

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KIRINYUH
(*Chromolaena odorata* L) TERHADAP RESPON INSANG IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus,1758) YANG TERINFEKSI BAKTERI
Aeromonas hydrophila MELALUI HISTOLOGI**

**EFFICACY OF GIVING CHROMOLAENA ODORATA L EXTRACT IN
RESPONSE TO A PARTIE OF NILLA (*Oreochromis niloticus*)
(LINNAEUS,1758) THAT IS INFECTED WITH *Aeromonas hydrophilas*
HISTOLOGY**



Ade Pratama

L012222006



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KIRINYUH
(*Chromolaena odorata L*) TERHADAP RESPON INSANG IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) YANG TERINFEKSI BAKTERI
Aeromonas hydrophila MELALUI HISTOLOGI**

Ade Pratama

L012222006



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KIRINYUH
(*Chromolaena Odorata L*) TERHADAP RESPON INSANG IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus,1758) YANG TERINFEKSI BAKTERI
(*Aeromonas hydrophila*) MELALUI HISTOLOGI

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

Ade Pratama

L012222006

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KIRINYUH
(*Chromolaena Odorata L*) TERHADAP RESPON INSANG IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) YANG TERINFEKSI BAKTERI
(*Aeromonas hydrophila*) MELALUI HISTOLOGI

Ade Pratama

L012222006

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 15 Oktober 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Magister Ilmu Perikanan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin
Makassar

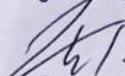
Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



Dr. Marlina Achmad, S.Pi, M.Si
NIP 132307998

Pembimbing Pendamping,



Dr. Ir. Gunarto Latama M.Sc
NIP 131803220

Ketua Program Studi



Dr. Ir. Badraeni, MP
NIP 196510231991032001

Dekan Fakultas Ilmu kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin,



Prof. Safruddin, S.Pi, MP, Ph.D
NIP 197506112003121003

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "efektivitas pemberian ekstrak daun kirinyuh (*Chromolaena Odorata L*) terhadap respon insang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) yang terinfeksi bakteri (*Aeromonas hydrophila*) melalui histologi" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr.Marlina Achmad,S,Pi, M.Si dan Dr.Ir.Gunarto latama, M.Sc). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan, maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah disubmit di Jurnal (African Journal of Biological Sciences) sebagai artikel dengan judul " The Effectiveness of Giving Kirinyuh Leaf Extract (*C. odorata L* on *Tilapia O.niloticus* Infected W ith Bacteria *Aeromonas Hydrophila* through Histology". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 26 November 2024

Materai dan tanda tangan



v

v

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Dr.Marlina Achmad,S.Pi, M.Si sebagai pembimbing utama, dan Dr.Ir.Gunarto latama, M.Sc sebagai pembimbing pendamping. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Teknologi Pembenihan, Laboratorium Produktivitas dan Kualitas Perairan, dan Laboratorium penyakit dan parasit, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, yang telah mengizinkan saya untuk melaksanakan penelitian.

Kepada Ibu Dr. Andi Aliah Hidayani,S.Si.,M.Si, Asmi Citra Marlina,S.Pi.,M.Agr., Ph.D. dan Dr. Ir. Hasni Yulianti Aziz, M,P. selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan saran dan masukan kepada penulis.

Kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen. Serta teman-teman, saya mengucapkan terima kasih atas bantuan dan suport selama menempuh program pendidikan magister.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada seluruh keluarga (kakak/adik, tante paman) atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis,



Ade Pratama

ABSTRAK

Ade Pratama **Efektivitas Pemberian Ekstrak Daun Kirinyuh (*Chromolaena Odorata L*) Terhadap Respon Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus,1758) Yang Terinfeksi Bakteri (*Aeromonas hydrophila*) Melalui Histologi** (di bimbing oleh Marlina Achmad dan Gunarto Latama).

Latar Belakang: Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah spesies ikan air tawar yang banyak dibudidayakan karena pertumbuhannya yang cepat dan adaptabilitas yang tinggi. Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu masalah penting dalam budidaya ikan nila. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi bakteri ini dapat menyebabkan perubahan struktur histologis insang, serta perubahan pada hematologi. Ekstrak daun kirinyuh mengandung flavonoid, berpotensi sebagai antibakteri untuk infeksi bakteri. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Menilai efektivitas ekstrak daun kirinyuh sebagai antibakteri terhadap insang ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* melalui pendekatan histologi, dan (2) Menentukan dosis terbaik ekstrak kirinyuh untuk mengatasi infeksi *A. hydrophila* pada insang ikan nila berdasarkan hasil histologi. **Metode:** Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari empat perlakuan dengan tiga ulangan: (A) Pemberian ekstrak kirinyuh 9 g, (B) Pemberian ekstrak kirinyuh 10 g (C) Pemberian ekstrak kirinyuh 11 g dan (D) Kontrol (tanpa ekstrak daun kirinyuh). Ikan nila yang digunakan memiliki ukuran seragam. Uji histologi dilakukan untuk mengevaluasi dampak ekstrak kirinyuh terhadap kondisi insang ikan. **Hasil:** Penelitian uji toksisitas ekstrak daun kirinyuh terhadap ikan nila menunjukkan adanya toksisitas, pada konsentrasi 11 g (perlakuan C) dengan kematian satu ekor, Konsentrasi 12 g (perlakuan D), kematian mencapai 4 ekor pada Konsentras 9 g dan 10 g (perlakuan A dan B) tidak menyebabkan kematian. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kirinyuh terhadap *A. hydrophila* menunjukkan hasil yang menjanjikan. Pada Konsentrasi (11g/50 μ l) menghasilkan zona hambat 18,67 mm, Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan ($p < 0,05$). hasil pengamatan histologi insang ikan nila yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, terlihat berbagai perubahan patologis yang signifikan pada struktur insang Pada setiap perlakuan. pengamatan survival rate (SR), memperlihatkan pengaruh yang signifikan pada pemberian ekstrak terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan. Hasil Analisis ANOVA menunjukkan pemberian ekstrak kirinyuh berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap survival rate. Pengukuran kualitas air memperlihatkan ikan nila selama penelitian dalam keadaan baik dan optimal. **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil penelitian bahwa Ekstrak daun kirinyuh menunjukkan potensi sebagai agen terapeutik alami dalam pengendalian infeksi *A. hydrophila* pada ikan nila (*O. niloticus*). Namun, penggunaannya memerlukan pertimbangan dosis yang maksimal.

