

**EFEKTIVITAS IMUNOSTIMULAN EKSTRAK *Gracillaria* sp.
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas salmonicida* SECARA IN VIVO**

***THE EFFECTIVENESS of Gracillaria sp. AS AN IMMUNOSTIMULANT AGAINST
Aeromonas salmonicid IN AN IN VIVO STUDY***

Shara Jayanti^{1*}, Anja Asmarany¹, IGP Gede Rumayasa Yudana²

¹Program Studi Teknik Penanganan Patologi Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo
Sedati, Kabupaten Sidoarjo, Indonesia, 61253

²Program Studi Teknik Budidaya Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo Sedati,
Kabupaten Sidoarjo, Indonesia, 61253

*Korespondensi: sharajuskwantoro@gmail.com

ABSTRACT

This study was determining the effect of immunostimulant from Gracillaria sp. on Aeromonas salmonicida bacteria in vivo. The parameters were the survival rate, total leukocytes (Cyprinus carpio) and IC50 of Gracillaria sp. as an immunostimulant for koi that infected with Aeromonas salmonicida. Gracillaria sp. extract can improve the immune system, as seen from immune parameters such as leukocytes and health. Gracillaria sp. extract with 70% ethanol has a flavonoid content of 1.9 mg QE/g. Flavonoids are antioxidant that can increase the immune system to against pathogen. The application of immunostimulant is given orally by mixing with the cellulase enzyme as much as 7.2 mg/g then added to koi feed at a dose based on IC50 Gracillaria sp. which is 18.6 mg/ml. The study was conducted using 6 treatments where the results showed that the highest total of leukocytes was in fish fed with immunostimulants at a dose of 2IC50 and infected with Aeromonas sp (P2) of 37.12×10^4 cells/mm³. While the lowest total leukocytes were in P5 fish, which was 16.08×10^4 cells/mm³. The lowest survival rate was in P5 (Fish fed commercial feed infected with Aeromonas salmonicida) 80% and in addition the survival value of the fish was 100%. In P5 fish, the fish fins became soft, the fish scales fell out, the surface of the fish skin produced a lot of mucus and there were wrinkles on the fish's tail fins.

Keywords: Immunostimulant; *Gracillaria* sp.; *Cyprinus carpio*; *Aeromonas salmonicida*

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh pemberian imunostimulan dari *Gracillaria* sp. terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* secara in vivo. Parameter yang diuji adalah tingkat kelangsungan hidup, total leukosit ikan koi (*Cyprinus carpio*) serta dosis efektif dari ekstrak *Gracillaria* sp. sebagai imunostimulan untuk ikan koi yang terinfeksi bakteri *Aeromonas salmonicida*. Ekstrak *Gracillaria* sp. cukup efektif digunakan sebagai bahan imunostimulan untuk meningkatkan sistem imun ikan, terlihat dari parameter imun seperti leukosit dan kesehatan ikan. Ekstrak *Gracillaria* sp. dengan pelarut etanol 70 % terbukti memiliki kandungan flavonoid sebesar 1,9 mg QE/g. Flavonoid merupakan senyawa bioaktif yang dapat meningkatkan sistem imun terhadap infeksi patogen. Aplikasi imunostimulan diberikan secara per oral dengan pemberian enzim selulase sebanyak 7,2 mg/g yang ditambahkan pada pakan ikan koi dengan dosis berdasarkan IC50 *Gracillaria* sp. yaitu 18,6 mg/ml. Penelitian dilakukan menggunakan 6 perlakuan dimana hasil menunjukkan bahwa jumlah total sel leukosit tertinggi adalah pada ikan yang diberikan pakan berimunostimulan dengan dosis 2IC50 dan diinfeksi dengan *Aeromonas* sp (P2) sebesar $37,12 \times 10^4$ sel/mm³. Sedangkan total leukosit terendah pada ikan P5 yaitu sebesar sebesar $16,08 \times 10^4$ sel/mm³. Tingkat kelangsungan hidup paling rendah adalah pada P5 (Ikan diberikan pakan komersil dengan diinfeksi *Aeromonas salmonicida*) 80% dan selain itu nilai kelangsungan hidup ikan adalah 100%. Pada ikan P5 mengalami kelembekan sirip ikan, kerontokan sisik ikan, permukaan kulit ikan mengeluarkan lendir yang banyak serta geripis pada sirip ekor ikan.

