

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens*) SEBAGI FITOFARMAKA UNTUK MENCEGAH SERANGAN BAKTERI *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)**

**SKRIPSI**

**Oleh**

**ETIKA OKTAVIANI**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

## ABSTRACT

### **THE EFFECTIVITY OF SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens*) LEAF EXTRACT AS PHYTOPHARMACA FOR PREVENT *Vibrio alginolyticus* ATTACKS IN TIGER GROUPEL (*Epinephelus fuscoguttatus*)**

By

**Etika Oktaviani**

Phytopharmaca in Indonesia has already familiar and is widely used for traditional medicine in humans. Medicines made from these herbs also have the potential and have been used for the treatment on fish. Sambung nyawa (*Gynura procumbens*) is one of the plants that has been widely used for human medicine because of secondary metabolites content which have medicinal properties such as flavonoids, tannins, and saponins. Sambung nyawa leaves also have the potential to be used as fish medicine in order to prevent disease. One dangerous bacterial disease that causes a lot of damage is vibriosis caused by *Vibrio alginolyticus*. Vibriosis attacks a lot of superior sea water commodities, such as tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775). The use of synthetic antibiotics has been widely used but has many adverse effects, so it needs new alternatives for the prevention of vibriosis. One of them is the use of sambung nyawa leaf extract, this is supported because of its potential. This study aims to examine the effect of sambung nyawa leaf extract to improve the body resistance of tiger grouper so that it can prevent the attack of *Vibrio alginolyticus* bacteria. The method includes extraction, *in vitro* test, *in vivo* test, hematology test, and histopathology test. The conclusion of this study is that the most effective dose of sambung nyawa leaf extract to increase the body resistance of tiger grouper and prevent the attack of *Vibrio alginolyticus* is 700 ppm.

**Key words** : *sambung nyawa leaf, prevention, vibriosis*

## ABSTRAK

### **EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens*) SEBAGAI FITOFARMAKA UNTUK PENCEGAHAN SERANGAN *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)**

Oleh

**Etika Oktaviani**

Fitofarmaka di Indonesia sudah tidak asing lagi dan banyak dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional pada manusia. Obat berbahan herbal ini juga berpotensi dan sudah dimanfaatkan untuk pengobatan ikan. Tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*) merupakan salah satu tanaman yang sudah banyak dimanfaatkan untuk pengobatan manusia karena memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat obat seperti flavonoid, tanin, dan saponin. Daun sambung nyawa juga berpotensi untuk digunakan sebagai obat ikan dalam rangka pencegahan penyakit. Salah satu penyakit bakterial yang berbahaya dan banyak menimbulkan kerugian besar adalah vibriosis yang disebabkan oleh *Vibrio alginolyticus*. Vibriosis banyak menyerang komoditas unggulan air laut yaitu ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775). Penggunaan antibiotik sintetik telah banyak digunakan tetapi menimbulkan banyak dampak buruk, sehingga perlu alternatif baru untuk pencegahan vibriosis. Salah satunya yaitu dengan penggunaan ekstrak daun sambung nyawa, hal ini didukung karena potensinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh ekstrak daun sambung nyawa untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan sehingga dapat mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Metode yang dilakukan meliputi uji ekstraksi bahan, uji *in vitro*, uji *in vivo*, uji hematologi, dan uji histopatologi. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu dosis ekstrak daun sambung nyawa yang paling efektif untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan dan mencegah serangan *Vibrio alginolyticus* adalah dosis 700 ppm.

**Kata kunci :** *daun sambung nyawa, pencegahan, vibriosis*

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens*) SEBAGI FITOFARMAKA UNTUK MENCEGAH SERANGAN BAKTERI *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)**

**Oleh**

**ETIKA OKTAVIANI**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA PERIKANAN**

**pada**

**Jurusan Perikanan dan Kelautan  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

Judul Skripsi : **EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens*) SEBAGAI FITOFARMAKA UNTUK PENCEGAHAN SERANGAN *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)**

Nama Mahasiswa : **Etika Oktaviani**

No. Pokok Mahasiswa : 1514111086

Program Studi : Budidaya Perairan

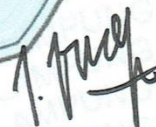
Jurusan : Perikanan dan Kelautan

Fakultas : Pertanian





**Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc.**  
NIP. 19791118 200212 2 001



**Wardiyanto, S.Pi., M.P.**  
NIP. 19690705 200112 1 001

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan



**Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.**  
NIP. 19640215 199603 2 001

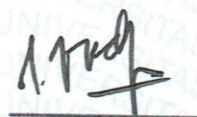
**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc.**

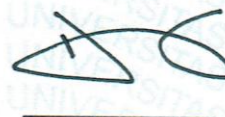


Sekretaris : **Wardiyanto, S.Pi., M.P.**

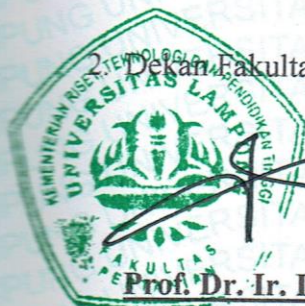


Penguji

Bukan Pembimbing : **Deny Sapto Chondro U., S.Pi., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si.**

NIP. 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 5 Maret 2019

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana/ Ahli Madya), baik di Universitas Lampung maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan naskah, dengan naskah disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini serta sanksi lainnya yang sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandar Lampung, 19 April 2019



Etika Oktaviani  
NPM. 1514111086

## RIWAYAT HIDUP



Penulis berdarah muslim, dilahirkan di Sumber Jaya, Lampung Barat pada tanggal 31 Oktober 1997. Penulis adalah anak pertama dari dua bersaudara, dari Bapak Suryo Suparjanto dan Ibu Sujati. Pendidikan yang pernah ditempuh oleh penulis yaitu Sekolah Dasar Negeri 4 Way Petai Sumber Jaya Lampung Barat (2003 – 2009), Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Way Tenong Lampung Barat (2009 – 2012), dan Sekolah Menengah Kejuruan Unggul dan Terpadu Lampung Tengah (2012 – 2015).

Tahun 2015, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Penulis memperoleh beasiswa Bidikmisi delapan semester selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia Umum, Kimia Dasar, Genetika Ikan, Manajemen Teknik Pembenihan Ikan, Fisiologi Hewan Air, Imunologi Ikan, dan Manajemen Kesehatan Ikan. Selain itu penulis juga aktif di Komunitas *Languages Learning Club* (LLC) sebagai Presiden (2016), Unit Kegiatan Mahasiswa Penelitian (UKMP) sebagai Sekretaris Departemen Riset dan Penalaran (2017), dan Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan.



Tahun 2018, penulis melakukan praktik umum di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Lampung dengan judul “Identifikasi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)”. Pada tahun yang sama juga melakukan Kuliah Kerja Nyata Kebangsaan di Kecamatan Ulubelu, Kabupaten Tanggamus. Penulis menyelesaikan tugas akhir untuk mencapai gelar Sarjana Perikanan (S.Pi) dalam bentuk Skripsi dengan judul “Efektivitas Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Sebagai Fitofarmaka Untuk Pencegahan Serangan *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)” pada tahun 2019.

## PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur kupersembahkan Skripsi ini kepada Ayahanda Suryo Suparjanto dan Ibunda Sujati yang sangat kusayang dan cintai atas semua pengorbanan dan setiap tetes keringat serta do'a demi menghantarkan putrimu dalam mencapai gelar sarjana ini

Keluarga besar dan kerabat yang senantiasa hadir disetiap langkah dalam perjalananku, terimakasih atas setiap do'a dan dukungannya

*Sahabat-sahabat dan teman-temanku yang tiada henti menghadirkan pelangi disetiap hari-hariku, terimakasih atas semua kenangan dan tetaplah berkarya*

Almamaterku tercinta, Universitas Lampung

Agama, bangsa, dan negara

## MOTTO

Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri

Q.S. Ar Ra'd : 11

Ilmu pengetahuan itu bukanlah yang dihafal, melainkan yang memberi manfaat  
(Imam Syafi'i)

Why worry? If you've done the very best you can, then worrying won't make it any better  
(Walt Disney)

It's fine to celebrate success, but it's more important to heed the lessons of failure  
(Bill Gates)

Work hard. Do your best. Keep your word. Never get too big for your britches. Trust in God. Have no fear, and never forget a friend  
(Harry S. Truman)

Pray + Endeavor = Success  
(Etika Oktaviani)

Hidup adalah kombinasi dari keyakinan, keajaiban, anugerah, dan air mata  
(Etika Oktaviani)

## SANWACANA

Puji syukur penulis haturkan kehadirat Allah SWT., berkat limpahan rahmat, hidayah, serta petunjuk-Nya maka Skripsi ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya. Skripsi dengan judul “Efektivitas Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Sebagai Fitofarmaka Untuk Pencegahan Serangan *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ibu Ir. Siti Hudaidah, M.Sc. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Ibu Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc. selaku pembimbing utama, terima kasih atas kesediaannya untuk memberikan bimbingan, saran, dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
4. Bapak Wardiyanto, S.Pi., M.P. selaku pembimbing kedua serta pembimbing akademik. Terima kasih atas kesediaannya untuk memberikan bimbingan, saran, dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.

5. Bapak Deny Sapto Chondro Utomo, S.Pi., M.Si. selaku penguji utama pada ujian skripsi. Terima kasih atas masukan dan saran-saran dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Jajaran dosen dan staf Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, terima kasih sudah banyak berbagi ilmu dan membantu demi kelancaran kegiatan perkuliahan dan penelitian.
7. Ayah dan Ibu tercinta, terima kasih atas semua do'a dan pengorbanan yang tiada henti mengalir.
8. Mbah, Adik, dan keluarga besar yang selalu memberikan dukungan dan semangat serta bantuan demi kelancaran pencapaian ini.
9. Sahabat-sahabatku Novi, Puspa, Nurani, Wuni, Jupendi, Vitri, Restu, Klara, Romi, Putri Purnama, Bang Arif, Riana, dan Lilin yang selalu ada dalam segala kondisi.
10. Kakak-kakakku Mas Imron, Bang Triando, Mas Heru, Mas Irfandi, Bang Helpo, Mba Dian, Mba Fitri, Mba Farida, Mba Astri, Mba Ica, dan Mba Maol, terima kasih sudah banyak berkontribusi dalam penelitian.
11. Keluargaku Aquaculture 2015, Endayani, Berry, Aji, Aldi, Hestya, Virgia, Asep, Falqi, Hani, Artho, Dena, Yuke, Nindi, Uli, Winda, Ando, May, Ayu, Mega, Ajeng, Agung Nugraha, Hanisa, Chatammi, Putri Yulia, Defril, Nanda, Melina, Tiwi, Iqlima, Joko, Shena, Ezed, Riyanti, Bella, Bayu, Ignatius, Dwi, Rafif, Azkha, Wayan, Hendi, Agung Harits, Nadila, Rara, Risa, Anggraini, Anlian Fahmi, Anggun, Santrika, Yosiva, Sevia, Arico, Sakinah, Ellen, Triga, Raka, Nurlia, Merlinda, Ade, Eka, Toto, Mba Tata Bang Rovi, Bang Mikola, dan Bang Rafta, terima kasih atas semua canda, tawa, dan duka bersama,

tetaplah berkarya.