Kata Kunci: Ikan nila, *Aeromonas hydrophila*, ekstrak daun kirinyuh, histologi, antibakteri.

ABSTRACT

ADE PRATAMA **The Effectiveness of Kirinyuh Leaf Extract (*Chromolaena Odorata* L.) on the Gill Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected with Bacteria (*Aeromonas hydrophila*) via Histological Analysis** (Supervised by Marlina Achmad and Gunarto Latama).

Background. Nile tilapia (*O. niloticus*) is a widely cultivated freshwater fish species known for its rapid growth and high adaptability. However, infection by the bacterium *Aeromonas hydrophila* poses a significant challenge in tilapia farming, as it can cause structural changes in the gills and alterations in hematology. Kirinyuh leaf extract, which contains flavonoids, has shown potential as an antibacterial agent against such infections. **Objective.** This study aims to (1) assess the antibacterial effectiveness of kirinyuh leaf extract on the gills of Nile tilapia infected with *A. hydrophila* through histological methods, and (2) determine the optimal dosage of kirinyuh extract for treating *A. hydrophila* infections in Nile tilapia gills based on histological findings. **Methods:** The research employed an experimental design using a completely randomized design (CRD) with four treatments and three replications: (A) 9 g kirinyuh extract, (B) 10 g kirinyuh extract, (C) 11 g kirinyuh extract, and (D) control (no kirinyuh extract). The tilapia used were of uniform size. Histological tests were conducted to evaluate the impact of kirinyuh extract on the gill condition of the fish. **Results.** The toxicity test of kirinyuh leaf extract on Nile tilapia indicated toxicity at the 11 g concentration (treatment C), with one fish mortality, and at the 12 g concentration (treatment D), where four fish died. However, no mortality was observed at the 9 g and 10 g concentrations (treatments A and B). The antibacterial activity test of kirinyuh leaf extract against *A. hydrophila* showed promising results, with an inhibition zone of 18.67 mm at the 11 g/50 μ l concentration. ANOVA analysis revealed significant differences between treatment groups ($p < 0.05$). Histological observations of the gills of Nile tilapia infected with *A. hydrophila* revealed significant pathological changes in gill structure across treatments. The survival rate (SR) analysis also showed that the extract significantly impacted the fish's survival rate. ANOVA results indicated that kirinyuh extract had a significant effect ($P < 0.05$) on survival rate. Water quality measurements indicated that the tilapia remained in good and optimal conditions throughout the study. **Conclusion.** Kirinyuh leaf extract demonstrates potential as a natural therapeutic agent for controlling *A. hydrophila* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). However, careful consideration of the optimal dosage is necessary for its use.

Keywords: Nile tilapia, *Aeromonas hydrophila*, kirinyuh leaf extract, histology, antibacterial.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGUJIAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	v
UCAPAN TERIMAKASIH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	3
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan dan Manfaa	3
1.4. Batas Penelitia	3
1.5. Hipotesis	3
1.6. Kerangka Pikir	3
BAB II METODE PENELITIAN.....	5
2.1. Tempat dan Waktu	5
2.2. Prosedur Penelitian	5
2.2.1. Pengambilan Sampel.....	5
2.2.2. Sterilisasi Alat dan bahan.....	5
2.2.3. Proses Ekstraksi Daun Kirinyuh	5
2.2.4. Kultur Bakteri dan Pembuatan Media kultur.....	6
2.2.5. Pengamatan Toksitas.....	7
2.2.6. Aktivitas Antibakteri	7
2.2.7.Perendaman Ekstrak	8
2.2.8. Histologi	9
2.3. Metode Penelitian.....	10
2.4. Prameter Penelitian	11
2.4.1. UJI LD50 (Lethal Dose 50).....	11
2.4.2. Uji Aktifitas Antibakteri.....	12
2.4.3.Pemeriksaan Histologi	12
2.4.4.SR (Survival Rate).....	13
2.4.5. Analisis data	13
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	16
3.1 Hasil	16
3.1.1 UJI Toksitas Ekstrak Daun Kirinyuh	16
3.1.2 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kirinyuh	16
3.1.3 Histologi Insang Ikan Nila	18
3.1.4 SR (Survival Rate)	19

3.1.5 Kualitas Air	19
3.2 Pembahasan	20
3.2.1 Uji Toksitas	20
3.2.2 Aktivitas Antibakteri.....	21
3.2.3 Histologi Insang Ikan Nila	22
3.2.4 SR (Survival Rate).....	23
3.2.5 Kualitas Air	24
BAB IV KESIMPULAN DAN SARA	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	31
RIWAYAT HIDUP	41

