

**Fitofarmaka Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Untuk Meningkatkan Imunitas Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal 1775) Terhadap Serangan Bakteri *Vibrio alginolyticus*
Etika Oktaviani^{*}, Esti Harpeni^{**}, Wardiyanto^{*}**

^{*} Program Studi Budidaya Perairan, Universitas Lampung

^{**} Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Lampung

ABSTRAK

Fitofarmaka di Indonesia sudah tidak asing lagi dan banyak dimanfaatkan untuk pengobatan-pengobatan tradisional. Tanaman sambung nyawa merupakan salah satu tanaman yang sudah banyak dimanfaatkan untuk pengobatan manusia karena memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat obat. Kandungan-kandungan tersebut seperti flavonoid, tannin, dan saponin. Selain untuk pengobatan manusia, daun sambung nyawa juga berpotensi untuk digunakan sebagai obat ikan dalam rangka pencegahan penyakit. Vibriosis merupakan salah satu penyakit bakterial yang disebabkan oleh *Vibrio alginolyticus* dan rentan menyerang ikan kerapu macan. Penggunaan antibiotik sintetik telah banyak digunakan tetapi menimbulkan banyak dampak buruk, sehingga perlu alternatif baru untuk pencegahan vibriosis. Salah satunya yaitu dengan penggunaan ekstrak daun sambung nyawa, hal ini didukung karena potensinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh ekstrak daun sambung nyawa untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan sehingga dapat mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Metode yang dilakukan meliputi ekstraksi bahan, uji fitofarmaka, uji *in vitro*, uji *in vivo*, uji hematologi, dan uji histopatologi. Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang paling efektif untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan dan mencegah serangan *Vibrio alginolyticus* adalah dosis 700 ppm.

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

Fitopharmaca in Indonesia is already familiar and is widely used for traditional treatments. *Gynura procumbens* is one of the plants that has been widely used for human medicine because it's secondary metabolites content that have medicinal properties. These ingredients are flavonoids, tannins and saponins. In addition to human medicine, the leaves of *Gynura procumbens* also have the potential to be used as fish medicine in order to prevent disease. Vibriosis is a bacterial disease caused by *Vibrio alginolyticus* and is susceptible to attacking tiger groupers. The use of synthetic antibiotics has been widely used but has many adverse effects, so it needs new alternatives for the prevention of vibriosis. One of them is the use of *Gynura procumbens* leaf extract, this is supported because of its potential. This study aims to examine the effect of *Gynura procumbens* extract to improve the body resistance of tiger grouper so that it can prevent the attack of *Vibrio alginolyticus* bacteria. The method carried out included material extraction, phytopharmaca test, *in vitro* test, *in vivo* test, hematology test, and histopathology test. The most effective dose of *Gynura procumbens* leaf extract to increase the body resistance of tiger grouper and prevent the attack of *Vibrio alginolyticus* is a dose of 700 ppm.

PENDAHULUAN

Dewasa ini pengobatan tradisional dengan fitofarmaka menjadi perhatian dunia. Darminto *et. al.* (2011) menyatakan bahwa di Thailand dan Filipina fitofarmaka telah dimanfaatkan sebagai bakterisida, fungisida, algasida, virusida, herbisida, dan pestisida. Fitofarmaka adalah sediaan obat yang berasal dari bahan herbal dan sudah teruji klinis (Irmawati & Primiani,

2017). Di Indonesia fitofarmaka telah dimanfaatkan untuk pengobatan manusia, tetapi belum banyak digunakan dalam budidaya perikanan. Salah satu bahan herbal yang dapat digunakan sebagai fitofarmaka adalah daun sambung nyawa. Nirwan (2007) melaporkan bahwa daun sambung nyawa merupakan tanaman obat yang banyak dimanfaatkan karena banyak khasiatnya. Secara tradisional daun sambung nyawa telah banyak digunakan sebagai obat antikanker.

Daun sambung nyawa berpotensi dapat menjadi antimikrobal karena memiliki kandungan flavonoid dan minyak atsiri. Telah dibuktikan oleh Rahman (2010) pada penelitiannya bahwa daun sambung nyawa dengan konsentrasi 10% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Rivai *et. al.* (2011) melaporkan bahwa daun sambung nyawa mengandung 67,094µg/mL flavonoid.

Berdasarkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang dimilikinya, daun sambung nyawa berpotensi untuk digunakan sebagai fitofarmaka dalam pencegahan penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan. Ikan kerapu macan merupakan komoditas unggul air laut, bahkan saat harga tinggi harga jualnya dapat berkisar antara Rp250.000,00/kg hingga Rp350.000,00/kg bergantung pada kualitasnya (Saputra, 2018). Sementara, vibriosis menjadi kendala utama dalam budidaya ikan kerapu macan karena dapat menyebabkan kematian lebih dari 70% dalam suatu musim (Sahari, 2018), sehingga berdampak buruk pada produksi ekonomi. Penelitian yang dilakukan Hastari *et. al.* (2014) di Teluk Hurun Lampung menunjukkan bahwa *Vibrio alginolyticus* menjadi salah satu agen vibriosis yang berbahaya.

Penggunaan antibiotik untuk penyakit bakterial seperti vibriosis sudah banyak dilakukan, tetapi memiliki dampak yang buruk. Seperti yang telah dilaporkan oleh Andayani (2009) bahwa ternyata banyak dari antibiotik tersebut menimbulkan resistensi bakteri dalam penanggulangan penyakit. Selain itu, Sumayani & Cahyoko (2008) menambahkan bahwa penambahan antibiotik yang tidak terkontrol dan secara berkelanjutan dapat menyebabkan residu antibiotik pada produk perikanan yang dapat berdampak buruk bagi manusia. Alternatif lain yang dapat dilakukan yaitu menggunakan produk fitofarmaka untuk penanggulangan penyakit bakterial. Dengan demikian penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh ekstrak daun sambung nyawa untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan sehingga dapat mencegah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

MATERI DAN METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan asumsi individu sebagai ulangan. Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu macan yang berukuran panjang rata-rata 15 cm dengan bobot rata-rata 40 gr sebanyak 20 ekor setiap wadah percobaan berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm. Pengujian ekstrak dilakukan secara oral kepada ikan uji melalui pakan kemudian diuji tantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Kepadatan *Vibrio alginolyticus* yang diinjeksikan yaitu 10^8 CFU/mL sebanyak 0,1 mL/ekor secara intramuscular. Penentuan dosis ekstrak daun sambung nyawa pada pakan mengacu pada hasil uji *in vitro*. Sehingga diperoleh dosis setiap perlakuan pada uji *in vivo* yaitu:

A : 0 ppm

B : setengah dari dosis terbaik uji *in vitro*

C : dosis terbaik uji *in vitro*

D : dua kali lipat dari dosis terbaik uji *in vitro*

Ekstraksi Serbuk Daun Sambung Nyawa

Ekstraksi daun sambung nyawa dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Metode yang dilakukan mengacu pada Riadini (2015). Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan *vacuum rotary evaporator* IKA RV 10 produksi Jerman pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 75 rpm hingga diperoleh ekstrak kental berupa pasta.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan pada enam parameter, yaitu saponin, steroid, terpenoid, tannin, alkaloid, dan flavonoid. Sebelum dilakukan uji, ekstrak pasta daun sambung nyawa diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut methanol. Metode yang dilakukan yaitu memodifikasi pada Tasmin *et. al.* (2014) dan (Robinson, 1991).