12. Sahabat-sahabat KKN Kebangsaan 2018, Siti Nurahmah, Adelia, Kautsar, Andre, Diana, dan Popy, terimakasih sudah banyak bersama dan berbagi.
13. Sahabat-sahabat penghuni rusunawa Unila pada masanya, Yuni, Ira, Rini, Riana, Alma, Asfi, dan Ani.
14. Sahabat-sahabat asrama Eko Wijayanti, Septi, Agus, Nesti, Ridho, Rizky, Aziz, Bang Nopen, Adipati, Daru, Yogi, dan Wahyu, terimakasih sudah banyak berbagi waktu dan kebersamaan.
15. Kakak-kakak perikanan dan kelautan 2014 dan 2013
16. Adik-adik perikanan dan kelautan 2016 dan 2017
17. Keluarga besar *Languages Learning Club* dan UKM Penelitian Unila
18. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan kesalahan, Oleh sebab itu, penulis juga menghaturkan maaf atas segala kekurangan.

Bandar Lampung, 19 April 2019

Etika Oktaviani

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xix
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Tujuan Penelitian .....	3
C. Manfaat Penelitian .....	3
D. Kerangka Pikir .....	3
E. Hipotesis Penelitian .....	6
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
A. Ikan Kerapu Macan .....	7
1. Klasifikasi Ikan Kerapu Macan .....	7
2. Morfologi Ikan Kerapu Macan .....	8
3. Habitat Ikan Kerapu Macan .....	8
B. Penyakit Vibriosis pada Ikan Kerapu Macan .....	9
C. Fitofarmaka .....	10
D. Potensi Daun Sambung Nyawa sebagai Fitofarmaka .....	10
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	13
A. Waktu dan Tempat .....	13
B. Alat dan Bahan .....	13
1. Ekstraksi Bahan .....	13
2. Uji Fitokimia .....	13

3. Uji <i>In Vitro</i> .....	14
4. Uji <i>In Vivo</i> .....	14
5. Uji Hematologi dan Histopatologi .....	14
6. Pengamatan Kualitas Air .....	15
C. Rancangan Penelitian .....	15
D. Prosedur Penelitian .....	16
1. Pembuatan Serbuk Daun Sambung Nyawa .....	16
2. Ekstraksi Serbuk Daun Sambung Nyawa .....	17
3. Uji Fitokimia .....	18
4. Uji <i>In Vitro</i> .....	19
5. Uji Toksisitas .....	20
6. Uji <i>In Vivo</i> .....	22
E. Parameter Pengamatan .....	25
1. Gejala Klinis .....	25
2. <i>Survival Rate</i> (SR) .....	25
3. <i>Relative Percent Survival</i> (RPS) .....	25
4. Pengamatan Hematologi .....	26
5. Pengamatan Histopatologi .....	29
6. Kualitas Air Pemeliharaan .....	31
F. Analisis Data .....	31
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
A. Hasil Uji Fitokimia .....	32
B. Hasil Uji <i>In Vitro</i> .....	33
1. Uji Zona Hambat .....	33
2. Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) .....	37
3. Uji Toksisitas ( <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> ) .....	39
C. Hasil Uji <i>In Vivo</i> .....	42
1. Gejala Klinis .....	42
2. <i>Survival Rate</i> (SR) dan <i>Relative Percent Survival</i> (RPS) .....	44
3. Profil Darah .....	46
4. Profil Histopatologi .....	57



5. Data Kualitas Air .....	68
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>71</b>
A. Kesimpulan .....	71
B. Saran .....	71
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>72</b>
<b>GLOSARIUM .....</b>	<b>82</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>84</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian .....	6
Gambar 2. Ikan Kerapu Macan .....	8
Gambar 3. Tanaman Sambung Nyawa .....	11
Gambar 4. Alur Penelitian .....	16
Gambar 5. Diameter Uji Zona Hambat Ekstrak Daun Sambung Nyawa .....	34
Gambar 6. Kadar Hematokrit .....	47
Gambar 7. Total Eritrosit .....	49
Gambar 8. Total Leukosit .....	50
Gambar 9. Persentase Jumlah Limfosit .....	52
Gambar 10. Persentase Jumlah Monosit .....	54
Gambar 11. Persentase Jumlah Neutrofil .....	55
Gambar 12. Profil Histopatologi Insang Ikan Uji .....	59
Gambar 13. Profil Histopatologi Hati Ikan Uji .....	63
Gambar 14. Profil Histopatologi Limpa Ikan Uji .....	65
Gambar 15. Profil Histopatologi Usus Ikan Uji .....	67

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sambung Nyawa .....	32
Tabel 2. Identifikasi Daya Hambat Antibakteri Daun Sambung Nyawa Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	38
Tabel 3. <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> .....	40
Tabel 4. Gejala Klinis Ikan Uji Pasca Infeksi Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	42
Tabel 5. <i>Survival Rate</i> (SR) dan <i>Relative Percent Survival</i> (RPS) Ikan Kerapu Macan Pasca Infeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	44
Tabel 6. Data Kualitas Air Pemeliharaan Ikan Uji .....	70

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Ekstraksi Daun Sambung Nyawa .....	85
Lampiran 2. Uji Fitokimia .....	85
Lampiran 3. Hasil Uji Zona Hambat .....	86
Lampiran 4. Hasil Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) .....	87
Lampiran 5. Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) .....	87
Lampiran 6. Uji <i>In Vivo</i> .....	88
Lampiran 7. Uji Hematologi dan Histopatologi .....	89
Lampiran 8. Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) .....	90
Lampiran 9. Pembuatan Media <i>Nutrient Broth</i> (NB) .....	90
Lampiran 10. Pembuatan Media <i>Thiosulfate Citrat Bile Salt Sucrose</i> (TCBS) ...	91
Lampiran 11. Pembuatan Larutan Hayem .....	91
Lampiran 12. Pembuatan Larutan Turk .....	92
Lampiran 13. Pembuatan Larutan Giemsa .....	92
Lampiran 14. Perbandingan Larutan Davidson dan Larutan Formalin 10% .....	93
Lampiran 15. Perhitungan Uji Toksisitas dengan Metode BSLT .....	93
Lampiran 16. Uji Statistik Diameter Zona Hambat .....	94
Lampiran 17. Uji Statistik Kadar Hematokrit .....	94
Lampiran 18. Uji Statistik Total Eritrosit .....	95
Lampiran 19. Uji Statistik Total Leukosit .....	95

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Komoditas perikanan di Indonesia sangat beragam dan berlimpah, baik dari wilayah air tawar maupun air laut. Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal 1775) merupakan salah satu komoditas air laut yang menjadi komoditas unggul ekspor nomor dua setelah udang. Sebagai komoditas unggulan, ikan ini memiliki nilai ekonomis yang tinggi dengan harga mencapai Rp120.000,00/kg di pasaran (Wijaya, 2015). Bahkan saat harga tinggi harga jualnya dapat berkisar antara Rp250.000,00/kg hingga Rp350.000,00/kg bergantung pada kualitasnya (Saputra, 2018). Komoditas tersebut dipasarkan dalam bentuk segar maupun dalam kemasan dengan penjualan hingga mencapai skala internasional. Kebutuhan protein hewani asal laut terus meningkat, hal tersebut diiringi dengan meningkatnya minat pembudidaya untuk membudidayakan ikan kerapu macan.

Kendala utama dalam budidaya ikan kerapu macan yaitu adanya serangan penyakit bakterial. Sarjito *et al.* (2009) menyatakan bahwa salah satu penyakit yang sering menyerang ikan kerapu macan di KJA adalah infeksi bakterial vibriosis. Vibriosis adalah salah satu penyakit bakteri yang memengaruhi budidaya perikanan dan penyebab utama permasalahan penyakit budidaya yang menye-

babkan kerugian produksi ekonomi karena kematian lebih dari 70% dalam suatu musim. Penelitian yang dilakukan Hastari *et al.* (2014) menunjukkan hasil karakterisasi bakteri patogen pada ikan kerapu macan di KJA Teluk Hurun Lampung adalah *V. logei*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* dan *V. metschnikovii*.

Untuk mengendalikan penyakit, khususnya penyakit bakterial, selama ini telah digunakan berbagai jenis antibiotik sintetik seperti *kloramfenikol*, *oxytracycline*, dan *erythromycin* dalam pengobatan penyakit ikan. Namun dalam pengobatan penyakit ikan dinilai masih kurang efektif, karena pada tahapnya membutuhkan waktu yang tidak singkat. Selain itu, kondisi ikan yang sudah tidak baik lebih mudah untuk terserang penyakit yang lebih parah sehingga berpotensi untuk mengalami kematian lebih cepat. Oleh sebab itu, perlu adanya alternatif lain untuk penanggulangan penyakit bakterial pada ikan, yaitu dengan melakukan pencegahan sebelum terjangkit penyakit bakterial. Prinsip dari pencegahan penyakit ini yaitu dengan meningkatkan kekebalan sistem imun ikan melalui pemberian imunostimulan. Penggunaan imunostimulan ini diharapkan lebih efektif karena kondisi ikan yang masih baik akan lebih mudah menerima asupan baru sehingga sistem imunnya dapat meningkat. Ketika sistem imun ikan sudah baik, maka diharapkan akan sulit terjangkit penyakit.

Imunostimulan dapat terkandung dalam suatu fitofarmaka. Fitofarmaka adalah sediaan obat herbal yang berbahan alami. Salah satu jenis tanaman yang berpotensi sebagai fitofarmaka yaitu tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*). Tanaman sambung nyawa sangat mudah ditemui di wilayah Lampung dan juga

mudah untuk ditanam. Fadli (2015) melaporkan bahwa kandungan yang terbukti terdapat dalam tanaman sambung nyawa diantaranya yaitu sterol tak jenuh, flavonoid, polifenol, triterpenoid, steroid, saponin, asam klorogenat, asam kafeat, asam vanilat, asam para hidroksi benzoat, asam para kumarat, dan minyak atsiri. Dewasa ini flavonoid dan minyak atsiri menarik perhatian, hal tersebut disebabkan karena sifatnya sebagai antibakteri dan antijamur sehingga dapat dipergunakan sebagai antibiotik atau obat alami (fitofarmaka) yang aman dan ramah lingkungan.

### **B. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mempelajari efektivitas ekstrak daun sambung nyawa untuk mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus* pada budidaya ikan kerapu macan.