Kata kunci: Imunostimulan; *Gracillaria* sp; *Cyprinus carpio*; *Aeromonas salmonicida*

I. PENDAHULUAN

Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) berkomitmen untuk mengoptimalkan produksi rumput laut, karena selain dapat menambah nilai ekonomi bagi masyarakat, komoditas rumput memiliki nilai ekspor yang tinggi. Indonesia merupakan eksportir rumput laut terbesar kedua setelah Tiongkok dengan volume ekspor tahun 2020 sebesar 195.574 ton dengan nilai mencapai USD 279,58 juta (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, 2021). Beberapa jenis imunostimulan yang dapat diaplikasikan dalam budidaya perikanan yaitu polisakarida, produk bakteri, vitamin, sitokin, dan ekstrak tanaman (Shahbazi dan Bolhassani, 2016). Penggunaan ekstrak tanaman untuk pembuatan pakan herbal memiliki beberapa kelebihan diantaranya tersedia secara melimpah di alam, bersifat ramah lingkungan (biodegradable) serta mengandung berbagai senyawa bioaktif yang dapat meningkatkan sistem imun ikan (Shakya, 2017). Beberapa bakteri yang banyak menginfeksi ikan koi diantaranya kelompok bakteri dari genus *Flavobacterium*, *Pseudomonas* dan *Aeromonas* (Neidorf dan Morozova, 2021). Bakteri *Aeromonas sp.* Merupakan genus yang paling banyak menyerang ikan karena distribusinya yang luas di perairan tawar, payau, maupun laut. Hal ini dikarenakan *Aeromonas sp.* dapat hidup pada lingkungan dengan kondisi suhu 4°C sampai 41°C, pH 5 – 10 serta toleran terhadap NaCl hingga konsentrasi 5,5 g/L (Sinubu *et al.*, 2022). Bakteri *A. salmonicida* juga dilaporkan menjadi salah satu bakteri yang banyak menyerang ikan koi. *Aeromonas salmonicida* merupakan kelompok bakteri dari genus *Aeromonas* yang menyebabkan penyakit furunculosis baik pada ikan golongan salmonid maupun non salmonid (Rahmawati *et al.*, 2021).

Gracilaria sp. memiliki kandungan

senyawa aktif seperti flavonoid, fenol, saponin, alkaloid dan triterpenoid. Kandungan total flavonoid adalah $21,78 \pm 0,32$ mg QE/g dan total fenol $124 \pm 2,13$ mg GAE/g (Purwaningsih dan Deskawati, 2020). Flavonoid mampu *merelease* energi transduksi pada membran sitoplasma dari bakteri tertentu dan menghambat motilitas bakteri (Mirzoeva, *et al.*, 1997) selain itu gugus hidroksil senyawa flavonoid mampu merubah komponen organik serta transport nutrisi sehingga menyebabkan toksisitas terhadap bakteri (Di Carlo *et al.*, 1999). Kandungan flavonoid total mempengaruhi aktivitas antibakteri dan memiliki hubungan berbanding lurus (Manik *et al.*, 2014). Berdasarkan permasalahan tersebut, pada penelitian ini bertujuan menguji imunostimulan *Gracilaria sp* terhadap infeksi *Aeromonas salmonicida* pada ikan koi (*Cyprinus carpio*).

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Kualitas Air dan Tanah Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo serta laboratorium Universitas Airlangga. Pelaksanaan penelitian ini yaitu pada bulan Juni – November 2023.

Alat

Haemocytometer, mikroskop, akuarium, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), inkubator, aerator, filter akuarium, blender, mesh 200, mikroskop, heater, nampan, ember, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, ose, bunsen, timbangan digital, gelas objek, cover glass, pipet tetes, mikropipet, oven, sentrifuge dan spektrofotometer

Bahan

Ikan koi, rumput laut, pakan ikan, isolat bakteri *Aeromonas salmonicida*., DPPH, akuades, alkohol 70%, larutan EDTA 10%, larutan Giemsa, larutan Turk's, Etanol 70%, aluminium foil, sarung tangan, masker, syringe 1cc dan syringe 3 cc.

Preparasi Sampel Rumput

Laut Rumput laut yang akan digunakan dalam penelitian ini dicuci bersih dan ditiriskan untuk membebaskan sisa-sisa cucian. Rumput laut dikeringkan tanpa langsung dibawah matahari selama ± 4 hari dengan diberi pelapis kain putih. Sampel yang sudah kering (simplisia) dipotong dihaluskan dengan blender. Serbuk rumput laut diayak menggunakan mesh 200 (Wibowo dan Fitriyani, 2013).

Uji aktivitas antioksidan

Gracillaria sp. diekstraksi dengan pelarut etanol. Ekstrak rumput laut dengan kandungan flavonoid terbaik kemudian diuji lanjut kandungan senyawa antioksidannya dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat. Kontrol negatif disiapkan dengan cara mengambil sebanyak 4 ml larutan DPPH dipipet dan diletakkan dalam tabung kemudian disimpan selama ± 30 menit pada ruangan gelap sebelum diamati nilai absorbansinya. Selanjutnya disiapkan ekstrak rumput laut dalam berbagai konsentrasi. Masing – masing ekstrak rumput laut dengan berat 43 mg, 91 mg, 180 mg, dan 250 mg dilarutkan dengan masing – masing dengan 10 mL etanol 96%. Sampel selanjutnya diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 3 ml larutan DPPH 40 ppm. Campuran larutan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang 519 nm. Larutan kontrol dibuat dengan mencampurkan 1 mL etanol dengan 3 mL DPPH 40 ppm. Hasil pengamatan dinyatakan dalam persentase inhibisi dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban kontrol}} \times 100\%$$

