ke-2 hingga hari ke-7.

Tabel 2. Respon makan ikan selama penelitian

Hari ke-	RESPON MAKAN IKAN														
	A			B			C			Kontrol (-)			Kontrol (+)		
	ulangan			ulangan			ulangan			ulangan			ulangan		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
-5	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
-3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	++
-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+
1	+	++	+	+	+	+	++	+	++	++	++	++	-	+	+
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	++	+	+
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+	+
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+

Keterangan : - tidak ada respon makan
 + respon makan kurang
 ++ respon makan baik
 +++ respon makan ikan sangat baik

Ket : ikan uji dengan perlakuan :

A : injeksi ekstrak daun ketapang 50 mg/ml dan injeksi *A. salmonicida*

B : injeksi ekstrak daun ketapang 75 mg/ml dan injeksi *A. salmonicida*

C : injeksi ekstrak daun ketapang 100 mg/ml dan injeksi *A. salmonicida*

K- : tanpa injeksi ekstrak daun ketapang (kontrol negatif)

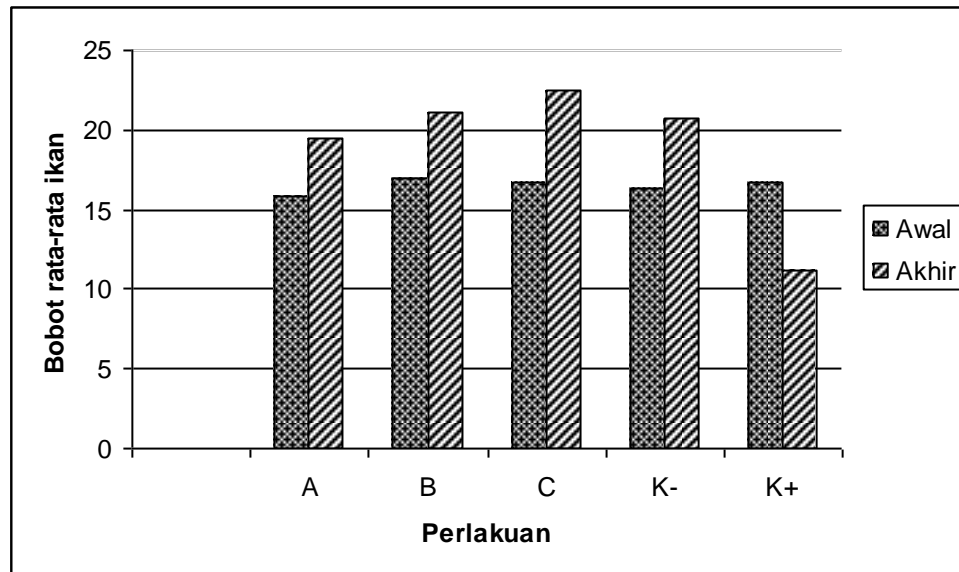
K+ : tanpa injeksi ekstrak daun ketapang tetapi injeksi *A. salmonicida* (kontrol positif)

3.2 Pengamatan bobot rata-rata ikan

Berdasarkan Gambar 8 dapat diketahui bahwa pada perlakuan A, B, C, dan Kontrol negatif ikan terjadi peningkatan bobot rata-rata tubuh yang bervariasi hingga sebesar 7 gram. Peningkatan bobot tubuh akibat respon makan yang sangat baik pada perlakuan A, B, dan C dipengaruhi oleh kondisi ikan yang sudah tidak mengalami stres pasca penyuntikan.

Penurunan bobot rata-rata terjadi pada ikan perlakuan kontrol positif.

Penurunan bobot rata-rata pada kontrol positif disebabkan karena kurangnya respon terhadap makan yang diakibatkan karena ikan mengalami stress akibat penyuntikan bakteri *A. salmonicida* dan akibat tidak adanya perlakuan pencegahan dengan menggunakan ekstrak daun ketapang.



