SUPLEMENTASI EKSTRAK *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN NONSPESIFIK IKAN LELE *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) TERHADAP INFEKSI PATOGEN *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) MELALUI PAKAN

(Skripsi)

Oleh

DHEA ADINDA RYSKY
1854111006

FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022

ABSTRAK

SUPLEMENTASI EKSTRAK *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN NONSPESIFIK IKAN LELE *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) TERHADAP INFEKSI PATOGEN *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) MELALUI PAKAN

Oleh

Dhea Adinda Rysky

Motile Aeromonas Septicemia (MAS), merupakan penyakit yang sering dijumpai pada budi daya ikan lele. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* mampu menyerang berbagai tingkatan umur pada ikan budi daya. Kandungan *Tribulus terrestris* berpotensi sebagai imunostimulan alami dengan mengandung bahan aktif seperti saponin, tanin, dan flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian secara oral ekstrak *T. terrestris* untuk meningkatkan respon imun nonspesifik pada ikan lele yang terinfeksi patogen *Aeromonas hydrophila*. Penelitian dilakukan secara eksperimen dengan empat perlakuan, yaitu: kontrol atau tanpa suplementasi ekstrak *Tribulus terrestris* (A), suplementasi ekstrak *T. terrestris* 200 mg/kg (B), suplementasi ekstrak *T. terrestris* 400 mg/kg (C), dan suplementasi ekstrak *T. terrestris* 600 mg/kg (D). Hasil yang didapatkan pada penelitian ini yaitu suplementasi ekstrak *T. terrestris* menghasilkan pengaruh yang berbeda nyata terhadap peningkatan respon imun nonspesifik pada ikan lele antara lain aktivitas fagositosis, indeks fagositosis, total leukosit, dan kadar hematokrit. Dosis terbaik dalam penelitian ini adalah 200 mg/kg pakan. Penelitian ini diharapkan menjadi informasi alternatif penggunaan bahan alami dan berpotensi sebagai imunostmulan pada budi daya ikan lele.

Kata kunci: *Aeromonas hydrophila*, ekstrak *Tribulus terrestris*, ikan lele, imunostimulan, *motile aeromonas septicemia* (MAS).

ABSTRACT

THE EFFECT OF *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) EXTRACT ON IMMUNE NONSPESIFIC RESPONSES OF AFRICAN CATFISH *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) INFECTED BY *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901)

By

Dhea Adinda Rysky

Motile Aeromonas Septicemia (MAS), is a disease that is often found in catfish farming. Caused by the bacteria *Aeromonas hydrophila* which capable of attacking various age levels in cultured fish. The *Tribulus terrestris* has the potential as a natural immunostimulant by containing active ingredients such as saponins, tannins, and flavonoids. This study aimed to examine the effect of the addition of *T. terrestris* extract in feed to increase nonspecific immune response in catfish infected by *Aeromonas hydrophila* pathogen. The study was conducted experimentally with four treatments, namely: control or without supplementation of *T. terrestris* extract (A), supplementation of *T. terrestris* extract 200 mg/kg (B), supplementation of *T. terrestris* extract 400 mg/kg (C) and *T. terrestris* extract supplementation 600 mg/kg (D). The results showed that supplementation of *T. terrestris* extract had a significantly to increase nonspecific immune responses in catfish, including phagocytic activity, phagocytosis index, total leukocytes, and hematocrit levels. The dose of 200 mg/kg (Treatments of B) was better than the others. This research was expected to be information as alternative natural ingredients and potential immunostimulators in catfish farming.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, catfish, immunostimulant, , *motile aeromonas septicemia* (MAS), *Tribulus terrestris* extract.

SUPLEMENTASI EKSTRAK *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN NONSPESIFIK IKAN LELE *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) TERHADAP INFEKSI PATOGEN *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) MELALUI PAKAN

Oleh

Dhea Adinda Rysky

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
2022

Judul	: **SUPLEMENTASI EKSTRAK Tribulus terrestris (Linnaeus, 1753) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN NONSPESIFIK IKAN LELE Clarias gariepinus (Burchell, 1822) TERHADAP INFEKSI PATOGEN Aeromonas hydrophila (Chester, 1901) MELALUI PAKAN**
Nama Mahasiswa	: Dhea Adinda Rysky
NPM	: 1854111006
Jurusan/Program Studi	: Perikanan dan Kelautan/Budidaya Perairan
Fakultas	: Pertanian

Menyetujui

1. Komisi Pembimbing,

Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P.	**Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si.**
NIP. 19840805 200912 1 003	NIP. 19900120 201903 1 011

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan
   Universitas Lampung

Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si.
NIP. 19700815 199903 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P.** ----------

Sekertaris : **Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si.** ----------

Penguji
Bukan pembimbing : **Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.** ----------

2. Dekan Fakultas Pertanian

Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP. 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **30 Agustus 2022**

PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik sarjana baik di Universitas Lampung maupun 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 sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandar lampung, 07 November 2022

t pernyataan,

SEPULUH RIBU RUPIAH 10000 METERAI TEMPEL DEE53AKX117520812

Dhea Adinda Rysky
NPM. 1854111006

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Dhea Adinda Rysky dilahirkan di Cengal, Ogan Komering Ilir, Sumatera Selatan pada 23 Januari 2001, sebagai anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Agus Purwanto dan Ibu Sulimah. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD Negeri 2 Cengal pada tahun 2006, kemudian meyelesaikan pendidikan menegah pertama di SMPN 1 Purbolinggo Lampung Timur pada tahun 2012. Penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Purbolinggo Lampung Timur dengan Jurusan Ilmu Pengetahuan Sosial (IPS) dan lulus pada tahun 2018.

Pada tahun 2018 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur SMMPTN-Barat. Selama menjadi mahasiswa, penulis melakukan kegiatan magang industri sebanyak dua kali. Pertama di UPTD. Balai Benih Ikan (BBI) Kota Metro pada komodiatas ikan gurami (*Ospronemus gourami*) pada tahun 2020. Kedua di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Kemanan Hasil Perikanan (Balai KIPM) Lampung bidang biologi molekuler dan mikrobiologi pada tahun 2020. Penulis juga menjadi asisten dosen pada mata kuliah Biologi Akuatik (2019), Fisiologi Perkembangan Larva Ikan (2021) dan Fisiologi Reproduksi Ikan (2022). Penulis pernah mengikuti kegiatan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) bidang kewirausahaan pada tahun 2021. Selain itu, penulis aktif mengikuti kegiatan kemahasiswaan pada Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (Himapik) yaitu menjadi anggota Bidang Kewirausahaan (2020) dan Bendahara Umum Himapik tahun 2021 pada kabinet Sahitya Baruna.

Pada Januari-Februari 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Tambah Subur, Kecamatan Way Bungur, Lampung Timur, Lampung selama 40 hari. Pada Agustus-September 2021 penulis melaksanakan Praktik Umum (PU/ studi independen di Laboratorium Budidaya Perikanan, Universitas Lampung selama 30 hari dengan judul "Uji *in vitro* Aktivitas Antibakteri dari *Tribullus terrestris* di Laboratorium Budidaya Perikanan Universitas Lampung". Pada Maret-Mei 2022 penulis melakukan penelitian di Laboratorium Budidaya Perikanan, Universitas Lampung dengan judul "Suplementasi Ekstrak *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) sebagai Imunostimulan untuk Meningkatkan Respon Imun Non-spesifik Ikan Lele *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) terhadap Infeksi Patogen *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) melalui Pakan".

PERSEMBAHAN

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat serta karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Dengan kerendahan hati, kupersembahkan skripsi ini sebagai tanda bukti dan kasih sayangku yang tulus kepada kedua orang tuaku, Papa Agus Purwanto dan Mama Sulimah, yang telah mengisi dengan begitu banyak kebahagiaan sehingga seumur hidup tidak cukup untuk menikmatinya, selalu memberikan kasih sayang, doa, dukungan, nasihat dan serta upaya demi tercapainya cita-citaku. Ketika orang lain menutup telinga untukku, mereka berdua membuka hatinya untuku. Terima kasih karena selalu ada untukku.

MOTTO

Baginya (manusia) ada malaikat-malaikat yang selalu menjaganya bergiliran, dari depan dan dari belakangnya. Mereka menjaganya atas perintah Allah. Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap suatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya dan tidak ada perlindungan bagi mereka selain Dia

(Q.S. Ar-Ra'd : 11)

"Apa yang kamu mulai harus kamu selesaikan"

-AAF

SAMAWACANA

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Suplementasi Ekstrak *Tribulus terrestris* (Linnaeus, 1753) sebagai Imunostimulan untuk Meningkatkan Respon Imun Nonspesifik Ikan Lele *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) terhadap Infeksi Patogen *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) melalui Pakan" sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung. Shalawat dan salam pada Rasulullah Muhammad SAW yang telah membawa kita pada zaman yang terang benderang seperti sekarang.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
2. Dr. Indra Gumay Yudha, M,Si. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
3. Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P. selaku Pembimbing Utama yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran, dan kritik dalam proses menyelesaikan skripsi ini;
4. Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si. selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan dukungan, bimbingan, saran, dan kritik dalam proses menyelesaikan skripsi ini;
5. Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D. selaku Penguji Utama dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan dukungannya selama perkuliahan dan penelitian ini, serta memberikan saran dan kritik dalam menyelesaikan skripsi;
6. Dosen-dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat dan pengalaman hidup kepada penulis selama menjadi mahasiswa;

7. Seluruh staf administrasi Jurusan Perikanan dan Kelautan yang telah membantu segala urusan administrasi selama masa perkuliahan;
8. Kedua orang tuaku tersayang, Papa Agus Purwanto dan Mama Sulimah, terima kasih atas doa, cinta, kasih sayang, kesabaran, dan semua dukungan dalam kehidupan bersama penulis serta dukungan moril maupun materil yang selama ini diberikan kepada penulis;
9. Kakak Ega Mawardika bersama suami (Nugroho Eko Prasetyo), serta kedua keponakan Shanum Ufaira Nabiha Prasetyo dan Shania Mehrunisa Haflani Prasetyo yang telah memberikan dukungan dan doa;
10. Adhi Auliya Fikri terima kasih atas segala dukungan, kebaikan, motivasi, dan perhatian selama masa perkulihan dan penyelesaian skripsi ini;
11. Rekan seperjuangan, Dwi Ramadhan, Azizah, Puput Ayu Nurvadilla, Aryanti Rafika Sari, Meilin Chairani Abmar, Lietha Nurdianti, Cindi Arina, Rya Fatunnissa, Khoiriyah Nurya Yulianti, M. Nasir, dan Manarul Huda atas segala bantuan, semangat dan doa selama masa perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini;
12. Sahabatku yang tak pernah lelah mendengarkan curhatku Hellend Chintia, Rosella Mely Wiyandri, Zelin Trisna Aini, Hanifah Aulia, dan Sri Wulandari terima kasih atas segala dukungan, semangat dan motivasi;
13. Keluarga Poseidon 18 terima kasih selama ini telah menjadi rekan dan saudara yang paling menyenangkan dalam berkembang bersama serta saling memberikan motivasi dan dukungan dalam perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.