Uji In Vitro

Uji *in vitro* yang dilakukan yaitu uji zona hambat dan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Dosis ekstrak yang digunakan yaitu 500, 600, 700, 800, 900, 1000, dan 1500 ppm. Uji zona hambat dilakukan dengan metode *paper disc diffusion agar* dengan *paper disc* produksi Jepang ukuran 8mm, sedangkan uji MIC mengacu pada Soelama *et. al.* (2015)

Uji Toksisitas

Uji toksisitas mengacu pada Sari, *et. al.*, (2016) dan Kaban *et. al.* (2016) dengan penggunaan dosis ekstrak mengacu pada hasil terbaik uji *in vitro*. Data pengujian toksisitas diperoleh dari analisis LC₅₀ yang dilakukan dengan analisis regresi (Arief *et. al.*, 2017).

Uji In Vivo

Pakan uji dibuat dengan menyempatkan ekstrak daun sambung nyawa dengan dosis berbeda sebanyak 100 mL ke dalam masing-masing pakan komersil ikan kerapu macan sebanyak 1 kg. Kemudian dicampur hingga rata dan dijemur hingga kering. Pemberian pakan uji dilakukan selama 14 hari kemudian diujiantang pada hari ke 15 dan pemeliharaan hewan uji dilakukan hingga hari ke 21 dengan pemberian pakan yang sama sesuai dosis perlakuan. Pemeliharaan hewan uji dikontrol pada kondisi kualitas air optimum. Parameter yang diamati meliputi gejala klinis, *survival rate* (SR), *relative percent survival* (RPS), profil hematologi dan histopatologi. Pengamatan gejala klinis memodifikasi pada Hastari *et. al.*, 2014 dan diamati setelah ikan uji diujiantang.

Pengamatan SR dan RPS juga dilakukan setelah ikan uji diujiantang dengan perhitungan mengacu pada Amend *et. el.* 1981.

$$SR\% = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

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

Keterangan : SR : Tingkat kelangsungan hidup (%)

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

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

RPS : Relative Percent Survival

Pengamatan hematologi meliputi pengamatan total leukosit, total eritrosit, dan diferensial leukosit. Metode pengamatan yang dilakukan yaitu meliputi pengambilan sampel darah yang mengacu pada Lestari *et. al.* (2017), perhitungan jumlah eritrosit perhitungan jumlah leukosit, dan perhitungan diferensial leukosit yang mengacu pada (Pal & Pal, 2006). Rumus perhitungan jumlah eritrosit yaitu:

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

Keterangan :

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

N : jumlah sel darah merah dalam 1 mm³ darah

Rumus perhitungan jumlah leukosit yaitu:

$$N = nx50$$

Keterangan :

n : jumlah sel darah putih yang terdapat dalam 64 kotak

N : jumlah sel darah putih dalam 1 mm³ darah

Perhitungan diferensial leukosit menurut Hartika (2014) yaitu sebagai berikut:

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

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

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

Pengamatan profil histopatologi dilakukan pada organ insang, hati, limfa, dan usus dengan metode yang mengacu pada Sumantri *et. al.* (2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Fitokimia

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sambung Nyawa

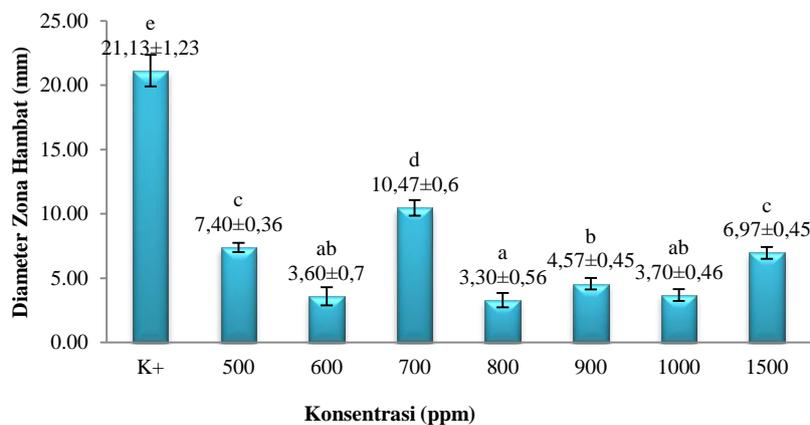
No.	Jenis Uji Kualitatif Fitokimia	Pereaksi	Hasil Positif	Hasil Uji
1	Saponin	Akuades, kemudian dikocok	Terdapat busa	+
2	Steroid	Asam asetat glacial dan H ₂ SO ₄	Warna menjadi biru atau ungu	-
3	Terpenoid	Asam asetat glacial dan H ₂ SO ₄	Warna menjadi merah atau kuning	-
4	Tanin	FeCl ₃ 10%	Warna menjadi hitam kebiruan	+
5	Alkaloid	Kloform dan pereaksi Meyer	Warna menjadi putih kecoklatan	-
6	Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl pekat	Warna menjadi merah atau kuning	+

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak daun sambung nyawa sangat potensial sebagai fitofarmaka untuk ikan. Senyawa saponin menyebabkan tegangan permukaan menurun, sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar, begitulah saponin bekerja sebagai antibakteri (Nuria *et. al.*, 2009). Menurut Middleton (2000), efek konsumsi flavonoid antara lain antiinflamasi, antimikroba, dan antivirus yang sangat berpotensi untuk menjadi fitofarmaka bagi ikan. Pernyataan tersebut sejalan dengan Robinson (1991) yang menyatakan bahwa flavonoid tertentu mengandung komponen aktif untuk menjadi antimikroba dan antivirus. Kemudian keberadaan tannin dalam ekstrak daun sambung nyawa juga berpotensi

sebagai antibakteri. Sari & Sari (2011) menjelaskan bahwa tannin mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal tersebut mengakibatkan sel bakteri lisis karena tekanan fisik maupun osmotik sehingga sel bakteri mati.

Hasil Uji *In Vitro*

Hasil diameter zona hambat yang terbentuk berbeda-beda dari setiap perlakuan. Yadav & Bishe (2004) menjelaskan daya hambat antibakteri berdasarkan diameter zona hambatnya digolongkan dalam empat kategori, yaitu sangat kuat (>20 mm), kuat (10-20 mm), sedang (5- 10 mm), dan tergolong lemah (< 5mm). Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak daun sambung nyawa yang tergolong memiliki daya hambat antibakteri yang lemah yaitu konsentrasi 600 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm. Kemudian konsentrasi 500 ppm dan 1500 ppm tergolong memiliki daya hambat sedang, sedangkan konsentrasi 700 ppm tergolong memiliki daya hambat kuat (Gambar 1) dan merupakan hasil terbaik untuk acuan uji toksisitas dan uji *in vivo*.



