

**PENGUNAAN EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA *Gynura procumbens*  
(Lour) Merr. UNTUK PENGOBATAN INFEKSI *Vibrio alginolyticus* PADA  
IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)**

SKRIPSI

Oleh

NOVI SANTIKA



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

## ABSTRACT

### UTILIZATION OF SAMBUNG NYAWA LEAF EXTRACTS *Gynura procumbens* (Lour) Merr. FOR TREATMENT OF *Vibrio alginolyticus* IN TIGER GROUPEL (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)

By

Novi Santika

Tiger Grouper is one of the sea water fish commodities that is quite popular with the community and has a high economic value. The problem faced by farmers is the attack of *Vibriosis*, one of which is caused by the *Vibrio alginolyticus* bacteria. The Utilization of synthetic antibiotics has been widely used but has many adverse effects, so it needs new alternatives for the treatment of *Vibriosis* disease. One of them is by using the sambung nyawa leaf extract. Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) sustaining plants contain secondary metabolites such as flavonoids, tannins, and antibacterial saponins. This study aims to determine the best dosage of sambung nyawa leaf extract for the treatment of *Vibriosis* disease in tiger grouper. The study was conducted in two stages, namely *in vitro* and *in vivo*. Before the fish were treated with feed that had been given a sambung nyawa leaf extract, the fish were challenged using *Vibrio alginolyticus* with a density of  $10^8$  CFU / mL as much as 0.1 mL / head and then fed with treatment and maintained for 21 days. The results of the *in vitro* study showed that the life of sambung nyawa leaf extract at a dose of 700 ppm had a broad inhibitory effect on *V. alginolyticus*, which amounted to 10.47 mm compared to other treatments. Whereas when continued for *in vivo* testing, a dose of 350 ppm in general has been applied for the treatment of attacks of *Vibrio alginolyticus* in tiger grouper.

**Keyword** :Sambung Nyawa Leaf, Treatment, *Vibriosis*

## ABSTRAK

### **PENGUNAAN EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA *Gynura procumbens* (Lour) Merr. UNTUK PENGobatan INFEKSI *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal,1775)**

Oleh

**Novi Santika**

Ikan Kerapu Macan merupakan salah satu komoditas ikan air laut yang cukup digemari oleh masyarakat dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Masalah yang dihadapi oleh petani adalah adanya serangan penyakit *Vibriosis* salah satunya disebabkan oleh bakteri *Vibrio alginolyticus*. Penggunaan antibiotik sintetik telah banyak digunakan tetapi menimbulkan banyak dampak buruk, sehingga perlu alternatif baru untuk pengobatan penyakit *Vibriosis*. Salah satunya yaitu dengan penggunaan ekstrak daun sambung nyawa. Tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*) mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tannin, dan saponin yang bersifat antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dosis terbaik dari ekstrak daun sambung nyawa untuk pengobatan penyakit *Vibriosis* pada ikan kerapu macan. Penelitian dilakukan secara dua tahap yaitu secara *in vitro* dan *in vivo*. Sebelum ikan diberi perlakuan pakan yang telah diberi ekstrak daun sambung nyawa, ikan di uji tantang dengan menggunakan bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan kepadatan  $10^8$  CFU/mL sebanyak 0,1 mL/ekor kemudian diberi pakan perlakuan dan dipelihara selama 21 hari. Hasil penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa pada dosis 700 ppm mempunyai daya hambat yang luas terhadap *V. alginolyticus*, yaitu sebesar 10,47 mm dibandingkan perlakuan lain. Sedangkan pada saat dilanjutkan untuk uji *in vivo*, dosis 350 ppm secara umum sudah dapat diaplikasikan untuk pengobatan serangan *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu macan.

**Kata Kunci :Daun Sambung Nyawa, Pengobatan, Vibriosis**

**PENGGUNAAN EKSTRAK DAUN SAMBUNG NYAWA *Gynura procumbens*  
(Lour) Merr. UNTUK PENGOBATAN INFEKSI *Vibrio alginolyticus* PADA  
IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal,1775)**

**Oleh**

**Novi Santika**

**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 Proposal : Penggunaan Ekstrak Daun Sambung Nyawa  
*Gynura Procumbens* (Lour) Merr. Untuk  
Pengobatan Infeksi *Vibrio alginolyticus* Pada  
Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus*  
*Fuscoguttatus* Forsskal, 1775)

Nama Mahasiswa : Novi Santika

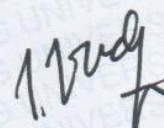
No. Pokok Mahasiswa : 1514111005

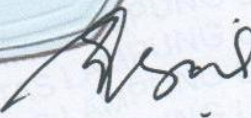
Program Studi : Budidaya Perairan

Jurusan : Perikanan dan Kelautan

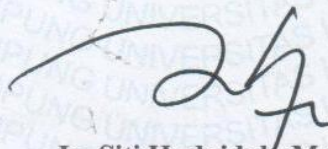
Fakultas : Pertanian



  
**Wardiyanto, S.Pi., M.P.**  
NIP. 196907052001121001

  
**Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc.**  
NIP. 197911182002122001

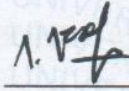
2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

  
**Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.**  
NIP. 196402151996032001

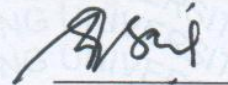
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

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



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



**Penguji**

**Bukan Pembimbing : Henni Wijayanti M., S.Pi., M.Si.**



**Dekan Fakultas Pertanian**



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

**NID. 19611020 198603 1 002**



**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 5 April 2019**

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis saya, Skripsi ini adalah hasil asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana), 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 dipublikasi orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam 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, 30 April 2019  
Yang Membuat Pernyataan



Novi Santika  
NPM. 1514111005

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Gisting pada tanggal 20 September 1997 sebagai anak ke-7, dari tujuh bersaudara dari pasangan bapak Sayat dan Ibu Mikem. Penulis menyelesaikan pendidikan di SD Negeri 3 Simpangkanan pada tahun 2009, SMP Negeri 1 Sumberejo pada tahun 2012, dan SMA Negeri 1 Sumberejo pada tahun 2015. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2015 melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri) dan menerima beasiswa bidikmisi selama delapan semester.

Selama menjadi mahasiswi, penulis pernah mengemban amanah di UKMF FOSI Fakultas Pertanian Periode 2016-2017, dan menjadi anggota aktif Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung (HIMAPIK) Bidang Kerohanian 2016-2017 dan 2017-2018. Selain itu, penulis pernah menjadi asisten dosen pada beberapa mata kuliah (Ikhtiologi, Mikrobiologi Akuatik, Bioteknologi Akuakultur, Imunologi Ikan dan Manajemen Kesehatan Ikan). Pada tahun 2018 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik Periode 1 selama 40 hari di Desa Gunung Mekar, Kecamatan Jabung, Kabupaten Lampung Timur pada bulan Januari-Maret. Pada Bulan Juli-Agustus 2018 penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro Dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian Dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong selama 40 hari dengan judul “**Identifikasi Bakteri *Vibrio Alginolyticus* Pada Budidaya Ikan Nila Salina Di Indramayu, Pekalongan Dan Balongan**”



Pada tahun 2008, penulis lolos dalam seleksi PKM-PE, sebagai anggota yang didanai oleh dikti untuk tahun 2018 dengan judul “MANTRA HANTUKERANG”

Pemanfaatan Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynuraprocumbens*) Untuk Ketahanan Tubuh Ikan Kerapu Macan(*Epinephelus fuscoguttatus*) Terhadap Serangan *Vibrio alginolyticus*. Pada tahun yang sama penulis melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tugas akhirnya dalam bentuk skripsi yang berjudul **“Pemanfaatan Ekstrak Daun Sambung Nyawa *Gynura procumbens* (Lour) Merr. Untuk Pengobatan Penyakit *Vibriosis* Pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775)”** di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

## PERSEMBAHAN

*Sebuah karya yang ku persembahkan untuk kedua  
orangtuaku...*

Terimakasih untuk Do'a, kerja keras, dukungannya, dan  
cinta Kasih selama ini...