Semoga amal kebaikan yang telah diberikan mendapat imbalan dari Allah SWT. Penulis menyadari penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan, namun penulis berharap karya ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, 30 Agustus 2022
Penulis

Dhea Adinda Ryksy

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI i

DAFTAR GAMBAR iii

DAFTAR TABEL iv

DAFTAR LAMPIRAN v

I. PENDAHULUAN 1
- 1.1 Latar Belakang 1
- 1.2 Tujuan Penelitian 3
- 1.3 Manfaat Penelitian 3
- 1.4 Kerangka Pikir 4
- 1.5 Hipotesis 6

II. TINJAUAN PUSTAKA 8
- 2.1 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi *Tribulus terrestris* 8
  - 2.1.1 Klasifikasi *Tribulus terrestris* 8
  - 2.1.2 Morfologi dan Biologi *Tribulus terrestri* 8
- 2.2 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi Ikan Lele (*C. gariepinus*) 10
  - 2.2.1 Klasifikasi Ikan Lele 10
  - 2.2.2 Morfologi Ikan Lele 10
- 2.3 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi Bakteri *A. hydrophilla* 11
  - 2.3.1 Klasifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* 11
  - 2.2.2 Morfologi dan Biologi Bakteri *Aeromonas hydrophilla* 11
- 2.4 Sistem Kekebalan Pada Ikan 13
  - 2.4.1 Komponen sistem imun nonspesifik 13
  - 2.4.2 Komponen sistem imun spesifik 13
- 2.5 Imunostimulan 14

III. METODE PENELITIAN 16
- 3.1 Waktu dan Tempat 16
- 3.2 Alat dan Bahan 16

3.2.1 Alat penelitian 16
3.2.2 Bahan penelitian 17
3.3 Rancangan Percobaan 17
3.4 Prosedur Penelitian 19
3.4.1 Ekstraksi *Tribulus terrestris* 19
3.4.2 Persiapan Wadah Ikan Uji 19
3.4.3 Persiapan Ikan Uji 20
3.4.4 Persiapan Pakan Uji 20
3.4.5 Pemeliharaan Ikan Uji 20
3.4.6 Uji Tantang 20
3.5 Parameter Penelitian 21
3.5.1 Gejala Klinis 21
3.5.2 Aktivitas dan Indeks Fagositosis 21
3.5.3 Total Leukosit 22
3.5.4 Kadar Hematokrit 22
3.5.5 Tingkat Kelangsungan Hidup (*Survival rate*) 23
3.5.6 Rerata Waktu Kematian (*Mean Time to Death*/MTD) 23
3.5.7 Kualitas Air 23
3.5.8 Analisis Data 24

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 25
4.1 Hasil 25
4.1.1 Gejala klinis 25
4.1.2 Aktivitas dan Indeks Fagositosis 27
4.1.3 Total Leukosit 29
4.1.4 Kadar Hematokrit 29
4.1.5 Tingkat Kelangsungan hidup dan Rerata Waktu Kematian 30
4.1.6 Kualitas Air 32
4.2 Pembahasan 32
4.2.1 Gejala Klinis 32
4.2.2 Aktivitas dan Indeks Fagositosis 33
4.2.3 Total Leukosit 34
4.2.4 Kadar Hematokrit 35
4.2.5 Tingkat Kelangsungan Hidup dan Rerata Waktu Kematian 36
4.2.6 Kualitas Air 36
4.2.7 Pembahasan Umum ..... .37

V. SIMPULAN DAN SARAN 25
5.1 Simpulan 39
5.2 Saran 39

DAFTAR PUSTAKA 27

LAMPIRAN 48

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Kerangka pikir penelitian.....5
2. Tanaman *Tribulus terrestris*.....9
3. Morfologi ikan lele (*Clarias gariepinus*).....11
4. Isolasi *Aeromonas hydrophila* dalam media selektif 12
5. Tata letak wadah pemeliharaan.....18
6. Gejala klinis ikan lele pasca uji tantang.....25
7. Kondisi ikan lele pada hari ke-28 pemeliharaan.....26
8. Nilai rata-rata aktivitas fagositosis.....27
9. Nilai rata-rata indeks fagositosis 28
10. Total leukosit 29
11. Persentasi kadar hematokrit 30
12. Tingkat kelangsungan hidup (*Survival rate*).....31
13. Rerata waktu kematian.....31
14. Pembuatan ekstrak *Tribulus terrestris* 56
15. Persiapan wadah pemeliharaan 56
16. Persiapan ikan uji 57
17. Pembuatan pakan dicampur ekstrak *Tribulus terrestris*.....57
18. Media kultur bakteri *Aeromonas hyrophil*a 58
19. Uji tantang bakteri *Aeromonas hyrophila* pada ikan lele.....59
20. Pengamatan kualitas air.....59
21. Pengamatan profil darah ikan lele.....60

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Alat penelitian 16
2. Bahan penelitian.....17
3. Pengamatan gejala klinis.....26
4. Kualitas air 32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Respon imun nonspesifik ikan lele (*Clarias gariepinus*) 49
2. Analisis data statistik 51
3. Dokumentasi penelitian.....56

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu penyakit yang sering menyerang berbagai jenis ikan budi daya adalah penyakit bakterial khususnya *Aeromonas hydrophila* (Purba *et al.*, 2020). Bakteri ini dapat menyerang berbagai tingkatan umur pada ikan budi daya, pada saat bakteri *Aeromonas hydrophila* menginfeksi ikan maka akan terjadi gejala klinis seperti pendarahan, kehilangan nafsu makan, bergerak pasif, dan luka infeksi pada bagian tubuh terutama pada bagian dada, perut, dan sirip (Damayanti & Tanbiyaskur, 2022). Serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* terjadi karena berbagai faktor penyebab seperti kepadatan yang tinggi, kualitas air yang buruk, pakan yang buruk dan suhu ekstrim. Hal ini dapat memicu ikan menjadi stres. Pada saat ikan stres maka imunitas tubuh akan menurun, sehingga memudahkan terserang berbagai jenis penyakit (Pujiastuti, 2015). Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah *motile aeromonas septicemia* (MAS) dimana akibat keganasannya penyakit bakterial ini dapat mengakibatkan kematian pada ikan hingga 80% (Haryani & Granduosa, 2012) sehingga dapat menyebabkan kerugian oleh pembudi daya.

Kematian ikan akibat serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* telah terjadi sejak tahun 1980 hingga saat ini, dimana bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas* menyerang ikan mas, gurame, lele, dan tawes (Olga, 2012). Pada sistem budi daya konvensional yaitu budi daya ikan lele di Kampung Tugu, Desa Sukamaju, Cianjur ditemukan kematian yang diduga disebabkan oleh serangan patogen *Aeromonas hydrohila* dengan ciri fisik berupa bintik merah di tubuh lele yang mati dan semakin lama bintik tersebut menjadi kuning (Hanan, 2019). Kematian ikan tersebut menyebabkan kerugian karena populasi ikan yang dipanen menurun sebanyak

20%. Kemampuan *A. hydrophila* dalam menimbulkan penyakit cukup tinggi dengan patogenitas yang ditunjukkan LD_{50} berkisar antara 10^4-10^6 sel/ml di perairan yang mengandung bahan organik tinggi. Di samping itu, bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 4-45^{0}C meskipun lambat dan akan tumbuh optimum pada suhu 37^{0}C (Olga *el al.,* 2020).

Pada saat ini telah banyak dilakukan pengadaan vaksin untuk bakteri *Aeromonas hydrophila* (Mulia *et al.,* 2016). Namun faktor yang menjadi pertimbangan yaitu banyaknya sterotipe dari bakteri ini, sehingga menyebabkan vaksin yang ada belum tentu mampu membunuh semua strain *Aeromonas hydrophila*. Di samping itu pula penggunaan vaksin relatif lebih mahal biayanya dan masih kesulitan dalam proses transportasi dan penyimpanan sehingga memberatkan sebagian besar pembudi daya, khususnya budi daya konvensional (Sugiani *et al.,* 2018). Untuk itu perlu dilakukan langkah pencegahan agar ikan tidak mudah terserang penyakit, seperti pemberian pakan berkualitas, pemberian imunostimulan alami, pemberian vitamin, dan menjaga kualitas air budi daya (Wulandari, 2014). Langkah pencegahan merupakan teknik dalam pengendalian penyakit yang ideal karena dapat menekan kerugian yang disebabkan oleh serangan penyakit ikan budi daya (Pasaribu & Asriati, 2021).