Pembuatan Pakan Herbal Rumput Laut

Jumlah simplisia rumput laut yang ditambahkan pada pakan ikan ditentukan

dengan mengacu pada nilai IC50 dari uji antioksidan pada ekstrak rumput laut. Dosis simplisia yang digunakan untuk pembuatan 1 kg pakan ikan yaitu sebanyak 10x dari nilai IC50 ekstrak rumput laut. Dalam proses pembuatan pakan ditambahkan 5 mg progol yang dilarutkan dalam 125 mL akuades sebagai perekat pakan. Pakan ikan yang telah dicampur dengan simplisia dikeringkan pada suhu 60°C. Pakan herbal dibuat dengan 2 dosis yaitu pakan herbal dosis IC50 dan pakan herbal dosis 2 kali IC50. Selanjutnya pakan herbal yang telah kering diuji lanjut untuk mengetahui nilai IC50 dari simplisia rumput laut setelah diproses menjadi pakan herbal.

Sesudah perhitungan % inhibisi, dilakukan penentuan persamaan regresi linier dengan x adalah konsentrasi dan y adalah % inhibisi. Nilai $y = 50$ menunjukkan kondisi inhibisi terhadap 50% DPPH. Nilai x merupakan konsentrasi larutan ekstrak rumput laut yang mampu meredam 50% dari total DPPH (IC50). Nilai IC50 dalam uji DPPH artinya sampel yang berhasil meredam 50% DPPH dan dapat disimpulkan sebagai konsentrasi efektif dari aktivitas antioksidan sampel tersebut (Tristantini *et al.*, 2016).

Preparasi Simplisia Rumput Laut dengan Enzim

Estraksi kandungan total flavonoid dalam rumput laut dilakukan dengan menggunakan enzim selulase. Sebanyak 10gram serbuk rumput laut ditambahkan dengan 300 mL akuades, kemudian dihomogenkan. Sampel rumput laut diberikan perlakuan dengan penambahan enzim selulase sebanyak 7,2 mg/g. Proses ekstraksi dilakukan dengan kondisi pH 6, suhu 46 °C dengan waktu inkubasi selama 150 menit.

Aplikasi Pakan Herbal dan Uji Tantang Pada Ikan Koi

Ikan yang telah diaklimatisasi dipindahkan ke dalam akuarium uji dengan jumlah masing –

masing sebanyak 5 ekor ikan. Perlakuan yang diberikan kepada ikan koi sebagai berikut : Pada penelitian ini menggunakan 3 kali pengulangan.

P1 = Ikan diinfeksi *Aeromonas salmonicida* dan diberikan pakan herbal rumput laut dengan dosis IC50

P2 = Ikan diinfeksi *Aeromonas salmonicida* dan diberikan pakan herbal rumput laut dengan dosis 2 kali IC50

P3 = Ikan diberikan pakan herbal rumput laut dengan dosis IC50 tanpa diinfeksi *Aeromonas salmonicida*

P4 = Ikan diberikan pakan herbal rumput laut dengan dosis 2 kali IC50 tanpa diinfeksi *Aeromonas salmonicida*

P5 = Ikan diberikan pakan komersil dengan perlakuan diinfeksi *Aeromonas salmonicida*

P6 = Ikan diberikan pakan komersil dengan perlakuan tanpa diinfeksi *Aeromonas salmonicida*

Jumlah gram pakan yang diberikan mengacu pada nilai IC50 dari pakan herbal rumput laut. Pakan diberikan sebanyak 3 kali dalam sehari. Setelah perlakuan pakan selama 3 minggu, dilakukan uji tantang pada ikan perlakuan dengan menggunakan bakteri *Aeromonas salmonicida*. Uji tantang dilakukan dengan menggunakan metode perendaman. Bakteri *Aeromonas salmonicida* yang telah ditumbuhkan dalam 100 mL media TSB diinkubasi pada suhu 30°C hingga jumlah sel mencapai sekitar 10⁷ CFU/mL. Biakan bakteri kemudian diencerkan dengan 900 mL larutan NaCl 0,85%. Proses perendaman ikan dalam larutan bakteri dilakukan selama 30 menit (Pratiwi *et al.*, 2016). Ikan yang telah mengalami proses perendaman dipindahkan kembali ke dalam akuarium uji untuk diamati gejala klinis dan kelangsungan hidup selama 1 minggu pasca uji tantang.