*Semua keluargaku yang telah memberikan semangat serta  
dukungan*

*Teman-teman yang menjadi penyemangat dalam perjalananku  
meraih gelar sarjana*

*Untuk Almamater Kebanggaanku  
Universitas Lampung*

## MOTTO

Sungguh Akan Kamu Jalani Tingkat Demi Tingkat Dalam Kehidupan  
(QS. Al-Insyiqaq 84:19)

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan  
kesanggupannya  
(QS. Al-Baqarah : 286)

Jika kamu menginginkan suatu perkara maka pelan-pelanlah  
(tenanglah) hingga Allah akan menunjukkan padamu jalan keluarnya  
(HR. Bukhori)

Jadilah seperti karang di lautan yang tetap kokoh diterjang ombak,  
walaupun demikian air laut tetap masuk kedalam pori-porinya, Iringi  
dengan Sabar dan Semangat Tanpa Batas (Novi Santika)

## SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmat karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pemanfaatan Ekstrak Daun Sambung Nyawa *Gynura procumbens* (Lour) Merr. Untuk Pengobatan Penyakit *Vibriosis* Pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775)” yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW sebagai panuta bagi kita semua.

Dalam kesempatan ini mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof.Dr.Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Kedua orang tuadan keluarga besar yang selalu memberi semangat, keceriaan, dukungan dan doa.
3. Ibu Ir. Siti Hudaidah, M.Sc. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
4. Bapak Wardiyanto, S.Pi., M.P selaku dosen Pembimbing Utama, atas masukan dan motivasi sehingga skripsi ini menjadi semakin baik.

5. Ibu Esti Harpeni, S.T., M.App.Sc., selaku dosen Pembimbing Kedua yang telah membimbing dengan penuh keuletan dan kesabaran dari awal hingga selesainya skripsi ini serta telah memberikan motivasi yang besar.
6. Ibu Henni Wijayanti M., S.Pi., M.Si., selaku dosen Pembahas yang memberikan saran dan masukan yang membangun.
7. Bapak Suparmono, S.Pi., M.T.A., selaku dosen Pembimbing Akademik atas bimbingan, saran dan semangat yang diberikan.
8. Seluruh dosen dan staf serta karyawan Program Studi Budidaya Perairan Universitas Lampung.
9. Seluruh staf karyawan Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.
10. Teman seperjuangan yaitu Etika Oktaviani (Partner Penelitian) dan Endayani (Teman spesial berbagi cerita) terimakasih karena sudah selalu ada dalam keadaan apapun.
11. Teman-teman kos yaitu Desti, Susi, Galuh, dan Ilda.
12. Teman-teman seperjuangan angkatan 2015 yaitu, Asep Aisyidiqqa Marta, Yuke, Nindi, Nurlia, Puspa, Sakinah, Berry, Tiwi, Ellen, Anggun, Risa, Santrika, Rara, Memer, Yosiva, Ajeng, Eka, Nadila, Bela, Falqi, Bayu, Dwi, Riana, Triga, Sevia, Toto, Azkha, iqlima, putrid, jupen, anggraini, dan Rafif terimakasih atas semua canda, tawa, dan duka bersama, tetaplah berkarya.
13. Teman-teman FOSI FP yaitu Utri, Neni, Eka, Linda, Raka, Masnur, Haitomi, Karvin, Apip, Khusma, dan Adi.
14. Kakak-kakakku Asep Arahman, Bang Triando, Bang Helpo, Mba Dian, Mba Fitri, dan Mba Farida, terimakasih sudah banyak berkontribusi dalam penelitian.

15. Teman-teman KKN Desa Gunung Mekar (Mba Yuana, Bang Tareh, Riza, Dessy dan nday).
16. 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, 30 April 2019

Novi Santika

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xvii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xviii
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	3
B. Tujuan Penelitian . .....	3
C. Manfaat Penelitian .....	3
D. Kerangka Pikir .....	3
E. Hipotesis .....	6
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
A. Ikan Kerapu Macan ( <i>Epinephelus Fuscoguttatus</i> ).....	7
B. Potensi Daun Sambung Nyawa Sebagai Fitofarmaka .....	9
C. Ekstraksi.....	10
D. Penyakit Vibriosis dan Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	12
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	14
A. Waktu dan Tempat penelitian .....	14
B. Alat dan Bahan.....	14
C. Prosedur Penelitian .....	15

D. Pelaksanaan Penelitian.....	16
E. Analisis Data.....	28
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>29</b>
<b>A. Hasil Uji <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
1.Uji Fitokimia.....	29
2.Uji Zona Hambat.....	31
3.Uji MIC.....	34
4.Uji Toksisitas .....	36
<b>B. Hasil Uji <i>In Vivo</i> .....</b>	<b>37</b>
1.Gejala Klinis .....	37
2. <i>Survival Rate</i> (SR) dan <i>Relative Percent Survival</i> (RPS).....	39
3.Sel Darah Putih (Leukosit).....	40
4.Hematokrit .....	47
5.Histopatologi.....	49
6.Kualitas Air.....	59
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>61</b>
A. Kesimpulan .....	61
B. Saran .....	61
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>71</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Pemikiran Penelitian.....	5
2. Ikan Kerapu Macan ( <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> ).....	8
3. Hasil Uji Zona Hambat .....	33
4. Total Leukosit .....	42
5. Persentase Limfosit .....	43
6. Persentase Monosit .....	45
7. Persentase Neutrofil .....	46
8. Persentase Hematokrit .....	48
9. Profil Histopatologi Hati.....	51
10. Profil Histopatologi Insang.....	54
11. Profil Histopatologi Usus.....	56
12. Profil Histopatologi Limpa .....	58

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jenis Pelarut dan Sifat Fisiknya .....	11
2. Hasil Uji Kualitatif Fitokima .....	29
3. Hasil Uji Zona Hambat .....	32
4. Hasil Pengamatan Uji MIC .....	34
5. Hasil Uji Toksisitas .....	36
6. Gejala Klinis .....	38
7. <i>Survival Rate</i> (SR) dan <i>Relative Percent Survival</i> (RPS).....	40
8. Kualitas Air .....	59

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Ekstraksi Daun Sambung Nyawa.....	71
2. Uji Fitokimia.....	72
3. Uji Zona Hambat.....	73
4. Uji MIC.....	74
5. Uji BSLT.....	75
6. Uji Hematologi.....	76
7. Pembuatan Media NA.....	77
8. PembuatanMedia NB.....	78
9. PembuatanMedia TCBS.....	79
10. Perhitungan LC <sub>50</sub> .....	80
11. Uji Statistik Zona Hambat.....	81
12. Uji Statistik Hematokrit.....	82
13. Uji Statistik Leukosit.....	83
14. Pembuatan Larutan Hayem.....	84
15. Pembuatan Larutan Turk.....	85
16. . Pembuatan Larutan Giemsa.....	86

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Ikan kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775) merupakan salah satu spesies kerapu yang termasuk dalam komoditas ekonomis penting dan unggulan Indonesia. Permintaan kerapu macan sebagai bahan konsumsi akhir-akhir ini semakin meningkat. Komoditi tersebut dipasarkan dalam bentuk segar maupun dalam kemasan dengan penjualan hingga mencapai skala internasional. Hal ini menunjukkan ikan kerapu semakin dibutuhkan oleh pasar. Selain memiliki nilai ekonomis tinggi, ikan kerapu macan memiliki beberapa keunggulan diantaranya nilai gizi yang tinggi dan pertumbuhan yang lebih cepat daripada ikan kerapu jenis lain.

Salah satu kendala utama yang dihadapi dalam budidaya ikan kerapu di Indonesia adalah tingginya tingkat kematian terutama pada benih yang dapat mencapai 100% (Aonullah *et al.*, 2013). Salah satu penyakit yang sering menyerang benih ikan kerapu macan di KJA adalah penyakit bakterial yaitu vibriosis yang disebabkan bakteri *Vibrio* sp. (Rahayu, 2009). Penelitian yang dilakukan Herfiani (2013) ditemukan jenis *Vibrio* sp. yang banyak menyerang kerapu macan adalah *Vibrio alginolyticus*. Bakteri golongan vibrio diketahui sebagai bakteri oportunistik dan merupakan bakteri yang sangat ganas dan berbahaya pada budidaya ikan kerapu karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder, untuk

melakukan invasi jaringan pada tubuh ikan dengan membentuk kolonisasi dan perkembangbiakan hingga mencapai *quorum sensing* dan menjadi patogen untuk menyerang sistem imun non spesifik seperti sisik dan kulit ikan sehingga dapat masuk ke dalam jaringan tubuh dan menyerang sistem imun spesifiknya sehingga membuat ikan menjadi sakit (Todar, 2002).