Saat ini penggunaan imunostimulan alami sebagai suplemen terbukti dapat meningkatkan mekanisme sistem imun baik humoral maupun seluler (Wari, 2020). Pemberian imunostimulan alami juga tidak memberikan efek samping dalam jangka panjang baik pada ikan dan ramah lingkungan untuk manajemen penyakit ikan (Payung, 2019). Berbeda dengan penggunaan antibiotik sebagai pengobatan karena dapat meninggalkan residu dan menyebabkan resistensi bakteri terhapat antibiotik yg diberikan (Azhar & Dyke, 2019). Di samping itu, penggunaan imunostimulan alami lebih ekonomis dan mudah didapatkan di lingkungan sekitar. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai imunomodulator yaitu tanaman *Tribulus terrestris* (Gultepe *et al.,* 2014). *Tribulus terrestris* memiliki kandungan bahan aktif, seperti saponin, tanin, flavonoid, dan alkaloid yang dapat digunakan sebagai imunostimulan alami (Dimitrova, 2012).

Tanaman *Tribulus terrestris* mengandung zat saponin, flavonoid, dan alkaloid yang memiliki sifat antiinflamasi, antitumor, dan imunomodulator (Chhatre *et al.*, 2014). Selain itu, *Tribulus terrestris* mengandung zat seperti senyawa dioscin, protodioscin, dan iongenina yang bertanggung jawab untuk meningkatkan produksi tetosteron dan menyembuhkan gangguan seksual (Garrepally *et al*., 2011). *Tribulus terrestris* tidak hanya dapat digunakan sebagai pencegahan penyakit, tetapi dapat digunakan juga pada genetika dan reproduksi ikan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada ekstrak tribulus (Yilmaz *et al.*, 2014) pada ikan nila (*Oreochromis mossambicus)* yang diinfeksi bakteri *Streptococcus iniae* melalui metode pemberian pakan dengan dosis 200; 400; 600; 800 mg/kg diperoleh hasil sintasan tertinggi pada dosis 400 mg/kg, yaitu sebesar 7,22% per hari.

Hingga saat ini penggunaan ekstrak tribulus dalam pencegahan penyakit bakterial *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele melalui metode pemberian pakan belum pernah dilakukan. Dengan demikian perlu dipelajari apakah suplementasi ekstrak tribulus sebagai imunostimulan dapat memberikan pengaruh yang berbeda nyata dalam meningkatkan respon imun nonspesifik ikan lele yang diinfeksi patogen *Aeromonas hydrophila*. Studi ini diharapkan dapat memberikan alternatif untuk pencegahan penyakit pada ikan air tawar yang selama ini menggunakan pengobatan sintetis yang tidak ramah lingkungan.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh aplikasi *Tribulus terrestris* terbaik untuk meningkatkan respon imun nonspesifik pada ikan lele yang terinfeksi patogen *Aeromonas hydrophila.*

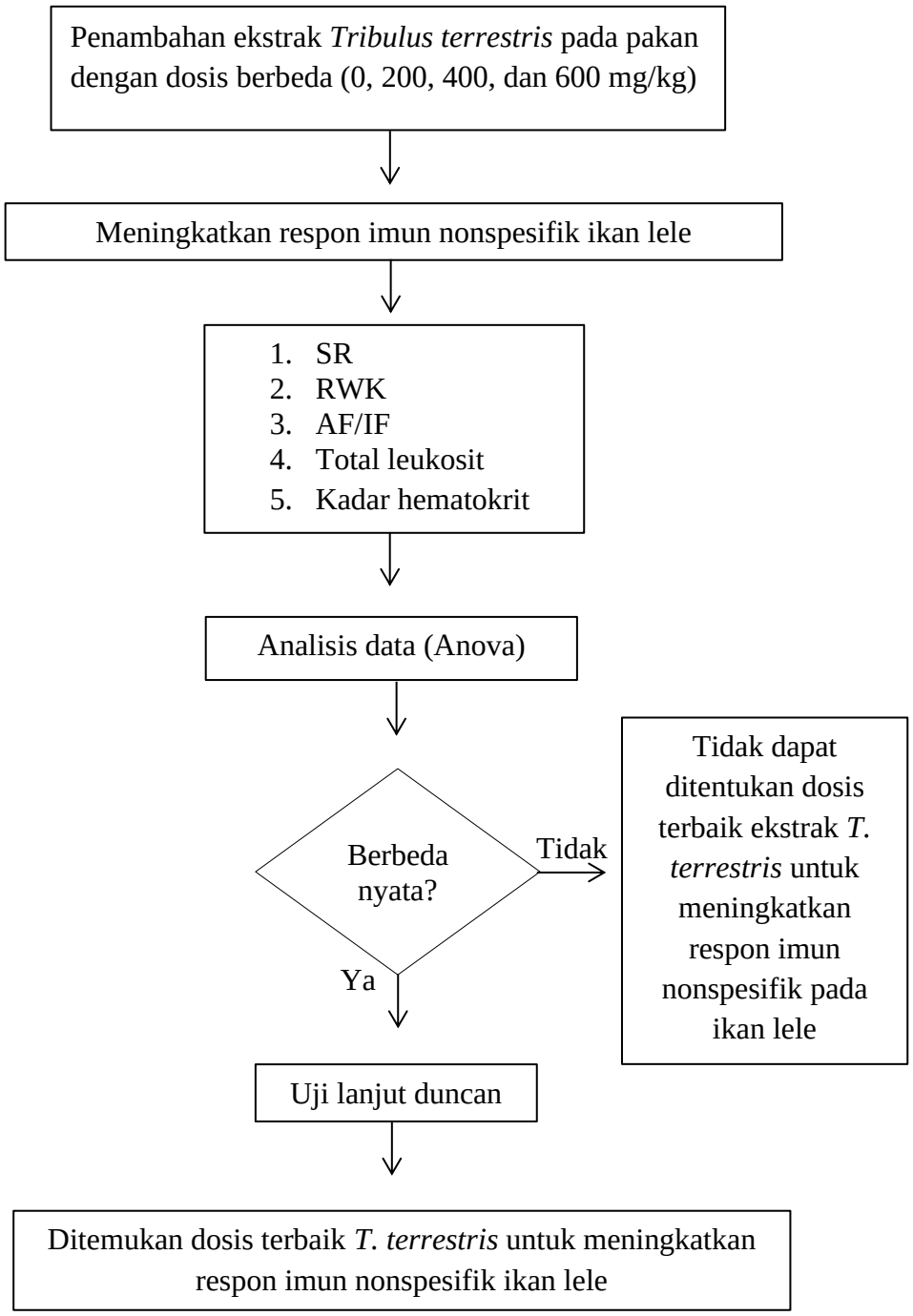
1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukan penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi, wawasan bagi pembaca dan sebagai bahan masukan untuk penelitian selanjutnya untuk menyempurnakan kajian mengenai aplikasi *Tribulus terrestris* sebagai imunostimulan.

1.4 Kerangka Pikir

Ikan lele menjadi salah satu dari 10 komoditas unggulan perikanan budi daya di Indonesia. Ikan lele memiliki potensi besar dan daya serap yang tinggi, baik pasar lokal maupun ekspor. Produksi ikan lele mengalami peningkatan dari tahun ke tahun sehingga budi daya skala masal pun terjadi untuk memenuhi kebutuhan pasar. Akibat tingginya kepadatan, bahkan hampir mendekati batas maksimal daya dukung lahan, menyebabkan ikan rentan terhadap stres. Ikan yang mengalami stres maka imunitas akan menurun. Saat imunitas ikan menurun maka akan mudah terserang penyakit. Kondisi ini menyebabkan munculnya penyakit ikan yang harus diwaspadai yaitu *motile aeromonas septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri *Aeromonas hydrophila* menyebabkan infeksi ke seluruh tubuh ikan secara singkat yang disertai pendarahan pada organ tubuh, bercak merah pada tubuh ikan, kulit meradang, diakhiri luka seperti bisul, dan hilangnya nafsu makan. Bahkan jika tidak segera ditangani dengan baik akan terjadi kematian mencapai 80% karena dapat menular dengan cepat. Hal ini sangat merugikan bagi pembudi daya.

Pada saat ini telah banyak dilakukan pengadaan vaksin untuk bakteri *Aeromonas hydrophila*, namun banyaknya sterotipe bakteri ini menyebabkan vaksin yang ada belum tentu mampu membunuh semua strain *Aeromonas hydrophila*. Di samping itu, penggunaan vaksin relatif lebih mahal biayanya. Dengan demikian, perlu dilakukan langkah pencegahan agar ikan tidak mudah terserang penyakit, seperti pemberian pakan berkualitas, pemberian imunostimulan alami, pemberian vitamin, dan menjaga kualitas air budi daya. Saat ini penggunaan imunostimulan alami sebagai suplemen terbukti dapat meningkatkan mekanisme kerja sistem imun, baik humoral maupun seluler. Pemberian imunostimulan alami juga tidak memberikan efek samping dalam jangka panjang pada ikan dan ramah lingkungan untuk manajemen penyakit. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai imunomodulator yaitu tanaman *Tribulus terrestris*. *Tribulus terrestris* memiliki kandungan bahan aktif seperti saponin, tanin, flavonoid, dan alkaloid yang berperan sebagai imunostimulan. Kerangka pikir penelitian disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

1.5 Hipotesis

Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut

1. Tingkat kelangsungan hidup

   H_0 : semua $\tau_i = 0$

   Pengaruh penambahan ekstrak *Tribulus terrestris* pada pakan dengan dosis yang berbeda (0, 200, 400, dan 600 mg/kg) tidak berbeda nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan lele.

   H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$

   Minimal ada satu perlakuan pengaruh pemberian ekstrak *Tribulus terrestris* yang berbeda nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan lele.