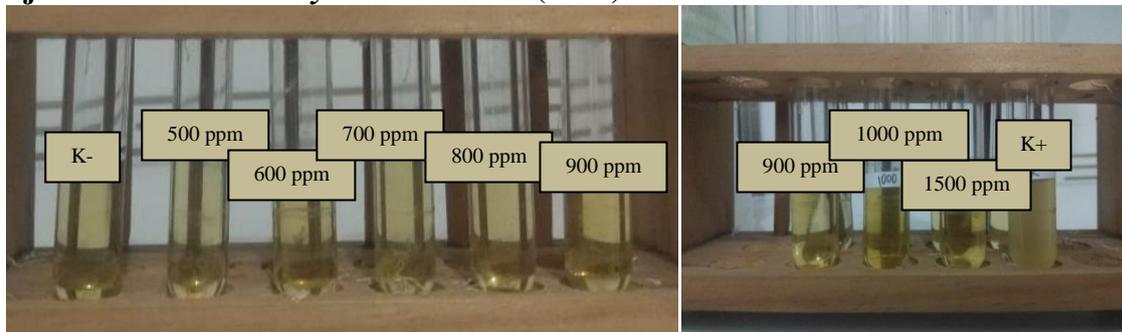
Gambar 1. Diameter Uji Zona Hambat Ekstrak Daun Sambung Nyawa

Terbentuknya zona hambat pada uji ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa anti bakteri yang terkandung di dalam ekstrak daun sambung nyawa. Sesuai dengan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan sebelumnya (Tabel 1), ekstrak daun sambung nyawa mengandung saponin, tanin, dan flavonoid. Menurut Adila *et al.*, (2013) senyawa flavonoid mampu merusak dinding sel sehingga menyebabkan kematian sel. Selain itu dijelaskan pula bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat pembentukan protein sehingga menghambat pertumbuhan mikroba. 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.

Selain flavonoid kandungan senyawa lain seperti senyawa tanin juga dapat merusak membran sel. Cowan (1999) menyatakan bahwa senyawa tanin dapat merusak pembentukan konidia jamur. Selanjutnya, senyawa saponin termasuk senyawa polifenol, yang mana senyawa ini dapat menghambat bakteri dengan cara merusak membran sitoplasma pada bakteri. Kerusakan pada membran sitoplasma dapat mencegah masuknya bahan-bahan makanan atau

nutrisi yang diperlukan bakteri untuk menghasilkan energi akibatnya bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian (Fadlian dkk, 2016).

Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



Gambar 2. Uji MIC

Konsentrasi 500 ppm dinyatakan sebagai nilai MIC, hal ini karena 500 ppm merupakan konsentrasi terendah yang tidak dapat menumbuhkan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian El Mahmood *et al.* (2010), yang menyatakan bahwa tabung yang sudah mulai menunjukkan kejernihan berarti tidak ada pertumbuhan bakteri dan dikatakan sebagai nilai MIC. Hal ini diperkuat oleh Pratiwi (2008) yang menyatakan bahwa apabila media jernih berarti antibiotik efektif menghambat pertumbuhan bakteri (bersifat bakteristatik), sedangkan apabila media keruh maka bakteri masih tumbuh yang berarti antibiotik tidak efektif menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin rendah nilai MIC suatu bahan aktif maka efektivitas bahan tersebut semakin tinggi, demikian pula sebaliknya (Muliani *et al.*, 2015).

Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Tabel 2. *Brine Shrimp Lethality Test*

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Rata-rata Mortalitas (%)	Angka Probit	Persamaan Garis	LC ₅₀ (ppm)
0 dosis	-	0	-	y = 0,923x + 1,822 R ² = 0,758	2388
½ dosis terbaik	2,54	23,33	2,54		
Dosis terbaik	2,84	23,33	2,84		
2× dosis terbaik	3,15	43,33	3,15		

Penghitungan nilai LC₅₀ ekstrak daun sambung nyawa dilakukan dengan memasukkan nilai log konsentrasi dan nilai probit pada grafik linear menggunakan program *Microsoft excel 2007* sehingga diperoleh hasil pengolahan data persamaan regresi $y = 0,923x + 1,822$ dengan $R^2 = 0,758$. Nilai R^2 tersebut menunjukkan bahwa lebih dari 70% variasi tingkat nilai probit larva udang dapat diterangkan dengan adanya perubahan log konsentrasi. Nilai y tersebut digunakan untuk mencari nilai LC₅₀. Dengan memasukkan nilai $y = 5$, maka akan diperoleh nilai $x = 3,443$. Untuk menghitung nilai LC₅₀ yaitu didapatkan dari Antilog x. Hasil LC₅₀ yang diperoleh yaitu sebesar 2388 ppm. Nilai tersebut berarti konsentrasi 2388 ppm ekstrak daun sambung nyawa mampu mematikan 50% *Artemia salina*. Tingkat toksisitas suatu ekstrak menurut Meyer (1982) adalah

$LC_{50} \leq 30$ ppm = Sangat Toksik; $31 \text{ ppm} \leq LC_{50} \leq 1000$ ppm = Toksik; dan $LC_{50} \geq 1000$ ppm = Tidak Toksik. Mengacu pada Meyer (1982) dapat dikatakan bahwa ekstrak daun sambung nyawa termasuk ekstrak yang tidak beracun, karena nilai LC₅₀ ekstrak tersebut yaitu lebih dari 1000 ppm.

Gejala Klinis

Berdasarkan pengamatan gejala klinis, dapat diketahui bahwa secara umum ikan kerapu macan yang telah diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* mengalami gerakan renang pasif, nafsu makan berkurang, memuntahkan makan, gerakan operkulum melambat, mata memerah hingga menonjol, tubuh berlendir, haemoragi bagian mulut, sisik mengelupas, pembengkakan lambung, dan terdapat luka pada bekas infeksi (Tabel 3). Penurunan nafsu makan pada ikan diduga disebabkan oleh stress sebagai akibat perlakuan ujiantang dan masuknya bahan atau benda asing yang masuk dalam tubuh.

Kondisi gejala klinis ikan yang serupa juga dilaporkan oleh Nursyirwani *et. al.* (2015) yang menyatakan bahwa ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* menunjukkan gejala tidak nafsu makan, berenang pasif, bergerak lambat, dan terjadi haemoragi pada sirip dan ekornya. Pang *et. al.* (2018) melaporkan hal serupa bahwa ikan kerapu yang diinfeksi *Vibrio alginolyticus* mengalami hemoragi, tidak nafsu makan, dan mengalami pembengkakan.