### **C. Manfaat Penelitian**

1. Sebagai fitofarmaka yang aman dan ramah lingkungan saat digunakan.
2. Memanfaatkan fitofarmaka untuk budidaya ikan kerapu macan.
3. Mewujudkan budidaya ikan kerapu macan dengan tingkat ketahanan tubuh yang tinggi.

### **D. Kerangka Pikir**

Vibriosis adalah salah satu penyakit bakteri serius yang mempengaruhi budidaya perikanan dan penyebab utama permasalahan penyakit budidaya yang menyebabkan penurunan produksi ekonomi karena kematian lebih dari 70% dalam suatu

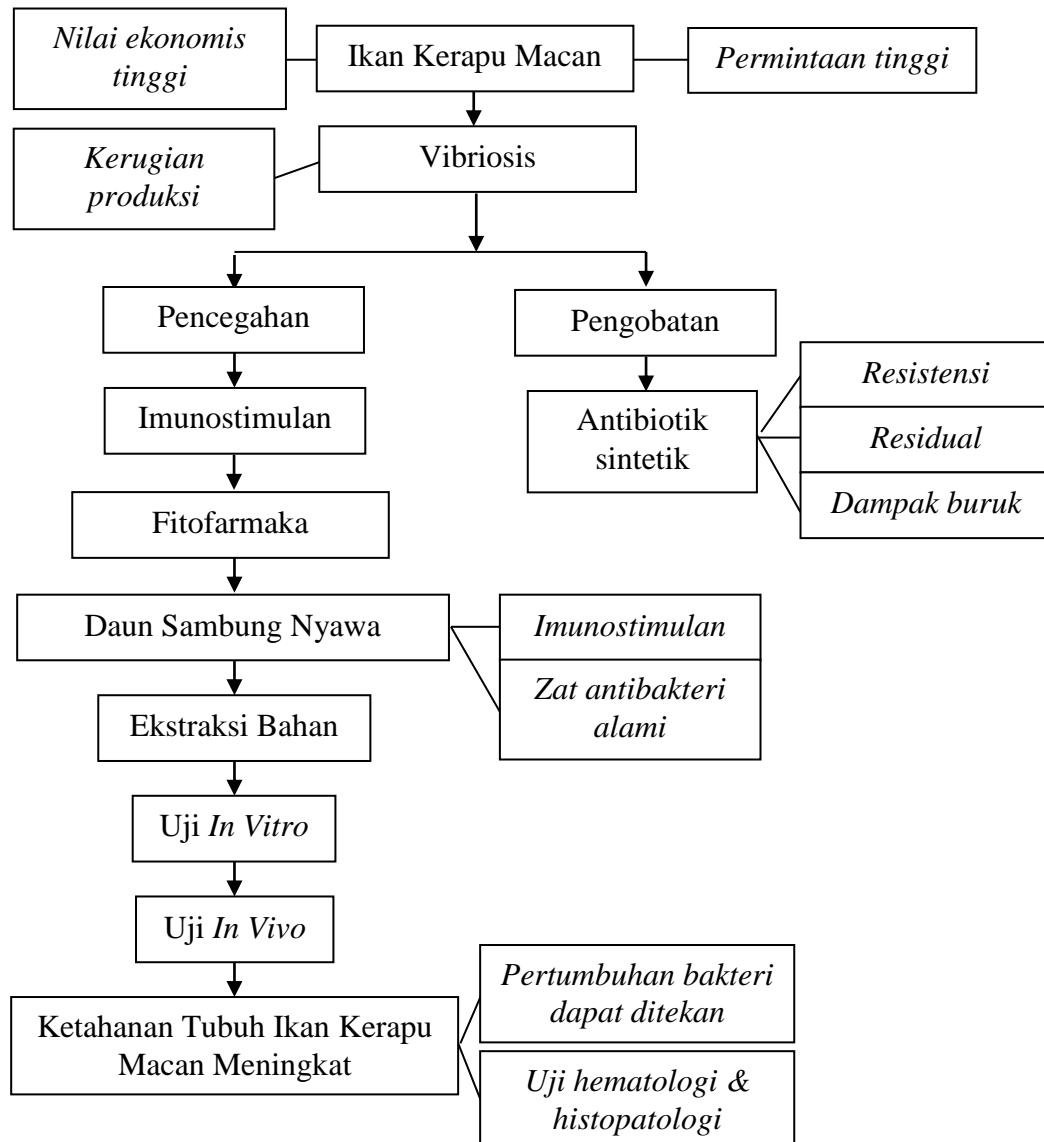
musim (Sahari, 2018). Penggunaan antibakteri sintetik untuk pengobatan penyakit ikan berpotensi menimbulkan bahaya untuk lingkungan dan manusia (Sumayani, 2008) serta terjadinya resistensi dari bakteri penyebab penyakit (Andayani, 2009). Selain itu remediasi dengan obat dinilai kurang efektif karena membutuhkan waktu yang lama dan kondisi ikan lebih rentan mengalami kematian. Sehingga perlu adanya alternatif lain yang lebih efektif dan aman dalam penanggulangan penyakit ikan. Salah satunya yaitu dengan memberikan imunostimulan pada ikan sehingga sistem imunnya meningkat dan dapat mencegah terjadinya penyakit pada ikan. Penggunaan imunostimulan yang aman dan ramah lingkungan dapat diperoleh dari fitofarmaka.

Fitofarmaka adalah sediaan obat alami, bahan bakunya terdiri atas simplisia atau sediaan galenik yang telah memenuhi persyaratan yang berlaku, yang telah jelas keamanan dan khasiatnya, sehingga sediaan tersebut terjamin keamanan, keseragaman komponen aktif, dan khasiatnya. Diketahui bahwa daun sambung nyawa berpotensi dapat menjadi antimikrobal karena memiliki kandungan flavonoid dan minyak atsiri. Telah dibuktikan oleh Rahman (2010) pada penelitiannya bahwa daun sambung nyawa dengan konsentrasi 10% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Aryanti *et al.* (2007) melaporkan hasil penelitiannya bahwa flavonoid ekstrak daun sambung nyawa umur panen empat bulan lebih aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dari pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus typhimurium*.



Secara umum metode yang dilakukan pada penelitian ini melalui empat tahap utama, yaitu ekstraksi bahan, uji *in vitro*, uji *in vivo*, dan uji hematologi dan histologi. Ekstraksi bahan pada penelitian ini yaitu proses pengambilan ekstrak daun sambung nyawa menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi dan evaporasi. Produk utama pada tahap ini yaitu berupa ekstrak daun sambung nyawa dalam bentuk pasta. Uji *in vitro* pada penelitian ini meliputi serangkaian proses laboratoris yang mencakup uji zona hambat, uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), dan uji toksisitas. Tahap ini ditujukan untuk memperoleh dosis ekstrak terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Dosis ekstrak terbaik yang telah diperoleh kemudian diaplikasikan secara *in vivo* pada hewan uji yaitu ikan kerapu macan berukuran panjang rata-rata 15 cm. Penentuan dosis yang digunakan yaitu tanpa dosis, setengah dari dosis terbaik, dosis terbaik, dan dua kali dari dosis terbaik. Tahap ini menggunakan metode oral dengan cara mencampurkan ekstrak daun sambung nyawa dengan pakan ikan kerapu macan secara *spraying*. Hewan uji yang diberi perlakuan diuji tantang pada hari ke 15 masa pemeliharaan. Data pendukung hasil penelitian diuji setelah masa pemeliharaan selesai yang meliputi data hasil uji hematologi dan histopatologi. Kedua uji tersebut dimaksudkan untuk mengetahui kondisi ketahanan tubuh ikan kerapu macan. Kerangka pikir penelitian ini disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian

### E. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

H0 : Tidak ada satupun konsentrasi ekstrak daun sambung nyawa yang efektif mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

H1 : Minimal ada satu konsentrasi ekstrak daun sambung nyawa yang efektif mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Ikan Kerapu Macan

#### 1. Klasifikasi Ikan Kerapu Macan

Ikan kerapu diduga berjumlah 46 spesies yang hidup di berbagai jenis habitat.

Jumlah tersebut ternyata berasal dari 7 genus, yaitu *Anyperodon*, *Cromileptes*,

*Cephalopholis*, *Epinephelus*, *Asthaloperca*, *Plectropomus*, dan *Variola*. Genus

*Plectropomus*, *Chromileptes*, dan *Epinephelus* digolongkan menjadi ikan komer-

sial dan mulai banyak dibudidayakan. *Flower* atau *carped cod* merupakan nama

ikan kerapu macan yang dikenal di pasaran internasional. Menurut Sutrisna (2011)

ikan kerapu macan digolongkan pada :

Kelas : Chondrichthyes

Subkelas : Ellasmobranchii

Ordo : Percomorphi

Divisi : Perciformes

Family : Serranidae

Genus : *Epinephelus*

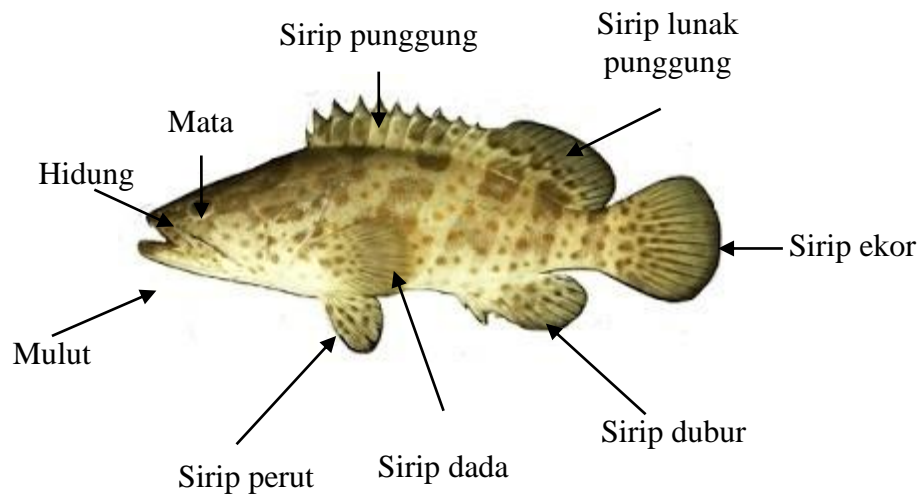
Spesies : *Epinepheus fuscoguttatus*

Sinonim : *Brown-marbled grouper*, *tiger grouper*; nama lokal Indonesia:

kerapu macan, balong macan.