2. Rerata waktu kematian

   H_0 : semua $\tau_i = 0$

   Pengaruh penambahan ekstrak *Tribulus terrestris* pada pakan dengan dosis yang berbeda (0, 200, 400, dan 600 mg/kg) tidak berbeda nyata terhadap rerata waktu kematian ikan lele.

   H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$

   Minimal ada satu perlakuan pengaruh pemberian ekstrak *Tribulus terrestris* yang berbeda nyata terhadap rerata waktu kematian ikan lele.

3. Pengamatan AF/IF

   H_0 : semua $\tau_i = 0$

   Pengaruh penambahan ekstrak *Tribulus terrestris* pada pakan dengan dosis yang berbeda (0, 200, 400, dan 600 mg/kg) tidak berbeda nyata terhadap AF/IF ikan lele.

   H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$

   Minimal ada satu perlakuan pengaruh pemberian ekstrak *Tribulus terrestris* yang berbeda nyata terhadap AF/IF ikan lele.

4. Pengamatan total leukosit

   H_0 : semua $\tau_i = 0$

   Pengaruh penambahan ekstrak *Tribulus terrestris* pada pakan dengan dosis yang berbeda (0, 200, 400, dan 600 mg/kg) tidak berbeda nyata terhadap total leukosit ikan lele.

   H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$

   Minimal ada satu perlakuan pengaruh pemberian ekstrak *Tribulus terrestris* yang berbeda nyata terhadap total leukosit ikan lele.

5. Pengamatan kadar hematokrit

   H_0 : semua $\tau_i = 0$

   Pengaruh penambahan ekstrak *Tribulus terrestris* pada pakan dengan dosis yang berbeda (0, 200, 400, dan 600 mg/kg) tidak berbeda nyata terhadap kadar hematokrit ikan lele.

   H_1 : minimal ada satu $\tau_i \neq 0$

   Minimal ada satu perlakuan pengaruh pemberian ekstrak *Tribulus terrestris* yang berbeda nyata terhadap kadar hematokrit ikan lele.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi *Tribulus terrestris*

2.1.1 Klasifikasi *Tribulus terrestris*

Menurut USDA *Plant Database* (2014) kedudukan taksonomi tanaman *Tribulus terrestris* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Family	: Zygophyllaceae
Genus	: *Tribulus L.*
Spesies	: *Tribulus terrestris L.*

2.1.2 Morfologi dan Biologi *Tribulus terrestris*

Tanaman *Tribulus terrestris* merupakan tanaman dengan batang dapat mencapai 2 meter. Daun yang dimiliki merupakan daun majemuk menyirip (± 1,25 cm) dan masing-masing terdiri dari 4-8 pasang. Bunga *Tribulus terrestris* berukuran kecil (± 8-15 mm) dengan kelopak bunga berwarna kuning. Buah yang dimiliki berduri dengan diameter ±1 cm dengan panjang duri mencapai 6 mm. Satu buah terdiri dari 5 segmen, setiap segmen memiliki 2 pasang duri yang tidak sama.

Setiap tanaman *Tribulus terrestris* dapat menghasilkan hingga 2.000 biji (Perveen, 2007). *Tribulus terrestris* merupakan salah satu tanaman herbal yang dapat hidup subur pada tanah yang kering dan berpasir. Tumbuhan ini dikenal sebagai hama pada sistem budi daya dan sering ditemukan pada padang rumput, pinggir jalan dan daerah yang tidak dimanfaatkan sebagai area tanam (Gambar 2).

Gambar 2. Tanaman *T. terrestris*
Sumber: USDA Plant Database (2014)

Tanaman *Tribulus terrestris* merupakan herbal yang memiliki rasa pahit dimana kurang diminati, rasa pahit tersebut berasal dari saponin. Ekstrak tribulus sendiri mengandung jumlah saponin yang cukup tinggi, yaitu 68% (Yilmaz, 2014). Kandungan antibakteri dalam *Tribulus terrestris* adalah golongan saponin, glikosida, flavonoid, tanin, sterol, alkaloid, dan minyak essensial. Selain itu, tumbuhan ini mengandung sumber antioksidan baru yang baik dan bermanfaat untuk mengobati berbagai patogen radikal (Dimitrova, 2012).

Tribulus terrestris bermanfaat sebagai diuretik, afrodisiak, imunomodulator, anti-inflamasi, antibakteri dan antikarsinogenik. Tribulus memiliki fraksi saponin, yaitu protodioscin dan protogracillin. Keduanya sangat membantu aktivitas biologi afrodisiak. Protodioscin memiliki kemampuan bekerja untuk meningkatkan testosteron ke dalam *dehydrostestosterone*. Bukan hanya itu, protodioscin dapat membantu dalam memproduksi sel darah merah dari tulang sumsum bersama dengan perkembangan otot dan berkontribusi dalam peningkatan sirkulasi darah dan transportasi oksigen yang mengarah pada kesehatan dan kinerja sistem imun spesifik (Tilwari *et al.*, 2011).

2.2 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi Ikan Lele (*Clarias gariepinus*)

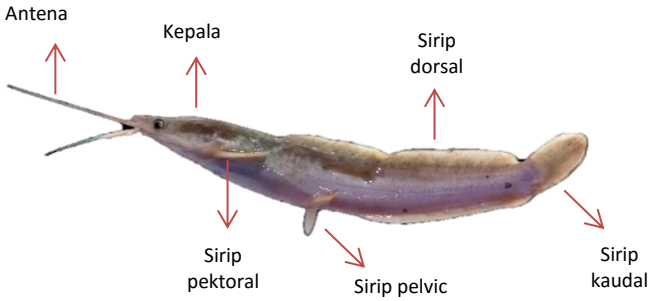
2.2.1 Klasifikasi Ikan Lele

Ikan lele mudah dibudi daya karena mampu hidup pada kualitas air dan oksigen yang rendah. Menurut Froese & Pauly (2022), ikan lele memiliki klasifisikasi sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Subkingdom : Metazoa
Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Kelas : Pisces
Subkelas : Teleostei
Ordo : Ostariophysi
Subordo : Siluroidea
Famili : Clariidae
Genus : *Clarias*
Spesies : *Clarias gariepinus*

2.2.2 Morfologi Ikan Lele

Ikan lele merupakan golongan hewan *nocturnal* dengan bentuk tubuh memanjang pipih ke bawah dan umumnya memiliki warna tubuh hitam keabuan, memiliki kepala yang pipih, tidak memiliki sisik, dan memili alat bantu pernapasan yang disebut *arborecent*. Insang pada ikan lele berukuran kecil yang terletak di belakang kepala. Jumlah sirip ikan lele sebanyak 68-79, di bagian sirip dada ada 9-10, di bagian sirip perut 5-6, di sirip dubur 50-60, dan memiliki 4 pasang sungut. Sirip dada dilengkapi dengan duri tajam patil yang memiliki panjang maksimum hingga mencapai 400 mm (Pratiwi, 2014). Giginya berbentuk villiform dan menempel pada rahangnya. Ikan ini juga mempunyai pigmen hitam yang berubah menjadi pucat bila terkena cahaya matahari. Memiliki dua buah lubang penciuman yang terletak di belakang bibir atas, sirip punggung dan anal memanjang sampai ke pangkal ekor, namun tidak menyatu dengan sirip ekor (Widodo, 2011).



Gambar 3. Morfologi ikan lele (*Clarias gariepinus*)
Sumber : dokumentasi pribadi

2.3 Klasifikasi, Morfologi dan Biologi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

2.3.1 Klasifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

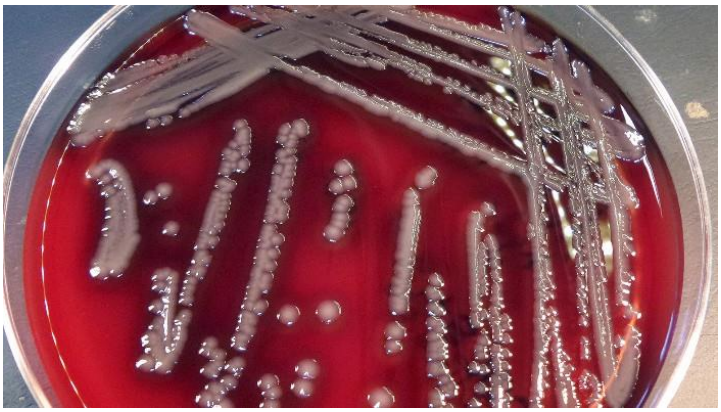
Dalam kegiatan budi daya wabah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat menyebabkan tingkat kematian yang tinggi akibat tingkat virulensi yang disebabkan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Menurut Holt (1994), bakteri ini memiliki klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut:

Phylum : Protophyta
Class : Schizomycetes
Ordo : Pseudanonadales
Famili : Vibrionaceae
Genus : *Aeromonas*
Species : *Aeromonas hydrophila*

2.2.2 Morfologi dan Biologi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis terdiri dari 12 lapisan, sehingga memiliki pori-pori pada dinding Gram negatif cukup besar (Firnanda, 2013). Menurut Sarkar (2012), beberapa bakteri dari golongan Gram negatif tidak mengeluarkan cairan racun, tetapi membuat endotoksin yang dilepaskan apabila sel mati atau pecah. Endotoksin merupakan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri. Bakteri ini juga menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menyerang ikan yang sehat

(Afrianto *et al.*, 2015). Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang mengandung lipid, lemak, atau zat seperti lemak dengan persentase yang lebih tinggi. Bakteri *Aeromonas hydrophila* dicirikan oleh benang sari pendek berdiameter 0,3-1,0 µm dan panjang 1,0-3,5 µm. Sel terdapat dalam bentuk uniseluler atau berkelompok dan bersifat aerob dan anaerob, bebas spora, motil, flagela, dan hidup pada kisaran suhu 27^0C (Aoki, 2016) (Gambar 4).