Gambar 8. Bobot rata-rata ikan patin selama penelitian

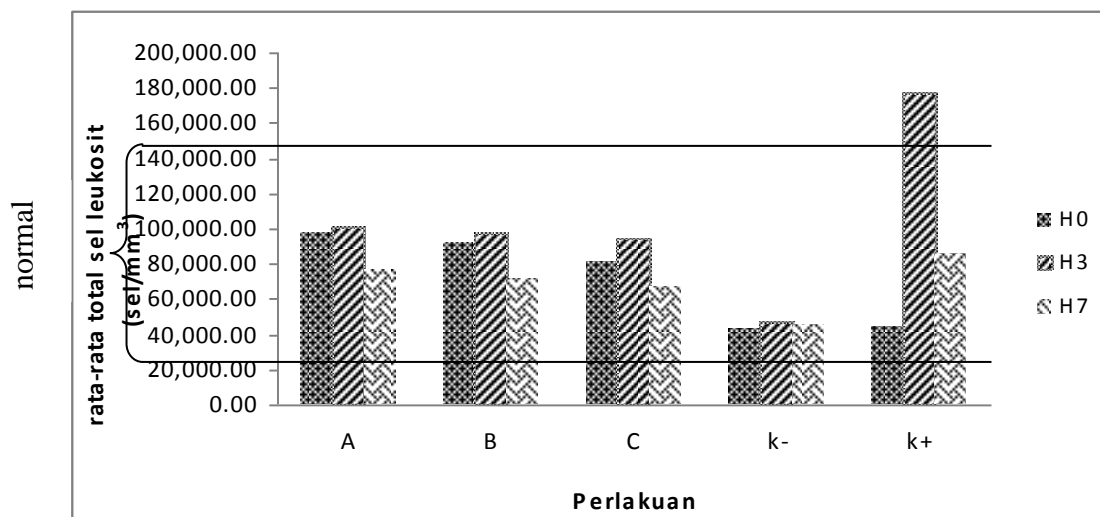
3.3. Pemeriksaan darah

3.3.1. Total leukosit

Berdasarkan hasil pengamatan uji darah yang telah dilakukan pada umumnya jumlah leukosit dan diferensial leukosit mengalami peningkatan pada darah ikan yang telah diinjeksi dengan ekstrak daun ketapang. Jumlah leukosit meningkat setelah diinjeksi dengan bakteri *A. salmonicida*, hal tersebut terlihat pada hari ke-3. Seluruh pengamatan difokuskan pada hari ke 3 karena pada hari ke-3 merupakan pengamatan setelah ikan uji diinjeksi dengan bakteri dan perubahan yang terjadi dapat terlihat dengan jelas.

Berdasarkan Gambar 9 dapat diketahui bahwa jumlah leukosit ikan perlakuan ekstrak daun ketapang pada hari ke-0, dengan konsentrasi 50 mg/ml sebesar 97.400 sel/mm³, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 92.000 sel/mm³ dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 80.867 sel/mm³, lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif yaitu sebesar 43.200 sel/mm³ dan 44.017 sel/mm³.

Pada hari ke-3 terjadi peningkatan jumlah leukosit pada semua perlakuan, yaitu pada konsentrasi 50 mg/ml sebesar 100.950 sel/mm³, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 97.833 sel/mm³ dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 93.966 sel/mm³, lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu sebesar 47.750 sel/mm³, sedangkan leukosit pada kontrol positif melebihi batasan normal yaitu 177.017 sel/mm³.



Gambar 9. Rata-rata total leukosit pada ikan patin selama penelitian

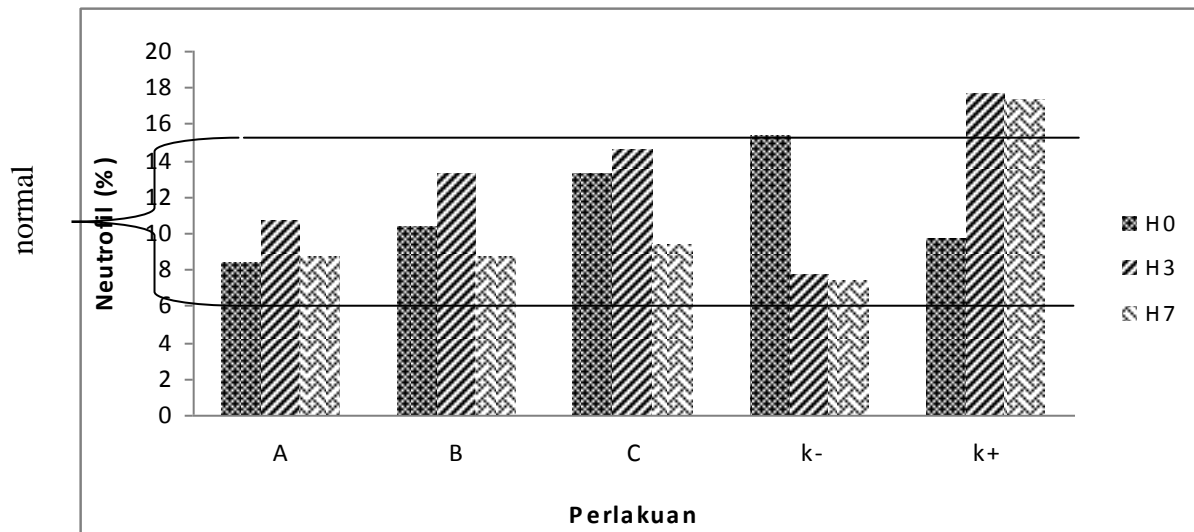
Pada hari ke-7, jumlah leukosit pada semua perlakuan kembali menurun pada semua perlakuan, yaitu pada konsentrasi 50 mg/ml sebesar 77.317 sel/mm³, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 71.216 sel/mm³ dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 66.817 sel/mm³, dan kontrol negatif dan positif yaitu sebesar 44.650 sel/mm³ dan 85.650 sel/mm³.