## 2. Morfologi Ikan Kerapu Macan

Ikan kerapu macan memiliki ciri-ciri morfologi antara lain bentuk tubuh pipih, yaitu lebar tubuh lebih kecil dari pada panjang dan tinggi tubuh, mulut lebar, se-rong ke atas dengan bibir bawah yang sedikit menonjol melebihi bibir atas, rahang atas dan bawah dilengkapi dengan gigi yang lancip dan kuat, sirip ekor berbentuk bundar, sirip punggung, posisi sirip perut berada di bawah sirip dada, serta badan ditutupi sirip kecil yang bersisik stenoid (Mariskha & Abdulgani, 2012). Secara keseluruhan ikan kerapu macan disajikan pada Gambar 2.



Sumber: Dunia Perikanan

Gambar 2. Ikan Kerapu Macan

## 3. Habitat Ikan Kerapu Macan

Habitat ikan kerapu macan pada fase dewasa yaitu di perairan yang lebih dalam dengan dasar terdiri atas pasir berlumpur. Sedangkan benih ikan kerapu macan habitatnya adalah pantai yang banyak ditumbuhi algae jenis *Gracilaria* sp. dan *Reticulata*. Ikan ini merupakan salah satu jenis ikan laut yang hidup di perairan dalam maupun payau yang bersalinitas 20 - 35 ppt. Ikan kerapu termasuk jenis

ikan karnivora dan cara makannya menangkap satu persatu makan yang diberikan sebelum makanan sampai ke dasar. Pakan yang paling disukai adalah krustaceae (rebon, dogol, dan krosok), selain itu beberapa jenis ikan (tembang, teri, dan belanak) (Effendi, 2000).

## **B. Penyakit Vibriosis pada Ikan Kerapu Macan**

Vibriosis adalah salah satu penyakit bakteri serius yang memengaruhi budidaya perikanan dan menjadi penyebab utama permasalahan penyakit budidaya yang berdampak pada produksi ekonomi karena menyebabkan kematian lebih dari 70% dalam suatu musim (Sarjito, 2009). Penelitian Sarjito *et al.* (2007) yang mengungkapkan bahwa ikan kerapu macan yang terinfeksi bakteri *Vibrio* mengalami perubahan yaitu keseimbangan terganggu, pergerakan ikan lamban, gripis di bagian sirip, haemoragi di beberapa bagian tubuh, dan luka borok.

Gejala klinis yang serupa juga pernah dilaporkan Hastari *et al.* (2014) yang menjelaskan bahwa gejala klinis ikan kerapu yang terkena penyakit vibriosis yaitu berupa adanya perubahan tingkah laku yang teramati seperti bergerak lamban dengan sesekali berenang tidak teratur/ *erratic swimming*, keseimbangan terganggu dan nafsu makan menurun. Sedangkan perubahan morfologi yang teramati pada penelitian ini adalah warna tubuh menjadi gelap, timbul luka kemerahan/ haemoragi pada mulut dan pangkal sirip dan operkulum terbuka, gripis di bagian sirip, dan luka borok.

### **C. Fitofarmaka**

Fitofarmaka adalah sediaan obat alami yang telah jelas keamanan dan khasiatnya, bahan bakunya terdiri atas sediaan galenik atau simplisia yang telah memenuhi persyaratan yang berlaku, sehingga sediaan tersebut terjamin keseragaman komponen aktif, keamanan, dan khasiatnya. Untuk menjadi fitofarmaka, obat alami harus distandarisasi dan harus melalui uji toksisitas, farmakologi eksperimental, dan uji klinik. Fitofarmaka sudah layak disejajarkan dengan obat modern. Secara umum bentuk sediaan fitofarmaka juga sejajar dengan penyediaan obat kimia, antara lain dalam bentuk kaplet, kapsul, tablet, sirup, dan lain sebagainya. Sediaan ini dikemas secara modern sesuai dengan standar obat kimia sehingga dapat diterima oleh kalangan medis (Raj *et al.*, 2012).

Darminto *et al.* (2011) menyatakan bahwa pengobatan tradisional dengan fitofarmaka mulai menjadi perhatian dunia sekarang ini. Di Thailand dan Filipina fitofarmaka telah dimanfaatkan sebagai bakterisida, herbisida, fungisida, virusida, algasida, dan pestisida. Di Indonesia fitofarmaka telah dimanfaatkan untuk pengobatan manusia, tetapi belum banyak digunakan dalam budidaya perikanan.

### **D. Potensi Daun Sambung Nyawa sebagai Fitofarmaka**

Nirwan (2007) melaporkan bahwa daun sambung nyawa merupakan tanaman obat yang banyak dimanfaatkan karena banyak khasiatnya, antara lain untuk menurunkan kadar gula dalam darah, obat kulit, menyembuhkan migraine, hepatitis B dan antitumor atau antikanker. Di samping itu air perasan daun sambung nyawa dapat digunakan sebagai penurun panas dan menghilangkan bengkak-bengkak.

Secara tradisional daun sambung nyawa telah banyak digunakan sebagai obat antikanker. Syukur (2001) mengemukakan bahwa daerah pertumbuhan daun sambung nyawa tersebar mulai dataran rendah sampai dataran tinggi yang mencapai ketinggian 1-1200 m di atas permukaan laut (dpl), namun paling banyak ditemui pada ketinggian 500 m dpl. Tanaman ini membutuhkan iklim pertumbuhan berupa curah hujan dengan kisaran 1500-3500 mm/tahun (iklim sedang sampai basah), tanah agak lembab sampai lembab serta subur. Daun sambung nyawa sangat mudah ditemui di Lampung dan sangat mudah untuk dibudidayakan.



Gambar 3. Tanaman Sambung Nyawa

Penelitian sebelumnya yang dilakukan Aonullah *et al.* (2013) menggunakan ekstrak daun jeruju mengungkapkan bahwa ekstrak daun jeruju tidak berpengaruh nyata terhadap kelulushidupan dan jumlah eritrosit ikan kerapu macan yang diinfeksi *Vibrio alginolyticus*, sehingga kajian lain terkait fitofarmaka untuk ikan kerapu masih perlu untuk terus dilakukan. Diketahui bahwa daun sambung nyawa berpotensi menjadi antimikroba karena memiliki kandungan flavonoid dan minyak atsiri. Telah dibuktikan oleh Rahman (2010) pada penelitiannya bahwa daun sambung nyawa dengan konsentrasi 10% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein dan terjadi peningkatan permeabilitas membran sitoplasma. Denaturasi protein menyebabkan gangguan dalam pembentukan atau fungsi molekul protein sehingga terjadi perubahan struktur protein dan menyebabkan terjadinya koagulasi protein. Membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan meningkatnya permeabilitas sel sehingga nukleotida pirin, pirimidin, dan protein akan keluar dari sel dan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Rivai *et al.* (2011) melaporkan bahwa daun sambung nyawa mengandung  $67,094\mu\text{g/mL}$  flavonoid.

Flavonoid bekerja sebagai inhibitor yang akan menghambat replikasi dan transkripsi DNA bakteri. Flavonoid dapat berikatan dengan protein bakteri ekstraseluler dan dapat melarutkan dinding sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa metabolit yang sering ditemukan pada tumbuhan. Salah satu peran flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai antivirus dan antimikroba, sehingga tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Aryanti *et al.* (2007) melaporkan hasil penelitiannya bahwa flavonoid ekstrak daun sambung nyawa umur panen empat bulan lebih aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dari pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus typhimurium*.



### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada Bulan April-September 2018. Tempat pelaksanaan penelitian ini yaitu di Laboratorium Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dan Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Ekstraksi Bahan**

Alat yang digunakan pada tahap ini yaitu oven, *blender*, timbangan digital, tabung erlenmeyer, dan *rotary evaporator* IKA RV 10. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu etanol 95%, akuades, dan daun sambung nyawa yang diperoleh dari Lampung.

##### **2. Uji Fitokimia**

Alat yang digunakan pada uji fitokimia yaitu tabung reaksi, pipet tetes, timbangan digital, dan gelas ukur. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu ekstrak daun sambung nyawa, akuades, asam asetat glacial,  $H_2SO_4$ , larutan  $FeCl_3$ , kloroform, KI,  $HgCl_2$ , serbuk Mg, dan HCl pekat.

### **3. Uji *In Vitro***

Alat yang digunakan pada tahap ini yaitu *hot plate*, *magnetic stirrer*, cawan petri, tabung reaksi, *autoclaf* Wisdom, inkubator, jarum ose, *colony counter*, *spreader*, bunsen, spektrofotometer, dan penggaris. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu media *Nutrien Agar* (NA), media *Nutrien Broth* (NB), media *Thiosulfate Citrat Bile Salts Sucrose* (TCBS) Agar, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), antibiotik kloramfenikol, isolat murni bakteri *Vibrio alginoyiticus* yang diperoleh dari Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang, air laut, alkohol 70%, dan akuades.

### **4. Uji *In Vivo***

Alat yang digunakan pada tahap ini yaitu bak pemeliharaan, ember, spuit, jaring-jaring, paralon, dan selang. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu ekstrak daun sambung nyawa, akuades, minyak ikan, ikan kerapu macan, dan pakan.

### **5. Uji Hematologi dan Histopatologi**

Alat yang digunakan pada tahap ini yaitu alat bedah, spuit, tabung EDTA, kaca preparat, hemasitometer, tabung hematokrit, sentrifuge, mikroskop, *hand counter*, *mikrohematokrit reader*, mikrotom, keranjang xylol, pemanas air, kassa, botol film, oven, *hot plate*, stabilizer, templat, kaset. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu sampel darah ikan, insang, hati, limpa, saluran pencernaan ikan, Giemsa, larutan Turk's, larutan Hayem, metanol, alkohol, xylol, parafin, larutan fiksatif, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%), xylol (1, 2, dan 3), parafin, larutan anestesi, hematoksin, BNF (*Buffer Netral Formalin*), alkohol 70%, auksin,

akuades, eosin, dan entellan.

## **6. Pengamatan Kualitas Air**

Alat yang digunakan untuk pengamatan kualitas air yaitu termometer, pH meter, refraktometer, dan DO meter.