Pengujian Darah

Pengambilan darah diambil melalui vena caudalis dengan menggunakan spuit 1 cc dengan ukuran jarum 26G. Sebelum pengambilan darah, spuit dibilas dengan EDTA 10% sebagai antikoagulan. Posisi jarum untuk pengambilan darah adalah 45° dan ditarik secara perlahan sampai darah masuk ke dalam tabung. Sampel darah disimpan di tabung mikro (A'yunin *et al.*, 2020). Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke-4.

$$\text{Total Leukosit} = \sum \text{Leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

Uji Total Leukosit

Jumlah leukosit dihitung dengan alat haemocytometer. Darah dipipet menggunakan pipet Thoma leukosit sampai skala 0,5 serta ditambahkan larutan Turk's sampai skala 11, pipet digerakkan dengan menyerupai angka delapan selama 3-5 menit hingga tercampur, kemudian empat tetes sampel pertama dibuang. Larutan tersebut diteteskan pada hemocytometer kemudian ditutup dengan gelas penutup. Sel leukosit diamati di bawah mikroskop dengan ukuran pembesaran 10x dan total leukosit dianalisa berdasarkan pada empat kotak besar di bagian sudut kiri dan kanan atas dan pada sudut kiri dan kanan bawah (A'yunin *et al.*, 2020). Rumus Total Leukosit:

$$\text{Total Leukosit} = \sum \text{Leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

Survival Rate (SR)

dengan menggunakan rumus sebagai berikut Mokoginta, *et.al.*, 2022):

$$SR = \left(\frac{Nt}{NO} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

SR = Kelulushidupan (%)

Nt = Jumlah ikan uji di akhir

NO = Jumlah ikan uji di awal

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining bahan alam yang potensial sebagai imunostimulan ikan dilakukan terhadap rumput laut jenis *Gracillaria sp.* Proses skrining dilakukan berdasarkan kadar senyawa flavonoid yang terkandung di dalam tiap jenis rumput laut yang diuji secara kuantitatif. Proses ekstraksi senyawa bioaktif dilakukan dengan menggunakan 2 jenis pelarut yaitu air dan etanol. Deteksi senyawa flavonoid merupakan Langkah awal dalam pengembangan imunostimulan dari bahan alam. Hal ini dikarenakan flavonoid merupakan senyawa bioaktif yang bersifat immunomodulator dan berperan sebagai antioksidan. Flavonoid dilaporkan dapat mengoptimalkan sistem kekebalan tubuh inang terhadap infeksi patogen (Khoirunnisa dan Sumiwi, 2019).

Tabel 1. Kadar senyawa flavon pada rumput laut *Gracillaria sp.*

No	Jenis Rumput Laut	Jenis Senyawa Bioaktif	Kadar Senyawa Bioaktif
1	Ekstraksi dengan pelarut air	Flavonoid	0,019 ± 1,34
2	Ekstraksi dengan pelarut etanol	Flavonoid	0,59 ± 1,9

Hasil skrining secara kuantitatif menunjukkan

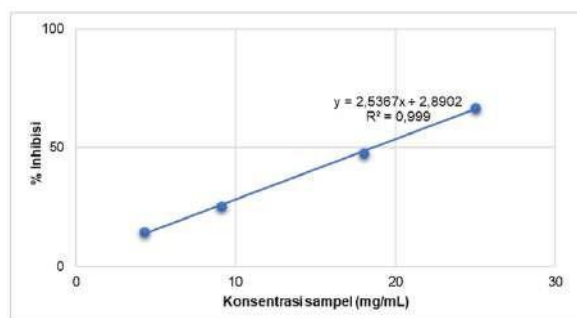
bahwa kadar senyawa flavonoid paling banyak terdapat pada rumput laut jenis *Gracillaria sp.* (Tabel 1). baik pada ekstrak dengan pelarut air maupun alkohol. Kadar senyawa flavon pada ekstrak dengan pelarut air sebesar 0,019 ± 1,34 (mg QE/g) dan pelarut etanol sebesar 0,59 ± 1,9 (mg QE/g). Perbedaan hasil ekstraksi rumput laut dengan pelarut etanol dan pelarut air disebabkan karena adanya perbedaan polaritas antar pelarut. semakin sama nilai kepolaran suatu jenis pelarut dengan kepolaran senyawa bioaktif pada bahan yang diekstraksi berbanding lurus dengan komponen senyawa bioaktif yang terekstraksi maka mampu meningkatkan jumlah rendemen yang diperoleh (Prayoga *et al.*, 2019).

Pelarut etanol mampu melarutkan hampir semua senyawa aktif termasuk flavonoid dikarenakan sifat kepolaran yang mirip. Flavonoid dapat digunakan untuk imunostimulan dikarenakan senyawa antioksidan memberikan senyawa atom hidrogen atau mengkelat logam dalam bentuk glukosida maupun aglikon menagkap radikal bebas (Xiong *et al.*, 2010). Flavonoid mampu meningkatkan Interleukin 12(IL-12) dan proliferasi limfosit sehingga mampu meningkatkan aktivitas immunoglobulin M (Ig M) dan meningkatkan aktivitas fagositosis (Yuliana *et al.*, 2024).

Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Gracillaria sp.*

Uji aktivitas senyawa antioksidan dengan metode DPPH dilakukan untuk mengetahui nilai IC50 dari ekstrak rumput laut *Gracillaria sp.* Nilai IC50 merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang memberikan inhibisi sebesar 50% terhadap radikal bebas DPPH. Hasil nilai absorbansi dan persen inhibisi ekstrak rumput laut *Gracillaria sp.*

Nilai persen inhibisi yang telah diperoleh selanjutnya dikonversi dalam kurva untuk mendapatkan persamaan regresi sehingga dapat ditentukan nilai IC50 dari ekstrak *Gracillaria sp.*

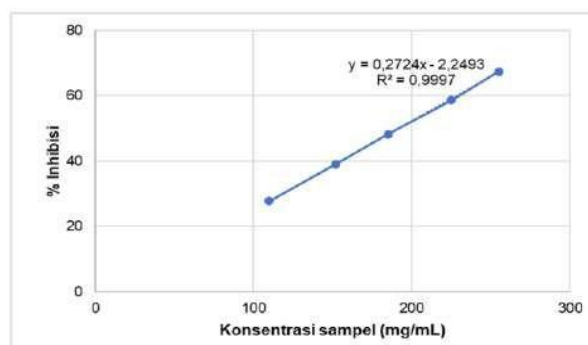


Gambar 1. Kurva nilai absorbansi dan persen inhibisi ekstrak *Gracillaria sp.*

Berdasarkan persamaan regresi dari gambar 1, menyatakan bahwa, $y = 2,5367x + 2,8902$, nilai IC₅₀ dari ekstrak *Gracillaria sp.* adalah sebesar 18,6 mg/mL. Aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat 50-100 µg/mL, sedang 101-150 µg/mL dan lemah 150-200 µg/mL (Molyneux, 2004). Semakin kecil nilai IC₅₀ artinya akan semakin beraktivitas antioksidan sehingga akan semakin banyak radikal bebas yang ditangkap dan semakin tinggi aktivitas fagositosis (Umboro, *et.al.*, 2020).

Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan Pakan Herbal Rumput Laut *Gracillaria sp.*

Pembuatan pakan herbal dilakukan melalui pencampuran pakan komersil dengan simplisia rumput laut yang telah diberi perlakuan enzimatis. Aplikasi enzim seperti pektinase, selulase, dan hemiselulase dapat membantu dalam menghidrolisis komponen dinding sel (Nababan *et al.*, 2019). Proses enzimatis terbukti efisien untuk ekstraksi senyawa polifenol khususnya antosianidin dan flavonoid (Glicor *et al.*, 2019).



Gambar 2. Kurva nilai absorbansi dan persen inhibisi pakan herbal *Gracillaria sp.*

Berdasarkan persamaan regresi dari gambar 2, menyatakan bahwa, $y = 0,2724x - 2,2493$, nilai IC₅₀ dari pakan herbal rumput laut *Gracillaria sp.* adalah sebesar 192 mg/mL. Aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat 50-100 µg/mL, sedang 101-150 µg/mL dan lemah 150-200 µg/mL (Molyneux 2004). Nilai IC₅₀ yang lemah dikarenakan ekstrak *Gracillaria sp.* hanya ditambahkan dalam pakan sebesar 10x dari nilai IC₅₀, sehingga komposisi terbanyak adalah bahan pakan dan sedikit dari kandungan imunostimulan dari *Gracillaria sp.*

Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan Koi

Berdasarkan hasil observasi yang dilakukan terhadap ikan koi selama 2 minggu pasca perlakuan infeksi bakteri *A. salmonicida*, diketahui tingkat kelangsungan hidup pada (Tabel 2). Dengan demikian nilai tingkat kelangsungan hidup ikan koi rendah adalah pada P5 (Ikan diberikan pakan komersil dengan diinfeksi *Aeromonas salmonicida*) sebesar 80% dan selain itu pada P1, P2, P3, P4, dan P6 memiliki nilai kelangsungan hidup 100%. *Survival rate* dari ikan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu umur ikan, nutrisi, serta kualitas air pemeliharaan khususnya suhu dan oksigen (Francisca dan Muhsoni., 2021).

Tabel 2. Kelangsungan Hidup Ikan

No.	Perlakuan	Jumlah Ikan Hidup	Jumlah Ikan Awal	SR%
1	P1	10	10	100
2	P2	10	10	100
3	P3	10	10	100
4	P4	10	10	100
5	P5	8	10	80
6	P6	10	10	100

Kelangsungan hidup ikan tergolong bagus, hal ini dikarenakan kualitas pakan mampu mengoptimalkan kesehatan ikan dan berkorelasi dengan keadaan fisik ikan dan jumlah leukosit ikan. Jumlah leukosit ikan berkaitan dengan respon imun ikan terhadap infeksi antigen. Pada perlakuan P5 kelangsungan hidup tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, adapun kematian ikan disebabkan dari individu ikan yang terlalu aktif dan sering terlempar dari aquarium. Kekurangan oksigen menjadi permasalahan utama ikan mengalami kematian.