3.3.2 Diferensial Leukosit

Berdasarkan Gambar 10, dapat diketahui bahwa persentase neutrofil cenderung meningkat setelah diinjeksi dengan ekstrak daun ketapang dan injeksi bakteri *A. salmonicida*. Pada hari ke-0, persentase neutrofil perlakuan ekstrak daun ketapang lebih tinggi dari kontrol positif tetapi lebih rendah dibanding dengan kontrol negatif. Jumlah neutrofil pada konsentrasi 50 mg/ml sebesar 8,33 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 10,33 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 11,33 % sel/mm³. Sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif adalah 15,33 % dan 9,67 %.

Jumlah neutrofil pada hari ke-3 mengalami peningkatan disemua perlakuan. Peningkatan tersebut berhubungan dengan adanya respon terhadap infeksi yaitu membunuh bakteri dan membersihkan pecahan jaringan. Lebih lanjut lagi Lucky (1977) dalam Rukhyani *et al* (1997) menjelaskan bahwa pada saat terjadi infeksi, jumlah neutrofil akan meningkat 6 -7 %. Pada perlakuan A, B, dan C neutrofil juga mengalami peningkatan akan tetapi peningkatannya masih dalam kisaran normal. Persentase neutrofil ikan uji pada kontrol positif melebihi batas normal yaitu sebesar 17,67 %. Pada hari ke-7, jumlah neutrofil mengalami penurunan

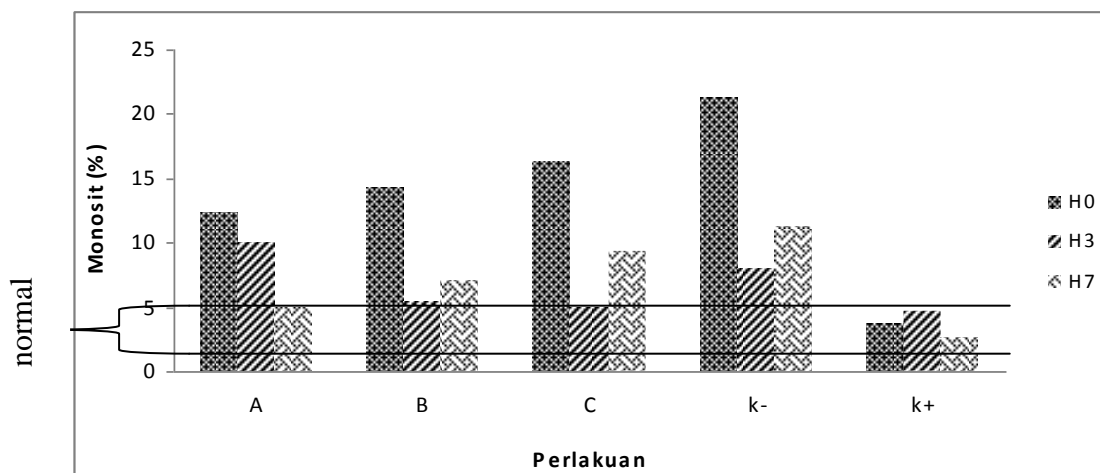
pada semua perlakuan, walaupun pada perlakuan kontrol positif persentase penurunan jumlah neutrofil sangat sedikit yaitu dari 17,67 % menjadi 17,33 %.



Gambar 10. Persentase rata-rata neutrofil dalam darah ikan patin selama penelitian

Berdasarkan Gambar 11, dapat diketahui bahwa persentase monosit dihari ke-0 pada perlakuan ikan konsentrasi 50 mg/ml sebesar 12.33 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 14.33 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 16.33 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 21.33 % dan 3.67 %.