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Daun kirinyuh.....	3
2. Tingkat aktivitas antimikroba berdasarkan diameter zona hambat	9
3. Hasil Uji Toksitas ekstrak daun Kirinyuh.....	16
4. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hamb.....	16
5. Hasil pengamatan survival rate pemeliharaan.....	19
6. Hasil Pengukuran Kualitas Air.....	19

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Skema kerja uji aktivitas antibakteri dengan metode difusiagar.....	9
2. Desain Penelitian.....	12
3. Hasil Zona Hambat Ekstrak Daun Kirinyuh.....	17
4. Histologi insang Ikan Nila.....	18

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Alat Penelitian.....	27
2. Bahan Penelitian.....	29
3. Dokumentasi Penelitian	32
4. Data Pengamatan Pemeliharaan Ikan Nila	32
5. Data <i>Survival Rate</i> Ikan Nila.....	34
6. Data Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Kirinyuh	35
7. Data Hasil Histologi Insang	35
8. Analisis Kualitas Air	35

DAFTAR TABEL

Tabel

Nomor urut	Halaman
1.Alat.....	32
2. Hasil Uji Toksitas Ekstrak Daun Krinyu.....	33
3.Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Daun Kirinyuh.....,,	34
4.Hasil Pengamatan Survival Rate Pemeliharaan.....	35
5.Hasil Pengukuran Kualitas Air.....	35

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu komoditas perikanan yang memiliki nilai ekonomi tinggi di banyak negara, termasuk Indonesia. Ikan ini dikenal dengan pertumbuhannya yang cepat, kemampuan beradaptasi dengan berbagai kondisi lingkungan, serta efisiensi konversi pakan yang baik. Keunggulan-keunggulan ini menjadikan ikan nila sebagai pilihan utama dalam budidaya perikanan air tawar, tidak hanya untuk konsumsi lokal tetapi juga untuk ekspor. Laporan FAO "Keadaan Perikanan dan Akuakultur Dunia 2022" mengungkapkan bahwa di antara spesies ikan bersirip, nila menduduki posisi kedua dalam produksi budidaya air global, tepat di bawah ikan mas. Fakta ini menegaskan peran krusial nila dalam pertumbuhan ekonomi perikanan internasional.

Habitat alami ikan nila meliputi perairan tawar seperti sungai, danau, waduk, dan rawa-rawa. Namun, spesies ini juga mampu hidup di perairan payau dan bahkan air laut berkat toleransinya yang tinggi terhadap variasi salinitas. Adaptabilitas ini membuat ikan nila menjadi salah satu spesies yang paling mudah dibudidayakan dalam berbagai sistem perairan (Mujalifah et al., 2018). Meskipun demikian, budidaya ikan nila menghadapi berbagai tantangan, salah satunya adalah serangan penyakit.

Insang merupakan organ penting pada ikan yang memiliki fungsi vital, yaitu sebagai organ pernapasan dan osmoregulasi. Insang juga berinteraksi langsung dengan lingkungan perairan, sehingga dapat menjadi indikator yang sensitif terhadap perubahan kualitas air (Pramono et al., 2016). Penelitian-penelitian terbaru telah menunjukkan bahwa perubahan struktur histologis insang dapat mengindikasikan dampak dari berbagai faktor, seperti kondisi lingkungan perairan dan infeksi bakteri patogen. Dalam kondisi lingkungan yang buruk, insang ikan nila (*O. niloticus*) dapat mengalami kerusakan histologis, seperti hiperplasia, edema, dan nekrosis (Pramono et al., 2016). Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu masalah penting dalam budidaya ikan nila. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi bakteri ini dapat menyebabkan perubahan struktur histologis insang, serta perubahan pada profil hematologi ikan nila (Aisyah et al., 2016; Jusadi et al., 2018). Kondisi insang yang terganggu dapat memengaruhi respons imun ikan terhadap infeksi (Rahmadani et al., 2017).

Bakteri *Aeromonas* merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan berbagai penyakit pada ikan, termasuk septicemia hemoragik, yang ditandai dengan gejala seperti luka pada tubuh, eksophthalmia (mata menonjol), ulserasi, dan perut bengkak. Infeksi yang ditimbulkan oleh bakteri ini bersifat akut dengan tanda klinis warna kulit ikan menjadi lebih gelap, hemoragik pada kulit, hemoragik lokal pada pangkal operkulum, sirip ekor dan sirip punggung, pembengkakan pada organ hati dan limpa serta menyebabkan pendarahan pada organ pencernaan (Mangunwardoyo et al., 2016). Penyebaran bakteri ini sering dikaitkan dengan kondisi perairan yang buruk, termasuk tingginya kadar bahan organik, yang dapat menjadi media pertumbuhan yang baik bagi bakteri tersebut. Pengendalian infeksi *A. hydrophila* dalam budidaya ikan nila biasanya dilakukan dengan penggunaan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik secara terus-menerus dapat menimbulkan masalah serius, seperti resistensi antibiotik pada patogen, pencemaran lingkungan perairan, dan adanya residu antibiotik dalam produk ikan yang dapat membahayakan kesehatan konsumen (Chen et al., 2019). Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan yang lebih aman dan ramah lingkungan.