Gejala Klinis Pada Ikan Koi

Ikan Koi pada perlakuan P1 yaitu dengan pemberian pakan herbal dengan dosis IC50 dan P2 dengan pemberian pakan herbal dengan dosis 2 kali IC50 menunjukkan terlihat sehat walaupun sudah diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida*. Ikan pada perlakuan P3 dan P4 yaitu perlakuan pakan herbal tanpa infeksi *Aeromonas salmonicida* serta P6 yaitu perlakuan pakan komersil tanpa infeksi bakteri juga menunjukkan terlihat sehat dari morfologi dan gejala klinis yang terlihat (Gambar 3). Gejala klinis yang terlihat yaitu sisik ikan tampak mengkilat serta bersih, tidak mengalami perubahan warna seperti titik maupun bercak, dan sisik ikan tampak utuh

tanpa adanya lesi serta tidak ada geripis pada sirip ikan koi, tidak terdapat benjolan pada permukaan kulit, perut ika tidak melembung, operkulum normal, ikan berenang dengan normal, insang berwarna merah segar, tidak ada lender berlebih pada kulit, masih respon terhadap pemberian pakan, ekor selalu dalam keadaan membuka, gerakan lincah dan gesit serta feses putus – putus saat keluar dari lubang anus.



Gambar 3. Gejala Klinis Ikan Koi Perlakuan P1, P2, P3, P4 dan P6 tampak normal

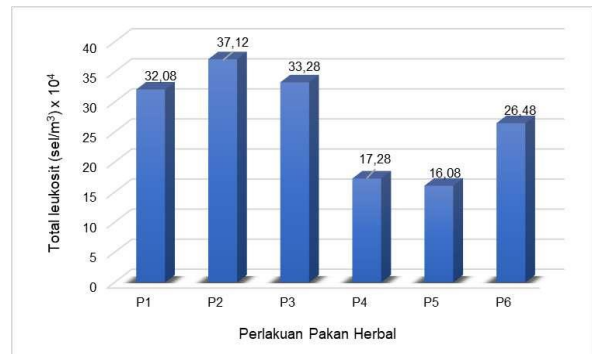
Ikan Koi pada perlakuan P1 yaitu dengan pemberian pakan herbal dengan dosis IC50 dan P2 dengan pemberian pakan herbal dengan dosis 2 kali IC50 menunjukkan terlihat sehat walaupun sudah diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida*. Ikan pada perlakuan P3 dan P4 yaitu perlakuan pakan herbal tanpa infeksi *Aeromonas salmonicida* serta P6 yaitu perlakuan pakan komersil tanpa infeksi bakteri juga menunjukkan terlihat sehat dari morfologi dan gejala klinis yang terlihat.



Gambar 4. Gejala Klinis Ikan Koi P5 Ikan koi pada perlakuan P5 menunjukkan

Beberapa kelainan pada kulit ikan, seperti pada gambar 5 dengan keterangan A yang ditandai dengan kelembekan pada sirip ikan, sedangkan pada keterangan B dan C nampak sisik ikan mengalami kerontokan serta permukaan kulit ikan mengeluarkan lender yang banyak serta pada keterangan D menunjukkan geripis pada sirip ekor ikan sehingga dapat disimpulkan bahwa ikan koi pada perlakuan P5 tidak dalam keadaan sehat (Gambar 4). Furunculosis mengakibatkan peradangan kulit serta sisik ikan secara kronis. *A. salmonicida* mengakibatkan leukopenia, sisik yang rontok, geripis pada sirip, hemoragi, kerusakan jaringan jaringan serta degenerasi sel otot. Perubahan patologi yang menciri antara lain: nekrosis sel otot serta pembengkakan subkutan, Infeksi akut menyebabkan pendarahan pada jaringan pada pangkal sirip dada dan sirip perut (Izadi dan Vajargah, 2022)

Analisis Total Leukosit Pada Ikan Koi
Leukosit merupakan komponen sel darah yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh ikan.



Gambar 5. Grafik total leukosit ikan koi dengan perlakuan pakan herbal *Gracillaria sp.*

Hasil perhitungan total leukosit pada perlakuan pakan herbal (P1, P2, P3, P6 dan P4) mempunyai nilai total yang lebih tinggi daripada nilai total sel leukosit ikan koi yang terinfeksi *A. salmonicida* yang diberi perlakuan pakan komersil (P5) (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa aplikasi imunostimulan berupa pakan herbal rumput laut menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah leukosit pada ikan koi. Jumlah sel leukosit ikan pada *range* nilai antara 20.000 - 150.000 sel per mm³ darah. Pada ikan dengan perlakuan pakan herbal memiliki total leukosit sebesar 37,12 x 10⁴ (P2) dan 33,28 x 10⁴ sel/mm³ (P3) serta total leukosit pada (P1) sebesar 32,08 x 10⁴ sel/mm³. Adanya perlakuan infeksi bakteri *A. salmonicida* pada ikan koi menyebabkan peningkatan leukosit sebesar 46,55% pada ikan perlakuan P2 (2 kali IC50).