Gambar 4. Isolasi *Aeromonas hydrophila* dalam media selektif
Sumber: Nugroho (2018)

Menurut Mulia (2010), gejala penyakit *Aeromonas hydrophila* pada jenis ikan air tawar menunjukkan bintik-bintik merah atau luka kecil di satu bagian tubuh dan sirip dengan sirip geripis (patah). Bintik-bintik merah muncul di beberapa bagian tubuh. Beberapa bintik merah bergabung dan melebar, bahkan menjadi nekrotik atau keropeng dan kulit bersisik, mata menonjol (*bulging eyes*) pada salah satu atau kedua mata, perut bengkak dengan cairan kuning, anus kemerahan, dan tinja keluar. Gejala internal menunjukkan pendarahan pada ginjal, empedu dan saluran cerna. Selain itu, cairan kuning ditemukan di perut. Perdarahan yang terjadi pada pangkal sirip punggung, pangkal sirip ekor, dan *operculum* disebabkan oleh toksin hemolisin yang merusak sel darah merah sehinga sel meninggalkan pembuluh darah menyebabkan warna kemerahan pada permukaan kulit.

2.4 Sistem Kekebalan Pada Ikan

2.4.1 Komponen Sistem Imun Nonspesifik

Sistem imun nonspesifik juga sering disebut dengan *innate immunity* yang merupakan sistem pertahanan tubuh garis depan saat tubuh terpapar benda asing (Aprianto, 2019). Sistem imun nonspesifik ikan terdiri dari penghalang fisik (mukus, kulit, dan sisik), pertahanan humoral, dan sel-sel fagositik. Mukus memiliki kemampuan menghambat kolonisasi mikroorganisme. Selain itu juga mukus mengandung imunoglobulin (IgM) yang dapat menghancurkan patogen. Adapun kulit dan sisik merupakan pelindung fisik yang melindungi ikan dari kemungkinan luka. Pertahanan nonspesifik utama lainnya berupa sel-sel fagositik, yang terdiri dari monosit/makrofag, granulosit (sel leukosit: neutrofil, basofil, dan eosinofil) dan sel NK (*natural killer*) (Rahmaningsih, 2018). Sel fagosit akan mengenali dan memakan bakteri dan sel-sel inang yang rusak melalui tiga tahapan proses yaitu pelekatan, fagositosis, dan pencernaan.

2.4.2 Komponen Sistem Imun Spesifik

Sistem imun spesifik sering disebut dengan sistem imun *adaptive* yang merupakan sistem imun yang mengenali antigen khusus dengan antibodi yang diproduksi sel limfosit. Sistem imun *adaptive* juga terdapat dua mekanisme, yaitu respon humoral diperantarai oleh antibodi yang diproduksi oleh sel limfosit B (Ode, 2013). Adapun imunitas *adaptive* seluler diperantarai oleh limfosit T yang berperan melakukan destruksi sel-sel yang terinfeksi mikroba secara intraseluler. Antibodi akan disintesis ketika ada respon dari luar berupa antigen yang kemudian dipresentasikan oleh sel-sel yang bertugas mempresentasikan antigen (*antigen presenting ce'lls*, APCs), antara lain makrofag, sel-sel dendrit dan *lymphocyte B* (sel B). APCs akan mempresentasikan epitop (determinan antigen) kepada sel T *helper* melalui molekul MHC (*major histocompatibility comnplex*) kelas II (Kropshofer *et al.*, 2007).

2.5 Imunostimulan

Imunostimulan merupakan bahan yang mampu meningkatkan mekanisme respon imun nonspesifik ikan (Sonida *et al.*, 2014). Dalam bidang akuakultur, penggunaan imunostimulan dapat mengaktifkan sistem kekebalan tubuh ikan dan membantu melawan patogen pembawa penyakit. Ikan memiliki sistem kekebalan tubuh nonspesifik dan spesifik baik humoral maupun seluler. Komponen yang terlibat dalam kekebalan seluler pada ikan adalah sel fagosit, neutrofil, sel *natural killer* dan sel limfosit, sedangkan yang terlibat dalam kekebalan humoral terdiri dari lysozyme, hemolisin, molekul imunoglobulin, dan komplemen. Pemberian imunostimulan pada ikan dapat meningkatkan kemampuan fagositosis, stimulasi sitokin dari limfosit, kerja sama antara komponen humoral dan seluler, meningkatkan respon antibodi dan komplemen (Wang *et al.*, 2016). Metode pencegahan penyakit pada ikan dinilai lebih aman dengan menggunakan imunostimulan yang ramah lingkungan dan dapat menciptakan budi daya perikanan yang berkelanjutan.

Sistem imun pada ikan lele terletak pada organ *lymphoid* primer dan sekunder. *Tymus* dan bagian anterior pada ginjal merupakan organ *lymphoid* primer. Organ ini berfungsi untuk haemotopoiesis dan pembentukan *predetermined lineages* dari sel tertentu. Organ sekunder pada teleost bertanggung jawab terhadap pembentukan respon imun terhadap antigen spesifik, melibatkan interaksi berbagai sel. Respon imun pada ikan terdiri dari imunitas alami dan imunitas spesifik. Pengamatan gambaran darah ikan pada ikan lele biasanya meliputi hematokrit, hemoglobin, sel darah merah, sel darah putih, dan diferensial lekosit (Nafiqoh *et al.*, 2019). Imunitas alami pada ikan lele meliputi juga fisik, seluler, dan humoral. Fisik pada ikan lele yaitu kulit dan mukus. Pertahanan seluler yaitu sel fagosit, sedangkan humoral meliputi lisosim, antimikrobial peptide, komplemen, transferin, laktoferin, interferon, fibronektin, dan interleuktin.

Efisiensi imunostimulan sangat dipengaruhi oleh waktu pemberian, dosis, dan cara pemberian. Imunostimulan dapat diberikan secara terpisah atau bersamaan dengan vaksin. Bila diberikan sebelum vaksinasi, bertujuan agar sistem kekebalan tubuh sudah aktif dan siap terpapar oleh antigen vaksin. Dosis imunostimulan

yang diberikan dapat memengaruhi kemanjuran dan potensi imunostimulan. Pemberian imunostimulan melalui injeksi dapat menstimulasi kekebalan protektif yang memberikan manfaat pencegahan penyakit ikan dalam akuakultur. Metode pemberian melalui oral tidak menimbulkan stres bagi ikan dan mampu meningkatkan fungsi leukosit dan proteksi terhadap penyakit infeksius seperti *furunculosis*, *vibriosis*, dan *streptococcosis*. Metode ketiga yang juga mampu mengaktifkan fagositosis adalah pemberian melalui perendaman dengan larutan imunostimulan.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Mei 2022. Tempat pelaksanaan penelitian ini di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini dapat dilihat pada uraian Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian

No.	Alat	Fungsi
1	Kontainer	Wadah pemeliharaan ikan.
2	Blower	Alat untuk mensuplay kebutuhan oksigen.
3	Aerasi	Penghasil oksigen.
4	Timbangan digital	Untuk mengukut bobot ikan.
5	Baskom	Tempat pencampuran pakan ikan.
6	Nampan	Tempat pengeringan pakan ikan.
7	Alat bedah	Alat untuk membedah ikan.
8	Botol spray	Menyemprotkan ekstrak TT ke pakan.
9	Autoklaf	Sterilisasi alat dan bahan yang diperlukan.
10	Botol sampel	Wadah sampel histologi.
11	pH meter	Alat pengukur pH air.
12	DO meter	Alat pengukur DO.
13	*Petri dish*	Wadah kultur bakteri dan uji *in vitro*.
14	*Haemocytometer*	Alat penghitung sel darah putih.
15	*Vacum evaporator*	Alat penguap filtrat.
16	*Sentrifuge*	Pemisah komponen sel darah.
17	Preparat ulas	Untuk meletakkan objek mikroskop.
18	Tabung hematokrit	Mengukur persentase sel darah merah dalam darah.
19	Mikroskop	Untuk mengamati sel darah.

Tabel 1. Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian (lanjutan)

No.	Alat	Fungsi
20	Erlenmeyer	Untuk mencampur cairan dan membuat media.
21	Tebung reaksi	Penampung reaksi kimia.
22	Gelas ukur	Untuk mengukur cairan.
23	Jarum *ose*	Memindahkan biakan bakteri ke media kultur.
24	Bunsen	Alat pembakar.
25	*Hot plate*	Alat untuk memanaskan larutan.
26	Tabung EDTA K3	Tabung pemeriksaan darah.
27	Jaring	Menutup bagian atas kontainer.
28	*Laminary flow*	Meja kerja steril untuk kegiatan kultur bakteri.
29	*Vortex*	Alat pencampur larutan.
30	Spuit 1ml	Mengambil darah ikan dan menyuntikkan bakteri.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1	Ikan lele	Ikan uji.
2	Simplisia *T. Terrestris*	Bahan yang digunakan untuk ekstrak.
3	Media GSP	Media selektif bakteri *A. hydrophila*.
4	Media TSA	Media tumbuh bakteri.
5	Media TSB	Media tumbuh bakteri.
6	Akuades	Pelarut bahan kimia.
7	Etanol 90%	Larutan fiksatif histologi.
8	Alkohol 70%	Sebagai antiseptik.
9	*Oxytetraxyclin*	Antibiotik.
10	Isolat *A. hydrophila*	Bakteri uji.
11	Pelet komersil	Pakan buatan.
12	Larutan giemsa	Pewarna pada eritrosit.
13	EDTA	Antikoagulan darah.
14	Methanol	Larutan fiksatif darah.
15	Larutan Turk’s	Memberi warna pada leukosit.
16	Formalin 10%	Bahan pengawet histologi.
17	Etanol 96%	Bahan pelarut kimia.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu metode rancangan acak lengkap (RAL). Percobaan penelitian terdiri dari 4 perlakuan dan 3 ulangan. Adapun perlakuan dan rancangan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Perlakuan A : Ekstrak *Tribulus terrestris* 0 mg/kg pakan