## **C. Rancangan Penelitian**

Pengujian efektivitas ekstrak daun sambung nyawa ini dilakukan menggunakan metode eksperimental Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas 4 perlakuan dengan individu sebagai ulangan. Pengujian dilakukan secara oral kepada ikan uji. Penentuan dosis ekstrak daun sambung nyawa pada pakan mengacu pada hasil uji *in vitro*. Sehingga diperoleh dosis setiap perlakuan yaitu:

A : 0 ppm

B : setengah dari dosis terbaik

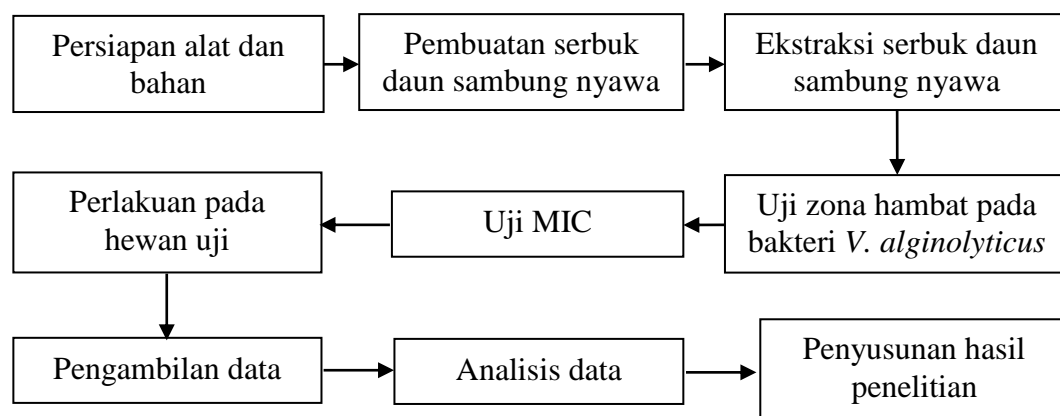
C : dosis terbaik

D : dua kali lipat dari dosis terbaik

Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu macan yang berukuran panjang rata-rata 15 cm dengan bobot rata-rata 40 g sebanyak 20 ekor setiap wadah percobaan. Kepadatan *Vibrio alginolyticus* yang diinjeksikan yaitu  $10^8$  CFU/mL sebanyak 0,1 mL/ekor secara intramuskular Sarjito *et al.* (2007). Pemberian pakan uji dilakukan selama 14 hari kemudian diuji tantang pada hari ke 15 dan pemeliharaan hewan uji dilakukan hingga hari ke 21 dengan pemberian pakan yang sama sesuai dosis perlakuan.

#### D. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan mencakup empat tahap utama, yaitu ekstraksi daun sambung nyawa, uji *in vitro*, uji *in vivo*, dan uji hematologi dan histopatologi. Tahap ekstraksi meliputi persiapan pengeringan daun sambung nyawa, penepungan daun, maserasi, dan evaporasi. Tahap uji *in vitro* meliputi uji zona hambat, uji MIC, dan uji toksisitas. Tahap *in vivo* meliputi pemberian ekstrak secara oral pada hewan uji, ujiantang bakteri, pengambilan data *survival rate* (SR), *relative percent survival* (RPS), dan pengamatan kualitas air. Tahap berikutnya yaitu uji hematologi dan histopatologi sebagai data pendukung, dan terakhir yaitu penyusunan laporan. Secara umum prosedur penelitian yang dilakukan tersaji pada Gambar 4.



Gambar 4. Alur Penelitian

#### 1. Pembuatan Serbuk Daun Sambung Nyawa

Daun sambung nyawa yang sudah terkumpul dicuci dengan air bersih dan dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven bersuhu 45°C (Wahyuni *et al.*, 2017) selama  $\pm 48$  jam. Kemudian daun sambung nyawa yang

sudah kering di remas-remas dan digiling hingga menjadi serbuk halus. Pembuatan serbuk ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Politeknik Negeri Lampung.

## **2. Ekstraksi Serbuk Daun Sambung Nyawa**

Daun sambung nyawa sebagai sumber senyawa antibakteri diekstrak terlebih dahulu sehingga diperoleh ekstrak yang mengandung senyawa antibakteri. Ekstraksi daun sambung nyawa dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Metode ini dipilih karena maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana. Sebanyak 300 gr serbuk daun sambung nyawa yang diperoleh direndam dalam metanol 95% sebanyak 3000 mL (perbandingan 1:10 w/v) sesuai dengan penelitian Riadini (2015) selama 72 jam.

Metanol digunakan sebagai pelarut karena senyawa ini bersifat non polar, sehingga diharapkan senyawa yang terekstraksi dari daun sambung nyawa merupakan senyawa non polar juga. Cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel. Hal ini menyebabkan larutan yang terpekat keluar sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dengan di luar sel (Harborne, 1987).

Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50° C dengan kecepatan putaran 75 rpm hingga diperoleh ekstrak kental berupa pasta. Pemekatan bertujuan untuk mence-

gah potensi terjadinya kerusakan komponen yang terkandung dalam ekstrak dan mempermudah penyimpanannya jika dibandingkan dengan keadaan ekstrak yang masih mengandung pelarut (Sari *et al*, 2016). Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Mutu Hasil Pertanian Universitas Lampung.

### **3. Uji Fitokimia**

Uji fitokimia dilakukan pada enam parameter, yaitu saponin, steroid, terpenoid, tanin, alkaloid, dan flavonoid. Sebelum dilakukan uji, ekstrak pasta daun sambung nyawa diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut metanol. Metode yang dilakukan yaitu memodifikasi pada Tasmin *et al*. (2014) sebagai berikut.

#### **a. Saponin**

Sebanyak 0,5 mL sampel ekstrak di larutkan di dalam 5 mL akuades, kemudian dikocok selama 30 detik. Hasil positif jika terdapat busa pada larutan.

#### **b. Steroid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 0,5 mL asam asetat glacial dan 0,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi biru atau ungu.

#### **c. Terpenoid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 0,5 mL asam asetat glacial dan 0,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi merah atau kuning.

**d. Tanin**

Sebanyak 1 mL sampel ditambah 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  10%. Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi hitam kebiruan (Robinson, 1991).

**e. Alkaloid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 5 mL tetes kloroform dan 5 tetes pereaksi Mayer (1 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades, ditambahkan 0,271 g  $\text{HgCl}_2$  hingga larut). Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi putih kecoklatan.

**f. Flavonoid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 0,5 g serbuk Mg dan 5 mL HCl pekat (tetes demi tetes). Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi merah atau kuning dan terdapat busa.

**4. Uji *In Vitro*****a. Uji Zona Hambat**

Uji zona hambat dilakukan dengan metode *paper disc diffusion agar*. Isolat murni *Vibrio alginolyticus* diremajakan dalam media NA kemudian ditumbuhkan dalam medium NB, inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Ekstrak daun sambung nyawa dibuat konsentrasi sebesar 500, 600, 700, 800, 900, 1000, dan 1500 ppm. Isolat cair bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan kepadatan  $10^8$  diinokulasi ke dalam media NA sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . Sebanyak 25  $\mu\text{L}$  ekstrak daun sambung nyawa ditetaskan ke atas kertas cakram steril (diameter 8 mm) yang diletakkan di dalam cawan petri steril kemudian menggunakan pinset steril dipindahkan ke atas media

NA yang telah diinokulasi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Kontrol positif berupa kertas cakram yang diberi 25  $\mu$ L larutan antibiotik kloramfenikol 1 ppm, sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram yang diberi 25  $\mu$ L metanol. Inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Kertas cakram yang membentuk zona bening disekelilingnya menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan *Vibrio*. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dan digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas penghambatan.

#### **b. Uji MIC**

Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan cara membuat media cair NB sebanyak 4,5 mL setiap tabung reaksi. Kemudian larutan ekstrak daun sambung nyawa dibuat dengan konsentrasi 500, 600, 700, 800, 900, 1000, dan 1500 ppm. Selanjutnya masing-masing konsentrasi ekstrak daun sambung nyawa ditambahkan sebanyak 0,5 mL kedalam media NB yang telah disiapkan. Bakteri *Vibrio alginolyticus* sebanyak 0,1 mL dimasukkan kedalam suspensi media dan ekstrak daun sambung nyawa. Kontrol positif berupa media NB yang diinokulasi bakteri tanpa penambahan ekstrak daun sambung nyawa. Kontrol negatif berupa media NB tanpa tambahan ekstrak dan bakteri uji. Indikator terdapat bakteri yang tumbuh apabila media berubah menjadi keruh atau sama seperti kontrol positif. Pengamatan dilakukan dengan pengamatan turbidimetri atau pengamatan kekeruhan secara visual (Soelama *et al.*, 2015).

#### **5. Uji Toksisitas**

Penggunaan ekstrak daun sambung nyawa untuk fitofarmaka pada ikan harus



diketahui tingkat toksiknya melalui uji toksik, sehingga penggunaannya aman untuk ikan dan lingkungan. Terdapat beberapa metode uji toksisitas, salah satu uji yang efektif dapat dilakukan yaitu uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Brine Shrimp Lethality Test* adalah suatu metode pengujian yang dapat digunakan sebagai *bioassay* yang sederhana untuk meneliti tingkat sitotoksik suatu senyawa. Cara yang dilakukan yaitu dengan menentukan nilai  $LC_{50}$  yang dinyatakan dari komponen aktif suatu simplisia ataupun bentuk sediaan ekstrak dari suatu tumbuhan (Sari *et al.*, 2016).

Uji BSLT dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan ekstrak daun sambung nyawa dan air laut. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (triplo). Sebagai kontrol adalah air laut yang tidak diberi ekstrak sampel. Tabung percobaan disimpan di bawah pencahayaan lampu TL. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah larva *Artemia salina* yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya. Persentase kematian larva *Artemia salina* dihitung dari rata-rata kematian pada tiap konsentrasi terhadap total awal larva (Kaban *et al.*, 2016).

Data kemudian dianalisis dengan menggunakan persamaan regresi linear dengan melakukan transformasi data konsentrasi ke bentuk logaritma serta mengubah nilai persen kematian larva kedalam satuan probit. Berdasarkan analisis regresi linier antara log konsentrasi dan nilai probit larva udang akan diketahui nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak daun sambung nyawa. Data pengujian toksisitas diperoleh dari ana-

lisis LC<sub>50</sub> yang dilakukan dengan analisis regresi menggunakan *MS Office Excel* 2007 (untuk sistem operasi Windows) (Arief *et al.*, 2017).

## **6. Uji *In Vivo***

### **a. Persiapan Wadah dan Hewan Uji**

Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak kontainer berukuran 60 x 40 x 40 cm. Sebelum digunakan bak kontainer disterilisasi dengan cara dicuci dan didesinfeksi menggunakan kaporit 100 ppm. Masing-masing bak kontainer dilengkapi dengan *inlet* air, *outlet* air, dan aerasi. Media pemeliharaan menggunakan air laut steril sebanyak  $\frac{3}{4}$  dari volume total wadah pemeliharaan. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu macan dengan panjang rata-rata 15 cm dan bobot rata-rata 40 g/ekor yang berasal dari Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

### **b. Persiapan Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Ekstrak daun sambung nyawa dibuat larutan dengan tiga konsentrasi berbeda, yaitu setengah dari dosis terbaik uji *in vivo* (ppm), dosis terbaik uji *in vivo* (ppm), dan dua kali lipat dosis terbaik uji *in vivo* (ppm). Larutan dibuat sebanyak 100 mL menggunakan akuades dan dimasukkan ke dalam botol semprot.