Penyakit *Vibriosis* biasanya dapat diatasi dengan menggunakan antibiotik sintetis, tetapi antibiotik tersebut mempunyai dampak negatif pada lingkungan, meningkatnya bakteri yang resisten, dan terjadinya bioakumulasi residu antibiotik sintetis pada daging hewan laut yang dibudidayakan (Isnansetyo *et al.*, 2009). Residu antibiotik dapat menimbulkan toksisitas, reaksi alergi dan memicu perkembangan resistensi dari bakteri patogen (Cabello, 2006). Selain itu, Sumayani (2008) menambahkan bahwa penambahan antibiotik yang tidak terkontrol dan secara berkelanjutan dapat menyebabkan residu antibiotik pada produk perikanan yang dapat berdampak buruk bagi manusia. Oleh sebab itu, perlu adanya alternatif lain untuk penanggulangan penyakit bakterial pada ikan yang aman dan ramah lingkungan seperti penggunaan fitofarmaka.

Fitofarmaka adalah sediaan obat yang telah jelas keamanan dan khasiatnya, bahan bakunya terdiri atas simplisia atau sediaan galenik yang telah memenuhi persyaratan yang berlaku, sehingga sediaan tersebut terjamin keseragaman komponen aktif, keamanan dan khasiatnya. Salah satu jenis tanaman yang berpotensi sebagai fitofarmaka yaitu tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*). Tanaman ini sangat mudah ditemui di wilayah Lampung dan juga mudah untuk ditanam. Fadli (2015) melaporkan bahwa tanaman tersebut terbukti mengandung flavonoid, sterol

tak jenuh, triterpenoid, polifenol, saponin, steroid, asam klorogenat, asam kafeat, asam vanilat, asam para kumarat, asam para hidroksi benzoat, dan minyak atsiri. Minyak atsiri dan flavonoid akhir-akhir ini menarik perhatian, hal ini 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 adalah untuk menentukan dosis terbaik dari ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) untuk pengobatan penyakit *vibriosis* pada ikan kerapu macan.

### **C. Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini yaitu untuk memberikan informasi ilmiah kepada mahasiswa dan pembudidaya ikan dalam mengobati serangan bakteri patogen *Vibrio alginolyticus* dengan aplikasi pemberian ekstrak daun sambung nyawa melalui pakan.

### **D. Kerangka Pikir**

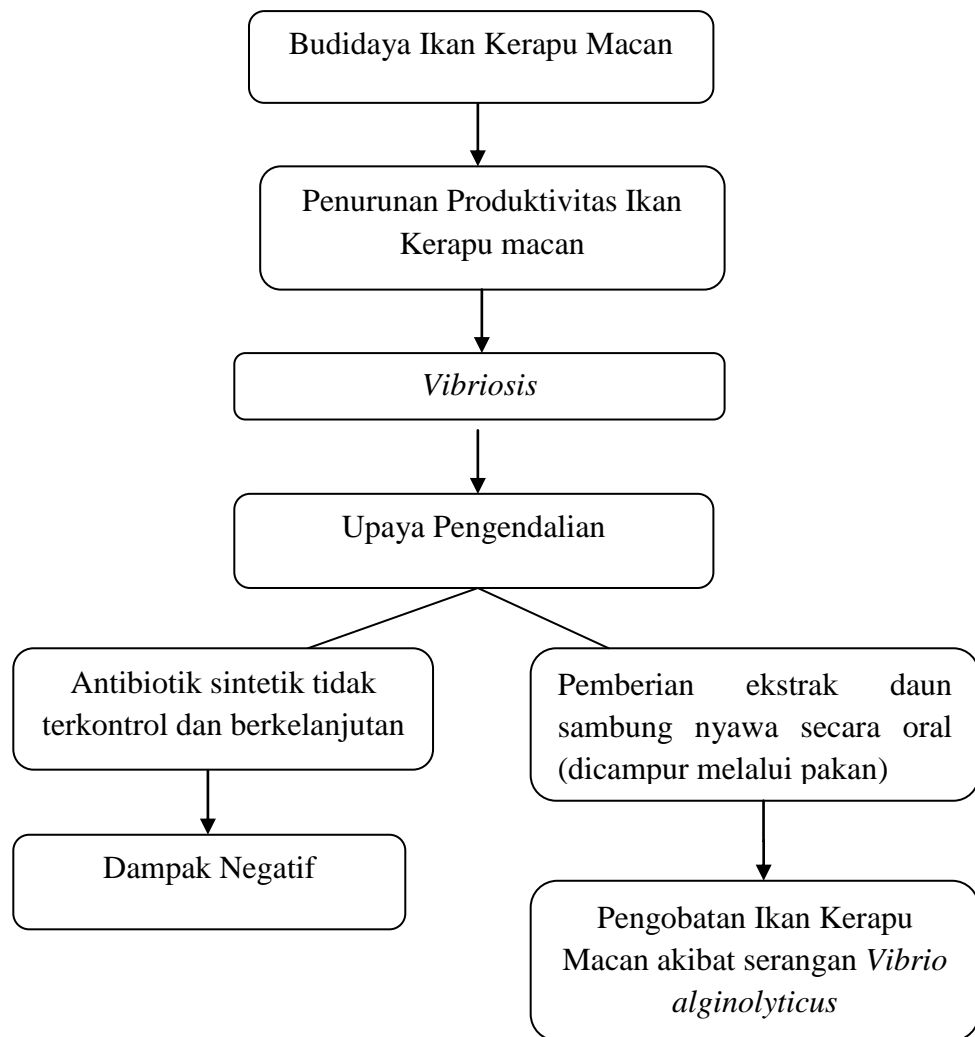
Ikan kerapu macan merupakan salah satu komoditas perikanan yang bernilai ekonomi penting, namun dalam budidaya sering mengalami kendala seperti adanya serangan penyakit. Penyakit merupakan salah satu faktor pembatas dalam budidaya ikan kerapu macan. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen pada ikan budidaya dapat meningkatkan angka mortalitas ikan. Salah satu hal yang perlu dilakukan dalam meningkatkan hasil produksi budidaya ikan adalah dengan cara mengatasi kendala-kendala yang dapat menghambat kelancaran proses

produksi budidaya, diantaranya dengan mengatasi serangan-serangan virus atau bakteri yang dapat mengganggu proses pertumbuhan dan perkembangan organisme yang dibudidayakan.

Keberadaan bakteri patogen dalam proses budidaya ikan dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar. Bakteri patogen utama yang sering menyerang udang maupun ikan terutama ikan kerapu macan adalah bakteri *Vibrio* sp. (Rinawati, 2011). Selama ini usaha pengendalian *vibriosis* pada kegiatan budidaya ikan kerapu masih mengandalkan pada penggunaan obat-obatan atau antibiotik sintetis. Penggunaan antibiotik sintetis secara berkelanjutan dan tak terkontrol akan dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap obat-obatan tersebut. Oleh sebab itu, perlu adanya alternatif lain untuk pencegahan dan atau penanggulangan penyakit bakterial pada ikan yang aman dan ramah lingkungan seperti penggunaan fitofarmaka. Fitofarmaka adalah sediaan obat yang telah jelas keamanan dan khasiatnya, bahan bakunya terdiri atas simplisia atau sediaan galenik yang telah memenuhi persyaratan yang berlaku, sehingga sediaan tersebut terjamin keseragaman komponen aktif, keamanan dan khasiatnya (Raj *et. al.*, 2012).

Salah satu jenis tanaman yang berpotensi sebagai fitofarmaka yaitu tanaman sambung nyawa. Tanaman sambung nyawa sangat mudah ditemui di wilayah Lampung dan juga mudah untuk ditanam. Fadli (2015) melaporkan bahwa tanaman sambung nyawa terbukti mengandung flavonoid, sterol tak jenuh, triterpenoid, polifenol, saponin, steroid, asam klorogenat, asam kafeat, asam vanilat, asam para kumarat, asam para hidroksi benzoat, dan minyak atsiri. Minyak atsiri dan flavonoid akhir-akhir ini menarik perhatian, hal ini disebabkan

karena sifatnya sebagai antibakteri dan antijamur sehingga dapat dipergunakan sebagai antibiotik atau obat alami (fitofarmaka) yang aman dan ramah lingkungan. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut dalam pemanfaatan ekstrak daun sambung nyawa sebagai antibakteri untuk pengobatan penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan.