Pada hari ke-3, jumlah monosit pada semua perlakuan mengalami penurunan presentase. Kemudian pada hari ke-7 perlakuan B, C, Kontrol positif, dan Kontrol negatif mengalami peningkatan kembali, kecuali pada perlakuan A. Peningkatan persentase monosit tersebut diduga karena fungsinya sebagai makrofag dan memfagosit benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

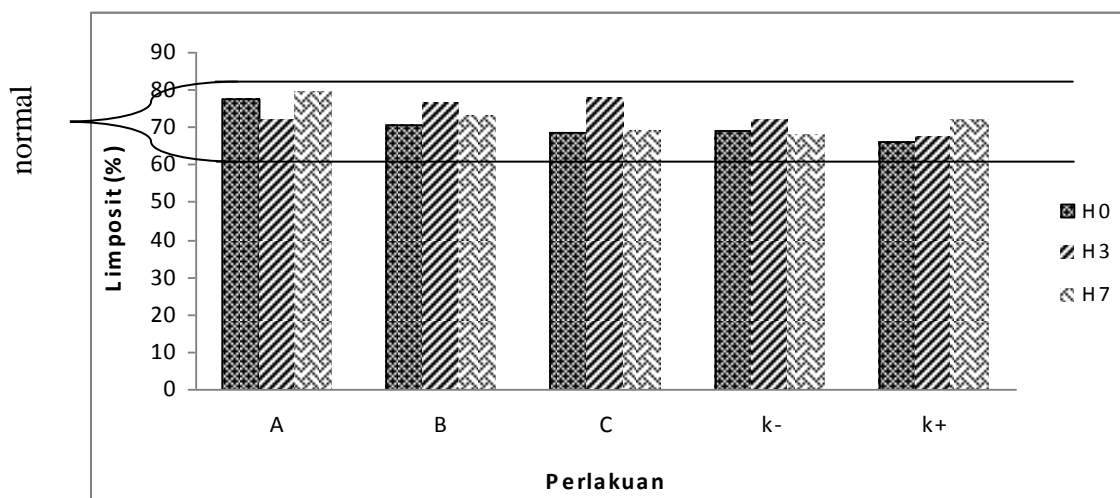


Gambar 11. Persentase rata-rata monosit dalam darah ikan patin selama penelitian

Berdasarkan Gambar 12 dapat diketahui bahwa pada hari ke-0, persentase limfosit pada konsentrasi perlakuan 50 mg/ml sebesar 77.33 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 70.67 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 68.67 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 69.33 % dan 66 %.

Pada hari ke-3 persentase limfosit pada konsentrasi perlakuan 50 mg/ml sebesar 72 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 76,33 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 78 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 72,33 % dan 67,67 %.

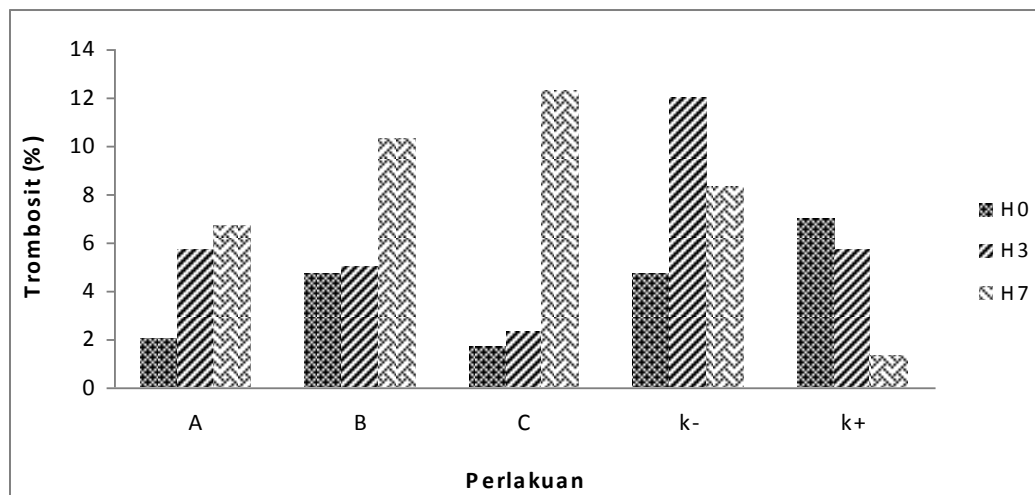
Pada hari ke-7 persentase limfosit pada konsentrasi perlakuan 50 mg/ml sebesar 79,67 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 73,33 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 69 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 68 % dan 72,33 %. Nilai persentase limfosit tersebut masih dalam kisaran normal yaitu 60% – 80% (Anderson, 1947; Chinabut *et al.*, 1991; Klontz, 1994 dalam Johnny *et al.*, 2003).