Tabel 3. Gejala Klinis Ikan Uji Pasca Infeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Hari Ke- (Pasca Infeksi)	Perlakuan (ppm)			
	0 dosis	½ dosis terbaik	Dosis terbaik	2× dosis terbaik
1	++	++	++	++
2	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	+++	++++
4	++++	+++	++	++
5	++++	+++	++	++
6	+++	++	+	+
7	+++	+	-	-

Keterangan:

- : Ikan normal
- + : Berenang normal, nafsu makan kurang, mata baik, dan gerakan operkulum normal
- ++ : Berenang pasif, tidak nafsu makan, mata memerah hingga menonjol, gerakan operkulum lambat, pembengkakan lambung, dan warna tubuh memucat
- +++ : Berenang pasif, makan dimuntahkan, mata menonjol, gerakan operkulum lambat, pembengkakan lambung, haemoragi, dan warna tubuh memucat
- ++++ : Berenang pasif, makan dimuntahkan, mata menonjol, gerakan operkulum lambat, pembengkakan lambung, haemoragi, kerusakan sisik, terdapat luka bekas infeksi, dan kematian (Modifikasi Hastari *et. al.*, 2014)

Survival Rate (SR) dan Relative Percent Survival (RPS)

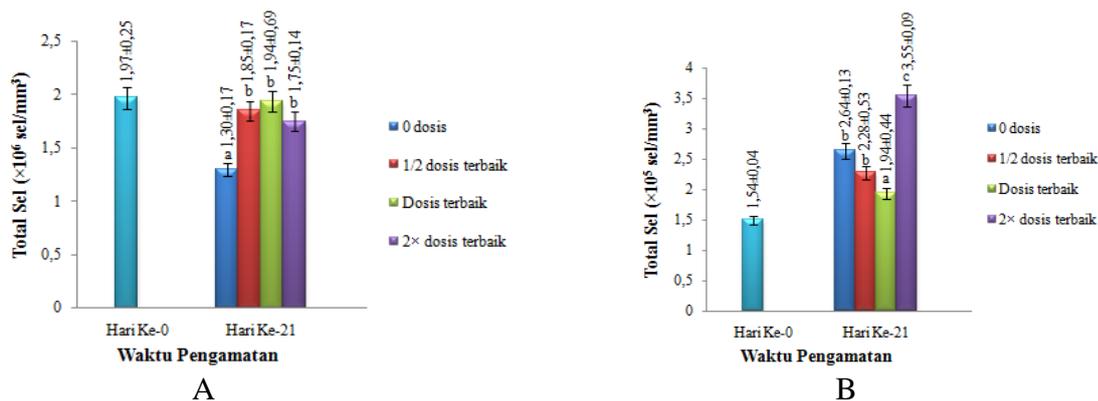
Berdasarkan data pengamatan kelangsungan hidup ikan uji, dapat dijelaskan bahwa persentase SR terbaik yaitu perlakuan dosis terbaik dengan persentase nilai 95% (Tabel 4). Perlakuan tersebut merupakan perlakuan dosis ekstrak 700 ppm, hasil ini sama seperti hasil uji *in vitro*. 2x dosis terbaik tidak menunjukkan hasil yang lebih baik diduga karena dosis yang diberikan terlalu tinggi. Andayani *et. al.* (2018) menjelaskan bahwa dosis yang terlalu tinggi tidak meningkatkan efek *immune stimulant* dalam meningkatkan imunitas. Karena tubuh ikan tidak mampu merespon mekanisme respon seluler dan humoral, antibodi tidak terbentuk dan mungkin akan dihasilkan efek racun.

Tabel 4. *Survival Rate* (SR) dan *Relative Percent Survival* (RPS) Ikan Kerapu Macan Pasca Infeksi *Vibrio alginolyticus*

Perlakuan (ppm)	Σ Ikan Awal	Mortalitas	SR (%)	RPS (%)
0 dosis	20	7	65	-
½ dosis terbaik	20	6	70	14,28
Dosis terbaik	20	1	95	85,71
2× dosis terbaik	20	6	70	14,28

Nilai RPS sangat dipengaruhi oleh tingkat kematian benih perlakuan dan kontrol. Secara keseluruhan, nilai rata-rata tingkat kematian perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sambung nyawa dapat menurunkan angka kematian ikan uji setelah diuji tantangan dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan data yang telah diperoleh, angka RPS tertinggi yaitu perlakuan C dengan nilai 85,71% (Tabel 4). Angka tersebut menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak daun sambung nyawa dengan konsentrasi 700 ppm sudah efektif dan dapat memberikan proteksi terhadap ikan uji. Hal ini mengacu pada pendapat Amend (1981) yang menyatakan bahwa perlakuan dinyatakan efektif apabila dapat menimbulkan proteksi terhadap ikan uji yang ditandai dengan nilai RPS di atas 60% saat dilakukan uji tantangan.

Profil Darah



Gambar 3. (A) Total eritrosit, (B) Total leukosit

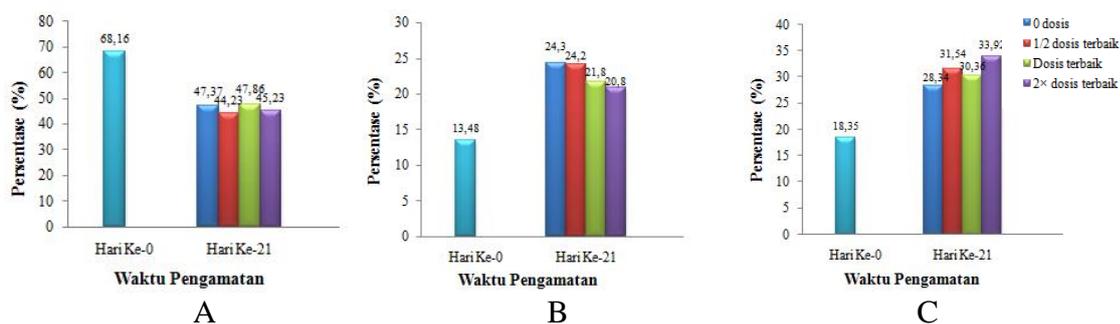
Perlakuan dosis 0 ppm berbeda nyata dengan ketiga perlakuan lainnya, sedangkan ketiga perlakuan lainnya tidak berbeda nyata (Gambar 3). Dangeubun & Metungun (2017) menjelaskan bahwa pada ikan yang tidak sehat mengalami penurunan jumlah eritrosit karena tubuh melawan agen patogen. Penjelasan tersebut diperkuat oleh Sadikin (2002) yang menyatakan bahwa penurunan jumlah eritrosit mengindikasikan adanya serangan agen asing ke dalam tubuh organisme.

Meskipun mengalami penurunan, tetapi kisaran eritrosit pada setiap perlakuan masih dalam kisaran normal. Hal ini sesuai dengan pendapat Robert (2001) yang menyatakan bahwa kisaran normal total eritrosit ikan teleostei yaitu $1,05 \times 10^6 - 3,00 \times 10^6$ sel/mm³. Selain itu, Andayani (2007) juga membuktikan bahwa total eritrosit ikan kerapu macan mencapai $3,35 \times 10^6$. Hasil ini diduga berkaitan dengan pengaruh ekstrak daun sambung nyawa yang mampu menurunkan tingkat stress atau sebagai anti depresan pada ikan kerapu macan. Soetarno *et al.* (1996), melaporkan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman memberi pengaruh biologi terhadap daya tahan tubuh, antistress, antibakteri, antijamur, dan perangsang lainnya.