Gambar 1. Kerangka Pemikiran Penelitian



## E. Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

H<sub>0</sub> : Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak daun sambung nyawa untuk pengobatan penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terhadap parameter gejala klinis, SR (*Survival Rate*), RPS (*Relative Percent Survival*), parameter hematologi, dan histopatologi.

H<sub>1</sub>: Ada pengaruh pemberian ekstrak daun sambung nyawa untuk pengobatan penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terhadap parameter gejala klinis, SR (*Survival Rate*), RPS (*Relative Percent Survival*), parameter hematologi, dan histopatologi

## II. TINJAUAN PUSTAKA

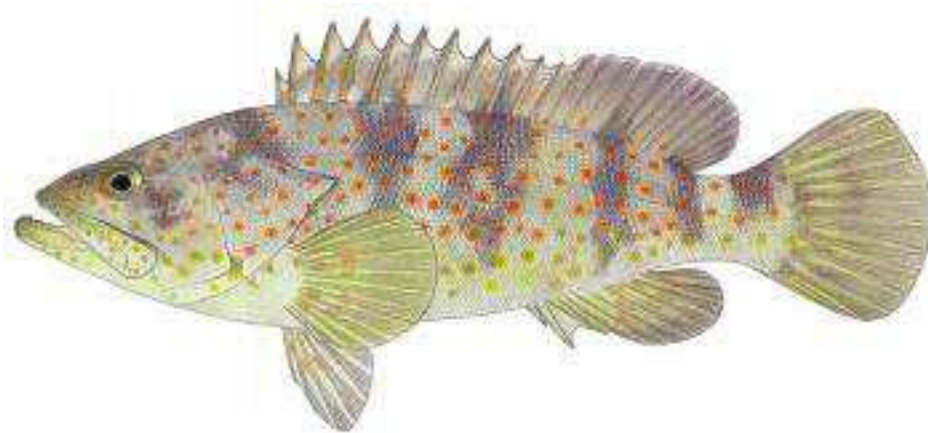
### A. Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

#### 1. Klasifikasi Kerapu Macan

Menurut Sutrisna (2011) ikan kerapu macan digolongkan pada :

Kelas	: Chondrichthyes
Subkelas	: Ellasmobranchii
Ordo	: Percomorphi
Divisi	: Perciformes
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Epinephelus</i>
Spesies	: <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>

Ciri-ciri morfologi ikan kerapu macan antara lain bentuk tubuh pipih, yaitu lebar tubuh lebih kecil dari pada panjang dan tinggi tubuh, rahang atas dan bawah dilengkapi dengan gigi yang lancip dan kuat, mulut lebar, serong ke atas dengan bibir bawah yang sedikit menonjol melebihi bibir atas, sirip ekor berbentuk bundar, sirip punggung, posisi sirip perut berada di bawah sirip dada, serta badan ditutupi sirip kecil yang bersisik stenoid (Gambar 2). Ikan kerapu macan merupakan salah satu jenis ikan laut yang hidup di perairan dalam maupun payau yang bersalinitas 20-35 ppt (Mariskha&Abdulgani, 2012).



Gambar 2. Ikan Kerapu Macan

## 2. Habitat Ikan Kerapu Macan

Habitat benih ikan kerapu macan adalah pantai yang banyak ditumbuhi algae jenis *reticulata* dan *Gracilaria* sp. Ikan kerapu macan pada fase dewasa hidup di perairan yang lebih dalam dengan dasar terdiri dari pasir berlumpur. Ikan kerapu termasuk jenis 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 jenis-jenis (tembang, teri, dan belanak) (Effendi, 2000).

Ikan Kerapu Macan tersebar luas dari wilayah Asia Pasifik termasuk Laut Merah, tetapi lebih dikenal berasal dari Teluk Persi, Hawaii atau Polynesia. Ikan ini juga terdapat di semua perairan pulau tropis Hindia dan Samudra Pasifik Barat dari pantai Timur Afrika sampai dengan Mozambika. Ikan ini dilaporkan banyak ditemukan di Madagaskar, India, Thailand, Indonesia, pantai tropis Australia, Jepang, Philipina, Papua Nugini, dan Kaledonia Baru. Sedangkan di perairan

Indonesia kerapu macan banyak ditemukan di perairan Sumatera, Jawa, Sulawesi, dan pulau Buru (Evalawati *et al.*, 2001).

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

Daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) yang memiliki nama lain daun dewa merupakan tanaman obat yang banyak dimanfaatkan karena banyak khasiatnya antara lain untuk menurunkan kadar gula dalam darah, obat kulit, menyembuhkan migrain, hepatitis, dan anti tumor atau anti kanker. Selain itu air perasan daun dewa dapat digunakan sebagai penurun panas dan menghilangkan bengkak-bengkak. Secara tradisional daun sambung nyawa telah banyak digunakan sebagai obat anti kanker (Nirwan (2007)). (Syukur (2001) mengemukakan bahwa daerah pertumbuhan daun sambung nyawa tersebar mulaidataran 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 menghendaki 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.

Daun sambung nyawa berpotensi dapat menjadi antimikrobal karena memiliki kandungan flavonoid dan minyak atsiri. 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 (2011) melaporkan bahwa daun sambung nyawa mengandung 67,094 µg/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 antimikroba dan antivirus, sehingga tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional. Aryanti (2007) melaporkan hasil penelitiannya bahwa flavonoid ekstrak daun sambung nyawa umur panen empat bulan lebih aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* daripada *E.coli* dan *S.typhimurium*.

### **C. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses untuk menghasilkan sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku ekstrak yang telah ditetapkan (Erliza, 2006).

Tujuan ekstraksi adalah memisahkan bahan padat dan bahan cair suatu zat dengan bantuan pelarut. Ekstraksi dapat memisahkan campuran senyawa dengan berbagai sifat kimia yang berbeda. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi bahan

alam umumnya dilakukan untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi adalah tipe persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, suhu pelarut, dan tipe pelarut (Tohir, 2010). Prinsip pemilihan pelarut adalah *like dissolve like*, artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non-polar akan melarutkan senyawa non-polar (Achmadi, 1992). Beberapa jenis pelarut dan sifat fisiknya disajikan dalam (Tabel 1).

Tabel 1. Beberapa Jenis Pelarut dan Sifat Fisiknya

Pelarut	Titik Didih (°C)	Titik Beku (°C)	Konstanta Dielektrik
Heksana	68	-94	1,8
Dietil eter	35	-116	4,3
Kloroform	61	-64	4,8
Etil asetat	77	-84	6,0
Aseton	56	-95	20,7
Etanol	78	-117	24,3
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2

Sumber : Nur&Adijuwana, 1989

Proses ekstraksi terdiri dari beberapa tahap, yaitu penghancuran bahan, penimbangan, perendaman dengan pelarut, penyaringan, dan tahap pemisahan. Penghancuran bertujuan agar dapat mempermudah pengadukan dan kontak bahan

dengan pelarutnya pada saat proses perendaman. Kemudian bahan ditimbang untuk mengetahui berat awal bahan sehingga dapat menentukan rendaman yang dihasilkan.

Bahan yang telah ditimbang kemudian direndam dalam pelarut, seperti heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan metanol (polar). Proses perendaman ini disebut dengan maserasi. Tahap selanjutnya, yaitu tahap pemisahan yang terdiri dari penyaringan dan evaporasi. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan sampel dengan pelarut yang telah mengandung bahan aktif. Untuk memisahkan pelarut dengan senyawa bioaktif yang terikat dilakukan evaporasi, sehingga pelarutnya akan menguap dan diperoleh senyawa hasil ekstraksi yang dihasilkan (Khopkar, 2003).