Salah satu alternatif yang potensial adalah penggunaan bahan alami atau herbal sebagai agen antibakteri. Salah satu tanaman yang memiliki potensi besar dalam hal ini adalah kirinyuh. Meskipun sering dianggap sebagai tanaman gulma, kirinyuh memiliki berbagai senyawa bioaktif yang bisa dimanfaatkan untuk keperluan medis, termasuk sebagai agen antimikroba. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kirinyuh mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, triterpenoid, tanin, dan fenolik, yang semuanya memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan (Irma et al., 2016).

Flavonoid dalam daun kirinyuh, diketahui dapat mengganggu integritas sel bakteri dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sitoplasma, yang akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri (Darmawati et al., 2015). Saponin, senyawa lain yang terdapat dalam daun kirinyuh, bekerja sebagai antimikroba dengan menurunkan tegangan permukaan sel bakteri, menyebabkan kebocoran sel, dan memicu kematian sel (Noer, 2006). Alkaloid, yang juga terkandung dalam kirinyuh, dapat mengganggu pembentukan dinding sel bakteri, yang sangat penting untuk menjaga integritas struktural sel (Ernawati, 2015). Selain itu, tanin diketahui dapat menyebabkan lisis sel bakteri dengan cara mengganggu polipeptida pada dinding sel, sehingga mencegah pembentukan dinding sel yang sempurna dan menyebabkan kematian sel (Ngajow et al., 2013).

Penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan ekstrak daun kirinyuh sebagai agen antibakteri dalam budidaya ikan nila sangat penting. Hal ini tidak hanya untuk mengurangi ketergantungan pada antibiotik sintetis, tetapi juga untuk menemukan solusi yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan dalam pengelolaan kesehatan ikan budidaya. Selain itu, penggunaan tanaman herbal seperti kirinyuh dapat menjadi alternatif yang lebih aman bagi kesehatan konsumen serta

lingkungan perairan, yang sering kali terancam oleh polusi dan resistensi mikroba akibat penggunaan antibiotik. Dengan demikian, pemanfaatan tanaman herbal seperti kirinyuh dapat berkontribusi pada keberlanjutan dan kesehatan industri akuakultur.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan sebelumnya, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana potensi ekstrak daun kirinyuh (*Chromolaena odorata L*) terhadap *histologi* insang ikan nila yang tersinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*?
2. Berapa dosis ekstrak daun kirinyuh yang dapat berpengaruh terhadap perubahan *histologi* insang ikan nila yang tersinfeksi bakteri *A. hydrophila*?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

2. Menganalisis efektifitas ekstrak daun kirinyuh sebagai antibakteri terhadap insang ikan nila yang tersinfeksi bakteri *A. hydrophila* melalui *histologi*.
3. Menentukan dosis terbaik ekstrak kirinyuh melalui insang ikan nila) yang tersinfeksi bakteri *A. hydrophila* melalui *histologi*.

1.4 Batas Penelitian

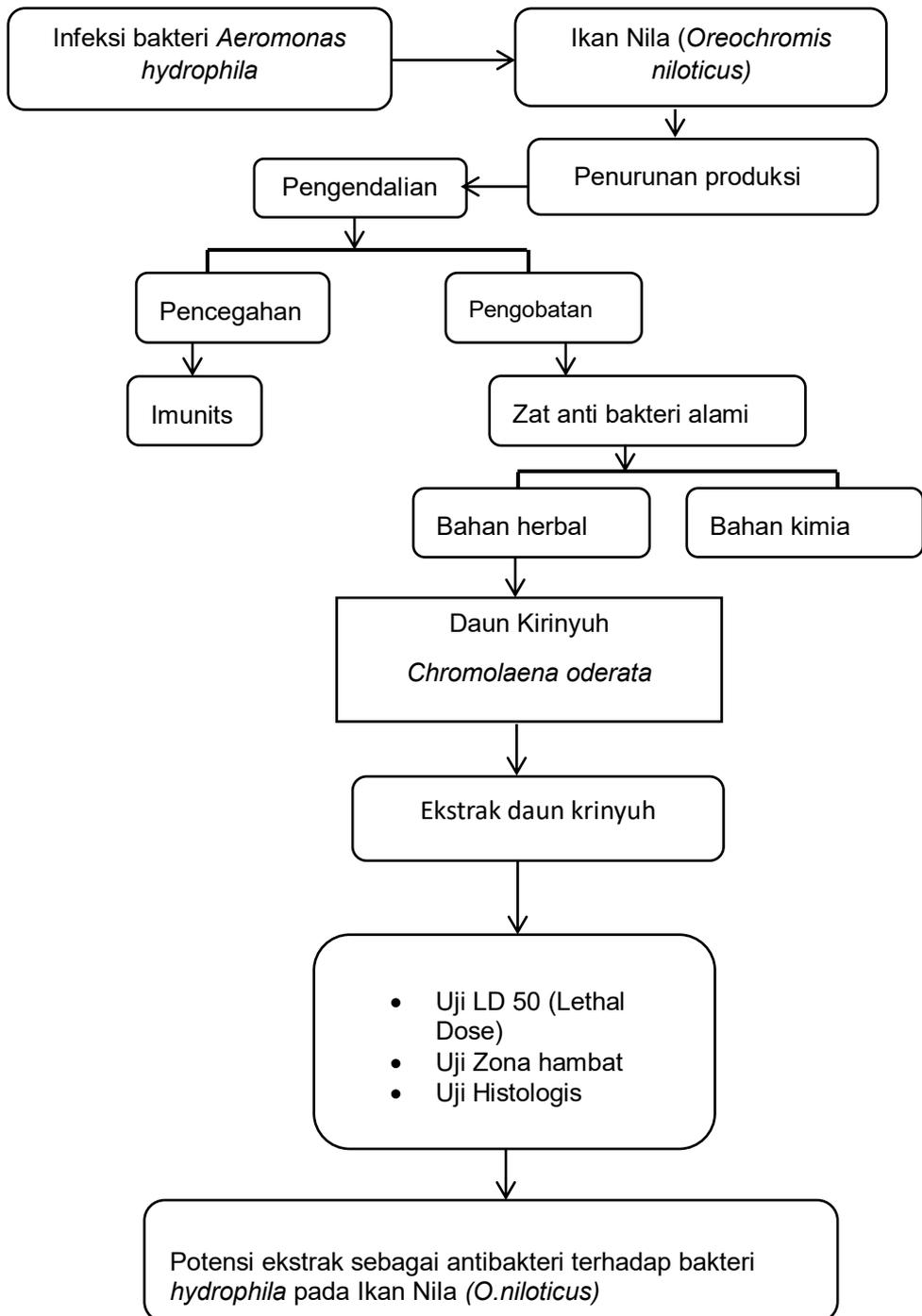
Penelitian ini dibatasi dengan pemberian ekstrak daun kirinyuh dengan dosis yang berbeda pada ikan nila yang terinfeksi bakteri (*A. hydrophila*)