Gambar 12. Persentase rata-rata limfosit dalam darah ikan patin selama penelitian

Berdasarkan Gambar 13, dapat diketahui bahwa pada hari ke-0 persentase trombosit pada perlakuan ikan konsentrasi 50 mg/ml sebesar 2 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 4,67 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 1,67 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 4,67 % dan 7 %.

pada hari ke-3 persentase trombosit pada perlakuan ikan konsentrasi 50 mg/ml sebesar 5,67 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 5 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 2,33 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 12 % dan 5,67 %. Sedangkan pada hari ke-7 persentase trombosit pada perlakuan ikan konsentrasi 50 mg/ml sebesar 6,67 %, konsentrasi 75 mg/ml sebesar 10,33 %, dan pada konsentrasi 100 mg/ml sebesar 12,33 %, sedangkan pada kontrol negatif dan kontrol positif sebesar 8,33 % dan 1,33 %.



Gambar 13. Total rata-rata trombosit dalam darah ikan patin selama penelitian

B. Pembahasan

Kemampuan ekstrak daun ketapang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida* dapat terbukti melalui uji *in vitro*. Dari uji tersebut didapatkan konsentrasi ekstrak daun ketapang yang efektif menghambat *A. salmonicida* adalah pada konsentrasi 50 mg/ml. MIC dapat dicirikan dengan warna larutan dalam tabung sampel berwarna jernih (warnanya sama dengan warna yang terdapat pada tabung kontrol negatif). Hal ini dapat dilihat seperti pada Lampiran 5. Nilai MIC yang didapat adalah ekstrak daun ketapang dengan konsentrasi 50 mg/ml. Sehingga nilai MIC tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi yang berada di atasnya dalam uji *in vivo* (75 dan 100 mg/ml).

Daun ketapang merupakan tumbuhan yang mengandung zat antibakteri terhadap *A. salmonicida*. Senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri pada daun ketapang adalah flavonoid dan tannin yang berfungsi sebagai antibakteri dan mampu merangsang kekebalan tubuh (Angka *et al*, 2004). Flavonoid mempunyai

sifat yang khas yaitu bau yang tajam, sebagian besar merupakan pigmen warna kuning, dapat larut dalam air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi. Flavonoid diketahui telah disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba sehingga flavonoid efektif secara *in vitro* terhadap sejumlah mikroorganisme. Aktivitas flavonoid kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, dan dengan dinding sel. Flavonoid yang bersifat lipofilik mungkin juga akan merusak membran mikroba (Paisal, 2009). Tannin adalah suatu nama deskriptif umum untuk satu grup substansi fenolik polimer yang mampu menyamak kulit atau mempresipitasi gelatin dari cairan, suatu sifat yang dikenal sebagai astringensi (Indobic, 2009). Salah satu aksi molekul tannin adalah membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan non spesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukkan ikatan kovalen. Cara kerja aksi antimikrobal tannin mungkin berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, protein transport cell envelope. Tannin juga membentuk kompleks dengan polisakarida (Anonymous, 2009).

Pertumbuhan bakteri juga dapat terhambat oleh beberapa faktor diantaranya adalah perbedaan tekanan osmosis yang terjadi antara cairan di dalam dan di luar bakteri, rusaknya membran sel yang diakibatkan karena iritasi dan perubahan pH (Salle, 1996 dalam Delviana, 1999). Bakteri *Aeromonas* adalah bakteri gram negatif yang mempunyai dinding sel yang kompleks, berlapis-lapis yang disebut juga dengan lapisan lipopolisakarida (*LPS layer*). Lapisan tersebut dapat ditembus oleh ekstrak karena memiliki viskositas yang tinggi, akan terjadi proses

osmosis yang menyebabkan ekstrak masuk ke dalam lapisan LPS dan merusak lapisan tersebut. Membran lapisan luar tersebut memiliki fungsi sebagai pertahanan (*barier*) permeabel terhadap molekul-molekul kecil, namun tidak permeabel pada enzim atau molekul besar dan mengandung toksin (Delviana, 1999). Bakteri juga memiliki kapsul yang merupakan penutup atau pelindung. Bagian tersebut yang dirusak oleh zat antibakteri. Bila bakteri kehilangan kapsulnya, maka tingkat virulensinya akan berkurang sehingga bakteri kehilangan kemampuannya untuk menginfeksi dan akan terhambat pertumbuhannya (Pelezar dan Chan, 1988).

Dari hasil uji *in vivo*, pada awal perlakuan setelah ikan diinjeksi ekstrak daun ketapang maupun setelah injeksi *A. salmonicida* ikan menunjukkan respon makan yang sedikit. Hal ini terjadi diakibatkan pada kondisi tersebut tubuh ikan patin mengalami stres pasca penyuntikan. Tubuh ikan patin harus beradaptasi dengan benda asing yang masuk ke dalam tubuhnya. Namun pada hari selanjutnya ikan patin pada semua perlakuan mulai menunjukkan peningkatan nafsu makan.