Perlakuan B : Ekstrak *Tribulus terrestris* dosis 200 mg/kg pakan

Perlakuan C : Ekstrak *Tribulus terrestris* dosis 400 mg/kg pakan

Perlakuan D : Ekstrak *Tribulus terrestris* dosis 600 mg/kg pakan

Model rancangan acak lengkap (RAL) yang digunakan adalah:

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

Keterangan:

Y_{ij} : nilai pengamatan pada perlakuan ke-i, ulangan ke-j

μ : nilai tengah umum

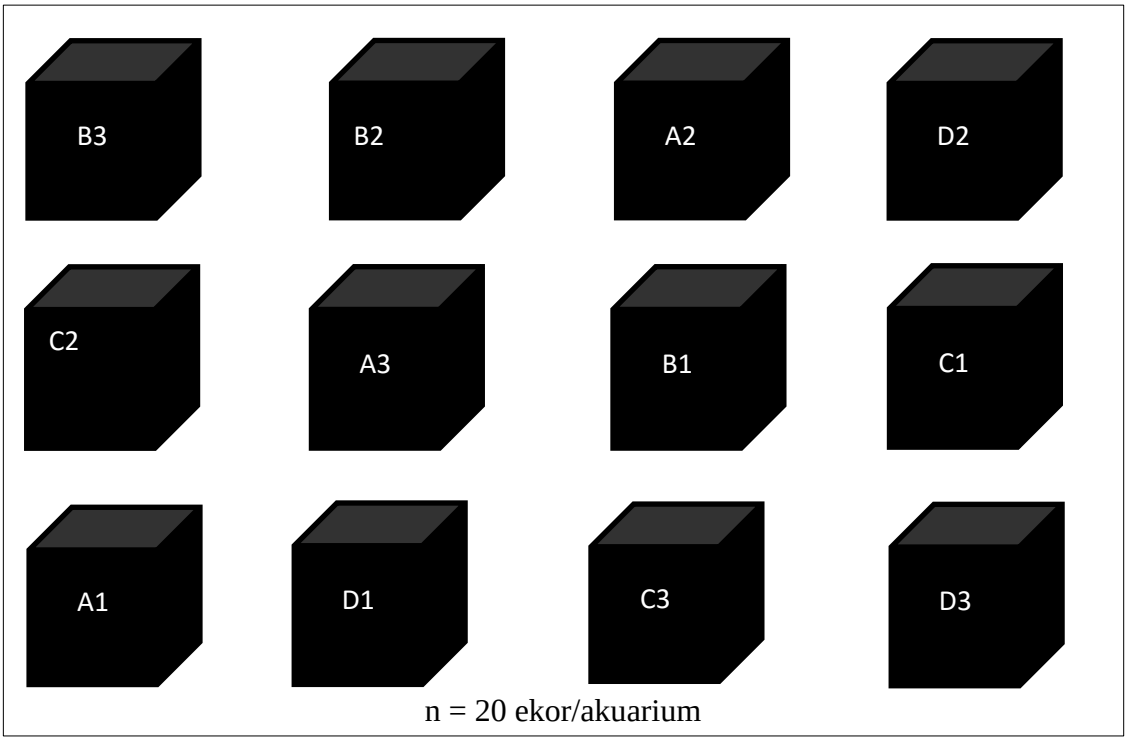
τ_i : pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

i : banyaknya perlakuan

j : banyaknya ulangan

Tata letak wadah pemeliharaan pada penelitian ini sebagai berikut:



Gambar 5. Tata letak wadah pemeliharaan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi *Tribulus terrestris*

Pembuatan ekstrak *Tribulus terrestris* dilakukan dengan menggunakan etanol analis Emsure 96% dan simplisia *Tribulus terrestris* Flozindo (Putri, 2021). Proses pembuatan ekstrak yaitu dengan dicampurkan simplisia *Tribulus terrestris* yang telah di ayak dan di timbang 100 g dengan etanol analis Emsure 96% yang telah diencerkan menjadi 90% sebanyak 1 liter di dalam toples kaca. Kemudian diletakkan di atas *waterbath* dengan teknik maserasi suhu panas 70-80^0 C dan diaduk selama ±2 jam hingga tersuspensi. Langkah selanjutnya larutan didinginkan dan disaring dengan kertas saring. Larutan yang telah disaring diekstrak dengan *rotary vacum evaporatory*. Setelah dievaporasi ekstrak diletakkan dalam botol gelap yang ditutup menggunakan parafilm yang telah dilubangi dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20^{0}C. Ekstrask *Tribulus terrestris* dapat digunakan setelah masa inkubasi minimal 2 hari.

3.4.2 Persiapan Wadah Ikan Uji

Wadah yang digunakan adalah kontainer dengan ukuran 45 liter sebanyak 12 buah dan berisi 20 ekor ikan setiap wadah pemeliharaan. Sebelum digunakan, kontainer disterilisasi dengan cara dibersihkan dengan spons, dan dibilas dengan air bersih, kemudian dilakukan pengeringan selama 1 hari. Selanjutnya masing-masing kontainer diisi air dengan volume 30 liter air dan ditambahkan humus star sebagai *water conditioner*. Setelah diisi air, dimasukkan aerasi yang diletakkan di tengah kontainer dengan menyesuaikan kebutuhan ikan. Setiap kontainer diberi label atau kode untuk membedakan setiap perlakuan dalam wadah pemeliharaan. Wadah pemeliharaan dipastikan aman dan jauh dari sumber kontaminasi untuk meminimalisir kegagalan penelitian.

3.4.3 Persiapan Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan lele berukuran 12 cm dengan bobot rata-rata 18,5±2,12 g dan dipilih berdasarkan kriteria yang memiliki keseragaman ukuran, bergerak aktif, kelengkapan organ tubuh, dan kesehatan secara fisik. Sebelum diberikan perlakuan, ikan uji diaklimatisasi terlebih dahulu untuk mengurangi stres. Ikan uji yang telah diseleksi, dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan selama 1 minggu untuk adaptasi terhadap lingkungan baru.

3.4.4 Persiapan Pakan Uji

Pakan yang digunakan pada penelitian ini adalah pakan komersial MS Prima Feed PF 1000 dengan kandungan protein 28-30%. Pencampuran ekstrak *Tribulus terrestris* dilakukan dengan pencampuran ekstrak *Tribulus terrestris* sesuai dosis 200, 400 dan 600 mg/kg dengan ethanol 90% (Turnip, 2021), agar pakan tidak mudah larut dalam air. Selanjutnya larutan disemprotkan pada pakan dan dikeringanginkan dalam suhu ruang. Pakan disimpan dalam suhu -20^{0}C dan dipisahkan wadah antar perlakuan, kemudian diberi label.

3.4.5 Pemeliharaan Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan sebanyak 240 ekor yang dipelihara dalam kontainer selama 28 hari. Setiap kontainer diisi dengan 20 ekor ikan sesuai dengan perlakuan. Sebelum dilakukan perlakuan, ikan uji dipuasakan selama satu hari agar ikan lebih konsumtif saat pemberian pakan. Pemberian pakan dilakukan dengan metode *at satiation* dengan frekuensi pemberian pakan dua kali sehari, yaitu pukul 08.00 dan 17.00 WIB selama 28 hari.

3.4.6 Uji Tantang

Uji tantang bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan setelah 14 hari masa pemeliharaan ikan uji dan telah diberi pakan dengan ekstrak *Tribulus terrestris* sesuai dosis. Ikan diuji tantang sebanyak 137 ekor dengan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* sebanyak 0,1 ml/ekor secara injeksi dengan konsentrasi bakteri

sebesar 10^8 cfu/ml. Setelah uji tantang dilanjutkan analisa gejala klinis dan kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* hingga masa pemeliharaan selesai.

3.5 Parameter Penelitian

3.5.1 Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis pada ikan dilakukan setiap hari setelah ikan diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Pengukuran terhadap gejala klinis dilakukan dengan mengamati perubahan morfologi pada tubuh ikan, keseimbangan tubuh dan organ, tingkah laku, dan respon terhadap pakan.

3.5.2 Aktivitas dan Indeks Fagositosis

Pengamatan dilakukan dengan memasukkan sampel darah yang sudah diambil sebanyak 50 µl dalam tube dan ditambahkan sebanyak 50 µl isolat *Aeromonas hydrophila,* lalu di *vortex* hingga homogen dan diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya dibuat sediaan ulas darah dengan mengambil larutan darah dan dikeringkan. Preparat ulas darah yang sudah kering difiksatif dengan metanol selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan giemsa selama 25 menit. Setelah itu dibilas dengan akuades dan keringkan. Preparat ulas diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400×. Perhitungan sel fagositik dilakukan dengan cara mengamati sel-sel yang telah memfagosit bakteri hingga berjumlah 100 sel. Perhitungan aktivitas fagositosis menurut Anderson & Siwicki (1995), adalah sebagai berikut:

$$AF = \frac{\text{Jumlah sel fagosit}}{\text{Jumlah sel yang diamati}}\ x\ 100\%$$

$$IF = \frac{\text{Jumlah bakteri yang difagosit}}{\text{Jumlah sel fagosit}}$$

3.5.3 Total Leukosit

Umumnya ikan yang diberi perlakuan memiliki total leukosit yang mendekati normal pada hari ke-14 pasca uji tantang. Prosedur perhitungan jumlah leukosit diukur menurut Blaxhall dan Daisley (1973), pertama darah sampel dihisap dengan pipet yang berisi bulir pengaduk berwarna putih sampai skala 0, 05 lalu ditambahkan larutan Turk's sampai skala 11, pipet diayun membentuk angka 8 (sama dengan pengadukan untuk penghitungan jumlah sel darah merah) selama 5-15 menit sehingga darah bercampur rata. Setelah itu, dua tetes pertama larutan darah dari dalam pipet dibuang, kemudian diteteskan larutan pada *haemocytometer*, setelah itu ditutup dengan *cover glass*. Cairan akan memenuhi ruang hitung secara kapiler. Jumlah sel darah putih atau leukosit total dihitung dengan bantuan mikroskop dengan perbesaran 400×. Jumlah leukosit total dihitung dengan cara menghitung sel yang terdapat dalam 4 kotak kecil.