1.5. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun kirinyuh memiliki potensi antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan nila.

1.6. Kerangka Pikir

Kerangka pemikiran adalah alur pikir peneliti sebagai dasar-dasar pemikiran untuk memperkuat sub fokus yang menjadi latar belakang dari penelitian ini. Maksud dari kerangka berpikir sendiri adalah supaya terbentuknya suatu alur penelitian yang jelas dan dapat diterima secara akal (Sugiyono, 2017: 92).



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Februari 2024 di Laboratorium teknologi pembenihan dan laboratorium penyakit dan parasit Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan (FIKP) Universitas Hasanuddin.

2.2. Prosedur Penelitian

2.2.1. Pengambilan Sampel

Sampel daun kirinyuh (*Chromolaena odorata*) dikumpulkan dari Desa Tandung Kab Luwu Utara. Daun kirinyuh yang terkumpul selanjutnya akan dibersihkan dengan air sampai bersih kemudian dikering anginkan pada suhu ruangan sampai benar benar kering. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk dan selanjutnya di timbang (Vicencio, 2020)

2.2.2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda (alat ataupun bahan). Tujuan sterilisasi adalah, Mematikan, menghambat pertumbuhan dan menyingkirkan semua mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan yang akan digunakan dalam suatu pekerjaan guna menciptakan suasana aseptis. Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih menggunakan deterjen dan dikeringkan dengan posisi terbalik di udara terbuka, setelah kering dilakukan sterilisasi dengan cara memasukkan alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam autoclave selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer, kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven selama 30 menit.

2.2.3. Proses Ekstraksi Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata L.*)

Ekstraksi adalah proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Zhang et al., 2018) hal ini, daun kirinyuh diekstraksi melalui metode maserasi, mengikuti langkah-langkah berikut:

1. Persiapan Bahan

Daun kirinyuh dipetik lalu dikeringkan pada suhu ruangan. 40-60°C Setelah kering, daun ditimbang sebanyak 500 g dan dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus.

2. Perendaman (Maserasi)

Serbuk daun kirinyuh direndam dalam methanol 70% dengan volume sebanyak 300 ml. Campuran ini diaduk untuk memastikan pelarut dan serbuk daun tercampur merata. Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam Setiap 24 jam, larutan disaring menggunakan kertas saring pada corong.

3. Penggantian Pelarut

Setelah penyaringan, pelarut yang lama disimpan dan diganti dengan methanol baru sebanyak 300 ml. Pada labu Erlenmeyer proses ini diulang selama tiga kali dalam jangka waktu 24 jam untuk memastikan senyawa aktif terlarut dengan baik.

4. Pemekatan Ekstrak

Larutan maserat yang telah dikumpulkan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 61°C dengan kecepatan 60 rpm. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan methanol sehingga diperoleh ekstrak yang lebih kental.

5. Pengeringan Ekstrak

Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dikeringkan menggunakan hedrayer selama 24 jam, untuk memastikan tidak ada sisa pelarut. Ekstrak kering ini disimpan dalam wadah steril yang tertutup rapat dan dapat disimpan di lemari es hingga siap digunakan untuk pengujian lebih lanjut hasil ekstrak di hitung menggunakan rumus berikut (Dahanani et al.,2017).

$$\% \text{ Ekstrak} = \frac{(\text{Berat simplisia})}{\text{Ekstrak pekat!}} \times 100$$

2.2.4. Kultur Bakteri dan Pembuatan Media kultur

Pembuatan media dilakukan dengan cara mempersiapkan akuades sebanyak 60 ml lalu penimbangan media TSA sebanyak 2,4 g setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer, dipanaskan dengan menggunakan hot plate sambil diaduk rata dengan menggunakan magnetik stirrer yang dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Setelah mendidih dan tercampur rata media TSA disterilkan dengan menggunakan autoclave selama 20 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atmosfer. Media agar didinginkan hingga suhu sekitar 50°C, lalu dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 20 ml untuk setiap cawan Petri.

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 1,28 g ditambahkan akuades sebanyak 32 ml lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan sterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampai media membeku.