Peningkatan jumlah leukosit yang terjadi pada perlakuan menunjukkan bahwa adanya respon imunitas ikan terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Hal ini sesuai dengan pendapat Aonullah *et. al.* (2013) yang menyatakan bahwa peningkatan jumlah total leukosit diduga sebagai respon ikan dalam mempertahankan hidupnya dari serangan *Vibrio alginolyticus*. Moyle & Cech (1988), menyatakan kenaikan leukosit pada umumnya terjadi pada ikan yang mengalami gangguan dari luar tubuhnya, termasuk infeksi patogen karena fungsi leukosit sebagai sistem pertahanan tubuh ikan. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa memiliki kemampuan sebagai imunostimulan yang mampu memberikan rangsangan terhadap respon imun non spesifik pada ikan yaitu ditandai adanya kenaikan pada total leukosit.

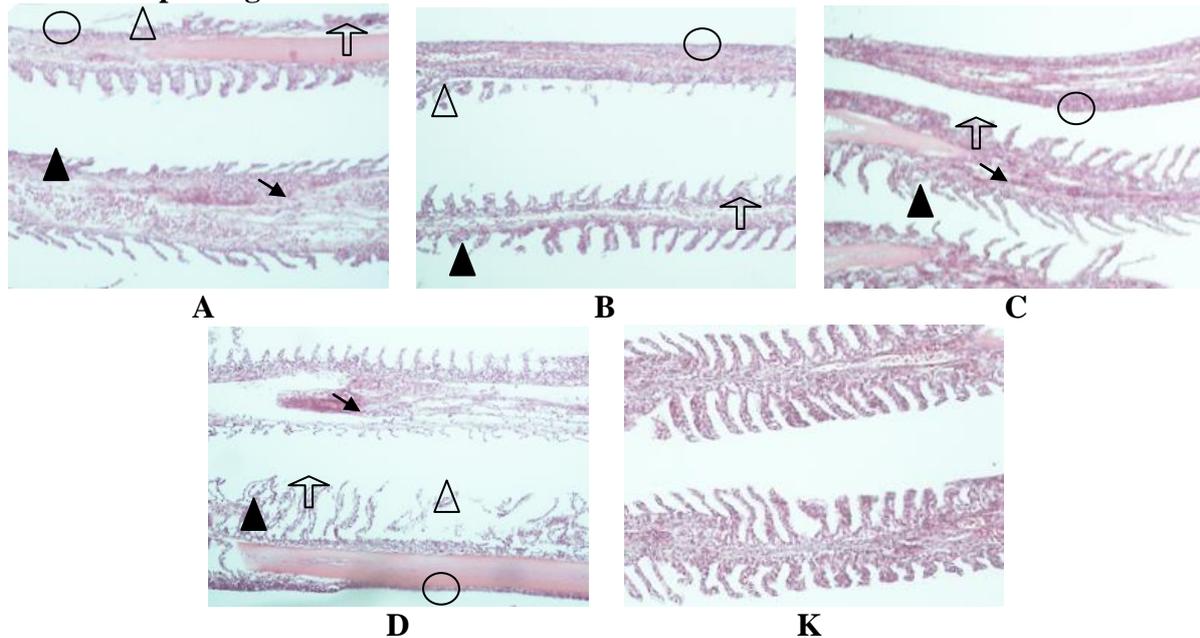
Hasil perhitungan diferensial leukosit yang diperoleh menunjukkan bahwa secara umum jumlah limfosit pada hewan uji mengalami penurunan dibandingkan dengan awal pemeliharaan, sedangkan jumlah monosit dan neutrofil meningkat (Gamabr 4). Dangeubun & Metungun (2017) menjelaskan bahwa penurunan persentase jumlah limfosit terjadi ketika terjadi infeksi sedangkan jumlah monosit dan neutrofil meningkat dan ketiga komponen sel darah putih tersebut saling memengaruhi satu sama lain. Hal tersebut didukung dengan pendapat Alamanda *et. al.* (2007) bahwa penurunan jumlah limfosit pada infeksi membuat neutrofil dan monosit meningkat sebagai pertahanan utama, yang berkerja secara efektif melawan infeksi. Setelah infeksi, neutrofil akan menjadi lebih aktif dari pada limfosit karena limfosit akan aktif setelah neutrofil selesai bekerja.

Dibandingkan dengan jumlah monosit, persentase jumlah neutrofil pada penelitian ini lebih tinggi. Hal ini diduga karena neutrofil aktif memfagosit pada awal terjadinya infeksi, setelah itu kemudian digantikan oleh monosit yang lebih kuat. Kumar & Sharma (2010) menjelaskan bahwa sel-sel yang pertama kali diproduksi dan meningkat dalam jumlah besar pada peradangan adalah neutrofil. Sel tersebut bergerak lebih cepat dari pada monosit dan dapat mencapai pada area yang terinfeksi dalam 2-4 jam. Pada tahap ini, sel pertahanan atau fagositosis didominasi oleh neutrofil. Baratawidjaja (2006) menegaskan bahwa sirkulasi neutrofil hanya terjadi dalam sirkulasi kurang dari 48 jam sebelum mencapai area infeksi.



Gambar 4. Diferensial leukosit (A) Persentase limfosit, (B) Persentase monosit, (C) Persentase neutrofil