#### **D. Penyakit *Vibriosis* dan Bakteri *Vibrio alginolyticus***

Salah satu kendala utama yang dihadapi dalam budidaya ikan kerapu di Indonesia adalah tingginya tingkat kematian terutama pada benih yang dapat mencapai 100% (Aonullah *et. al.*, 2013). Penyakit vibriosis pada ikan kerapu diketahui sebagai salah satu penyebab rendahnya kelangsungan hidup baik pada usaha pembenihan maupun pembesaran ikan kerapu macan (Murdjani, 2002). Bakteri *Vibrio alginolyticus* diketahui sebagai penyebab kematian pada ikan laut hingga mencapai 80-90% (Kasonchandra, 1999).

Salah satu jenis bakteri yang sering ditemukan pada budidaya ikan kerapu macan yaitu jenis *Vibrio alginolyticus*. Bakteri ini merupakan jenis bakteri yang paling patogen pada ikan dibandingkan jenis bakteri lainnya. Gejala klinis yang tampak pada ikan terinfeksi *Vibrio alginolyticus* yaitu gerakan ikan yang melemah,

berenang di tepi bak, malas atau jarang bergerak dan kemerahan pada bagian tubuhnya. *Vibrio* juga termasuk bakteri yang bersifat *halofil*, yaitu tumbuh dengan rentang toleransi salinitas 5-80 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 20-40 ppt (Taslihan, 1992). Parameter fisika dan kimia kualitas air yang tidak baik menjadi penyebab melimpahnya jumlah bakteri *Vibrio* sp. pada air budidaya ikan kerapu macan. Johnny *et al.*, (2002) melaporkan kejadian penyakit infeksi bakteri *V. alginolyticus* pada ikan laut budidaya, yaitu ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*). Bakteri *Vibrio alginolyticus* tergolong oportunistis dimana akan menjadi patogen apabila kondisi ikan tidak optimal misalnya stres karena kualitas air dan pakan tidak bagus. Interaksi yang tidak serasi ini menyebabkan mekanisme pertahanan diri yang dimiliki menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit.



### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-November 2018 bertempat di Laboratorium Budidaya Perairan Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Lampung dan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung, Desa Hanura, Kecamatan Padang Cermin, Kabupaten Pesawaran.

#### B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain bak pemeliharaan 4 buah (4 perlakuan), pipa paralon, aerator, selang aerasi, batu aerasi, timbangan digital, autoklaf, pipet tetes, alat bedah, sarung tangan, masker, spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml, tabung eppendorf, *vacuum evaporator* (Heidolph), *haemocytometer*, kaca penutup, mikroskop, gelas objek, tabung hematokrit dengan heparin, cawan petri 150 × 15 ml (Normax), tabung reaksi 5 ml (Iwaki glass), *hotplate* (Stuart CB16), *spreader*, *sentrifuge*, mikropipet, *yellow tip*, *mikrotube* (1,5 ml), plastik tahan panas, erlenmeyer 500 ml dan 250 ml (Pyrex), aluminium foil, kertas label, kertas cakram, saringan, *Laminary flow*, *cassette embedding*, *water bath*, *staining jar*, corong, pH meter, DO meter, Termometer suhu, *Cuvet*, spektrofotometer, refraktometer, gelas ukur, lampu bunsen, dan jarum ose, alat bedah, spuit, tabung EDTA, *hand counter*.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu macan, *Nutrien Agar* (NA), media *Nutrien Broth* (NB), media *Thiosulfate Citrat Bile Salts Sucrose* (TCBS) *Agar*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), isolat murni bakteri *Vibrio alginolyticus*, ekstrak daun sambung nyawa, larutan EDTA 10%, larutan anastesi, sampel darah ikan, insang, hati, limpa, saluran pencernaan, Giemsa, larutan Turk's, larutan Hayem, methanol, alkohol, xylol, parafin, larutan fiksatif, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%), xylol (1, 2, dan 3), paraffin, hematoksin, BNF (*Buffer Netral Formalin*), alkohol 70%, auksin, akuades, eosin, dan entellan.

### **C. Prosedur Penelitian**

#### **a. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental RAL (Rancangan Acak Lengkap) yang terdiri atas 4 perlakuan dengan individu sebagai ulangan. Penambahan ekstrak daun sambung nyawa dilakukan secara oral sedangkan penentuan dosis ekstrak daun sambung nyawa pada pakan mengacu pada hasil uji *in vitro*. Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu macan berukuran 15 cm dengan berat rata-rata 40 gram sebanyak 20 ekor setiap bak pemeliharaan. Uji tantang pada ikan uji dilakukan di awal pemeliharaan dengan kepadatan bakteri *Vibrio alginolyticus* yang digunakan yaitu  $10^8$  CFU/mL sebanyak 0,1 mL/ekor secara intramuskular (dengan konsentrasi yang digunakan mengacu pada Sarjito *et al.* (2007)). Pemberian pakan dilakukan setelah uji tantang dan pemeliharaan hewan uji dilakukan hingga hari ke-21 dengan pemberian pakan yang sama sesuai dosis perlakuan.

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

A: Tanpa diberi perlakuan ekstrak daun sambung nyawa dan di uji tantang dengan

*Vibrio alginolyticus*

B: Diberi perlakuan $\frac{1}{2}$  dosis terbaik ekstrak daun sambung nyawa dan di uji

tantang dengan *Vibrio alginolyticus*

C: Diberi perlakuan dosis terbaik ekstrak daun sambung nyawa dan di uji tantang

dengan *Vibrio alginolyticus*

D: Diberi perlakuan  $2\times$  dosis terbaik ekstrak daun sambung nyawa dan di uji

tantang dengan *Vibrio alginolyticus*

#### **b. Parameter yang diamati**

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini meliputi pengamatan hematologi (kadar hematokrit, total leukosit, dan diferensial leukosit), *survival rate* (SR), *relative percent survival* (RPS ), sedangkan parameter penunjang yang diamati adalah gejala klinis, kualitas air pemeliharaan, dan pengamatan histologi.

### **D. Pelaksanaan Penelitian**

#### **1. Tahap Persiapan**

##### **a. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Sterilisasi merupakan usaha yang dilakukan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroorganisme kontaminan, dilakukan dengan cara mencuci alat dan bahan yang akan digunakan sampai bersih, ditunggu sampai kering dan dibungkus dengan menggunakan kertas kopi, hal ini bertujuan untuk mencegah alat-alat terkena air, selanjutnya masukkan alat-alat tersebut ke dalam autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

## **b. Pembuatan Ekstrak**

Ekstraksi adalah proses penarikan suatu senyawa metabolit sekunder dengan bantuan suatu pelarut. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada tekstur, kandungan air, dan jenis senyawa kimia yang diisolasi dari suatu tumbuhan, sehingga senyawa yang diekstraksi dapat tertarik sempurna tanpa mengalami perubahan sifat dan strukturnya. Ekstraksi tumbuhan dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Harborne, 1987). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan metode maserasi karena metode tersebut merupakan salah satu metode umum dalam proses ekstraksi bahan alam, selain itu metode maserasi lebih sederhana dan mudah dilakukan. Tahapan proses ekstraksi dalam penelitian ini, yaitu ekstraksi daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 300 gr serbuk daun sambung nyawa yang diperoleh direndam dalam methanol 95% sebanyak 3000 mL (perbandingan 1:10 w/v) sesuai dengan penelitian (Riadini, 2015) selama 72 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 75 rpm hingga diperoleh ekstrak kental berupa pasta. Proses ekstraksi ini dilakukan di Laboratorium Mutu Hasil Pertanian Universitas Lampung.

## **c. Uji Fitokimia**

Pada penelitian ini, parameter uji fitokimia yang akan dilakukan yaitu, steroid, terpenoid, tannin, flavonoid dan alkaloid. Sebelum dilakukan uji, ekstrak pasta daun sambung nyawa diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut methanol. Metode yang dilakukan yaitu mengacu pada Tasmin *et. al.* (2014) sebagai berikut:

**1. Terpenoid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 0,5 mL asam asetat glacial dan 0,5 mL  $H_2SO_4$ . Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi merah atau kuning.

**2. Saponin**

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

**3. Tanin**

Sebanyak 1 mL sampel ditambah 3 tetes larutan  $FeCl_3$  10%. Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi hitam kebiruan.

**4. Alkaloid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 5 mL tetes kloroform dan 5 tetes pereaksi Mayer (1 g KI dilarutkan dalam 20 mL aquades, ditambahkan 0,271 g  $HgCl_2$  hingga larut). Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi putihkecoklatan.