Pemeliharaan stok kultur bakteri *A. hydrophila* mengikuti metode (Sieber et al.,2020) yaitu stok murni bakteri diambil sebanyak satu ose kemudian diisolasi pada media TSA secara esepik kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan koloni segar yang tumbuh. Kemudian koloni di pindahkan kembali pada media TSA yang cair steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan suspensi uji bakteri yang segar dan pertahankan pada suhu 4°C.

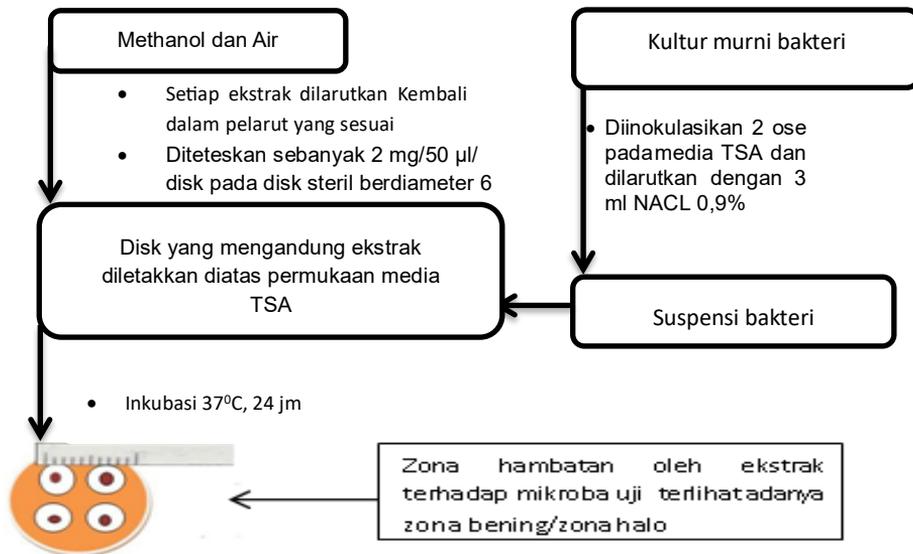
2.2.5. Pengamatan Toksitas

Pengamatan dilakukan setiap 6 jam selama 3 hari, dengan mencatat jumlah kematian ikan di setiap wadah beserta waktu kematian, guna menganalisis dampak toksisitas ekstrak daun krinyuh secara tepat. Selain kematian, perilaku ikan dipantau, termasuk tanda-tanda stres seperti pergerakan lamban, hilangnya keseimbangan, dan peningkatan laju pernapasan, yang mengindikasikan adanya respons terhadap toksin. Pengamatan fisik juga dilakukan untuk mendeteksi adanya perubahan pada kondisi tubuh ikan, seperti kerusakan insang, perubahan warna, atau munculnya luka. Data hasil pengamatan ini dicatat dengan rinci dan sistematis dalam tabel observasi untuk memudahkan penarikan kesimpulan terkait tingkat toksisitas ekstrak daun krinyuh.

2.2.6. Aktivitas Antibakteri

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan merujuk pada metode yang telah digunakan sebelumnya yaitu metode difusi agar (Zainuddin et al., 2019; 2020) (Gambar.1). Ekstrak kasar (metanol dan air) dilarutkan kembali dengan masing-masing pelarutnya kemudian diteteskan pada permukaan paper disk dengan konsentrasi 2 mg/50 μ l/disc. Paper disk kemudian dikeringkan pada laminary flow sampai seluruh pelarut menguap.

Seluruh isolat bakteri uji dikultur pada media Tryptic Soy Agar (TSA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara mengambil 2 ose kultur murni bakteri, kemudian disuspensikan ke dalam 3 ml larutan fisiologis NaCl 0,9% steril dan diaduk hingga merata. Sebanyak 200 μ l suspensi bakteri dengan kepadatan masing-masing 107 ml dicampurkan ke dalam media agar yang hangat dan diaduk perlahan di dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Setiap jenis ekstrak diteteskan sebanyak 50 μ l pada paper disk yang berbeda dan kemudian pelarut dibiarkan menguap. Disk kemudian diletakkan secara hati-hati dan aseptis pada permukaan media agar yang telah dihomogenkan dengan bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik ciprofloxacin 30 ppm, dan kontrol negatif adalah pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (metanol dan air). Setelah masa inkubasi, aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat (zona bening/halo) disekitar paper disk yang diukur dengan menggunakan mistar. Penentuan tingkat aktivitas antimikroba berdasarkan diameter zona hambat menurut Zainuddin (2006).



Gambar 1. Skema kerja uji aktivitas antibakteri dengan metode difusiagar.
(Zainuddin et al., 2019; 2020).

Tabel 2. Tingkat aktivitas antimikroba berdasarkan diameter zona hambat
(Zainuddin, 2006).

Diameter zona hambat (mm)	Aktivitas antibakteri
≥ 20	Sangat tinggi
15 - <20	Tinggi
10 - <15	Sedang
6 - <10	Lemah
6	Tidak ada aktivitas

2.2.6. Perendaman Ekstrak

Perendaman ekstrak daun kirinyuh dilakukan menggunakan metode yang mengacu pada penelitian Pratama et al. (2017).

1. Persiapan Infeksi Bakteri

Infeksi dilakukan dengan menyemprotkan 0,8 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 ke insang ikan secara intramuskular. Setelah itu, ikan dimasukkan ke dalam 12 wadah berisi air dengan volume 9 liter per wadah. Setiap wadah berisi 10 ekor ikan dengan ukuran 11 cm yang dipantau hingga muncul gejala klinis infeksi seperti kerusakan pada insang yang ditandai dengan

ikan tersenggal-senggal di permukaan air di akibatkan kematian jaringan pada insang.