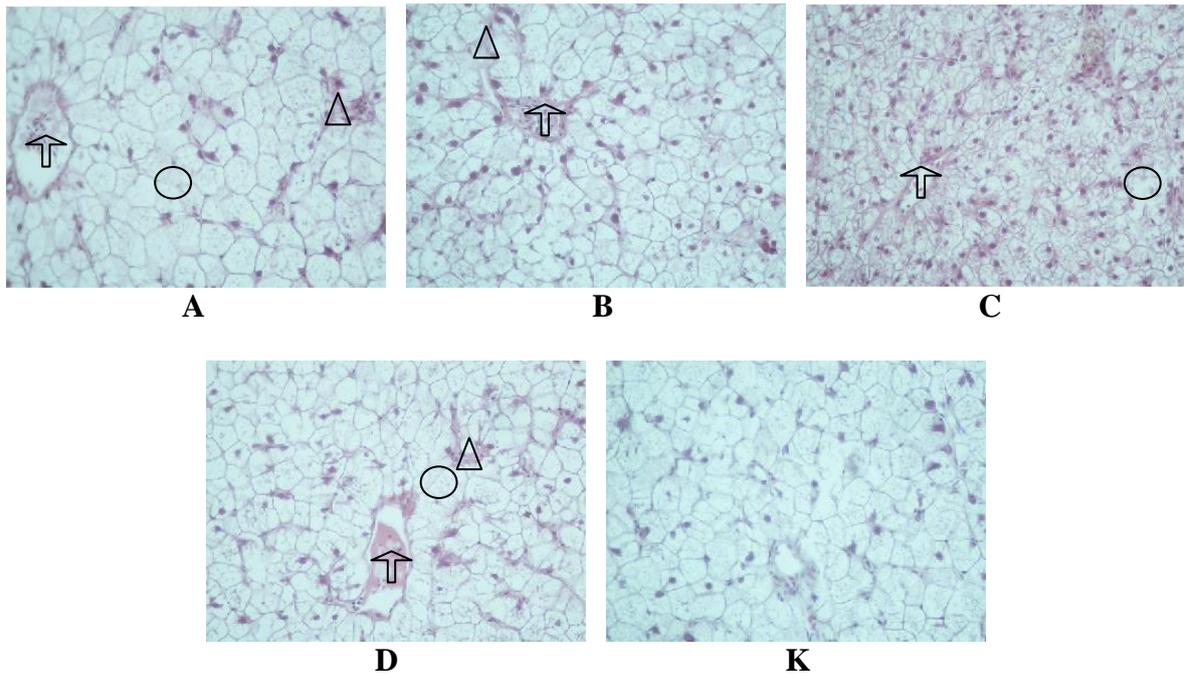
Profil Histopatologi



Gambar 5. Profil histopatologi insang ikan uji (A) dosis 0 ppm, (B) ½ dosis terbaik (350 ppm), (C) dosis terbaik (700 ppm), (D) 2× dosis terbaik (1400 ppm), (K) ikan normal; (▲) Edema, (⇩)Fusi, (▲) Hiperplasia, (△) Nekrosis, (○) Struktur lamella sekunder hilang. Pewarnaan H.E. Perbesaran 400x

Perubahan patologis yang paling umum terjadi pada insang adalah hiperplasia sel-sel lamella insang, yaitu peningkatan jumlah sel lamella. Priosoeryanto *et. al.* (2010) menjelaskan bahwa hiperplasia terjadi pada tingkat iritasi yang lebih rendah dan biasanya disertai peningkatan jumlah sel-sel mukus di dasar lamela dan mengakibatkan fusi dari lamela. Fusi adalah pendempetan sel antar lamella sekunder yang satu dengan yang lainnya. Selanjutnya, Parameswari *et. al.* (2013) juga menerangkan bahwa fusi terjadi karena lamella mengalami pembengkakan atau hiperplasia sehingga proses pernapasan terganggu. Keadaan ini mengakibatkan ukuran rongga (kapiler lumen) mengalami penyempitan dan sel yang berada di tengah lamella sekunder bergeser, sehingga terjadi pendempetan. Fusi lamella sekunder umumnya terjadi sebagai respon terhadap infeksi parasit dan bakteri yang kronis ataupun adanya iritasi yang disebabkan bahan kimia (Efrizal *et al.*, 1998). Sedangkan, hiperplasia lamella sekunder pada insang terjadi akibat adanya pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol dan pada lamella primer disebabkan oleh pembelahan sel-sel chlorid secara berlebihan (Sipahutar *et al.*, 2012).

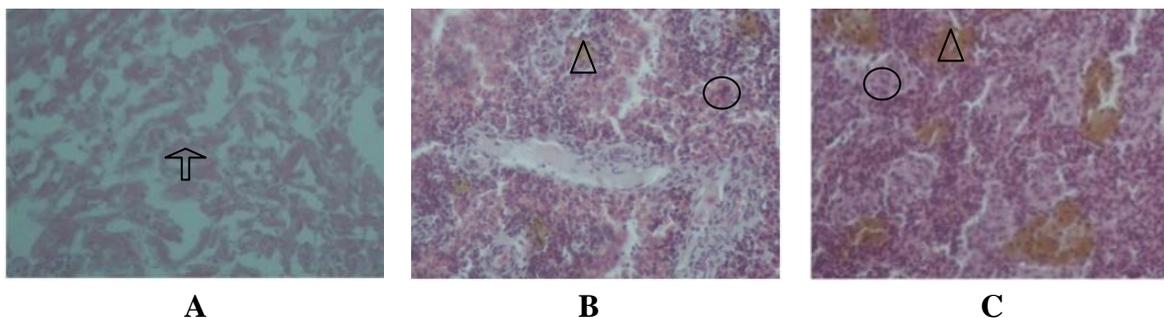
Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa semua hati dari setiap perlakuan mengalami kerusakan yang sama, yaitu adanya nekrosis, inflamasi, dan degenerasi melemak. Hal ini sebagai akibat dari adanya gangguan yang disebabkan oleh infeksi bakteri pada setiap hewan uji. Kondisi tersebut juga pernah dilaporkan oleh Sarjito *et. al.* (2007). Hastari *et al.* (2014) menjelaskan bahwa nekrosis merupakan sel-sel yang mempunyai aktivitas yang sangat rendah dan akhirnya mengalami kematian sel jaringan sehingga menyebabkan hilangnya fungsi pada daerah yang mengalami nekrosis. Nekrosis dapat dilihat pada bentuk dan warna sel yang mati dengan warna pudar dan bentuk sel yang tidak utuh (hancur) sehingga jaringan menjadi rapuh.

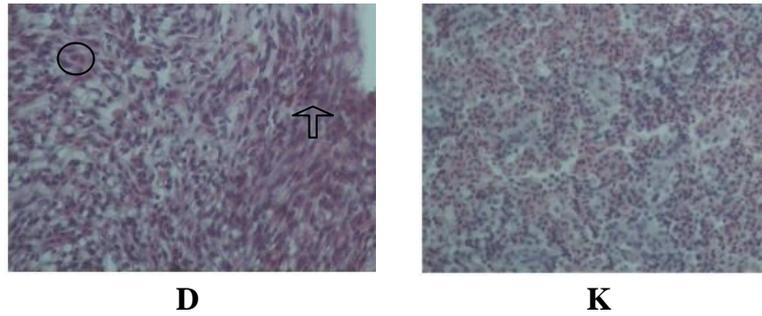


Gambar 6. Profil histopatologi hati ikan uji (A) dosis 0 ppm, (B) ½ dosis terbaik (350 ppm), (C) dosis terbaik (700 ppm), (D) 2× dosis terbaik (1400 ppm), (K) ikan normal; (△) nekrosis, (○) degenerasi lemak, (↕) inflamasi. Pewarnaan H.E. Perbesaran 400x

Rahman *et. al.* (2018) menjelaskan bahwa nekrosis dapat disebabkan oleh trauma, agen-agen biologis (bakteri, virus, jamur dan penyakit), agen-agen kimia atau terjadi gangguan pada penyediaan darah pada suatu daerah khusus. Plumb (1994) menjelaskan bahwa degenerasi melemak adalah akumulasi substansi sel secara tidak normal yang diakibatkan oleh virus, bakteri dan toksik yang dikeluarkan di perairan. Selanjutnya Rahman *et. al.* (2018) menjelaskan bahwa inflamasi atau peradangan ditandai dengan adanya jendolan-jendolan darah serta jaringan berwarna merah karena terdapat banyak eritrosit yang keluar dari pembuluh darah. Respon peradangan ini bertujuan memulihkan jaringan serta menekan agen penyebab nekrosis.