### **c. Pembuatan Pakan Uji**

Pakan uji dibuat dengan menyemprotkan ekstrak daun sambung nyawa dengan dosis berbeda ke dalam masing-masing pakan komersil ikan kerapu macan sebanyak 1 kg. Kemudian dicampur hingga rata dan dijemur hingga kering. Pakan uji

dapat disimpan di dalam toples kedap udara selama uji.

#### **d. Pemeliharaan Ikan Kerapu Macan**

Pemeliharaan ikan kerapu macan dilakukan selama 21 hari dengan pemberian pakan yang dicampur ekstrak daun sambung nyawa sebanyak 3 kali sehari, yaitu pukul 07.00; 12.30; dan 16.00. Sebelum diberi perlakuan, ikan kerapu macan diaklimatisasi selama 3 hari sebagai proses adaptasi. Setelah aklimatisasi dilakukan pemberian pakan perlakuan selama 14 hari, kemudian pada hari ke 15 ikan kerapu macan diuji tantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Setelah uji tantang, kemudian dilakukan pengamatan terhadap gejala klinis dan kematian yang dialami ikan kerapu macan setiap hari selama tujuh hari pemeliharaan. Pemberian pakan uji dilakukan secara *ad satiation* (sekenyangnya). Untuk menjaga kualitas air pada wadah pemeliharaan, maka dilakukan penyiponan setiap pagi sebelum pemberian pakan dan sore hari setelah pemberian pakan. Pemeriksaan kualitas air dilakukan untuk memantau kondisi media pemeliharaan ikan kerapu macan melalui pengukuran suhu, DO, pH, dan salinitas.

#### **e. Persiapan Patogen dan Uji Kohabitasi**

Patogen yang digunakan sebagai uji tantang pada penelitian ini adalah *Vibrio alginolyticus*. Isolat bakteri diperoleh dari Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang. Uji Kohabitasi bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolat murni bakteri patogen aktif yang selanjutnya digunakan untuk uji tantang. Pada uji kohabitasi bakteri dilakukan 2 tahap injeksi untuk memperoleh isolat yang mampu membuat ikan sakit. Tahap uji kohabitasi yang dilakukan meliputi:

1. Isolat murni bakteri *Vibrio alginolyticus* diinokulasi pada media NB.
2. Kemudian diinjeksikan pada 5 ekor ikan stok sebanyak 0,1 ml/ekor dengan kepadatan  $10^8$ . Ikan uji diamati hingga menunjukkan gejala infeksi oleh bakteri tersebut.
3. Bakteri *Vibrio alginolyticus* diambil dari ikan uji yang sakit kemudian diinokulasi pada media TCBSA, selanjutnya diinkubasi selama 18 – 24 jam.
4. Setelah itu diinokulasi kembali pada media NB, dan diinkubasi kembali selama 18 – 24 jam.
5. Kemudian diukur kepadatannya dengan metode turbidimetri menggunakan alat spektrofotometer.
6. Kemudian tahap nomor dua hingga nomor lima dilakukan sekali lagi hingga bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat digunakan untuk ujiantang.

#### **f. Uji Tantang**

Ikan kerapu macan yang telah diberi pakan perlakuan selama 14 hari, kemudian diuji tantang pada hari ke-15 dengan menyuntikkan bakteri *Vibrio alginolyticus* sebanyak 0,1 ml/ekor. Penyuntikkan dilakukan secara intramuskular dengan sudut kemiringan kira-kira  $30^\circ$ . Kemudian ikan yang telah diuji tantang diamati gejala klinis dan kematiannya setiap hari selama tujuh hari pemeliharaan. Setelah dilakukan uji tantang pemberian pakan tetap dilakukan sesuai perlakuan yang diberikan sampai dengan akhir penelitian.

## E. Parameter Pengamatan

### 1. Gejala Klinis

Gejala klinis yang diamati seperti tingkah laku ikan saat berenang, nafsu makan, dan kondisi tubuh ikan. Parameter ini diamati setiap hari setelah ikan kerapu macan diuji tantang bakteri.

### 2. *Survival Rate (SR)*

Penghitungan jumlah ikan yang mati dilakukan setelah ikan kerapu macan diinjeksi *Vibrio alginolyticus* sampai akhir penelitian. Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$SR\% = \frac{Nt}{N0} \times 100\%$$

Keterangan : SR : Tingkat kelangsungan hidup (%)

Nt : Jumlah ikan yang hidup pada akhir pemeliharaan (ekor)

N0 : Jumlah ikan yang hidup pada awal pemeliharaan (ekor)

### 3. *Relative Percent Survival (RPS)*

*Relative Percent Survival (RPS)* merupakan pengamatan jumlah kematian ikan dari masing-masing perlakuan. Penghitungan RPS dilakukan setelah ikan kerapu macan diinjeksi *Vibrio alginolyticus*. Kemudian RPS dihitung dengan rumus berikut mengacu pada Amend (1981).

$$RPS = \left[ 1 - \frac{\text{Kematian ikan perlakuan}}{\text{Kematian ikan kontrol}} \right] \times 100\%$$

#### **4. Pengamatan Hematologi**

Pengamatan hematologi meliputi pengamatan kadar hematokrit, total leukosit, total eritrosit, dan diferensial leukosit. Metode pengamatan yang dilakukan yaitu meliputi:

##### **a. Pengambilan Sampel Darah**

Jarum spuit ditusukkan pada garis tengah tubuh di belakang sirip anal. Jarum dimasukkan ke dalam *musculus* sampai mencapai tulang belakang. Kemudian spuit ditarik perlahan-lahan sampai darah masuk ke dalam spuit. Setelah itu darah dimasukkan ke dalam *vacuum tube* yang telah diberi antikoagulan dan kertas label (Lestari *et al.*, 2017).

##### **b. Perhitungan Nilai Hematokrit dengan Metode Mikrohematokrit**

Tabung mikropipiler diisi dengan darah ikan hingga mencapai  $\frac{3}{4}$  bagian tabung. Setelah itu ujung tabung ditutup dengan penutup tabung. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin sentrifuge hematokrit dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Setelah 5 menit, mesin dimatikan dan tabung dikeluarkan lalu nilai hematokrit ditentukan dengan pengukuran menggunakan *mikrohematokrit reader* (Samsisko, 2013).

##### **c. Perhitungan Jumlah Eritrosit**

Darah dihisap dengan pipet eritrosit sampai batas 0,5. Kemudian darah dicampur dengan larutan Hayem sampai batas 101 yang tertera pada pipet. Isi pipet dikocok dengan membuat gerakan angka 8 agar tercampur. Cairan kemudian dimasukkan

ke kamar hitung kemudian dilakukan penghitungan di bawah mikroskop. Kamar hitung dengan bidang bergaris diletakkan di bawah kaca obyektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis bagi tersebut kemudian eritrosit akan terlihat. Semua eritrosit dihitung yang terdapat dalam lima bidang yang tersusun atas 16 bidang kecil. Eritrosit dihitung dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri dan seterusnya (Pal & Pal, 2006).

Rumus perhitungan jumlah eritrosit:

$$N = n \times 10^4$$

Keterangan :

n : jumlah sel darah merah yang terdapat dalam 80 kotak kecil

N : jumlah sel darah merah dalam 1 mm<sup>3</sup> darah

10<sup>4</sup> : kedalaman objek × pengenceran × jumlah sampel (10μm×200×5)

#### **d. Perhitungan Jumlah Leukosit**

Darah dihisap dengan pipet eritrosit sampai batas 0,5. Kemudian darah dicampur dengan larutan Turk sampai batas 11 yang tertera pada pipet. Isi pipet dikocok dengan membuat gerakan angka 8 agar tercampur. Cairan kemudian dimasukkan ke kamar hitung kemudian dilakukan penghitungan di bawah mikroskop. Kamar hitung dengan bidang bergaris diletakkan di bawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis bagi tersebut dan leukosit akan terlihat. Semua leukosit yang terdapat dalam keempat bidang besar dihitung pada sudut-sudut seluruh permukaan yang terbagi. Leukosit dihitung dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri dan seterusnya (Pal & Pal, 2006).

Rumus perhitungan jumlah leukosit:

$$N = nx50$$

Keterangan :

n : jumlah sel darah putih yang terdapat dalam 64 kotak

N : jumlah sel darah putih dalam 1 mm<sup>3</sup> darah

50 : pengenceran/volume kamar hitung = 20/(4/10)

#### **e. Sediaan Apus Darah (Pengamatan Diferensial Leukosit)**

Pembuatan sediaan apus darah menggunakan kaca preparat dan *cover glass*. Darah ditetaskan pada kaca preparat, kemudian *cover glass* ditempelkan pada tetes darah di kaca preparat dengan sudut 45°. *Cover glass* ditarik ke sisi kanan lalu didorong ke sisi kiri dengan cepat dan konstan. Setelah didapatkan film darah yang tipis, kemudian dikeringanginkan. Setelah itu, preparat apusan dimasukkan kedalam metanol selama 5 menit, jika telah selesai preparat tersebut dimasukkan kedalam pewarna giemsa selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dikeringkan. Jika preparat telah kering, preparat diamati dengan menggunakan mikroskop.

Perhitungan diferensial leukosit dilakukan dengan cara menemukan sel darah putih minimal berjumlah 100 sel untuk menentukan persentase jenis leukosit (Pal & Pal, 2006). Perhitungan diferensial leukosit menurut Hartika (2014) yaitu sebagai berikut:

$$\% \text{ Limfosit} = \frac{L}{100} \times 100\%$$



$$\% \text{ Monosit} = \frac{M}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ Neutrofil} = \frac{N}{100} \times 100\%$$

Keterangan :

L : Jumlah limfosit dalam 100 sel terhitung

M : Jumlah monosit dalam 100 sel terhitung

N : Jumlah neutrofil dalam 100 sel terhitung

## 5. Pengamatan Histopatologi

Organ yang diamati pada uji histopatologi meliputi insang, hati, limpa, dan saluran pencernaan. Sampel ikan yang digunakan untuk pengujian histopatologi diambil dari setiap perlakuan untuk mengetahui tingkat keparahan infeksi yang dialami ikan pasca ujiantang. Setiap perlakuan diambil 3 hewan uji sebagai ulangan. Proses pembuatan preparat sediaan histopatologi terdiri atas fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, pemotongan, serta pewarnaan. Berikut adalah langkah-langkah pembuatan sediaan histopatologi:

### a. Fiksasi

Proses pembuatan preparat histopatologi diawali dengan perendaman dengan larutan fiksatif menggunakan larutan Davidson yang merupakan larutan 330 mL etanol 95%, 220 mL formaldehid 4%, dan 115 mL asam asetik glasial dalam 335 mL akuades selama 24 jam atau sampai tak terbatas sesuai dengan keperluan penggunaan.