2. Pengobatan dengan Ekstrak Daun Kirinyuh

Setelah ikan menunjukkan gejala infeksi, pengobatan dilakukan melalui perendaman dengan larutan ekstrak daun kirinyuh. Konsentrasi yang digunakan dalam setiap perlakuan berbeda, yaitu, Perlakuan A 9 g ekstrak, Perlakuan B 10 g ekstrak, Perlakuan C 11 g ekstrak D kontrol yang tidak diberi perlakuan ekstrak daun kirinyuh. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 3 kali ulangan untuk memastikan hasil yang konsisten.

3. Adaptasi dan Pemeliharaan Ikan

Sebelum pemberian ekstrak, ikan diadaptasikan selama 30 menit. Hal ini dilakukan agar ikan dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan perendaman. Setelah adaptasi, ikan dipelihara selama 7 hari di dalam wadah yang telah disiapkan. Pakan diberikan secara satiasi berupa pelet dua kali sehari, yakni pada pukul 08.00 dan 15.00 WIB.

4. Pemantauan Kualitas Air

Kualitas air dijaga dalam batas toleransi yang sesuai untuk ikan nila, memastikan lingkungan yang optimal selama periode pemeliharaan.

2.2.7. Histologi

Menurut Sukiman (2022), prosedur histologi insang merupakan serangkaian tahapan penting dalam preparasi jaringan insang untuk analisis mikroskopis. Prosedur ini mencakup tahapan-tahapan mulai dari pengambilan sampel hingga dokumentasi hasil mikroskopis, yang bertujuan untuk memantau perubahan histologis yang terjadi, (Ghosh et al., 2017) Dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pengambilan Sampel Jaringan (Tissue Sampling)

- Pengambilan: Insang ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* diambil dengan hati-hati menggunakan alat bedah steril (seperti pinset dan gunting bedah) setelah perlakuan dengan ekstrak daun kirinyuh.
- Pembersihan: Sampel insang dibersihkan dengan larutan fisiologis steril (misalnya NaCl 0,9%) untuk menghilangkan kotoran atau darah yang bisa mempengaruhi hasil pengamatan.

2. Fiksasi Jaringan (Fixation)

- Fiksasi: Sampel insang dimasukkan ke dalam larutan fiksatif seperti formalin 10% atau larutan Bouin untuk mencegah dekomposisi jaringan dan mempertahankan struktur seluler.
- Waktu Fiksasi: Proses fiksasi dilakukan selama 24–48 jam pada suhu ruangan.

3. Pencucian (Washing)
 - Cucu insang dengan larutan buffer (seperti PBS) untuk menghilangkan formalin
4. Dehidrasi (Dehydration)
 - Dehidrasi: Sampel jaringan yang telah difiksasi didehidrasi melalui serangkaian rendaman dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 100%) untuk menghilangkan air dari jaringan.
 - Durasi: Masing-masing tahapan dehidrasi berlangsung selama 1–2 jam.
5. Penyusunan dalam Parafin (Infiltration)
 - Penanaman: Jaringan yang telah didehidrasi direndam dalam larutan parafin cair pada suhu sekitar 60°C hingga seluruh jaringan terselimuti parafin.
 - Tahapan: Proses ini dilakukan dalam dua atau tiga tahap rendaman parafin, masing-masing selama 1–2 jam.
6. Pencetakan (Embedding)
 - Menyusun insang dalam cetakan paraffin dan membukakan untuk membentuk blok jaringan.
7. Pemotongan Jaringan (Sectioning)
 - Pemotongan: Setelah jaringan mengeras karena parafin, dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom untuk menghasilkan irisan tipis (sekitar 4–5 mikrometer) yang dapat ditempatkan pada kaca objek.
 - Persiapan: Irisan yang telah dipotong ditempatkan di kaca objek dan dipanaskan sedikit untuk melelehkan parafin agar menempel pada kaca.
8. Pewarnaan Jaringan (Staining)
 - Pewarnaan: Irisan jaringan diwarnai menggunakan pewarna histologis seperti Hematoxylin-Eosin (HE):
 - Hematoxylin: Mewarnai inti sel dengan warna biru atau ungu.
 - Eosin: Mewarnai sitoplasma dan struktur lainnya dengan warna merah muda.
 - Pencucian dan Pengeringan: Setelah pewarnaan, sampel dicuci dan dikeringkan.

2.3 Metode Penelitian

Perlakuan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kirinyuh dengan dosis yang berbeda pada ikan nila yang terinfeksi bakteri *Aeromonas*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), empat perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah perendaman ekstrak dau kirinyuh kedalam wadah penelitian.

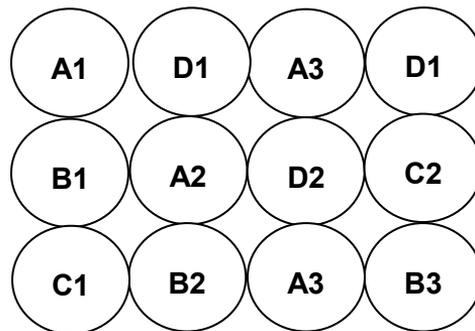
A : Pemberian ekstrak daun kirinyuh 9 g

B : Pemberian ekstrak daun kirinyuh dosis 10 g

C : Pemberian ekstrak daun kirinyuh dosis 11 g

D : Kontrol (Perlakuan tanpa pemberian dosis ekstrak daun kirinyuh).