Uji histopatologi limpa ikan uji menunjukkan bahwa terdapat hemosiderin pada limpa ikan uji. Hemosiderin ditandai dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan. Hemosiderin adalah senyawa besi yang mengandung pigmen kuning kecoklatam turunan dari pemecahan molekul hemoglobin selama destruksi atau daur ulang sel darah merah. Hal ini jelas pada jaringan dari pergantian sel darah merah selama kondisi hemolitik pada ikan dan terakumulasi pada pusat melanomakrofag (Mumford, *et. al.*, 2007).

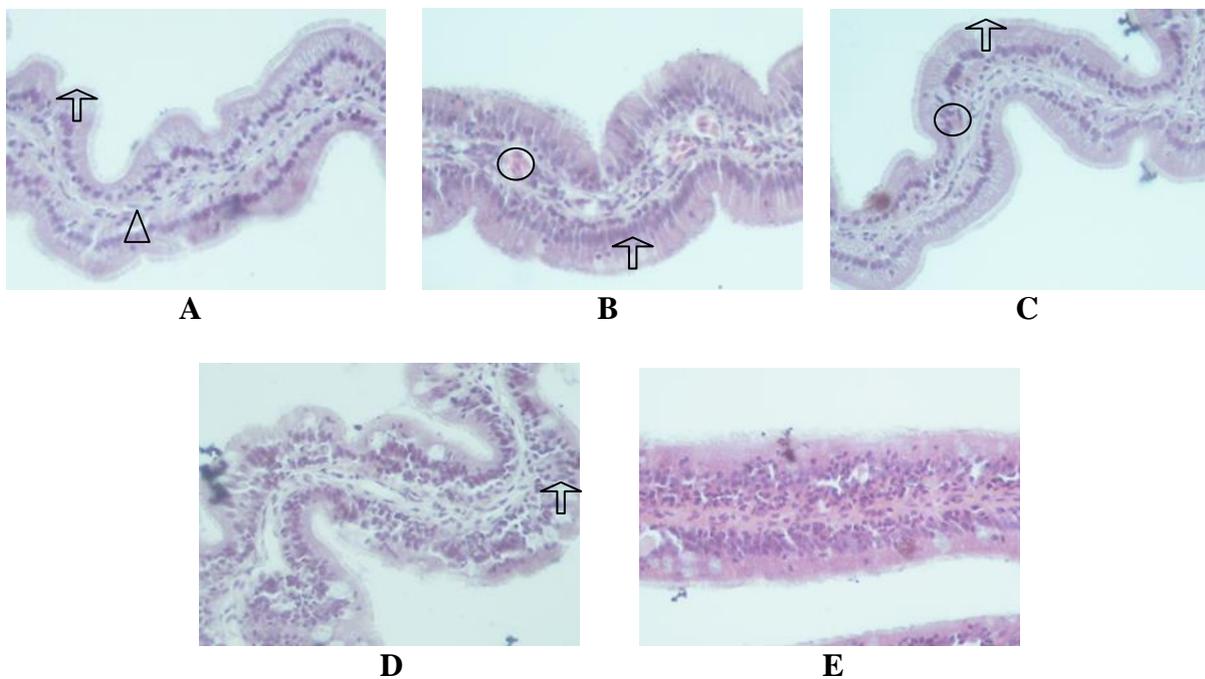




Gambar 7. Profil histopatologi limpa ikan uji (A) dosis 0 ppm, (B) ½ dosis terbaik (350 ppm), (C) dosis terbaik (700 ppm), (D) 2× dosis terbaik (1400 ppm), (K) ikan normal; (⇧) Kongesti, (△) hemosiderin, (○) *Melano macrofag center*. Pewarnaan H.E. Perbesaran 400x

Perubahan histopatologi yang terjadi pada usus ikan kerapu dalam penelitian ini yaitu proliferasi sel goblet. Menurut Nursyirwani *et. al.* (2015), sel goblet merupakan bagian dari lapisan mukosa usus yang berfungsi memproduksi mukus yang membantu memerangkap bakteri yang masuk ke dalam usus. Berdasarkan hasil tersebut dapat diduga bahwa ikan uji mengalami gangguan patogen yang telah diinfeksi ke dalam tubuhnya. Peningkatan sel goblet dari masing-masing perlakuan sebagai respon terhadap patogen yang masuk tersebut untuk melawan bakteri patogen.

Menurut Robert (2001), pada kondisi toksik akut yang disebabkan oleh toksin bakteri, virus, parasit, zat kimia atau alga, mukosa usus dapat terangkat seluruhnya. Sel-sel epitel mukosa usus individu dapat menggulung yang disertai penebalan kromatin dan sitoplasma eosinofil yang dapat terjadi akibat kelaparan dan kondisi kaheksia. Pada bentuk khusus terjadi pelepasan mukosa ke dalam lumen, kadang-kadang disertai hemoragi dan edema submukosa.



Gambar 8. Profil histopatologi usus ikan uji (A) dosis 0 ppm, (B) ½ dosis terbaik (350 ppm), (C) dosis terbaik (700 ppm), (D) 2× dosis terbaik (1400 ppm), (K) ikan normal; (⇧) proliferasi sel goblet, (△) edema, (○) hemoragi. Pewarnaan H.E. Perbesaran 400x

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini yaitu, dosis terbaik untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan kerapu macan dan mencegah serangan *Vibrio alginolyticus* secara *in vitro* dan *in vivo* yaitu dosis 700 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Abed, S.A., Sirat, H.M., & Taher, M. (2013). Total Phenolic, Antioxidant, Antimicrobial Activities and Toxicity Study of *Gynotroches axillaris* Blume (*Rhizophoraceae*). *EXCLI Journal*, 12, 404-412.
- Adila, R., Nurmiati., & Agustien, A. (2013). Uji antimikroba *Curcuma* spp. Terhadap Pertumbuhan *Candida albican*, *Staphylococcus aureus* dan *Escheria colli*. *Jurnal Biologi Universitas Andlas*, 2(1), 3
- Alamanda I. E., Handajani N. S., & Budiharjo A., (2007). Penggunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah Untuk Penetapan Kesehatan Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Jurnal Biodifersitas*, 8,34-38.
- Amend, D.F. (1981). Potency Testing of Fish Vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49,447–454.
- Andayani, S. (2009). Respon Non-Spesifik Ikan Kerapu Macan (*E. fuscoguttatus*) terhadap Immunostimulan Senyawa Aktif Alkaloid Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) Melalui Pakan. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*, 3B, 67–73.
- Andayani, S. 2007. Effect of Bioactive jellyfish (*Bougainvillia* sp.) as a Immunostimulan of Bactericidal Activity, Non-specific immune response as well as Survival Rate of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Dissertation Graduate School University of Brawijaya*. Malang. 122 p.
- Andayani, S., Fajar, M., & Rahman, M.F. (2018). Effect of Alkaloids Derived from Jellyfish (*Aeginura* sp.) on the Intestinal Histopathology and Relative Percentage Survival (RPS) of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) Infected by *Vibrio harveyi*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1), 1-6. IOP Publishing.
- Aonullah, A.A., Prayitno, S.B., & Sarjito. (2013). Pengaruh Penggunaan Ekstrak Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap Kelulushidupan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 126-135.
- Arief, D.A. Sangi, M.S., & Kamu, V.S. (2017). Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Biji Aren (*Arenga pinnata* MERR.). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 6(2), 12-15.
- Cowan, M. (1999). Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiolog* 2(4), 564.
- Dangeubun, J.L. & Metungun, C. (2017). Hematology of *Vibrio alginolyticus*-Infected Humpback Grouper *Cromileptes altivelis*, Under Treatment of *Alstonia acuminata* Shoot Extract. *AAFL Bioflux*, 10(2), 274-284.
- Darminto, Ali A., & Dini I. (2011). Skrining Senyawa Bioaktif pada Tumbuhan Mangrove yang Dapat Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penyebab Penyakit *Red Spot Disease*. *Jurnal Chemica*, 12(1), 33-39.
- Efrizal, T., Heru Setijanto, Djamar Tumpal F.L, dan Y. Sukra. 1998. Pengaruh Kadar Subletal Phosphamidon Terhadap Kerusakan Jaringan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Trew). Fakultas Perikanan UNRI, Pekanbaru.