Ikan yang diberikan dosis imunostimulan 2IC50 yaitu ikan P2 dan P4 memiliki grafik total leukosit lebih tinggi daripada ikan yang diberikan dosis imunostimulan IC50 yaitu P1 dan P3. Hal ini dikarenakan dengan pemberian dua kali dosis efektif mampu mengoptimalkan

peningkatan sistem imun. Sel imun adaptif termasuk leukosit, monosit dan limfosit. Kenaikan jumlah leukosit adalah suatu respon tubuh karena masuknya obat terapi maupun zat asing (antigen), ketika suatu obat maupun antigen masuk dalam tubuh menyebabkan bersirkulasinya catecholamine dan menaikkan hormon epinephrine serta cortisol sehingga meningkatkan jumlah leukosit (Zulianti *et al.*, 2023). Peningkatan dosis pemberian ekstrak herbal juga menunjukkan perbandingan lurus dengan kemampuan tanaman herbal tersebut sebagai imunostimulan yang ditandai dengan beberapa parameter seperti peningkatan nilai fagositosis dan jumlah total leukosit (Erjon, *et al.*, 2022).

Pada ikan perlakuan pakan herbal IC50 tanpa perlakuan infeksi bakteri (P4) memiliki jumlah leukosit lebih tinggi dibandingkan perlakuan pakan pakan komersil pada ikan koi yang terinfeksi bakteri (P5), namun total leukosit pada ikan yang tidak terinfeksi *A. salmonicida* yang diberikan pakan komersil (P6) lebih tinggi daripada ikan terinfeksi *A. salmonicida* yang diberi pakan herbal *Gracillaria sp.* (P4). Tingginya nilai leukosit P6 daripada P4 dikarenakan beberapa faktor seperti umur ikan, aktivitas otot, aksitasi dan masa estras serta kondisi *stress* pada ikan. Jumlah leukosit dapat mengalami penurunan apabila ikan berada dalam kondisi *stress*. Total leukosit terendah yaitu pada ikan P5 dengan nilai sebesar $16,08 \times 10^4$ sel/mm³, hal ini berkaitan dengan kondisi tubuh ikan yang tidak sehat (Gambar 4) ditunjukkan dengan adanya kelembekan pada sirip ikan, sisik ikan mengalami kerontokan, permukaan kulit ikan mengeluarkan lendir yang banyak serta geripis pada sirip ekor ikan, sehingga ikan tersebut dapat disimpulkan memiliki gejala klinis akibat infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* (Wulandari *et al.*, 2019).

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa jumlah total sel leukosit tertinggi adalah pada ikan yang diberikan pakan berimunostimulan dengan dosis 2IC50 dan diinfeksi dengan *Aeromonas sp* (P2) sebesar $37,12 \times 10^4$ sel/mm³. Sedangkan total leukosit terendah pada ikan P5 yaitu sebesar sebesar $16,08 \times 10^4$ sel/mm³. Tingkat kelangsungan hidup paling rendah adalah pada P5 (Ikan diberikan pakan komersil dengan diinfeksi *Aeromonas salmonicida*) 80% dan selain itu nilai kelangsungan hidup ikan adalah 100%. Pada ikan P5 mengalami kelembekan sirip ikan, kerontokan sisik ikan, permukaan kulit ikan mengeluarkan lendir yang banyak serta geripis pada sirip ekor ikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dituliskan secara jelas dan ringkas kepada Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo yang memberikan bantuan dana penelitian, yang didanai oleh DIPA tahun 2023.

DAFTAR PUSTAKA

- A'yunin, Q., Budianto, B., Andayani, S., & Pratiwi, D. C. (2020). Analisis kondisi kesehatan ikan patin *Pangasius sp.* yang terinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(2), 161-169
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. (2021). *Tingkatkan pertumbuhan ekonomi, KKP komitmen genjot produksi rumput laut*. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Diakses 15 Juli 2021, dari <https://www.kkp.go.id/djpb/tingkatkan-pertumbuhan-ekonomi-kkp->