Ikan nila diberi pakan pelet dua kali sehari, yaitu pada pukul 08.00 dan 15.00. Pakan yang diberikan secara satiasa yaitu pemberian pakan sesuai kemampuan ikan, adapun indikator kenyang pada ikan sampai tidak merespon lagi pakan yang diberikan.



Gambar 2. Desain Penelitian

Keterangan :

A, B, C = Perlakuan

D = Kontrol

1, 2, dan 3 = Ulangan.

2.4. Parameter Penelitian

2.4.1. UJI LD50 (Lethal Dose 50)

Pada uji LD50 dosis yang digunakan berdasarkan dosis uji MIC yang sudah dilakukan Mitaningrum (2019). Pada uji MIC diperoleh hasil ekstrak daun kirinyuh pada konsentrasi 9 ppm sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Uji LD50 mempunyai tujuan untuk mengetahui kematian 50%, ikan nila sehingga perlu adanya dosis pembanding. Charles H. Reed dan Hugo Muench. (1938) menentukan dosis LD50 dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$M = a - b (\sum pi - 0,5)$$

Keterangan:

M = Log LD50

a = logaritma dosis terendah yang masih menyebabkan kematian

b = beda dosis yang berurutan

pi = jumlah hewan yang mati setelah menerima dosis, i dibagi dengan jumlah seluruh hewan uji yang menerima dosis

2.4.2. Uji Aktifitas Antibakteri

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar menggunakan metode difusi agar, merujuk pada metode yang telah digunakan sebelumnya (Zainuddin *et al.*, 2019; 2020). Uji ini menentukan efektivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, dengan membandingkannya terhadap kontrol positif berupa antibiotik ciprofloxacin serta kontrol negatif berupa pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Ekstrak kasar (metanol dan air) dilarutkan kembali dalam pelarut masing-masing dan diteteskan pada permukaan disk kertas dengan konsentrasi 2 mg/50 µl/disc. Disk kertas kemudian dikeringkan di bawah laminar flow hingga semua pelarut menguap. Kultur murni dari isolat bakteri uji dikembangkan pada media Tryptic Soy Agar (TSA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Untuk menyiapkan suspensi bakteri, 2 ose bakteri diambil dari kultur murni dan disuspensikan dalam 3 ml larutan fisiologis NaCl 0,9% steril, kemudian diaduk hingga homogen. Sebanyak 200 µl suspensi bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml dicampurkan ke dalam media agar hangat dan dihomogenkan di cawan petri sebelum dibiarkan mengeras.

Setiap ekstrak diteteskan sebanyak 50 µl pada disk kertas yang berbeda, dan pelarut dibiarkan menguap. Disk kemudian ditempatkan secara aseptis di atas permukaan media agar yang telah mengandung suspensi bakteri. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif, digunakan ciprofloxacin dengan konsentrasi 30 ppm, sedangkan kontrol negatif menggunakan

pelarut (metanol dan air) yang digunakan dalam proses ekstraksi. Setelah masa inkubasi, aktivitas antibakteri diukur dengan zona hambat (halo/zona bening) di sekitar disk kertas, diameternya diukur menggunakan jangka sorong. Penentuan tingkat aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan ukuran zona hambat, sebagaimana dijelaskan oleh Zainuddin (2006).

Tabel 2..Tingkat aktivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat (Zainuddin, 2006).

Diameter zona hambat (mm)	Aktivitas antibakteri
≥20	Sangat tinggi
15 - <20	Tinggi
10 - <15	Sedang
6 - <10	Lemah
6	Tidak ada aktivitas

2.4.3. Pemeriksaan Histologi

Pengambilan jaringan insang dilakukan sebanyak 3 kali dengan ikan yang berbeda, Pengambilan jaringan dimulai pada saat sudah diinfeksi, dan saat ikan sudah diberi ekstrak kasar dengan daun (*chromolaena oderta*). Pengambilan insang dilakukan dengan menggunakan sectio set. Kemudian insang dibersihkan dengan aquades dan dimasukkan dalam botol film. Kemudian jaringan insang dibawa ke laboratorium guna menjalani serangkaian proses analisis histologi: dehidrasi, pembuatan blok, pengirisan, pewarnaan, and pengamatan mikroskopis (Dwiono et al., 2018).

2.4.4. SR (Survival Rate)

Kelangsungan hidup (SR) adalah tingkat perbandingan jumlah ikan yang hidup dari awal hingga akhir penelitian. Kelangsungan hidup dapat dihitung dengan rumus (Muchlisin et al., 2016).

$$R = \frac{(N_t)}{(N_o)} \times 100$$

SR = Kelangsungan hidup

N_t = Jumlah ikan di akhir penelitian (ekor)

N_o = Jumlah ikan awal penelitian (ekor)

2.4.4. Analisis data

Pengamatan uji Aktivats anti bakteri dan survival rate diamati dan dianalisis dengan menggunakan analisis varian (one-way ANOVA) untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan apabila terdapat pengaruh yang nyata maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut W-Tuckey sebagai alat bantu untuk pelaksanaan uji statistik, digunakan perangkat lunak program komputer SPSS versi 2.4. selanjutnya pengamatan Data Aktifitas antibakteri, pemeriksaan histologi dan LD50 dianalisis secara deskriptif dengan bantuan gambar dan tabel.