- El Mahmood, Ogbonna & Raji, M. (2010). The antibacterial activity of *Azadirachta indica* (neem) seeds extracts against bacterial pathogens associated with eye and ear infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(14), 1414-1421.
- Fadlian, B., Hamzah., & Abram. H.P. (2016). Uji Efektifitas Ekstrak Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) Sebagai Bahan Pengwet Alami Tomat. *J. Akad. Kim*, 5(1), 156.
- Hastari, I.F., Sarjito, & Prayitno, S.B. (2014). Karakterisasi Agensia Penyebab Vibriosis dan Gambaran Histologi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karamba Jaring Apung Teluk Hurun Lampung. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(3), 86-94.
- Irmawati, F. & Primiani, C.N. (2017). Perbandingan Uji Toksisitas Fitoestrogen pada Ginjal Tikus (*Sprangue dawley*) yang diinduksi Daidzein dan Air Perasan Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*), *Bioeksperimen*, 3(2), 52-60.
- Kaban, A.N., Daniel, & Saleh, C. (2016) Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksan dan Etil Asetat Terhadap Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *amarum*). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 14(1), 24-28.
- Kumar, V. & Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10, 1.325–1.334.
- Lestari, E., Setyawati, T.R., & Yanti, A.H. (2017). Profil Hematologi Ikan Gabus (*Channa striata* Bloch, 1793). *Protobiont*, 6(3), 283-289.
- Middelton, E., C. Kandaswami & Theoharides, T.C. (2000). The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Review*, 52(4), 673-751.
- Moyle, P.B. & Chech, J.J. 1988. *An Introduction to Ichthyology*. Prentice Hall Inc. A Division of Simon and Schuster Engelwood Cliffs, New Jersey. 597 ps.
- Muliani, Nurhidayah, & Kurniawan, K. (2015). Herbal Mangrove Sebagai Sumber Anti Bakteri *Vibrio harveyi* Penyebab Penyakit pada Udang Windu *Penaeus monodon*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(3), 405-414.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., & Blazer, V. (2007). *Fish Histology and Histopathology*. United States. USFWS-NCTC.
- Nirwan. (2007). Produksi flavonoid Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) Asal Kultur pada Kondisi Naungan dan Pemupukan. *Disertasi*. Instiut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nuria, M.C., A. Faizatun., & 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 Diimbuhi Bakteri Asam Laktat dan Diuji Tantang *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.

- Parameswari, W., Sasanti, A.S. & Muslim. (2013). Populasi Bakteri, Histologi, Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Benih Ikan Gabus (*Channa Striata*) yang Dipelihara dalam Media dengan Penambahan Probiotik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 1(1), 76-89.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Priosoeryanto, B.P., Ersa, I.M., Tiuria, R., & Handayani, S.U. (2010). Gambaran Histopatologi Insang, Usus dan Otot Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang Berasal dari Daerah Ciampea, Bogor. *Indonesian Journal of Veterinary Science & Medicine*, 2(1), 1-8.
- Rahman, E. F. (2010). Efektivitas Ekstrak Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (Lour.) DC) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* pada Plat Dasar Gigi Tiruan Resin Akrilik. *Majalah Ilmiah Sultan Agung*. 48(123), 32-45.
- Rahman, I.S., Maftuch, & Sanoesi, E. (2018). Efektifitas Imunostimulan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) Terhadap Histopatologi Hati Ikan Patin (*Pangasius* sp.) yang Diuji Tantang Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 2(2), 47-55.
- Riadini, R. K. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) Berdasarkan Perbedaan Metode Ekstraksi dan Umur Panen. *Disertasi*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Rivai, H., Femiwati, F., & Krisyanella, K. (2011). Karakterisasi Ekstrak Air Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya. *Jurnal Farmasi Higea*, 3(1), 16-24.
- Robert R.J. 2001. *Fish Pathology*. W. B. Saunders, USA.
- Robinson, T. (1991). Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. (Penerjemah: K. Padmawinata). ITB, Bandung.
- Sahari, P. Y. (2018). Perubahan Histopatologi Ginjal dan Hati Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*) dan Cantik (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus polyphekadion*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio vulnificus*. *Thesis*. Universitas Airlangga. Surabaya
- Saputra, B. (2018). Implementasi Pemberdayaan Masyarakat Melalui Program *Corporate Social Responsibility* Konservasi Kawasan Laut Badak LNG di Kota Bontang. *eJournal Sosiatri-Sosiologi*, 6(1), 46-60.
- Sari, F.P. & Sari, S. M. (2011). Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sari, I., Miranda, T., & Sadli. (2016). The Cytotoxic Activity of n-Hexane Extract of Kersen (*Muntingia calabura* Linn.) Leaves Using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Jurnal Natural*, 16(2), 37-44.
- 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.
- Sipahutar, Lucky Wahyu., Dwinna Aliza, Winaruddin, dan Nazaruddin. 2012. Gambaran Histopatologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipelihara dalam Temperatur Air di Atas Normal. *J. Medika Veterinaria*, 0852-1943.
- Soelama, H.J.J., Kepel, B.J., & Siagian, K.V. (2015). Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) Ekstrak Rumput Laut (*Eucaeuuma cottonii*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal e-GiGi*, 3(2), 374-379.

- Soetarno, S., Suganda, A. G., Sugihartina, G., & Sukrasno, S. (2000). Flavonoid dan Asam-asam Fenolat dari Daun Dewa [*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.]. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 6(1).
- Sumantri, A., Mulyana, & Mumpuni, F.S. (2017). Pengaruh Perbedaan Suhu Pemeliharaan terhadap Histopatologi Insang dan Kulit Ikan Komet (*Carassius auratus*). *Jurnal Mina Sains*, 3(1), 1-7.
- Sumayani, R.K., & Cahyoko, Y. (2008). Daya Antibakteri Perasan Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophilia* Secara *In Vitro*. *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*, 3(1), 83-87.
- 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.
- Yadav, A. V., & Bhise, S. B. (2004). Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science*, 87(9), 1176-1178.