**5. 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.

**6. Steroid**

Sebanyak 0,5 mL sampel ditambah 0,5 mL asam asetat glacial dan 0,5 mL  $H_2SO_4$ . Hasil positif jika warna sampel berubah menjadi biru atau ungu.

#### **d. Penyiapan Bakteri Uji**

Bakteri uji yang akan digunakan pada penelitian ini berasal dari Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung, Desa Hanura, Kecamatan Padang Cermin, Kabupaten Pesawaran.

### **2. Tahap Pelaksanaan**

#### **a. Uji In Vitro**

##### **1. Uji Zona Hambat**

Uji zona hambat dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*Diffusion Test*) menggunakan kertas cakram. Sebanyak 100 µl isolat cair *Vibrio alginolyticus* dengan kepadatan  $10^8$  CFU/mL ditetaskan pada media TSA lalu diratakan menggunakan *spreader*. Kertas cakram diletakkan pada permukaan media TSA, kemudian sebanyak 25 µl ekstrak daun sambung nyawa yang telah disiapkan sesuai dosis perlakuan (500, 600, 700, 800, 900, 1000, dan 1500 ppm ) ditetaskan pada permukaan kertas cakram menggunakan mikropipet. Kontrol positif dilakukan dengan memberikan kertas cakram berisi antibiotik *oxytetracycline*, sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram netral (Hanya diberi akuades). Lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi, kemudian diamati dan diukur diameter zona hambat ekstrak daun sambung nyawa terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*.

##### **2. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)**

Uji MIC dilakukan berdasarkan hasil uji zona hambat. Uji MIC bertujuan untuk mencari konsentrasi terendah bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode penentuan MIC langkah awal yang dilakukan yaitu

disiapkan tabung reaksi steril dan dimasukkan 4,5 ml media TSB kedalam masing-masing tabung reaksi. Ekstrak daun sambung nyawa dengan konsentrasi 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 ppm, dan kontrol (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) dimasukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 ml. Kemudian suspensi bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan kepadatan  $10^8$  CFU/mL sebanyak 0,1 ml ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan divortex hingga homogen kemudian dinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam . Pengamatan uji MIC dilakukan secara visual dengan melihat kekeruhan media yang telah diberi ekstrak daun sambung nyawa.

### **3. Uji Toksisitas**

Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Uji BSLT dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* yang berumur 48 jam ke dalam botol yang telah berisi larutan ekstrak dan air laut. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (triplo). Sebagai kontrol adalah air laut yang tidak diberi ekstrak sampel. Botol percobaan disimpan di bawah pencahayaan lampu TL. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah larva artemia yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya (Kaban, 2016). Data pengujian toksisitas diperoleh dari analisis LC50 yang dilakukan dengan analisis regresi menggunakan *MS Office Excel 2007* (untuk sistem operasi Windows) (Arief, 2017).

### **c. Uji In Vivo**

#### **1. Persiapan Wadah dan Ikan Uji**

Wadah yang akan digunakan berupa bak kontainer ( $60 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$ ). Sebelum digunakan bak dibersihkan dan dilakukan disinfeksi menggunakan kaporit kemudian diisi air yang telah diendapkan dan diberi aerasi selama 24 jam. Ikan kerapu macan disiapkan dengan ukuran 15 cm sebanyak 80 ekor kemudian diaklimatisasi dalam wadah uji selama 5 hari. Pengujian ekstrak daun sambung nyawa dilakukan secara oral kepada ikan uji sesuai dosis perlakuan.

#### **2. Persiapan Pakan Uji**

Bahan pakan yang digunakan adalah pakan komersil berbentuk pelet. Pakan tersebut ditimbang untuk masing-masing perlakuan. Ekstrak daun sambung nyawa ditimbang dan diletakkan pada 4 buah botol *spray* (4 perlakuan) dan kemudian dilarutkan dengan akuades hingga merata dan dibuat sesuai dengan dosis perlakuan. Pakan komersil diletakkan dalam suatu wadah dan kemudian ekstrak daun sambung nyawa yang telah tercampur akuades disemprotkan hingga merata. Pakan yang telah disemprot dikering anginkan sampai benar-benar kering, kemudian di simpan dalam toples kering.

#### **3. Uji Kohabitasi**

Patogen yang digunakan sebagai ujiantang pada penelitian ini adalah *Vibrio alginolyticus*. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada media TCBSA (*Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*). Isolat bakteri diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBPBL, Lampung. Uji Kohabitasi bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolat murni bakteri patogen aktif yang selanjutnya



digunakan untuk ujiantang. Pada uji kohabitasi bakteri dilakukan 2 tahap injeksi untuk memperoleh isolat yang mampu membuat ikan sakit. Berikut ini merupakan tahapan uji kohabitasi bakteri patogen yang akan digunakan:

1. isolat murni bakteri *Vibrio alginolyticus* diinokulasi pada media NB.
2. Kemudian diinjeksikan pada 6 ekor ikan stok dengan dosis 0,1 ml/ekor dengan kepadatan  $10^8$ . Ikan uji diamati hingga menunjukkan gejala infeksi oleh bakteri tersebut.
3. Bakteri *V. alginolyticus* diambil dari ikan yang sakit kemudian diinokulasi pada media TCBSA, selanjutnya diinkubasi selama 18-24jam.
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 2 hingga 5 dilakukan sekali lagi hingga bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat digunakan untuk ujiantang.

#### **4. Uji Tantang**

Ujiantang dilakukan pada ikan kerapu macan maupun ikan kontrol diawal pemeliharaan dengan kepadatan bakteri *Vibrio alginolyticus* yang digunakan yaitu  $10^8$  CFU/mL sebanyak 0,1 mL/ekor secara intramuskular dengan konsentrasi yang digunakan mengacu pada Sarjito *et al.* (2007). Pemberian pakan dilakukan setelah ujiantang dan pemeliharaan hewan uji dilakukan hingga hari ke-21 dengan pemberian pakan yang sama sesuai dosis perlakuan.

## 5. Pemberian Pakan dengan Penambahan Ekstrak Daun Sambung Nyawa

Dalam penelitian ini ikan kerapu macan dikelompokkan ke dalam 4 bak perlakuan masing-masing bak berjumlah 20 ekor. Masing-masing perlakuan diberi pakan perlakuan setelah dilakukan ujiantang dengan pemberian pakan yang dicampur ekstrak daun sambung nyawa sebanyak 3 kali sehari, yaitu pukul 07.00; 12.30; dan 16.00 secara *ad libitum* (sampai ikan kenyang) selama 21 hari pemeliharaan.

## 3. Tahap Pengamatan

### a. Gejala Klinis

Gejala klinis pada ikan uji diamati secara umum seperti tingkah laku ikan saat berenang, nafsu makan, dan kondisi tubuh ikan. Parameter ini diamati setiap hari setelah ikan kerapu macan diujiantang bakteri.

### b. *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 :

$$SR \% = \frac{NT}{NO} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Tingkat kelangsungan hidup (%)

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

NO : Jumlah ikan yang hidup pada awal pemeliharaan (ekor)

### c. *Relative percent survival (RPS)*

Kematian ikan dicatat sebelum dan sesudah ujiantang untuk menghitung kelangsungan hidup relatif (RPS). RPS dihitung dengan menggunakan rumus :

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

### d. Pengamatan hematologi

#### 1. 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 anti koagulan dan kertas label (Lestari *et. al.*, 2017).

#### 2. Perhitungan Kadar Hematokrit

Perhitungan kadar hematokrit diukur menurut Samsisko (2013). Pertama, Tabung mikrokapiler 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*.

#### 3. Perhitungan Total Leukosit

Perhitungan jumlah leukosit diukur menurut Pal *et al.*, (2006). 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.