- komitmen-genjot-produksi-rumput-laut65c300673a472/detail.html
- Erjon, E., Sari, E. R., & Triyani, R. (2022). Efek imunostimulan ekstrak etanol daun jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack) IC Nielsen) pada mencit putih jantan. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 5(1), 62-70. <https://doi.org/10.29313/jiff.v5i1.7704>
- Francisca, N. E. & Muhsoni, F. F. (2021). Laju pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada salinitas yang berbeda. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan dan Perikanan*, 2(3), 166-175.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., & Ferreira, I. C. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols—A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302-315.
- Izadi, F., & Vajargah, M. F. (2022). An overview of furunculosis. *Journal of Biomedical Research & Environmental Science*, 3(6), 738-741.
- Khoirunnisa, I., & Sumiwi, S. A. (2019). Review Artikel: Peran Flavonoid Pada Berbagai Aktivitas Farmakologi. *Farmaka*, 17 (2), 131–142.
- Lengka, K., Manoppo, H., & Kolopita, M. E. (2013). Peningkatan respon imun non spesik ikan mas (*Cyprinus carpio* L) melalui pemberian bawang putih (*Allium Sativum*). *E-Journal Budidaya Perairan*, 1(2).
- Manik, D. F., Hertiani, T., & Anshory, H. (2014). Analisis korelasi antara kadar flavonoid dengan aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Khazanah: Jurnal Mahasiswa*, 1-12.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3), 239-246.
- Mokoginta, L. F., Sinjal, H. J., Pangemanan, N. P., Pelle, W. E., & Solang, J. (2022). Pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi pakan komersil dengan penambahan Effective Microorganism-4. *E-Journal Budidaya Perairan*, 10(2), 166-176.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Nababan, M., Gunam, I. B. W., & Wijaya, I. M. M. (2019). Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri ISSN*, 7(2), 190-199.
- Neidorf, A., & Morozova, M. (2021, December). Diagnosis and treatment of flexibacteriosis of koi carp (*Cyprinus carpio* koi). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 937, No. 3, p. 032040). IOP Publishing.
- Rahmawati, A. R., Ulkhaq, M. F., Susanti, D., Kencono, H., & Fasya, A. H. (2021). Identifikasi Bakteri *Aeromonas Salmonicida* dan *Edwardsiella ictaluri* pada Ikan Hidup yang Akan Dilalulintaskan dari Daerah Istimewa Yogyakarta Identification of *Aeromonas Salmonicida* and *Edwardsiella ictaluri* in Live Fish that

- Will Be Trafficked from Yogyakarta Special Region. *Journal of Marine and Coastal Science Vol*, 10(2).
- Pratiwi, W., Suwanti, L. T., & Satyantini, W. H. (2016). Perendaman ekstrak *Spirulina plantesis* terhadap Ig-M, jaringan limpa dan diferensial leukosit ikan mas setelah diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 18(3).
- Prayoga, D. G. E., Nocianitri, K. A., & Puspawati, N. N. (2019). Identification of phytochemical compounds and antioxidant activity of pepe leaves (*Gymnema reticulatum* Br.) crude extract in various solvent types. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8(2), 111-121.
- Purwaningsih, S., & Deskawati, E. (2020). Karakteristik dan aktivitas antioksidan rumput laut *Gracilaria* sp. asal Banten. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 503-512.
- Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2016). Immunostimulants: types and functions. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 4(3), 45-51.
- Shakya, S. R. (2017). Effect of herbs and herbal products feed supplements on growth in fishes: A review. *Nepal Journal of Biotechnology*, 5(1), 58-63.
- Sinubu, W. V., Tumbol, R. A., Undap, S. L., Manoppo, H., & Kreckhoff, R. L. (2022). Identifikasi Bakteri Patogen *Aeromonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Matungkas, Kecamatan Dimembe, Kabupaten Minahasa Utara. *e-Journal BUDIDAYA PERAIRAN*, 10(2), 109-120.
- Trisnantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Jonathan, J. G. (2016). Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada daun tanjung (*Mimusops elengi* L.). In *Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"* (pp. G1-G1).
- Umboro, R. O., Bimmaharyanto, D. E., & Yanti, N. K. (2020). Uji Efektivitas Antioksidan (IC50) Dan Toksisitas Akut (Ld50) Fraksi Etanol Daun Nangka (*Artocarpus Heterophyllus* Lam.). *JUPE: Jurnal Pendidikan Mandala*, 5(6).
- Wibowo, L., & Fitriyani, E. (2013). *Pengolahan rumput laut (Eucheuma cottoni) menjadi serbuk minuman instan*. *Jurnal Vokasi*, 8(2), 101-109.
- Wulandari, T., Indrawati, A., & Pasaribu, F. (2019). Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* on catfish (*Clarias gariepinus*) farm Muara Jambi, Jambi Province. *Jurnal Medik Veteriner*, 2(2), 89-95.
- Xiong, S. L., Hou, D. B., Huang, N., & Li, A. (2012). Preparation and biological activity of saponin from *Ophiopogon japonicus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(26), 1964-1970.
- Yuliana, D., Handayani, D. P., & Purnamasari, V. (2024). A LITERATUR REVIEW: AKTIVITAS IMUNOMODULATOR PADA TANAMAN HERBAL. *Makassar Pharmaceutical Science Journal (MPSJ)*, 1(4), 243-250.
- Zulianti, D., Savitri, P.G.A., Uswatun, C., Andalucya, F., & Setiyowati, P. A. I. (2023). *Immunostimulant effectiveness of ethanolic extract of Japanese taro (Colocasia esculenta var. antiquorum) as an immune system enhancer by in vivo test*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 8(1), 20-28.