$$\sum \text{Total leukosit} = \frac{\text{N x P}}{\text{V}}$$

Keterangan:

N : Total leukosit pada 4 kotak hitung

V : Volume

P : Pengenceran

3.5.4 Kadar Hematokrit

Hematokrit adalah angka yang menujukkan persentase zat padat dalam darah terhadap cairan darah. Hematokrit digunakan mengukur perbandingan antara eritrosit dengan plasma, sehingga hematokrit memberikan rasio total eritrosit dengan total volume darah dalam tubuh (Putranto, 2019). Pengukuran hematokrit dilakukan dengan memasukkan sampel darah dalam tabung mikro hematokrit sampai kira-kira 4/5 bagian tabung. Ujungnya yang bertanda merah disumbat dengan *cristo-seal* kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm. Setelah itu diukur persentase dari nilai hematokrit. Kadar hematokrit dinyatakan

sebagai persen volume padatan sel darah (Dosim, 2013). Perhitungan rumus ditentukan dengan perhitungan (Royan *et al*., 2014) adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar hematokrit} = \frac{Panjang\ volume\ sel\ darah\ merah\ yang\ mengendap}{Panjang\ total\ volume\ darah\ dalam\ tabung}\ x\ 100\%$$

3.5.5 Tingkat Kelangsungan Hidup (*Survival rate*)

Perhitungan tingkat kelangsungan hidup dilakukan setelah masa peneliharaan berakhir. Tingkat kelangsungan hidup atau *survival rate* dapat dihitung dengan menggunakan persamaan menurut Effendi (2002) adalah sebagai berikut:

$$\text{SR} = \frac{Nt}{N0}\ \text{x}\ 100\%$$

Keterangan:

Nt :Jumlah ikan hidup pada akhir penelitian (ekor)

N0 :Jumlah ikan hidup pada awal penelitian (ekor)

3.5.6 Rerata Waktu Kematian (*Mean Time to Death*/MTD)

Rerata waktu kematian atau *mean time to death* diamati setelah uji tantang. Rerata waktu kematian dapat dihitung dengan menggunakan persamaan menurut Dwiyono (1999) adalah sebagai berikut:

$$\text{MTD} = \frac{\sum \text{ai.bi}}{\sum \text{bi}}$$

Keterangan:

a : waktu kematian (hari)

b : jumlah kematian ikan setiap waktu pengamatan (ekor)

3.5.7 Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor penting dalam budi daya ikan. Selama masa pemeliharaan pengukuran kualitas air digunakan sebagai penguat data penelitian. Pengamatan kualitas air meliputi suhu, pH, dan oksigen terlarut yang diukur pada pagi atau sore hari. Pergantian air (penyiponan) dalam kontainer

pemeliharaan dilakukan tiga hari sekali sebanyak 10% untuk mengurangi kotoran dalam air.

3.5.8 Analisis Data

Data pengamatan gejala klinis dan kualitas air dianalisis secara deskriptif. Selanjutnya data parameter kuantitatif yang diamati berupa tingkat kelangsungan hidup, rerata waktu kematian, pengamatan aktivitas dan indeks fagositosis, pengamatan total leukosit dan kadar hematokrit yang ditabulasi menggunakan *software* Microsoft Excel 2013 dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) dan apabila berbeda nyata akan diuji lanjut dengan menggunakan uji Duncan dengan selang kepercayaan 95% dengan *software* SPSS Statistics 20.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, suplementasi ekstrak *Tribulus terrestris* sebagai imunostimulan dalam pakan pada ikan lele yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* terbukti memberikan pengaruh nyata terhadap parameter imun nonspesifik seperti aktivitas fagositosis, indeks fagositosis, total leukosit, dan kadar hematokrit.

5.2 Saran

Saran yang diberikan dari hasil penelitian ini yaitu penggunaan dosis terbaik *Tribulus terrestris* sebesar 200 mg/kg dapat diaplikasikan sebagai pencegahan infeksi bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dengan pertimbangan mampu meningkatkan aktivitas fagositosis serta lebih efisien dalam penggunaan jumlah ekstrak tribulus.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

Afrianto, E & Liviawaty, E. 2015. *Penyakit Ikan*. Penebar Sawadaya. Jakarta. 220 hlm.

Alexander, C. P., Kirubakaran, C. J. W & Michael, R.D. 2010. Water soluble Fraction of tinospora cordifolia leaves enhanced the non spesific immune mechanism and disease resistance in *Oreochromis mossambicus. Journal Fish & Shellfish Immunology*. 30(3): 1-8.

Anderson, D. P & Siwicki, A.K. 1974. *Fish Imunology in Disease of Fish*. Hongkong : TFH Unlication, Inc Led. 299 hlm.

Anderson, D. P & Siwicki, A.K. 1995. Basic hematology and serology for fish health program. Paper presented in second symposium on diseases in Asia Aquaculture II. *Journal of Aquatic Animal Health and Environment*. 185-202.

Aoki, T. 2016. *Motile Aeromonas (Aeromonas hydrophila) Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Wallingford. CABI Publishing U.K. 385 hlm.

Aprianto, S. 2019. *Identifikasi dan Prevalensi Virus KHV (Koi Herver Virus) pada Ikan Mas (Cyprinus carpio) dengan Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction).* (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Pontianak. Pontianak. 28 hlm.

Arindita C & Prayitno, S. B. 2014. Pengaruh penambahan serbuk lidah buaya *(aloe vera)*dalam pakan terhadap kelulus hidupan dan profil darah ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management*. 3 (1): 66-75.

Azhar, F & Dyke, G. W. 2019. Pelatihan penanganan Streprococcus pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menggunakan pakan fermentasi di Desa Gontoran Lingsar. *Jurnal Abdi Insani*. 6 (2): 229-240.

Blaxhall, P.C & Daisley, K. W. 1973. Routine haematological methodes for use with fish health. *Journal of Fish Biology.* 5(1): 577-581.

Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D. & Sathaye, S. 2014. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrretris*. *Pharmacognosy Review*. 8(15): 1-45.

Damayanti, D & Tanbiyaskur. 2022. *Kajian Penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) pada Udang Vaname (Litonenaeus vannamei) yang Dibudi dayakan di Air Rawa*. (Skripsi). Universitas sriwijaya. 32 hlm.

Dimitrova, Z. 2012. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris* a natural product in infertity therapy. *Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 4 (4): 508-511.

Dosim., Hardi, E. H., & Agustina. 2013. Efek penginjeksian produk intraseluler (icp) dan ekstraseluler (ecp) bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap gambaran darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. 19 (1): 24-30.

Dwiyono, J. 1999. *Perkembangan Daya Tahan Lele Dumbo (Clarias gariieinus) yang Divaksin Aeromonas hydrohila dengan Jenis Antigen-H dan Antigen-O*. (Skripsi). Fakultas Pertanian, Jurusan Perikanan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 56 hlm.

Effendi, H., Utomo, B. A., Darmawangsa, G.M & Karo-karo, R.E. 2015. Fitoremediasi limbah budidaya ikan lele (*Clarias* sp.) dengan kangkung (*Ipomea aquatic*) dan pakcoy (*Brassica rapa chinensis)* dalam sistem resirkulasi. *Jurnal Ecolab*. 9 (2): 47-104.

Effendi, M. I. 2002. *Biologi Perikanan Cetakan Kedua*. Yayasan Pustaka Nusantama. Yogyakarta. 163 hlm.

Fajriani, A., Hastuti, S & Sarjito. 2017. Pengaruh serbuk jahe pada pakan terhadap profil darah, pertumbuhan, dan kelulusidupan ikan patin (*Pangasius* sp.). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 6 (4): 39-48.

Firnanda, R., Sugito., Fakhrurrazi & Sri. A. 2013. Isolasi *Aeromonas hydrophila* pada sisik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi tepung daun jaloh (*Salix tetrasperma roxb*). *Jurnal Medika Veterinaria*. 7 (1): 22-24.

Froese, R & Pauly, D. 2022. *FishBase*. World Wide Web Electronic Publication.

Garrepally, P., Reddy, G. A., Srinivas, P., Bontha, V. K., Vemula, S. K., Chilukkala, S., Challa, S. R & Sanka, K. 2011. Evaluation of *Tribullus terrestris* mucilage as suspending agent. *Journal of Apllied Pharmaceutical Science*. 32(1) 91-98.

Ginting, K. D., Morina, R & Henni, S. 2021. Diferensiasi leukosit ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang diberi pakan mengandung kunyit (*Curcuma*

domestica Val.) dan diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquatic Science*. 9(2):116-125.

Gultepe, N., Umit, A., Osman, S. K., Sevdan, Y., Onder, Y & Ali, T. 2014. Effect of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, hematological, immunological and biochemical variables of nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture*. 66(3): 9.

Hanan, S. 2019. *Ratusan Ikan Mendadak Mati Diduga Karena Bakteri*. https://-www.pikiran-rakyat.com.htm. Diakses 12 Agustus 2022.

Haryani, A & Granduosa, R. 2012. Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan.* 3 (3): 213–220.

Hermawan, A. T., Iskandar & Ujung. S. 2012. Pengaruh padat tebar terhadap kelangsungan hidup pertumbuhan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) di kolam Kali Menis Indramayu. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3(3): 85-93.

Holt, J.G., Krieg, N. R & Snealt, P.H.A. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Edisi 9. United Stated of America: Lippincot. William & Wilkins, Maryland. 143 hlm.