#### **4. 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 dikering anginkan. 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 *et al.*, (2006). Perhitungan kadar hematokrit, total leukosit, menurut Hartika *et al.* (2014) yaitu sebagai berikut :

$$\text{Kadar haematokrit (\%)} = \frac{\text{volume endapan darah}}{\text{volume total darah}}$$

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

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

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

#### e. Histopatologi

Pengamatan histologi ikan kerapu macan ini dilakukan untuk bagian organ dalam seperti insang, hati, limpa, dan saluran pencernaan. Proses pembuatan preparat histopatologi dalam penelitian ini dibuat oleh pihak Balai Veteriner Lampung. Sampel ikan yang digunakan untuk pengujian histopatologi diambil dari setiap perlakuan untuk mengetahui tingkat keparahan infeksi yang dialami ikan *pasca* uji tangkap. Proses pembuatan preparat sediaan histopatologi terdiri dari fiksasi, *dehidrasi*, *clearing*, *embedding*, pemotongan, serta pewarnaan. Berikut adalah langkah-langkah pembuatan sediaan histologi:

##### 1. Fiksasi

Proses pembuatan preparat histologi 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.

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

Setelah Ikan direndam dengan larutan fiksatif, kemudian dilanjutkan dengan *dehidrasi, clearing, dan embedding* dengan urutan sebagai berikut: jaringan 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, xylene (I), xylene (II), xylene (III), parafin (I) direndam dalam oven 60°C selama masing-masing 2 jam. Selanjutnya diblok dengan cara memindahkan jaringan ikan ke dalam cetakan kertas yang telah diisi dengan parafin cair sebelumnya.

## 3. Pemotongan Parafin

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

## 4. Pewarnaan

Preparat jaringan diwarnai dengan menggunakan *hematoxyline* dan *eosin*.

Prosedur pewarnaannya yaitu, potongan jaringan ikan uji dimasukkan kedalam xylene (I) 5 menit, xylene (II) 5 menit, etanol 100 % (I) 1 menit, etanol 100 % (II) 1 menit, etanol 95% (I) 1menit, etanol (II) 1menit, etanol 80% (I) 1menit, etanol 80% (II) 1menit, etanol 50% 1menit, 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, xylene (I) 1 menit, xylene (II) 1 menit, xylene (III) 1 menit. Sedangkan tahap akhir dari pewarnaan tersebut

dilakukan dengan meneteskan entelan (Canada Balsam Sintetis), kemudian ditutup dengan *cover glass*.

#### 5. Pemeriksaan Histopatologi Ikan Uji

Tingkat kerusakan diperoleh dari gambar jaringan yang diambil melalui mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat patogenitas yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio alginolyticus* berdasarkan kerusakan jaringan yang dialami ikan kerapu macan. Gambaran histopatologi yang diamati adalah kerusakan jaringan seperti penumpukan zat besi pada pembuluh darah (hemosiderin), nekrosis, hiperplasia, fusi, peningkatan sel goblet. Hasil uji histopatologi kemudian disajikan dalam bentuk gambar dan dianalisis menggunakan metode deskriptif.

#### f. Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diukur adalah DO (*Dissolved Oxygen*), Salinitas, Ph dan Suhu. Kualitas air diukur di awal dan akhir perlakuan.

#### E. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan aplikasi SPSS IBM 22 dan uji lanjut untuk beda nyata menggunakan uji Duncan. Parameter yang dianalisis statistik secara kuantitatif adalah uji zona hambat, dan parameter hematologi. Sedangkan parameter yang dianalisis secara deskriptif adalah data kualitas air, Tingkat Kelulushidupan (SR), *relative percent survival* (RPS), gejala klinis dan pengamatan histologi.

## **V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat satu dosis terbaik ekstrak daun sambung nyawa untuk mengobati penyakit *Vibriosis* pada ikan kerapu macansecara *in vitro* yaitu dosis 700 ppm dan pada perlakuan  $\frac{1}{2}$  dosis terbaik (350 ppm) sudah dapat digunakan untuk uji *in vivo*.

### **B. Saran**

Aplikasi penggunaan ekstrak daun sambung nyawa perlu semakin dikembangkan dan lebih banyak diaplikasikan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi pemberian ekstrak daun sambung nyawa dengan metode yang lain selain metode oral.



## 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.
- Achmadi, S.S. (1992). *Teknik Kimia Organik*. Bogor : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Affandi, R., & Tang, U. M. (2002). *Fisiologi Hewan Air*. Pekanbaru. 172hlm.
- Agungpriyono, S. (2003). Glikoprotein dan Lektin. *Dalam Modul: Pemanfaatan teknik kultur jaringan dan histokimia. DIKTI dan Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor*, Bogor.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(4), 487-491.
- Amend, D.F. (1981). Potency Testing of Fish Vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49,447–454.
- Anderson, D.P & Siwicki, A.K. (1993). Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture “Aquatic Animal Health and the Environment”. Phuket, Thailand. 25 – 29 th October 1993. Hal 185-202.
- Anderson, D.P. (1974). *Fish Immunology In Diseases of Fishes*. Ed. S.F. Snieszko and H.R. Axelrod. T.F.H. Publications Inc. Ltd, USA.
- Aonullah, A.A., Slamet B.P., & 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.
- 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.

- Asnita. (2011). Identifikasi cacing parasitik dan perubahan histopatologi pada ikan bunglon batik Jepara (*Cryptocentrusleptocephalus*) dari Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Asri, A. (2015). Gambaran histopatologi ikan dui-dui (*Dermogenys megarrhamphus*) Di Danau Matano Luwu Timur Sulawesi Selatan yang tercemar logam berat nikel (Ni) dan besi (Fe). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin, Makasar.
- 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.
- Baron, E.J., Peterson L.R. & Finegold S.M. (1994). *Diagnostic Microbiology 9<sup>th</sup> Edition*. Mossy Year Book, Inc. St.Louis. Missouri.
- Bondad-Reantaso, M. G., Kanchanakhan, S., & Chinabut, S. (2000). Review of grouper diseases and health management strategies for grouper and other marine finfish diseases. In *Report of the Regional Workshop on Sustainable Seafarming and Grouper Aquaculture*. Medan : Indonesia (pp. 17-20).
- Bond, C.E. (1979). *Biology of Fishes*. Saunders College Publishing. Philadelphia. 514 p.
- Bobbarala, V., & Naidu, C. K. (2012). *An Alternative Approaches for the Control of Sorghum Pathogens Using Selected Medicinal Plants Extracts*. India : Department of Botany, College of Science and Technology, Andhra University, Visakhapatnam.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Cavalieri, S.J., Rankin, I.D., Harbeck, R.J., Sautter, R.S., McCarter, Y.S., Sharp S.E., Ortez J.H., & Spiegel, C.A. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA : American Society for Microbiology.
- Campbell, T.W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology*. Wiley Blackwell, Iowa.
- Cornell, D.W. & Miller, G.J. (1995). *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. A Wiley Interscience Publ. : New York.
- Cowan, M. M. (1999). *Plant Products as Antimicrobial Agents*. *Clinical microbiology reviews*, 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.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Journal of microbiology*, 22(4), 659-665.
- Desrina, D., Taslihan, A., Ambariyanto, A., & Susiani, S. (2006). Uji keganasan bakteri *Vibrio* pada ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*): *Indonesian Journal of Marine Sciences*, 11(3), 119-125.
- Effendi, H. (2000). *Telaah kualitas air bagi pengelolaan sumberdaya lingkungan perairan*. Bogor: FPIK-IPB. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan 258 hal.
- Efrizal, T., Setijanto, H., Djamar Tumpal F.L, & Sukra, Y. (1998). Pengaruh kadar subletal fosfamidon terhadap kerusakan jaringan ikan nila (*Oreochromis niloticus* Trew). Fakultas Perikanan UNRI, Pekanbaru.
- El Mahmood, O., & 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.
- Erliza, N. (2006). *Ekstraksi giberalin dari akar eceng gondok*. Skripsi. Bogor: Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
- Evalawati., Meiyana, M. & Aditya, T.W. (2001). *Modul pembesaran kerapu macan (Epinephelus fuscoguttatus) dan kerapu tikus (Epinephelus altivelis) di Keramba Jaring Apung*. Lampung: Departemen Kelautan dan Perikanan, Direktorat Jendral Perikanan Budidaya, Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung.
- Fadli, M.Y. (2015). Benefits of sambung nyawa (*Gynura procumbens*) substance as anticancer. *Jurnal Majority*, 4(5), 50-53.
- Gbore, F. A., Oginni, O., Adewole, A. M., & Aladetan, J. O. (2006). The effect of transportation and handling stress on haematology and plasma biochemistry in fingerlings of *Clarias gariepinus* and *Tilapia zilli*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(2), 208-212.
- Harbone, J.B., (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-2. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediro. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- 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., & 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.
- Herfiani, Rantetondok, A., & Anshary, H. (2013). Diagnosis penyakit bakterial pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) pada keramba jaring apung Boneatiro di Kabupaten Buton. *Tesis*. 72 halaman.
- Indriastuti, D. (2009). Pengaruh B-Glukan dalam formulasi pakan terhadap respon imunitas ikan kerapu bebek. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Isnansetyo, A., & Kamei, Y. (2009). Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(10), 1239-1248.
- Jain, N. C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea And Febiger Publishing. Philadelphia. 417 p.
- Johnny, F., & Roza, D. (2014). Infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada lumba-lumba hidung botol, *Tursiops Aduncus* yang dipelihara Di Lovina, Singaraja, Bali. *Berita Biologi*, 13(3).
- Johnny, F. & Roza, D. (2002). Pengaruh penyuntikan immunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Bali : Laporan Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol. 12 hal.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2007). *Histologi Dasar Teks dan Atlas*. Edisi 10. EGC, Jakarta. Kiernan, J.A. 1990. *Histological and Histochemical Method: Theory and Practice*. Second Edition. Pergamon Press, New York.
- Karlina, C.Y., Muslimin, I., & Guntur, T. (2013). Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokol (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Stapylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Chem. Prog.*, 5, (2), 15-22.
- Kasonchandra, J. (1999). Major viral bacterial disease of marine fishes with emphasions seabass and grouper. In *Paper Contributed to the Fourth Symposium on Disease in Asian Aquaculture*. Philipines: Cebu International Convension Centre, Water front Cebu City Hotel, Cebu City.
- Khopkar, SM. (2003). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Saptorahardjo, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Basic Concept of Analytical Chemistry*.
- Kiernan, J.A. 1990. *Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford. Pergamon Press.