### **b. Dehidrasi, *Clearing*, dan *Embedding***

Setelah organ ikan direndam dengan larutan fiksatif, kemudian dilanjutkan dengan dehidrasi, *clearing*, dan *embedding* dengan urutan sebagai berikut: jaringan organ ikan uji dimasukkan secara berturut-turut ke dalam etanol 70 % (I), etanol 70 % (II), etanol 80 % (I), etanol 80 % (II), etanol 95 % (I), etanol 95 % (II), etanol 100 % (I), etanol 100 % (II), xylol etanol, xylol (I), xylol (II), xylol (III), parafin (I) direndam dalam oven 60°C selama masing-masing 2 jam. Selanjutnya diblok dengan cara memindahkan jaringan udang ke dalam cetakan kertas yang telah diisi dengan parafin cair sebelumnya.

### **c. Pemotongan Parafin**

Blok-blok parafin kemudian dipotong dengan ketebalan 5–7 mm secara membujur sehingga diperoleh irisan insang, hati, limpa, dan saluran pencernaan yang lebih luas, dan lebih banyak bagian organ ikan yang terwakili untuk pemeriksaan histopatologi. Jaringan organ ikan yang telah dipotong kemudian ditempatkan di permukaan air ( $\pm 40$  °C) di dalam *water bath*, selanjutnya ditempelkan pada kaca obyek dan dibiarkan mengering.

### **d. Pewarnaan Preparat**

Jaringan diwarnai dengan menggunakan hematoxyline dan eosin. Prosedur pewarnaannya yaitu, potongan jaringan udang uji dimasukkan kedalam xylol (I) 5 menit, xylol (II) 5 menit, etanol 100 % (I) 1 menit, etanol 100 % (II) 1 menit, etanol 95 % (I) 1 menit, etanol (II) 1 menit, etanol 80 % (I) 1 menit, etanol 80 % (II) 1 menit, etanol 50 % 1 menit, akuades 1 menit, hematoxyline 4 – 5 menit,

etanol acid 1 menit, eosin 2 menit, etanol 95 % (I), etanol 95 % (II) 1 menit, etanol 100 % (I) 1 menit, etanol 100 % (II) 1 menit, xylol (I) 1 menit, xylol (II) 1 menit, xylol (III) 1 menit. Sedangkan tahap akhir dari pewarnaan tersebut dilakukan dengan meneteskan entelan (*Canada Balsam Sintetis*), kemudian ditutup dengan *cover glass*.

#### **e. Pemeriksaan Histopatologi**

Preparat histopatologi diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x, 20x, dan 40x. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat patogenitas yang ditimbulkan oleh patogen berdasarkan kerusakan jaringan yang dialami ikan kerapu macan.

#### **6. Kualitas Air Pemeliharaan**

Parameter kualitas air yang diukur adalah oksigen terlarut, pH, salinitas, dan suhu. Parameter tersebut diukur pada hari ke 5 sebagai awal pemeliharaan dan hari ke 18 sebagai akhir pemeliharaan.

#### **F. Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan aplikasi SPSS 20 dan uji lanjut untuk beda nyata menggunakan uji Duncan. Parameter yang dianalisis statistik secara kuantitatif yaitu kelangsungan hidup, *relative percent survival*, dan parameter hematologi, sedangkan parameter yang dianalisis secara deskriptif adalah kualitas air, gejala klinis, dan pengamatan histopatologi.

## **V. SIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Simpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan yaitu dosis ekstrak daun sambung nyawa yang efektif untuk mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus* pada budidaya ikan kerapu macan yaitu dosis 700 ppm.

### **B. Saran**

Saran yang dapat ditawarkan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan yaitu:

1. Perlu dilakukan uji titer antibodi untuk mengetahui respon imun spesifik pada ikan uji.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas fagositosis dan indeks fagositosis untuk mengetahui perkembangan imun non spesifik pada ikan uji.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abed, S. A., Sirat, H. M., & Taher, M. (2013). Total Phenolic, Antioxidant, Antimicrobial Activities and Toxicity Study of *Gynotroches axillaris* Blume (*Rhizophoraceae*). *EXCLI Journal*, 12, 404-412.
- Adila, R., Nurmiati., & Agustien, A. (2013). Uji Antimikroba *Curcuma* spp. Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 2(1), 1-7.
- Affandi, R. & Tang, U. M. (2002). *Fisiologi Hewan Air*. Universitas Riau Press, Riau.
- Agung, L. A., Prayitno, S. B., & Sarjito. (2013). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap Profil Darah Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 87-101.
- Alamanda, I. E., Handajani, N. S., & Budiharjo, A., (2007). Penggunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah Untuk Penetapan Kesehatan Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Biodiversitas*, 8(1), 34-38.
- Amend, D. F. (1981). Potency Testing of Fish Vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49, 447-454.
- Andayani, S. (2007). Effect of Bioactive Jellyfish (*Bougainvillia* sp.) as a Immunostimulan of Bactericidal Activity, Non-specific Immune Response as Well as Survival Rate of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Dissertation*, University of Brawijaya, Malang.
- Andayani, S. (2009). Respon Non-Spesifik Ikan Kerapu Macan (*E. fuscoguttatus*) terhadap Immunostimulan Senyawa Aktif Alkaloid Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) Melalui Pakan. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*, 3B, 67-73.

- Andayani, S., Fajar, M., & Rahman, M. F. (2018). Effect of Alkaloids Derived from Jellyfish (*Aeginura* sp.) on the Intestinal Histopathology and Relative Percentage Survival (RPS) of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) Infected by *Vibrio harveyi*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1), 1-6.
- Anderson, D. P. (1974). *Fish immunology*. In *Diseases of fishes*. Ed. S.F. Snieszko and H.R. Axelrod. T.F.H. Publications Inc. Ltd, U.S.A.
- Aonullah, A. A., Prayitno, S. B., & Sarjito. (2013). Pengaruh Penggunaan Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap Kelulushidupan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 126-135.
- Arief, D. A. Sangi, M. S., & Kamu, V. S. (2017). Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Biji Aren (*Arenga pinnata* MERR.). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 6(2), 12-15.
- Aryanti, H., Syafria, Y., & Ermayanti, T. M. (2007). Isolasi dan Uji Antibakteri Batang Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* Lour) Umur Panen 1, 4 dan 7 Bulan. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6(2), 43-45.
- Ayini, U., Harmina B. S., & Dewi, T. C. (2014). Efek Antibakteri Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara *In Vitro*. *Biosaintifika*, 6(1), 67-75.
- Baratawidjaja K. G. (2006). *Basic Immunology 6th edition*. Balai Penerbitan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Bond, C. E. (1979). *Biology of Fishes*. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Campbell, T. W. (2015) *Exotic Animal Hematology and Cytology*. Wiley Blackwell, Iowa.
- Cowan, M. (1999). Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology*, 12(4), 564-582.
- Danata, R. H. & Yamindago, A. (2014). Analisis Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mangrove *Avicennia marina* dari Kabupaten Trenggalek dan Kabupaten Pasuruan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Kelautan*, 7(1), 12-19.

- Dangeubun, J. L. & Metungun, C. (2017). Hematology of *Vibrio alginolyticus*-Infected Humpback Grouper *Cromileptes altivelis*, Under Treatment of *Alstonia acuminata* Shoot Extract. *AAFL Bioflux*, 10(2), 274-284.
- Darminto, Ali A., & Dini I. (2011). Skrining Senyawa Bioaktif pada Tumbuhan Mangrove yang Dapat Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penyebab Penyakit *Red Spot Disease*. *Jurnal Chemica*, 12(1), 33-39.
- Effendi, H. (2000). *Telaah Kualitas Air*. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan. FPIK – IPB, Bogor.
- Efrizal, T., Setijanto, H., Tumpal, D., & Sukra, Y. (1998). Pengaruh Kadar Subletal Phosphamidon Terhadap Kerusakan Jaringan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Trew). *Tesis*. Fakultas Perikanan UNRI, Pekanbaru.
- El Mahmood, Ogbonna, & Raji, M. (2010). The Antibacterial Activity of *Azadirachta indica* (neem) Seeds Extracts Against Bacterial Pathogens Associated With Eye and Ear Infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(14), 1414-1421.
- Fadli, M.Y. (2015). Benefits of Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Substance as Anticancer. *Jurnal Majority*, 4(5), 50-53.
- Fadlian, B., Hamzah., & Abram. H.P. (2016). Uji Efektifitas Ekstrak Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) Sebagai Bahan Pengwet Alami Tomat. *J. Akad. Kim*, 5(1), 153-158.
- Firdausi, A.P., Sukenda, & Nuryati, S. (2017). Efikasi Vaksinasi pada Benih Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Metode Infiltrasi Hiperosmotik untuk Mencegah Infeksi *Streptococcus agalactiae*. *Jurnal Veteriner*, 18(4), 634-641.
- Fujaya Y. (2004). *Fish Physiology-Principles of Fisheries Technique Development*. PT. Rineka Cipta, Jakarta.
- Harborne, J.B. (1987). *Phytochemical Method (Metode Fitokimia)*. Terjemahan oleh Kosasih Patmawinata dan Iwang Soediro. ITB, Bandung.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., & Lusiastuti, A.M. (2011). Karakteristik dan Patogenitas *Streptococcus agalactiae* Tipe  $\beta$ -hemolitik dan Non-hemolitik pada Ikan Nila. *Jurnal Veteriner*, 12(2), 152-164.

- Hartika, R., Mustahal, M., & Putra, A. N. (2014). Gambaran Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Penambahan Dosis Prebiotik yang Berbeda Dalam Pakan. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 4(4), 259-267.
- Hastari, I.F., Sarjito, & Prayitno, S.B. (2014). Karakterisasi Agensia Penyebab Vibriosis dan Gambaran Histologi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karamba Jaring Apung Teluk Hurun Lampung. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(3), 86-94.
- Hastuti, S. & Subandiyono. (2010). *Buku Ajar Nutrisi Ikan*. Lembaga Pengembangan dan Penjaminan Mutu Pendidikan. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Hibiya, T & Fumio T. (1995). *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*. Edisi kedua. Kodansha Ltd, Japan.
- Iwama, G. & Nakanishi, T. (1996). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego.
- Juniarti, Osmeli. D., & Yuhernita. (2009). Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (*1,1-Diphenyl-2-Pikrilhydrazyl*) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Sains*. 13(1), 50-54.
- Kaban, A.N., Daniel, & Saleh, C. (2016). Uji Fitokimia, Toksisitas, dan Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksan dan Etil Asetat Terhadap Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *amarum*). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 14(1), 24-28.
- Kordi, K.. (2004). *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta dan Bina Adiaksara, Jakarta.
- Kumar, V. & Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10(11), 1.325–1.334.
- Lestari, E., Setyawati, T.R., & Yanti, A.H. (2017). Profil Hematologi Ikan Gabus (*Channa striata* Bloch, 1793). *Protobiont*, 6(3), 283-289.
- Loomis, T.A. (1978). *Toksikologi Dasar*. Edisi III. IKIP Semarang Press, Semarang.