Kroshofer, H & Vogt, A., B. 2007. Antigen presenting cell (APCs) in meyers immunology from cell biology to diesease. *JVHCVerlag*. 11(1): 43-91.

Mangunwardoyo, W & R. Ismayasari. 2010. Uji patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus Lin.*) melalui postulat koch. *Jurnal Riset Akuakultur*. 5 (2): 245-255.

Maryani, M & Rosdiana, R. 2020. Peranan imunostimulan akar kuning (*Arcangelisia flava merr*) pada gambaran aktivitas sistem imun ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 8(1): 22-36.

Mastuti, R. 2017. Pengobatan penyakit MAS (*motile aeromonas septicaemia*) dengan ekstrak daun mangrove (*Rhizophora* Sp.) pada ikan jambal siam (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan*. 5(1): 12.

Mulia, D. S. 2010. Isolasi, Karakterisasi, identifikasi bakteri *Aeromonas s*p. penyebab penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) pada gurami. *Jurnal Sains Akuatik.* 13(2): 9-17.

Mulia, D. S., Cintya, W & Heri, M. 2016. Imunogenitas heat killed *Aeromonas hydrophila* strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 sebagai kandidat vaksin. *Techno (Jurnal Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Purwokerto)*. 17(2): 94-100.

Nafiqoh, N., Lila, G & Desy, S. 2020. Potensi kombinasi tanaman obat herbal sebagai bahan pengendali penyakit bakteri, jamur, dan parasit pada ikan. *Jurnal Media Akuakultur*. 15(2): 105-111.

Ningtyas, R. 2010. *Uji Antioksidan, Antibakteri Ekstrak Air Daun Kecombrang (Etlingera elatior (Jack) R. M. Smith) sebagai Pengawet Alami terhadap Escherchia coli dan Staphylococcus aureus*. (Skripsi). Universitas Islam Negri Syarif Hidayatullah, Jakarta. 84 hlm

Nugroho, M. 2018. Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele. https://www-.sangkutifarm.com/bakteri-aeromonas-pada-ikan-lele.htm. Diakses 31 Oktober 2022.

Ode, I. 2013. Kajian imunitas untuk pengendalian penyakit pada ikan dan udang. *Jurnal Agribisnis Perikanan*. 6(2): 41-43.

Olga. 2012. Patogenitas bakteri *Aeromonas hydrophila* ASB01 pada ikan gabus (*Ophicephalus striatus*). *Jurnal Sains Akuatik*. 14(1): 33-39.

Olga., Siti, A & Dwi, M. 2020. Isolasi, Karakteristik dan identifikasi bakteri *Aeromonas* spp. pada ikan patin siam (*Pangasius hypophthalamus*) berpenyakit di Kabupaten Banjar. *Prosiding Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan*. 3(1): 23-31.

Pasaribu, W & Asriati, D. 2021. Kajian pustaka: penggunaan bahan herbal untuk pencegahan dan pengobatan penyakit bakterial ikan air tawar. *Jurnal Bahari Papadak*. 2(1): 41-52.

Payung, C. N & Henky, M. 2019. Peningkatan respon kebal non-spesifik dan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui pemberian jahe *Zingiber officinale*. *Jurnal Budidaya Perairan*. 3(1): 23-28.

Perveen, A., Abid, R & Fatima R. 2007. Stomatal types of some dicots within flora of Karachi, Pakistan. *Journal of Biological Sciences*. 39(4): 1017-1023.

Pratama, R. C., Rosidah, S & Rustikawati, I. 2017. Efektifitas ekstrak biji rambutan dalam mengobati benih ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 8(1): 130-138.

Pratiwi, W. 2017. *Perbedaan Uji Kepekaan Bakteri Saphylococcus Aureus Menggunakan Mediamueller Hintonagar dan Nutrient Agar terhadap Antibiotik Eritromisin, Vancomysin, dan Chloramphenicol*. (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang. 54 hlm.

Pujiastuti, N. 2015. *Identifikasi dan Prevalensi Ektoparasit pada Ikan Konsumsi di Balai Benih Ikan Siwarak*. (Skripsi). Universitas Negri Semarang. Semarang. 58 hlm.

Purba, A.M., Morina, R & Henni, S.2020. Sensitifitas larutan daun ketapang (*Terminalia catappa L*.) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 25(2): 116-122.

Putranto, W. 2019. *Gambaran Darah Ikan Nila (Oreochromis niloticus) yang Diberikan Pakan Bercampur Ekstrak Cair Daun Salam (Syzygium polyanthum)* (Skripsi). Universitas Bangka Belitung. Bangka Belitung. 25-63 hlm.

Putri, A. Y. 2021. *Nisbah Kelamin dan Performa Budidaya Nila (Oreochromis niloticus) dengan Ekstrak Biji Tribulus (Tribulus terrestris).* (Skripsi). Universitas Lampung. Lampung. 53 hlm.

Rahmaningsih, S & Zenuddin, M. 2018. Gambaran hematokrit darah ikan lele sangkuriang (*Clarias gariepinus*) yang diberi pakan serbuk daun majapahit (*Cresentia cujete esentia cujete* L.) dan diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila. Jurnal Kelautan dan Perikanan Terapan*. 1 (2): 63-67.

Rizkiyah, U. 2018. *Pengaruh Pemberian Multivitamin dalam Pakan terhadap Respon Imun Non-Spesifik Ikan Lele Dumbo* (*Clarias gariepinus*). (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto. 67 hlm.

Royan, F., Rejeki, S & Haditomo, A. H. C. 2014. Pengaruh salinitas yang berbeda terhadap profil darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology.* 3(2): 109-117.

Sandi, K. 2021. *Pengaruh Vitomolt Plus sebagai Feed Additive Fungsional Terhadap Imunitas dan Sintasan Ikan Nila (Oreochromis niloticus).* (Skripsi). Universitas Hasanuddin, Makassar. 72. hlm

Sari, E. T. P., Lukistyowaty, L & Aryani, N. 2012. Pengaruh pemberian temulawak *(Curcuma xantrhorriza Roxb*) terhadap kelulusanhidupan ikan mas (*Cyprinus Carpio L*) setelah diinfeksi *Aeromonas hydrophila. Jurnal Perikanan dan Kelautan* 17 (2): 43-59.

Sarkar. A. 2012. *Facettes de Glycobioinformatique : Applications á l'étude des Interactions Protéines-Sucres.* (These). Université de Grenoble. Français.

Sihotang. D. M. 2018. Penentuan kualitas air untuk perkembangan ikan lele sangkuriang menggunakan metode *fuzzy* SAW. *Jurnal Nasional Teknik Elektro dan Teknologi Informas*i. 7(4): 372-376.

Sonida, A., Esti, H & Tarsim. 2014. Deskripsi respon imun non-spesifik kakap putih (*Lates calcarifer)* yang diberi jintan hitam (*Nigella sativa*) dan uji tantang dengan *Viral Nervous Necrosis. Aquasains: Jurnal Perikanan dan Sumberdaya Perairan*. 3(1): 188-191.

Sugiani, D., Taukhid, T., Uni, P & Angele, M. L. 2018. Vaksin kering beku sel utuh bakteri *Aeromnas hydrophila* untuk pencegahan penyakit *motile aeromonas septicemia* pada ikan lele, nila dan gurami. *Jurnal Riset Akuakultur*. 13(2): 159-167.

Tilwari, A & Uma D. P. 2011. Immunomodulatory effect of fractions of saponins from *Tribulus terrestris* on non-specific immunity using *in vitro* phagocytosis. *Intenational Jurnal of Drug Discovery and Herbal Research (Ijddhr)*. 1(4): 202-207.

Turnip, D. M. S. 2021. *Performa Reproduksi Induk Lele Mutiara (Clarias gariepinus) Jantan yang Diberi Tribulus terrestris melalui Pakan*. (Skripsi). Universitas Lampung, Lampung. 55.

USDA Plant Database. 2014. *Classification of Tribulus terrestris* (Puncturevine).

Wang, W., Sun, J., Liu, C & Xue, Z. 2016. Review aplication of imunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspective. *Journal of Aquacullture Research*. 34 (1): 1-23.

Wari, L. H., Ayu, A. D & Fariq, A. 2020. Respon pemberian ekstrak daun mimba *Azadirachta indica* pada sistem imun ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture*. 5(1): 127-137.

Widodo, J. 2011. *Analisis Usaha Alternative Strategi Pengembangan Agribisnis Pembenihan Ikan Lele Dumbo di Kecamatan Ceper*. (Skripsi). Fakultas Peranian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 11 hlm.

Wintoko, F., Agus, S., Siti, H & Mahrus A. 2013. Imunogenitas head killed vaksin inaktif *Aeromonas Salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 2(1): 206-210.

Wulandari, R. 2014. *Efektivitas Ekstrak Daun Meniran (Phyllanthus niruri) secara Suntikan untuk Mencegah Infeksi Bakteri (Aeromonas hydrophila) pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus).* (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto. 31.

Yanuhar, U. 2012. Pengaruh pemberian bahan aktif ekstrak *Nannochloropsis oculata* terhadap kadar radikal bebas pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Ilmu Kelautan*. 1 (2): 185-191.

Yilmaz, S., Ergun, S., Kaya, H & Gurkan, M. 2014. Influence of *Tribulus terrestris* extract on the survival dan histopathology of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) fry before and after *Streptococcus iniae* infection. *Journal of Applied Ichthyology*. 51(2): 1-7.

Yuniastutik, T. 2019. Penentuan konsentrasi pewarna giemsa, waktu dan suhu inkubasi pada aktifitas fagositosis ikan lele (*Clarias* sp.) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyi*. *Jurnal Teknologi Manajemen Pengelolaan Laboratorium*. 2(1): 52-58.

Zainun, Z. 2017. Pengamatan parameter hematologis pada ikan mas yang diberi immunostimulan. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. 6 (1): 45-49.