Peningkatan bobot tubuh akibat respon makan yang sangat baik terlihat pada perlakuan A, B, dan C dipengaruhi oleh kondisi ikan yang sudah tidak mengalami stres pasca penyuntikan. Penurunan bobot rata-rata terjadi pada ikan perlakuan kontrol positif. Peningkatan bobot rata-rata ikan patin yang paling tinggi adalah pada perlakuan C yaitu konsentrasi ekstrak 100 mg/ml, jika dibandingkan dengan perlakuan A dan B.

Infeksi bakteri yang terjadi dalam tubuh ikan akan mengakibatkan jumlah leukosit meningkat, akan tetapi kinerja dari bakteri yang diinjeksi pada perlakuan A, B, C, dan kontrol positif akan menyebabkan pengaruh yang berbeda. Pada perlakuan A, B, dan C jumlah total leukosit meningkat tetapi masih dalam kisaran normal. Sehingga dari pengamatan darah dan gejala klinis dapat diketahui bahwa ekstrak daun ketapang dapat meningkatkan daya tahan tubuh ikan melalui peningkatan jumlah leukosit yang merupakan pertahanan seluler tubuh ikan. Peningkatan daya tahan tubuh ikan ini memberikan dampak positif dalam melawan infeksi *A. salmonicida*.

Leukosit memiliki tanggungjawab dalam respon kekebalan, apabila ada zat asing yang masuk ke dalam tubuh maka leukosit akan membuat antibodi. Antibodi akan digunakan oleh sistem kekebalan tubuh untuk memberikan rangsangan, mengidentifikasi dan menetralkan benda asing (antigen) yang masuk, seperti bakteri. Semakin besar rangsangan antigen, maka semakin banyak antibodi yang akan dihasilkan. Bakteri yang masuk ke dalam tubuh ikan akan diidentifikasi oleh leukosit sebagai antigen.

Menurut Chinabut *et al* (1991) dalam Rukhyani *et al* (1997) bahwa total leukosit ikan normal berkisar antara 20.000 – 150.000 sel/mm³. Jumlah leukosit yang menyimpang dari keadaan normal mempunyai arti klinis dalam mengevaluasi gangguan kesehatan ikan. Jumlah leukosit akan meningkat secara pesat dalam waktu singkat apabila terjadi suatu infeksi (Anderson, 1974; Tizard, 1982;

Manning dan Tatner, 1985; Nabib dan Pasaribu, 1989; Iwama dan Nakanishi, 1996 dalam Johnny *et al*, 2003).

Austin (1987) mengungkapkan bahwa patogen *A. salmonicida* dapat mendegradasi jaringan organ tubuh serta mengeluarkan toksin yang disebarkan keseluruh tubuh melalui aliran darah sehingga menyebabkan hemolisis dan pecahnya pembuluh darah sehingga menimbulkan warna kemerahan pada tubuh ikan, dan juga merupakan strain *typical* penyebab *fruncle* (melepuh), *haemorage* (kemerahan pada kulit) dan *ulcer* hingga menyebabkan kematian pada ikan. Hal tersebut dapat dilihat pada ikan uji kontrol positif yang mengalami perubahan pada anggota tubuhnya, yaitu berupa hiperemia, peradangan, nekrosis, dan hemoragik (Lampiran 9).

Dari pengamatan darah dan gejala klinis dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun ketapang dapat meningkatkan daya tahan tubuh ikan melalui peningkatan jumlah leukosit yang merupakan pertahanan seluler tubuh ikan. Peningkatan daya tahan tubuh ikan ini memberikan dampak positif dalam melawan infeksi *A.*

salmonicida. Berdasarkan uji darah yang telah dilakukan dengan cara menghitung jumlah leukosit (Lampiran 6), dapat diketahui bahwa perlakuan B tidak berbeda nyata terhadap perlakuan A, dan dan K- tidak berbeda nyata terhadap perlakuan C pada selang kepercayaan 95 %. Perlakuan A, B, C, dan K- berbeda nyata terhadap perlakuan K+, sedangkan perlakuan K- dan C berbeda nyata terhadap perlakuan B dan A. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak daun ketapang yang baik digunakan sebagai pencegahan bakteri *A. salmonicida* yang

baik terdapat pada konsentrasi 100 mg/ml, dan konsentrasi ekstrak daun ketapang 100 mg/ml mampu meningkatkan jumlah leukosit sebagai pertahanan tubuh ikan patin dari infeksi *A. salmonicida*.