- Kordi, M.G.H. (2004). *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan Kakap dan Kerapu*. Perca. Jakarta. 168 hal.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-Lacierda, E.R. & De la Pena, L.D. (1990). Occurrence of luminous bacterial diseases of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13.
- 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. 18 hlm.
- Mariskha, P. R., & Abdulgani, N. (2012). Aspek reproduksi ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) di Perairan Glondonggede Tuban. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), 27-31.
- Marshall, W.S. & Grosell, M. (2005). *Ion transport, osmoregulation, and acidbase balance in: The Physiology of Fishes*. Evans, D.H., and J.B. Claiborne (eds). Taylor and Francis Group, USA.
- Meyer, B.N, Ferrigni, N.R, Putman, J.E, Jacobsen, L.B, Nichol, D.E. & Melaughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- 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.
- Munford, R.S. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine: Severe Sepsis and Septic Shock*. Seventeenth Edition. Volume II. New York: Mc Graw Hill. p. 1695-1696.
- Murdjani, M. (2002). Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Ringkasan Disertasi*. Program Studi Ilmu-ilmu Pertanian Kekhususan Perlindungan Tanaman. Malang: Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.
- Nirwan. (2007). Produksi flavonoid Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) Asal Kultur pada Kondisi Naungan dan Pemupukan. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nitimulyo, K.H., Isnansyoto, A., Triyanto, I., Istiqomah, & Murdjani, M. (2005). Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen Penyebab Vibriosis pada Kerapu di Balai Budidaya Air Payau. *Jurnal Perikanan*, VII(2): 80-94.
- Nuria, M.C., Faizatun, A., & Sumantri. (2009). Uji antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*. 5: 26 – 37.

- Nursyirwani, Asmara, W., Wahyuni, A.E.T.H., & Triyanto. (2015). Histopatologi ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri asam laktat dan diuji tantangan *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Veteriner*, 16(4), 505-512.
- Pal, G.K. & P. Pal. (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.
- Pelezar, Michael. J. & Chan, E.S.C. (1988). *Dasar-dasar mikrobiologi* Edisi 2 terjemahan Ratna Siri H, Teja Imas, S. Sutarmi dan Sri Lestari A. Jakarta : UI Press.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Plumb, J.A. (1994). *Health Maintenance of Cultured Fishes : Principal Microbial Diseases*. CRC Press. Inc, 245 pp.
- Pratama, M.R. 2005. Pengaruh ekstrak serbuk kayu siwak (*Salvadorapersica*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar. *Laporan Hasil Penelitian* Program Studi Biologi. Fakultas MIPA Teknologi Sepuluh Nopember.
- Rahayu, A. M. (2009). Keragaman dan keberadaan penyakit bakterial dan parasitik benih kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus* di karamba jaring apung Balai Sea Farming Kepulauan Seribu, Jakarta. Departemen Budidaya Perairan. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Rahman, I.S., Maftuch, & Sanoesi, E. (2018). Efektifitas imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap histopatologi hati ikan patin (*Pangasius* sp.) yang diuji tantangan 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 hyper lipid emia in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(2), 31-35.
- Riadini, R. K. (2015). Ujiaktivitas antioksidan ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) berdasarkan perbedaan metode ekstraksi dan umur panen. *Disertasi*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta.

- Rivai, H., Femiwati, F., & Krisyanella, K. (2016). karakterisasi ekstrak air daun dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC dan penetapan kadar flavonoid totalnya. *Jurnal Farmasi Higea*, 3(1), 16-24.
- Robert RJ. (2001). *Fish Pathology*. W.B.Saunders, USA.
- 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.
- Rustikawati, I. (2012). Efektivitas Ekstrak Sargassum sp. terhadap diferensiasi leukosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika*, III (2): 125-134.
- Saptiani, G., Prayitno, S. B., & Anggoro, S. (2013). Potensi antibakteri ekstrak daun jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap *vibrio harveyi* secara *in vitro*. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1).
- Sari, F.P., & Sari, S. M.. (2011). Ekstraksi zat aktif antimikroba dari tanaman yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai bahan baku alternatif antibiotik alami. Semarang : Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Sarjito, Radjasa, O.K., Hutabarat, S., & Prayitno, S.B. (2009). Phylogenetic diversity of causative agen to vibriosis associated with groupers fish from Karimun Jawa Islands, Indonesia. *Current Research in Biotechnology*, 2(1), 14-21.
- Sarjito, Prayitno, S.B., Radjasa, O.K., & Hutabarat, S. (2007). Karakterisasi dan patogenitas agensia penyebab vibriosis pada kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 8(2), 89-95.
- Setyawan, N . (2013). Gambaran mikroskopis pada insang ikan sebagai indikator pencemaran logam berat di Perairan Kaligarang Semarang. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang.
- Shao, J. Z., Liu, J., & Xiang, L. X. (2004). *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *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.
- Sumayani, R.K., & Cahyoko, Y. (2008). Daya antibakteri perasan rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*, 3(1), 83-87.

- Suryati. (2010). Pemberian kappa-karaginan untuk meningkatkan respon imunitas dan resistensi penyakit pada ikan lele dumbo. *Tesis*. Bogor : Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sutrisna, A. (2011). Pertumbuhan ikan kerapu macan di perairan pulau panggang Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Fakultas Ilmu Kelautan. Bogor
- Suwoyo, H. S. (2011). Kajian kualitas air pada budidaya kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) sistem tumpang sari di areal mangrove. *Berkala Perikanan Terubuk*, 39(2), 25-40.
- 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.
- Taslihan, A. (1992). *Vibriosis pada Udang Windu*. Jepara: BPAP.
- Taslihan, A., M. Murdjani, C. Purbomartono, & E. Kusnendar. 2000. Bakteri patogen penyebab penyakit mulut merah pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), *Jurnal Perikanan*, 2(2): 57-62.
- Tizard IR. (1982). *Pengantar Immunologi Veteriner*. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Tohir, AM., (2010). Teknik ekstraksi dan aplikasi beberapa pestisida nabati untuk menurunkan palatabilitas ulat grayak (*Spodoptera litura* fabr.). *Buletin Teknik Pertanian*, 15(1), 37-40.
- Widayati, E.D. (2008). Studi histopatologi insang ikan mujair (*oreochromis mossambicus*) pada konsentrasi sublethal air lumpur Sidoarjo. *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Yuniar, V. (2009). Toksisitas merkuri (hg) terhadap kelangsungan hidup, pertumbuhan, gambaran darah dan kerusakan organ pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Bogor: IPB.