- Maftuch, H. N. & Sukarni. (2012). Kajian Penggunaan Ciprofloxacin Terhadap Hematologi Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J.Exp Life Sc*, 2(2), 65-69.
- Mariskha, P. R., & Abdulgani, N. (2012). Aspek Reproduksi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus sexfasciatus*) di Perairan Glondong Gede Tuban. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), 27-31.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. J., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31-34.
- Middelton, E., C. Kandaswami & Theoharides, T.C. (2000). The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Review*, 52(4), 673-751.
- Mohd-Aris, A., Saad, M. Z., Daud, H. M., Yusof, M. T., & Ina-Salwany, M. Y. (2018). *Vibrio harveyi* Protease Deletion Mutant as a Live Attenuated Vaccine Candidate Against Vibriosis and Transcriptome Profiling Following Vaccination for *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture International*, 27(1), 125-140.
- Moyle, P. B. & Chech, J. J. (1988). *An Introduction to Ichthyology*. Prentice Hall Inc. A Division of Simon and Schuster Engelwood Cliffs, New Jersey.
- Muliani, Nurhidayah, & Kurniawan, K. (2015). Herbal Mangrove Sebagai Sumber Anti Bakteri *Vibrio harveyi* Penyebab Penyakit pada Udang Windu *Penaeus monodon*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(3), 405-414.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., & Blazer, V. (2007). *Fish Histology and Histopathology*. USFWS-NCTC, United States.
- Mundriyanto, H., Taufik, P., & Tauhid. (2002). Respon Histologis Tubuh Kodok (*Rana catesbeiana* Shaw) Terhadap Infeksi Bakteri Patogen dan Potensi *Saccharomyces cerevisiae* Sebagai Immunostimulan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(3), 53-63.
- Nabib, R., & Pasaribu, F.H. (1989). *Patologi dan Penyakit Ikan*. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Nanda, N. D., Moelia, E., & Sudani, E.T. (2017). Pengaruh Pemberian Jus Sambung Nyawa (*Gynura procumbens L. merr*) Terhadap Produksi Ayam Pedaging. *Jurnal Aves*, 11(2), 45-51.
- Nuria, M. C., Faizatun, A., & Sumantri. (2009). Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha cuircas L*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*, 5(2), 26-37.
- Nirwan. (2007). Produksi Flavonoid Daun Dewa (*Gynura pseudochina (L.) DC*) Asal Kultur pada Kondisi Naungan dan Pemupukan. *Disertasi*. Instiut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nursyirwani, Asmara, W., Wahyuni, A. E. T. H., & Triyanto. (2015). Histopatologi Ikan Kerapu Macan yang Diimbuhi Bakteri Asam Laktat dan Diuji Tantang *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Veteriner*, 16(4), 505-512.
- Pal, G.K. & Pal, P. (2006). *Textbook of Practical Physiology*. Orient Longman Private Limited, Hyderabad
- Pang, H., Qiu, M., Zhao, J., Hoare, R., Monaghan, S. J., Song, D., Chang, Y., & Jian, J. (2018). Construction of a *Vibrio alginolyticus hopPmaJ (hop)* Mutant and Evaluation of its Potential as a Live Attenuated Vaccine in Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & shellfish immunology*, 76, 93-100.
- Parameswari, W., Sasanti, A. S., & Muslim. (2013). Populasi Bakteri, Histologi, Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Benih Ikan Gabus (*Channa Striata*) yang Dipelihara dalam Media dengan Penambahan Probiotik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 1(1), 76-89.
- Plumb, J. A. (1994). *Health Maintenance of Cultured Fishes: Principal Microbial Diseases*. CRC Press Inc, USA.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta.
- Priosoeryanto, B.P., Ersas, I.M., Tiuria, R., & Handayani, S.U. (2010). Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang Berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Indonesian Journal of Veterinary Science & Medicine*, 2(1), 1-8.

- Purwaningsih, U., Indrawati, A., & Lusiastuti, A. M. (2015). Patogenesis Ko-Infeksi Penyakit *Fish Tuberculosis* dan *Motile Aeromonas Septicemia* pada Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(1), 99-107.
- Rahman, E. F. (2010). Efektivitas Ekstrak Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (Lour.) DC) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* pada Plat Dasar Gigi Tiruan Resin Akrilik. *Majalah Ilmiah Sultan Agung*, 48(123), 32-45.
- Rahman, I. S., Maftuch, & Sanoesi, E. (2018). Efektifitas Immunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) Terhadap Histopatologi Hati Ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 2(2), 47-55.
- Raj, C. D., Jayanthi, V., Manaswini, V. S., Gayathri, R., Ranjani, C., & Brindha, P. (2012). Effect of Polyherbal Formulation (OB-6) on High Fat Diet Induced Hyperlipidemia in Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(2), 31-35.
- Riadini, R. K. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) Berdasarkan Perbedaan Metode Ekstraksi dan Umur Panen. *Disertasi*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Yogyakarta.
- Rivai, H., Femiwati, F., & Krisyanella, K. (2011). Karakterisasi Ekstrak Air Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya. *Jurnal Farmasi Higea*, 3(1), 16-24.
- Robert, R. J. (2001). *Fish Pathology*. W. B. Saunders, USA.
- Robert, R. J. (1978). *Fish Pathology*. Bailliere Tindall, London.
- Robinson, T. (1991). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerjemah: K. Padmawinata. ITB, Bandung.
- Royan, F., Rejeki, S. & Haditomo, A. H. C. (2014). Pengaruh salinitas yang berbeda terhadap profil darah ikan nila. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(2), 109-117.
- Sadikin, M. (2002). *Biokimia Darah*. Widya Medika, Jakarta
- Sahari, P. Y. (2018). Perubahan Histopatologi Ginjal dan Hati Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*) dan Cantik

(*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus polyphekadion*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio vulnificus*. Thesis. Universitas Airlangga, Surabaya.

Salasia, S.I.O., Sulanjari, D. & Ratnawati, A. (2001). Studi Hematologi Ikan Air Tawar. *Biologi*, 2(12), 710-723.

Samsisko, R.E.W. (2013). Respon Hematologis Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) pada Suhu Media Pemeliharaan yang Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga, Surabaya.

Saputra, B. (2018). Implementasi Pemberdayaan Masyarakat Melalui Program *Corporate Social Responsibility* Konservasi Kawasan Laut Badak LNG di Kota Bontang. *eJournal Sosiatri-Sosiologi*, 6(1), 46-60.

Saputra, D.A., Sukenda, & Widanarni. (2013). Aplikasi Sinbiotik dengan Dosis Probiotik Berbeda Untuk Pencegahan Vibriosis pada Ikan Kerapu Bebek, *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 12(2), 169-177.

Sari, I., Miranda, T., & 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, F.P. & Sari, S. M. (2011). *Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (Jatropha multifida Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami*. Technical Report Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.

Sarjito, Radjasa, O.K., Hutabarat, S., & Prayitno, S.B. (2009). Phylogenetic Diversity of Causative Agent of Vibriosis Associated with Groupers Fish from Karimunjawa Islands, Indonesia. *Current Research in Biotechnology*, 2(1), 14-21.

Sarjito, Prayitno, S.B., Radjasa, O.K., & Hutabarat, S. (2007). Karakterisasi dan Patogenitas Agen Penyebab Vibriosis pada Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 8(2), 89-95.

Shao, Z.J., Liu, J., & Xiang, L. X. (2004). *Aeromonas Hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* Lymphocytes in Vitro. *J.Aquaculture*, 229(1-4), 11-23.

Sipahutar, Wahyu, L., Aliza, D., Winaruddin, & Nazaruddin. (2012). Gambaran Histopatologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipelihara dalam Temperatur Air di Atas Normal. *J. Medika Veterinaria*, 7(1), 0852-1943.

- Siti Boedina Kresno. (2001). *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. 4<sup>th</sup> edition, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Soelama, H.J.J., Kepel, B.J., & Siagian, K.V. (2015). Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) Ekstrak Rumpun Laut (*Eucheuma cottonii*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal e-GiGi*, 3(2), 374-379.
- Soetarno, S., Suganda, A. G., Sugihartina, G., & Sukrasno, S. (2000). Flavonoid dan Asam-asam Fenolat dari Daun Dewa [*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.]. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 6(1), 6-7.
- Sumayani, R.K., & Cahyoko, Y. (2008). Daya Antibakteri Perasan Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophilia* Secara *In Vitro*. *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*, 3(1), 83-87.
- Sutrisna, A. (2011). Pertumbuhan Ikan Kerapu Macan di perairan pulau panggang Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Fakultas Ilmu Kelautan, Bogor
- Syukur C., Hermani. (2001). *Budidaya Tanaman Obat Komersil*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tasmin, N., Erwin, & Kusuma, I.W. (2014). Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Fraksi Kloroform dari Daun Terap (*Artocarpus Odoratissimus* Blanco). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 12(1), 45-52.
- Triadayani, A.E., Aryawati, R. & Diansyah, G. (2010). Pengaruh Logam Timbal (Pb) Terhadap Jaringan Hati Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*). *Maspari Journal*, 1(1), 42-47.
- Utami, D. T., Prayitno, S. B., Hastuti, S., & Santika, A. (2013). Gambaran Parameter Hematologis pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diberi Vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan Dosis yang Berbeda. *Journal of Aquaculture Management And Technology*, 2(4), 7-20.
- Vadstein, O. (1997). The Use of Immunostimulation in Marine Larviculture: Possibilities and Challenges. *J. Aquaculture*, 155(1-4), 401-417.
- Wahyukundari MA. (2013). *Laporan Hasil Penelitian Dosen Pemula Aktivitas Fagositosis Neutrofil dan Monosit yang Dipapar Ekstrak Daun Binahong*. FKG UNEJ, Jember
- Wahyuni, R., Guswandi, G., & Rivai, H. (2017). Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Jurnal Farmasi Higea*, 6(2), 126-133.

- Widayati, E.D. (2008). Studi Histopatologi Insang Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) pada Konsentrasi Sublethal Air Lumpur Sidoarjo. *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Wijaya, T. (2015). Pembesaran Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscogatta*. Metode Keramba Jaring Apung di Kawasan Taman Nasional Kepulauan Seribu. *Disertasi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Yadav, A. V., & Bhise, S. B. (2004). Chitosan: A Potential Biomaterial Effective Against Typhoid. *Current Science*, 87(9), 1176-1178.
- Yoshimitsu, T., Eda, H., & Hiramatsu, K. (1986). Groupers Final Report Marine-Culture Research and Development in Indonesia. *ATA-192. JICA*, 103-129.
- Yuwanita, R., Buwono, N.R., & Putra, H.F.E. (2018). Pengaruh *Dunaliella salina* Terhadap Polimorfonuklear Leukosit Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2), 124-130.