Respon imun adalah respon tubuh berupa suatu urutan kejadian yang kompleks terhadap antigen, untuk mengeliminasi antigen tersebut. Respon imun ini dapat melibatkan berbagai macam sel dan protein, terutama sel makrofag, sel limfosit, komplemen, dan sitokin yang saling berinteraksi secara kompleks. mekanisme pertahanan tubuh terdiri atas mekanisme pertahanan non spesifik dan mekanisme pertahanan spesifik (Guyton dan Hall, 1997).

Suatu reaksi tanggap kebal akan timbul apabila ada benda asing (antigen) yang memasuki suatu inang yang bereaksi dengan sistem kekebalan dari inang tersebut. Antigen atau bahan-bahan asing bisa terdiri dari sel-sel seperti bakteri, virus, jamur, parasit atau bahan protein lainnya. Apabila benda asing tersebut memasuki tubuh inang maka akan merangsang jaringan limfosit untuk memproduksi sel-sel limfosit dan makrofag. Limfosit yang dihasilkan oleh tubuh terdiri dari dua jenis sel yaitu :Limfosit-T dan limfosit –B. Perbedaan kedua limfosit ini adalah terletak pada ciri-ciri permukaan dan juga peranan dari setiap jenis sel tersebut. Misalnya dilihat dari fungsi sel-T atau limfosit-T mempunyai beberapa fungsi yaitu antara lain memainkan peran dalam pemusnahan jasad penyebab penyakit dengan jalan merangsang pembentukan “limfokin”. Limfokin adalah sekelompok bahan yang dapat meningkatkan aktifitas makrofag. Tanggap kebal yang ditimbulkan oleh sel-T disebut dengan keimunan perantara sel (cell

mediated immunity) sedangkan tanggap kebal yang dihasilkan oleh sel-B disebut dengan “humoral immunity”. Sifat dari kekebalan yang dihasilkan oleh sel-T adalah tidak spesifik, sedangkan yang dihasilkan oleh sel-B bersifat spesifik.

Perbedaan tanggap kebal spesifik dengan yang tidak spesifik adalah:

a) kespesifikan, b) keheterogenan dan c) ingatan/memori immunology.

Kespesifikan adalah pemilihan yang tepat baik oleh antibodi maupun limfosit untuk bereaksi dengan antigen atau benda asing lain dengan konfigurasi yang sama dengan antigen tersebut. Sifat keheterogenan dari tanggap kebal spesifik adalah terbentuknya berbagai jenis sel maupun hasil sel yang dikeluarkan sewaktu tubuh inang tersebut dimasuki oleh antigen. Sel-sel yang beraneka jenis tersebut akan menghasilkan antibodi dan limfosit sensitif yang bersifat heterogen. Sifat ketiga adalah terbentuknya “memori immunology” dalam sel-sel limfosit. Jadi apabila sewaktu waktu inang tersebut dimasuki oleh antigen yang sejenis maka inang tersebut akan cepat bereaksi untuk membentuk antibodi. Dengan adanya memori imunologi ini akan mempercepat dan meningkatkan terbentuknya zat anti (antibody) pada tubuh inang (Supriyadi, 2000)

Leukosit dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu, leukosit bergranular dan tidak bergranular. Leukosit granular terdiri dari eosinofil, basofil dan neutrofil, sedangkan leukosit tidak bergranular terdiri dari monosit, limfosit dan trombosit. Berdasarkan beberapa laporan, leukosit yang lazim ditemukan pada ikan adalah neutrofil, monosit, limfosit dan trombosit (Johnny *et al*, 2003). Pengamatan

diferensial leukosit dilakukan dengan menghitung persentase neutrofil, monosit, limposit dan trombosit pada hari ke-0, hari ke-3 dan hari ke-7 pasca infeksi. Jumlah neutrofil pada pengamatan didapatkan jumlah yang rendah meski pada semua perlakuan terjadi peningkatan. Hal tersebut disebabkan karena proporsi neutrofil dalam populasi leukosit hanya sekitar 6 – 8 % (Roberts, 1978 dalam Rukhyani *et al*, 1997).

Jumlah neutrofil pada hari ke-3 mengalami peningkatan disemua perlakuan. Peningkatan tersebut berhubungan dengan adanya respon terhadap infeksi yaitu membunuh bakteri dan membersihkan pecahan jaringan. Lebih lanjut lagi Lucky (1977) dalam Rukhyani *et al* (1997) menjelaskan bahwa pada saat terjadi infeksi, jumlah neutrofil akan meningkat 6 -7 %. Hal tersebut dapat terlihat jelas pada ikan disemua perlakuan tetapi peningkatannya masih dalam kisaran normal kecuali pada kontrol positif. Keabnormalan tersebut dapat terlihat pada ikan kontrol positif yang mengalami perubahan pada anggota tubuhnya, yaitu hemoragi, hiperemia, mata menonjol, peradangan, dan nekrosis (Lampiran 9). Fungsi utama neutrofil adalah penghancuran bahan asing melalui proses fagositik dan merupakan garis pertahanan pertama yang bergerak cepat ke arah bahan asing dan menghancurkannya. Umumnya jumlah neutrofil meningkat pada saat adanya bakteri karena neutrofil ke luar dari pembuluh darah menuju daerah infeksi. Reaksi keluarnya neutrofil dari pembuluh darah pada saat terjadinya infeksi disebabkan karena adanya pengaruh rangsangan kimiawi eksternal atau kemotaksis (Anderson, 1974; Tizard, 1982; Manning dan Tatner, 1985; Nabib dan Pasaribu, 1989; Iwama dan Nakanishi, 1996 dalam Johnny *et al*, 2003).

Peningkatan persentase monosit pada hari ke-7 diduga karena fungsinya sebagai makrofag dan memfagosit benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Fagositosis oleh makrofag merupakan proses yang sama terdapat pada neutrofil. Makrofag tertarik secara kemotaktik tidak hanya pada produk mikroorganisme dan produk reaksi kebal tetapi juga pada faktor sel yang rusak terutama neutrofil yang rusak. Jadi neutrofil tidak hanya mencapai dan menyerang bahan asing tetapi menjelang kematian membantu meningkatkan pengumpulan makrofag di tempat infeksi. Antigen dihancurkan di dalam makrofag dengan cara yang sama seperti pada neutrofil. Makrofag mampu memiliki aktifitas fagositik yang tahan lama, mengolah antigen dalam persiapan untuk tanggap kebal dalam memberi kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak dengan membuang jaringan yang mati, yang sedang mengalami kematian dan yang rusak. Rendahnya kadar monosit berdasarkan hasil pengamatan karena proporsi monosit dalam leukosit hanya sekitar 0,1% - 3%. Akan tetapi dapat meningkat sekitar 38% dalam waktu singkat bila terjadi infeksi. (Anderson, 1947; Chinabut et al., 1991; Klontz, 1994 dalam Johnny *et al.*, 2003).

Persentase limfosit pada hari ke-3 dan hari ke-7, mengalami penurunan dan peningkatan, akan tetapi penurunan dan peningkatan yang terjadi pada tiap perlakuan masih dalam kisaran normal. Limfosit berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh ditemukan dalam jumlah yang besar meskipun pada saat infeksi terjadi penurunan (Anderson, 1974; Tizard, 1982; Chinabut et al, 1991; Brown, 1993; Klontz, 1994; Iwama dan Nakanishi, 1996 dalam Johnny *et al.*, 2003).

Secara umum persentase trombosit pada perlakuan A, B, dan C di hari ke-3 meningkat kecuali pada kontrol positif, dan pada hari ke-7 semua perlakuan juga mengalami peningkatan kecuali pada kontrol negatif dan kontrol positif.

Trombosit merupakan sel yang kecil, inti berbentuk elips dan terletak ditengah sel, sitoplasma yang mengelilingi berwarna biru. Fungsi utama trombosit sebagai penutup luka, jumlah trombosit akan mengalami peningkat setelah terjadinya luka atau hemoragi pada tubuh ikan (Manning dan Tatner, 1985; Chinabut *et al*, 1991; Iwama dan Nakanishi, 1996 dalam Johnny *et al*, 2003).

Sistem imun pada ikan umumnya hampir sama dengan hewan vertebrata lain, perbedaannya hanya terletak pada organ pembentuknya, proses pembentukan, serta jenis dan komponen imunnya. Sistem ini sangat tergantung pada suhu dan dipengaruhi faktor lingkungan. Leukosit merupakan sel yang berperan penting dalam sistem pertahanan seluler tubuh, sehingga peningkatan leukosit dapat meningkatkan daya tahan ikan. Peningkatan yang terjadi pada leukosit ini diakibatkan meningkatnya jumlah neutrofil dan monosit, sehingga neutrofil dan monosit sangat berperan dalam besar dalam meningkatkan respon ketahanan tubuh ikan uji terhadap infeksi bakteri *A. salmonicida* yang disuntikkan.

Berdasarkan hasil analisa statistik maupun dekriptif dari beberapa parameter data hasil pengamatan yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak daun ketapang mampu meningkatkan imunitas ikan patin terhadap infeksi bakteri *A. salmonicida*. Pada perlakuan C atau konsentrasi ekstrak daun ketapang sebesar 100 mg/ml merupakan hasil yang paling baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya.