BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan nila adalah salah satu spesies ikan tropis yang paling banyak dibudidayakan di dunia, dan produksi secara global sekitar 4,5 juta ton pada tahun 2013 dan diperkirakan akan melebihi 6,6 juta ton pada tahun 2030 (Kuebutornye & Abarike, 2020). Produksi ikan nila di Indonesia meningkat setiap tahunnya. Pada tahun 2018, produksi ikan nila sebesar 1.171.699 ton, dan tahun 2019 produksi naik menjadi 1.374,230 ton (BPS, 2019). Rata-rata kenaikan produksi ikan nila Indonesia dari tahun 2015 hingga 2019 sebesar 5,4% (Yuniarti & Basuki, 2018). Untuk produksi ikan nila di Sulawesi Selatan juga meningkat setiap tahunnya yaitu pada tahun 2018 sebesar 8.170 ton dan pada tahun 2019 sebesar 8.594 ton (BPS, 2019). Data sementara dari KKP menyebutkan, produksi ikan nila di Sulawesi Selatan kurun waktu 2015- 2019 mengalami peningkatan sebesar 4.454,31 ton. Sementara itu menurut (Yuniarti & Basuki, 2018), rata-rata kenaikan produksi benih ikan nila di Indonesia sebesar 20,26%.

Ikan nila merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan dalam mendukung ketahanan pangan nasional maupun ketahanan ekonomi serta peningkatan kesejahteraan masyarakat. Ikan nila sebagai salah satu jenis ikan yang bernilai ekonomis tinggi (Mari e*t al*, 2018). Ikan nila merupakan ikan yang memiliki pertumbuhan yang cepat, mampu mentolerir berbagai kondisi lingkungan, termasuk padat tebar tinggi. Spesies ikan nila yang paling banyak dibudidayakan adalah *Oreochromis niloticus*, yang kini dibudidayakan di lebih dari 120 negara di seluruh dunia (Wang *et al*., 2023). Departemen perikanan dan Akuakultur FAO (*Food and Agriculture Organization*) menempatkan ikan nila di urutan ketiga setelah udang dan salmon sebagai contoh sukses perikanan budidaya dunia (Samsu, 2020).

Pada tahun 2020, diperkirakan bahwa ikan pangan yang dibudidayakan secara global adalah 82,1 juta ton, hal ini menunjukkan bahwa akuakultur tetap menjadi salah satu kontributor utama peningkatan sumber protein hewani. Namun, kemajuan kegiatan budidaya intensif telah berdampak terhadap pencemaran lingkungan dan munculnya wabah penyakit, menyebabkan gangguan pada pertumbuhan dan status kesehatan ikan, sehingga membuat ikan terpapar berbagai penyakit dan agen infeksius, yang mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar (Tadese *et al*., 2022).

Permasalahan yang sering dihadapi oleh para pembudidaya ikan nila adalah masalah penyakit yang menyerang ikan budidaya dan menyebabkan kematian massal pada ikan. Penyakit ikan adalah suatu keadaan fisik, morfologi dan fungsi yang mengalami perubahan dari kondisi normal yang disebabkan oleh faktor internal dan eksternal (Wirawan *et al*., 2018). Menurut Ashari *et al*. (2014), munculnya penyakit pada ikan merupakan akibat dari faktor inang (ikan) yang lemah, adanya mikroorganisme patogen dan kualitas lingkungan yang buruk.

Afryianto *et al* (2019) mengatakan bahwa ikan dapat terserang penyakit yang disebabkan oleh organisme lain, penumpukan sisa pakan ikan maupun kondisi

lingkungan kehidupan ikan. Interaksi yang tidak serasi antara ikan dengan kondisi kolam akan menyebabkan ikan mengalami stress sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan patogen berupa virus, bakteri, jamur, protozoa dan parasit merupakan golongan penyakit infeksi pada ikan. Persentase penyakit ikan akibat bakteri mencapai 33,9%, sementara 20,7% diakibatkan oleh protozoa, sisanya akibat dari virus, jamur, cacing dan krustasea (Kamelia, 2018). Salah satu penyakit infeksi yang menyerang ikan nila adalah penyakit bakterial (Azhar, 2018). Purnawingsih (2010), menyatakan bahwa patogen bakterial adalah jenis patogen yang sering menjadi kendala pada budidaya ikan nila.

Penyakit bakterial yang sering menjadi kendala pada budidaya ikan nila adalah yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. (Manurung, 2017) Bakteri tersebut umumnya hidup di air tawar, tanaman air, dan tubuh ikan, sehingga berpeluang besar untuk menginfeksi pada saat pertahanan tubuh menurun akibat stres (Manurung & Susantie, 2017). Lubis (2014) menyatakan gejala yang ditunjukkan oleh ikan yang terkena penyakit akibat infeksi bakteri biasanya berupa kehilangan nafsu makan, luka-luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang, perut membesar berisi cairan, sisik dan sirip ekor lepas, dan jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembekakan serta kerusakan pada hati, ginjal dan limpa ikan.

Dari semua jenis bakteri yang sering menjadi penyebab terjadinya penyakit pada budidaya ikan, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang menyebabkan kematian yang tinggi pada pembenihan ikan di seluruh dunia (Amrevuawho *et al*., 2014). *P. aeruginosa* adalah bakteri yang umum menjadi penyebab penyakit pada hewan, termasuk manusia. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif anaerobik, berbentuk batang berwarna merah muda, dan berflagel polar dengan motilitas unipolar, merupakan patogen oportunistik bagi tanaman dan hewan (Iglewski, 1996). Bakteri ini termasuk dalam famili *Pseudomonaceae* dan merupakan spesies dari genus *Pseudomonas* (Migula). Meskipun *P.aeruginosa* diklasifikasikan sebagai organisme aerobik, mereka dianggap oleh banyak orang sebagai anaerob fakultatif karena kemampuannya untuk beradaptasi dengan baik dan berkembang biak dalam kondisi kekurangan oksigen parsial atau total. Bakteri *P. aeruginosa* tersebar luas di alam dan telah diamati pada awal sejarah biologi mikro. *P. aeruginosa* adalah bakteri yang paling umum dari keluarga *Pseudomonaceae* dan ditemukan sebagai penyebab paling umum kedua dari penyakit nosokomial. Pada tingkat fosfat yang rendah, *P. aeruginosa* diaktifkan dari simbion untuk mengekspresikan racun mematikan di dalam saluran inang dan sangat merusak atau membunuh inang. Bakteri *P. aeruginosa* bersifat invasif dan toksigenik (Amrevuawho *et al*., 2014).

Hasil penelitian Amrevuawho *et al*. (2014) yang melakukan studi patologi *Clarias grapienus* yang diinfeksi dengan bakteri *P. aeruginosa* melaporkan bahwa perubahan histopatologi yang diamati pada ikan menunjukkan bahwa invasi bakteri *P. aeruginosa* mempengaruhi organ dalam ikan seperti insang, usus dan hati. Insang sangat sensitif terhadap perubahan kualitas air, sehingga mudah terkontaminasi oleh

bahan berbahaya seperti bakteri yang dapat merusak morfologi insang (Alaa *et al.,* 2012). Perubahan yang diamati pada insang ikan yang terinfeksi *P. aeruginosa* dalam penelitian Amrevuawho *et al*., (2014) menyebabkan penurunan drastis pada luas permukaan pernapasan, yang mengganggu proses pertukaran gas antara ikan dan lingkungannya, pada akhirnya jika tidak diobati dapat menyebabkan kematian pada ikan. Hal ini menguatkan hasil penelitian (Thomas *et al*., 2014) pada ikan *Oreochromis mossambicus* yang diinfeksi bakteri *P. aeruginosa* secara eksperimental, terlihat adanya kerusakan hiperplasia dan edema pada insang.

Upaya pengendalian dapat dilakukan dengan pemakaian bahan kimia seperti antibiotik (oxytetracycline, oxolinic acid, erytromycin, streptomycin, dan kanamycin). Namun, penggunaan antibiotik sintetis yang terus menerus dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan perairan, resistensi patogen, dan residu antibiotik yang dapat mempengaruhi kesehatan manusia dan mendapat penolakan dari pasar sehingga penggunaannya dibidang akuakultur tidak menjadi pilihan utama. Oleh sebab itu, penggunaan bahan alami yang bersifat herbal lebih efisien digunakan untuk menanggulangi penyakit bakterial (Rahman *et al*., 2023).

Ekstrak tanaman memiliki sifat seperti antistres, meningkatkan pertumbuhan, merangsang nafsu makan, dan imunostimulan serta mencegah penyakit pada ikan. Aktivitas ini sebagian dihasilkan oleh senyawa alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, fenolat, steroid, dan minyak atsiri yang terdapat pada tanaman (Reverter *et al*. 2014). Telah diketahui bahwa senyawa bioaktif ini dapat meningkatkan respon imun spesifik dan nonspesifik pada ikan (Harikrishnan *et al*. 2012). Van Hai. (2015) menyatakan sistem kekebalan tubuh bawaan terdiri dari makrofag, monosit, granulosit, dan lisozim, dan sel fagosit merupakan komponen yang paling penting. Lisozim penting dalam respon imun bawaan karena dapat merusak dinding sel bakteri dan mengaktifkan komplemen serta fagositosis bakteri, parasit, dan virus (Harikrishnan *et al*., 2011). Dengan demikian, penggunaan tanaman sebagai imunostimulan ditemukan dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh bawaan dan mencegah penyakit pada ikan (Harikrishnan *et al*., 2012). Kemampuan sel darah putih untuk membunuh patogen bakteri adalah salah satu mekanisme pertahanan yang paling penting. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan untuk mengatasi penyakit bakterial pada ikan budidaya adalah daun kumis kucing.

O. aristatus adalah tumbuhan obat tropis yang termasuk dalam famili Lamiaceae, yang berasal dari Asia Tenggara. Tanaman kumis kucing secara tradisional digunakan sebagai obat berbagai penyakit manusia selama berabad-abad yang sangat potensial untuk dikomersialkan sebagai produk kesehatan alami yang baru. Selain itu, daun *Ortosiphon stamineus* menunjukkan berbagai sifat farmakologis seperti sifat anti-inflamasi, antioksidan dan anti-bakteri (Razali *et al*., 2017). Menurut Humani *et al*. (2013), ekstrak daun kumis kucing banyak mengandung senyawa bahan kimia secara alami yaitu flavonoid, polifenol, protein aktif, glikosida, minyak atsiri, kalium dan senyawa terpenoid serta alkaloid. Menurut Suteja, *et al.* (2016), flavonoid adalah senyawa kimia aktif pada tanaman yang

berfungsi sebagai antibakteri yang dapat menghambat fungsi membran sitoplasma pada bakteri. Sedangkan senyawa Alkaloid menurut Kurniawan dan Aryana. (2015), memiliki kemampuan sebagai antibakteri, dengan cara kerja dari senyawa alkaloid yaitu mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan akan menyebabkan kematian sel pada bakteri. Pengujian in vitro ekstrak daun kumis kucing menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Alshawsh *et al*., 2012), *Salmonella thypi* (Rukmana & Mulyowati, 2015), *Enterococcus faecalis* (Zainal-Abidin *et al*., 2017), *S. aureus* dan *Aeromonas hydropilla* (Baytul Abidin *et al*., 2022), serta *Streptococcus mutans* (Mulyanti *et al*., 2021). Berdasarkan potensi tersebut maka dianggap perlu untuk melakukan penelitian mengenai efektifitas pemberian ekstrak daun kumis kucing (*orthosiphon aristatus*) terhadap histopatologi organ dan gambaran hematologi dari ikan nila (*oreochromis niloticus*) yang terinfeksi bakteri *pseudomonas aeruginosa*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana perubahan struktur histopatologi insang dan hati ikan nila yang tersinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang di papar ekstrak daun kumis kucing dengan dosis berbeda
2. Bagaimana perubahan jumlah eritrosit dan leukosit pada ikan nila yang tersinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang di papar ekstrak daun kumis kucing dengan dosis berbeda

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Peneltian ini bertujuan untuk :

1. Menganalisis perubahan struktur histopatologi insang dan hati ikan nila yang tersinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang di papar ekstrak daun kumis kucing dengan dosis berbeda
2. Menganalisis perubahan jumlah eitrosit dan leukosit pada ikan nila yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang di papar ekstrak daun kumis kucing dengan dosis berbeda

Hasil peneltian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi yang berguna bagi pembudidaya ika nila untuk mengatasi permasalahan penyakit yang disebabakaan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan ekstrak daun kumis kucing sebagai antibakteri. Selain itu, penelitian ini juga dapat memberikan alternatif pengobatan yang ramah lingkungan pada budidaya ikan nila dengan menggunakan ekstrak tanaman dari daun kumis kucing.

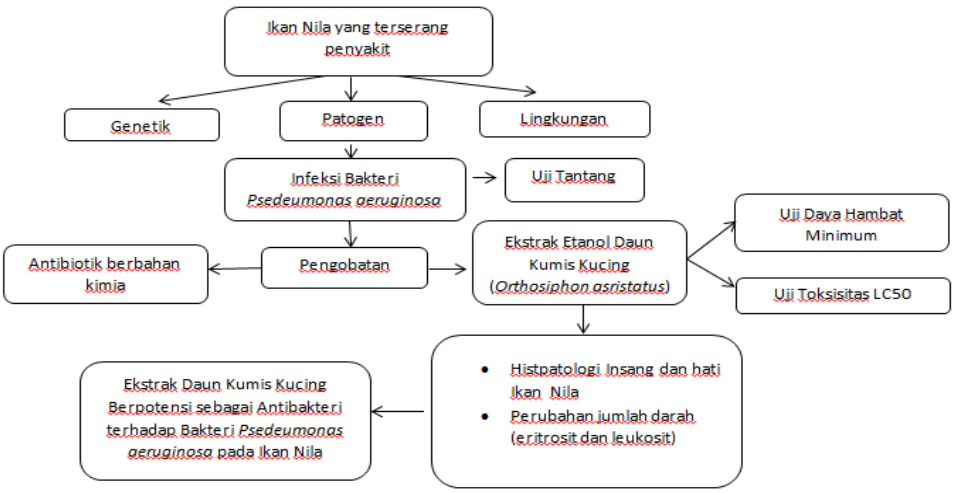
1.4 Hipotesis

Berdasarkan tujuan penelitian, maka hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terdapat perubahan struktur pada histopatologi insang dan hati ikan nila yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang telah diberi ekstrak daun kumis kucing.

2. Terdapat perubahan jumlah darah yang meliputi eritrosit dan leukosit pada ikan nila yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang telah diberi ekstrak daun kumis kucing.

1.5 Kerangka Pikir Penelitian



1.6 Landasaan Teori

1.6.1 Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*)

Orthosiphon aristatus dikenal sebagai obat herbal yang berasal dari family Lamiaceae. Tanaman herbal kumis kucing banyak ditemukan di negara-negara Asia Tenggara seperti Malaysia, Thailand, Indonesia dan Vietnam. Tanaman ini disebut sebagai Misai Kucing di Thailand dan Vietnam, sedangkan di Malaysia dan Indonesia disebut Kumis Kucing (Chua *et a*l., 2018) karena bunganya memiliki banyak filamen panjang seperti kumis kucing. Kumis kucing adalah tanaman obat yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. Banyak studi farmakologis telah menunjukkan bahwa tanaman kumis kucing memiliki potensi sebagai antimikroba, antioksidan, hepatoproteksi, antigenotoksik, antiplasmodial, sitotoksik, kardioaktif, antidiabetes dan antiinflamasi (Ashraf *et al*., 2018).

Berdasarkan taksonominya adapun klasifikasi menurut Catalogue of Life (2023) dari tanaman Kumis kucing (*Orthosiphon*) antara lain sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Phylum : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida

Order : Lamiales Bromhead
Family : Lamiaceae
Genus : *Orthosiphon Benth*.
Species : *Orthosiphon aristatus* (Blume)

Gambar 1. Morfologi tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) (Ismiyanti, 2024)

Kumis kucing merupakan tanaman obat berupa tumbuhan berbatang basah yang tegak dengan tinggi 50-150 cm. Tanaman kumis kucing memiliki batang berkayu, segi empat agak beralur, beruas, bercabang dan berakar kuat. Daun dari tanaman kumis kucing berupa daun tunggal, bulat telur, elips atau memanjang, tepi bergerigi, ujung dan pangkal runcing, tipis, panjang 2-10 cm, dan berwarna hijau. Memiliki bunga majemuk dalam tandan yang keluar di ujung percabangan, berwarna ungu pucat atau putih, dan benang sari lebih panjang dari tabung bunga (Anggraini *et al*., 2017). Tanaman kumis kucing yang tumbuh di Indonesia ada tiga varietas yaitu kumis kucing berbunga putih, putih-ungu dan ungu (Febjislami *et al*., 2019).

Kumis kucing merupakan tumbuhan obat yang banyak digunakan sebagai obat tradisional, secara umum, kumis kucing banyak diperdagangkan dalam bentuk simplisia kering, kapsul, tablet, minuman, dan ekstrak. Selain sebagai obat tradisional, kumis kucing juga memiliki beberapa aktivitas biologis, seperti antiinflamasi, antioksidan, antikanker dan diuretik (Adnyana *et al*., 2013), hepatoprotektif dan gastroprotektif, antihipertensi, antibakteri dan antidiabetes. Aktivitas biologis ini ditimbulkan karena adanya metabolit bioaktif yang terkandung dalam kumis kucing seperti metabolit dari golongan monoterpena, diterpena, triterpena, saponin, asam organik, dan flavonoid (Singh *et al*., 2015).

Singh *et al*. (2015) menyatakan bahwa daun kumis kucing memiliki banyak

kandungan senyawa asam rosmarinik, senyawa asam tersebut banyak digunakan sebagai agen antibakteri. Menurut penelitian (Adnyana *et a*l., 2013), beberapa bakteri yang dapat dihambat pertumbuhannya dengan senyawa asam rosmarinik yang diperoleh dari ekstrak daun kumis kucing adalah bakteri *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Litseria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* dan *Klebsiella pneumonia*. Ekstrak etanolik daun kumis kucing mengandung senyawa fenolik dan flavonoid, senyawa tersebut berikatan dengan protein pada bakteri melalui ikatan non spesifik membentuk kompleks protein-fenol. Pada konsentrasi rendah, terbentuk kompleks proteinfenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami penguraian, kemudian merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler dan membran sitoplasma mengalami lisis. Senyawa fenol masuk ke dalam sel bakteri melewati dinding sel bakteri dan membran sitoplasma, di dalam sel bakteri senyawa fenol menyebabkan penggumpalan (denaturasi) protein penyusun protoplasma sehingga dalam keadaan demikian metabolisme menjadi inaktif, dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat (Rukmana & Mulyowati, 2015).

Pada beberapa peneltian ekstrak tanaman daun kumis kucing memiliki aktivitas antibakteri, peneltian yang dilakukan oleh Baytul Abidin *et al*. (2022) perendaman ekstrak daun kumis kucing sebagai tindakan pengobatan terhadap penyakit infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele telah memberikan hasil yang signifikan terhadap tingkat kesembuhan ikan uji. Dengan demikian, pada perlakuan pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydripilla* pada ikan lele menunjukkan adanya keberhasilan. Hal ini membuktikan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar daun kumis kucing bersifat antimikroba. Dimana pada penelitian level in vitro menunjukkan bahwa ekstrak daun kumis kucing yang mengandung senyawa bioaktif telah terbukti bersifat antibakteri (Alshawsh *et al*., 2012; Rukmana & Mulyowati, 2015; Zainal-Abidin *et al*., 2017, Nor & Yasin, 2018; Mulyanti *et al*., 2021). Selain itu flavonoid yang merupakan salah satu senyawa aktif dalam ekstrak daun kumis kucing, menurut Choy *et al*. (2019) bermanfaat sebagai antiinflamasi sehingga dapat menekan dampak lesi yang terjadi saat terjadi infeksi. Hasil penelitian Amnda *et al*. (2020) mengungkapkan pengukuran daerah hambatan memperlihatkan bahwa ekstrak etanol daun kumis kucing memberikan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada kosentrasi paling tinggi 100 mg/ml diameter 8,50 mm.

1.6.2 Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Ikan nila adalah spesies yang berasal dari kawasan sungai Nil dan danau-danau sekitarnya di Afrika (Haqqawiy *et al*., 2013). Ikan nila merupakan ikan air tawar yang dibudidayakan dan menjadi salah satu komoditas ekspor. Departemen Perikanan dan Akuakultur FAO (*Food and Agriculture Organization*) menempatkan ikan nila di urutkan ketiga setelah udang dan salmon (Santoso, 2018). Ikan nila memiliki banyak varietas atau spesies yang dipengaruhi berbagai faktor seperti faktor

makanan dan pemangsaan (Dilami *et al*., 2021). Dari hasil pengamatan Mujalifah (2018) terhadap morfologi ikan nila diketahui bahwa ikan nila memiliki letak mulut superior (keatas). Tipe sirip ekor homocercal, bentuk morfologi ekor truncate (bersegi). Tubuh berwarna kehitaman atau keabuan, pada sirip ekor memiliki garis warna tegak. Habitat ikan nila adalah air tawar, seperti sungai, danau, waduk dan rawa-rawa tetapi karena toleransi ikan nila tersebut sangat luas terhadap salinitas (*eury haline*) sehingga dapat pula hidup dengan baik di air payau dan air laut. Salinitas yang cocok untuk ikan nila adalah 0-35 ppt, pertumbuhan ikan nila secara optimal pada saat salinitas 0-30 ppt (Santoso, 2018).

Ikan nila adalah ikan yang paling banyak dibudidayakan kedua di dunia setelah ikan mas. Pasar global untuk ikan nila tumbuh pada tingkat 10 – 12% per tahun. Tidak seperti kebanyakan spesies ikan bersirip lainnya, ikan nila adalah ikan yang dapat beradaptasi dengan berbagai sistem budidaya seperti sistem kolam dengan kepadatan tinggi, sistem budidaya keramba, sistem kolam air deras dan sistem budidaya super intensif. Karena kemudahan pemuliaan dan budidaya, maka ikan nila dijadikan sebagai sumber protein hewani dan menjadi spesies yang menarik untuk dibudidayakan di kalangan masyarakat (Prabu, 2019). Ikan nila adalah ikan tropis yang kuat terhadap perubahan kondisi lingkungan dan memiliki laju pertumbuhan yang cepat.

Gambar 2. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Ismiyanti, 2024)

Namun terlepas dari keunggulan ikan nila, juga dapat terjadi hal-hal yang tidak diinginkan yang dapat merugikan usaha budidaya seperti misalnya penurunan produksi, penurunan kualitas air dan bahkan kematian total, yang biasanya di sebabkan oleh munculnya penyakit. Penyakit dapat disebabkan oleh beberapa jenis patogen seperti, virus, parasit, jamur dan bakteri (Ashari, 2014). Ikan nila dapat terinfeksi penyakit yang disebabkan berbagai jenis bakteri, termasuk spesies dari genus *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, dan *Streptococcus*. Secara umum, sebagian besar penyakit ikan disebabkan oleh faktor stres, seperti lingkungan yang kurang optimal, misalnya kualitas air yang buruk, dan ini memungkinkan bakteri menginfeksi ikan nila dan menyebabkan penyakit (Haenen, 2023). Selain itu penyakit

ikan juga muncul akibat ketidakserasian antara ikan sebagai inang, patogen (mikroorganisme penyebab penyakit) serta lingkungan. Sistem pertahanan tubuh ikan dapat terganggu akibat adanya perubahan lingkungan serta berkembangnya patogen dalam suatu wadah budidaya. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri memperlihatkan gejala-gejala seperti kehilangan nafsu makan, luka-luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang, perut membesar berisi cairan, sisik lepas, sirip ekor lepas, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada hati, ginjal dan limpa. Penyakit bakteri ini dapat menyebabkan kematian diatas 80% dalam waktu relatif singkat (Ashari, 2014).

Dari beberapa jenis penyakit pada ikan yang disebabkan infeksi bakteri menunjukkan bahwa bakteri jenis *Psedeumonas* merupakan penyebab kematian yang tinggi pada pembenihan ikan di seluruh dunia. Bakteri *Psedeumonas* merupakan penyebab utama busuk sirip pada ikan. Jenis bakteri *Psedeumonas* yaitu *Pseudomonas fluorescens*, *P. angulliseptica*, *P. Aeruginosa* dan *P. putida* diidentifikasi pada berbagai spesies ikan sebagai penyebab agen septikemia (Thomas, 2014). Gejala klinis pada ikan yang terinfeksi bakteri *Psedeumonas* yaitu terjadi septicemia, ulserasi kulit dan pendarahan sirip ekor (Amrevuawho *et al*., 2014). Di antara penyakit ikan yang disebabkan infeksi bakteri, *Pseudomonas* dan *Aeromonas* dianggap sebagai dua jenis bakteri yang paling banyak menjadi patogen pada ikan (Thomas, 2014).

1.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Penyakit ikan akibat bakteri merupakan tantangan utama yang terjadi di bidang industri akuakultur dan peternakan ikan. Penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, organisme patogen yang dikenal penyebab atas kerugian ekonomi yang cukup besar dalam budidaya komersial *Oreochromis mossambicus*. Infeksi *Pseudomonas* telah diimplikasikan sebagai infeksi bakteri yang paling umum di antara ikan dan tampaknya merupakan penyakit yang berhubungan dengan stres pada ikan air tawar terutama dalam kondisi budidaya yang kurang baik. Infeksi *Pseudomonas* pada ikan menyebabkan perkembangan penyakit yang disebut penyakit kulit merah, yang terjadi sepanjang tahun. *Pseudomonas* adalah salah satu bakteri paling patogen yang menyerang ikan terutama *O. niloticus* dan *O. mossambicus* di peternakan ikan di Mesir (Thomas *et al*., 2014).

Pseudomonas spp. adalah bakteri gram-negatif dan merupakan perwakilan dari ordo *Pseudomonadales*. Beberapa spesies bakteri *Psedeumonas* spp merupakan patogen yang menyebabkan penyakit pada ikan. *P. anguilliseptica* adalah spesies yang paling patogen, terutama untuk ikan budidaya di Jepang dan Eropa yang menyebabkan penyakit bintik merah dan kematian pada belut. Bakteri *Psedeumonas* dari spesies *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* diisolasi dari ikan nila yang sakit. Ikan nila yang sakit menunjukkan gejala klinis terinfeksi bakteri *pseudomonas* seperti kemerahan pada seluruh tubuh, pembengkakan perut, mata keruh, sisik yang mengendur dan insang yang tersumbat. Penelitian lainnya juga menunjukkan, bakteri *P. anguilliseptica* menyebabkan penyakit pada ikan nila dengan menunjukkan gejala anoreksia, penggelapan tubuh, pendarahan pada tubuh

seperti pada pangkal sirip, sisik lepas, dan sirip terkikis, dengan beberapa ikan lainnya menunjukkan distensi perut, exophthalmia dan insang pucat. *Pseudomonas fluorescens* lebih sering digambarkan sebagai patogen oportunistik ikan nila (*Oreochromis* spp.) Miyazaki *et al*. (2021) menjelaskan bahwa wabah penyakit yang disebabkan bakteri *P. fluorescens* pada ikan nila di Jepang secara sistemik menunjukkan exophthalmia, nodular lesi di hati, limpa, ginjal dan insang, dan kantung renang yang meradang. Secara histopatologi, pembentukan abses pada mata, limpa dan nekrosis fokal di hati, insang dan ginjal terlihat pada beberapa ikan yang sakit (Haenen, 2023).

Gambar 3. Morfologi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Siregar, 2012)

Beberapa kasus penyakit pada ikan nila yang dibudidayakan terkait dengan *Pseudomonas* spp lainnya. Juga dilaporkan, termasuk pada *P. aeruginosa* yang menunjukkan gejala penggelapan tubuh, kehilangan sisik, pembusukan ekor dan kerusakan semua organ dalam (Khalil *et al*., 2013). *Pseudomonas* spp. ditemukan di lingkungan akuatik dan terestrial pada tingkat global. Infeksi *Pseudomonas* terjadi secara global seperti kasus *P. fluorescens* dijelaskan di Jepang, Filipina, Kerajaan Arab Saudi, Mesir dan Guatemala. *Pseudomonas mosselii* dijelaskan sebagai patogen ikan nila Mozambik (*Oreochromis mossambicus*) di Mexico. Penyakit ini ditularkan secara horizontal, melalui air, peralatan yang digunakan dan melalui kontak ikan-ke-ikan secara langsung. Pengobatan penyakit pseudomonasis, pada ikan nila ditemukan rentan terhadap antibiotik ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, oxytetracycline, streptomycin dan trimethoprim dan sulphamethoxazole (Haenen, 2023). Selain itu penelitian Pawasti (2014) menunjukkan pengobatan menggunakan larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculta*) pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *Psedeumonas aeruginosa* menunjukkan bahwa berpengaruh terhadap histopatologi insang dan hati yang dapat mempercepat pemulihan jaringan insang dan hati ikan mas mengarah pada jaringan normal. Andayani *et al* (2021) juga

melaporkan hasil penelitian bahwa penggunaan ekstrak kasar daun johar (*Cassia siamea lamk*) dengan pelarut etanol berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. aeruginosa.* dosis ekstrak kasar yang memiliki zona hambat tertinggi sebesar 210 ppm dengan rata-rata diameter 10,14 mm.

1.6.4 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Isolasi senyawa metabolit sekunder dari suatu tanaman dikenal dengan nama ekstraksi. Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif dari suatu campuran padatan dan/atau cairan dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat, karena preparasi ekstrak kasar tanaman merupakan titik awal untuk isolasi dan pemurnian komponen kimia yang terdapat pada tanaman (Febrina *et al*, 2015). Proses ekstraksi yang biasanya digunakan yaitu ekstraksi secara panas dan secara dingin. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks, destilasi uap air, dan soxhletasi sedangkan ekstraksi secara dingin yaitu dengan maserasi dan perkolasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya terhadap uji aktivitas antimikroba, terdapat beberapa cara ekstraksi yang digunakan.

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstraksi dengan metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang besifat termolabil (Mukhriani, 2014). Pada penelitian Nafiqoh *et al.* (2020) melakukan ekstraksi terhadap bebrerapa jenis tumbuhan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut akuades steril. Ekstraksi metode maserasi juga dilakukan pada penelitian Ibrahim *et al.* (2020) dengan menggunakan daun kering tumbuhan rengas dihaluskan dengan mesin grinder hingga menjadi bubuk. Sampel bubuk daun tumbuhan rengas dimaserasi bertahap pada maserator dengan pelarut heksana, etil asetat dan metanol.

1.6.5 Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi hambat minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari suatu bahan antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Melalui cara tersebut, kemampuan suatu antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada konsentrasi terendah dapat diketahui (Soelama *et al*., 2015). Hal ini juga sama dengan pernyataan Saputera *et al* (2019) bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) perlu diketahui pada suatu ekstrak tanaman obat karena konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan organisme tertentu. Pada umumnya, pengujian potensi antobiotik secara mikrobiologi dilakukan dengan menggunakan 2 metode, yaitu turbidimetri dan lempeng silinder atau difusi agar. Prinsip metode turbidimetri adalah berdasarkan hambatan pertumbuhan biakan mikroorganisme dalam media cair yang mengandung larutan

antibiotik, sedangkan prinsip metode lempeng silinder atau difusi agar adalah membandingkan zona hambatan pertumbuhan mikroorganisme uji oleh dosis senyawa antibiotik yang diuji terhadap zona hambatan oleh dosis antibiotik baku pembanding pada media lempeng agar (Fitriana *et al*., 2019).

Penelitian Wiharningtias *et al* (2016) melakukan uji daya hambat ekstrak kulit nanas (*ananas comosus*) terhadap *staphylococcus aureus* dengan dua metode turbidimetri. Metode yang pertama dilakukan dengan cara pengamatan kekeruhan secara visual dan yang kedua dengan mengukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Terdapat perbedaan hasil pengukuran pada metode turbidimetri dan spektrofotometri yang disebabkan oleh perbedaan prinsip kerja dari kedua metode tersebut. Pengujian dengan menggunakan metode turbidimetri bersifat subjektif karena pada metode ini pengamatan hanya dilakukan secara visual, serta sulitnya pengamatan pada larutan uji yang pekat sehingga resiko terjadinya kesalahan lebih besar. Sedangkan metode spektrofotometri memiliki hasil pengujian berupa data kuantitatif sehingga memiliki kecermatan lebih tinggi dalam perincian nilai pengukuran yang dihasilkan (Hendayana, 1996).

1.6.6 Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan kemampuan suatu molekul atau senyawa kimia yang dapat menimbulkan kerusakan pada bagian yang peka didalam maupun dibagian luar tubuh mahluk hidup. Suatu senyawa kimia dapat dikatakan sebagai racun jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek yang merusak. Efek yang ditimbulkan sangat tergantung dengan kadar racun yang diberikan, dengan dilakukan pengukuran besarnya kadar atau konsentrasi bahan yang dapat menimbulkan pengaruh pada organisme uji (Ambara, 2007).

Toksisitas diidentifikasikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan. Toksisitas selalu menunjukkan ke suatu efek berbahaya atau mekanisme biologi tertentu. Toksistas merupakan istilahrelatif yang biasa dipergunakan dalam membandingkan suatu zat kimia lebih toksik dari zat kimia lainnya. Pendekatan toksikologi tentang berbagai efek zat kimia atas berbagai sistem biologi dengan penekanan pada sistem mekanisme efek berbahaya zat kimia itu dan kondisi dimana efek berbahaya itu terjadi. Kematian merupakan salah satu diantara beberapa kriteria toksisitas salah satu caranya ialah menggunakan senyawa dengan dosis maksimal, kemudian kematian hewan uji dicatat. Angka kematian hewan dihitung sebagai harga median *Lethal Dose* (LD50) atau median *Lethal Concentration* (LC50).

1.6.7 Histopatologi

Histopatologi adalah ilmu yang mempelajari kelainan patologis (abnormal) suatu jaringan (Wandari *et al*., 2018). Analisa histopatologi dapat digunakan untuk mengetahui gambaran kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ yang menjadi target utama dari bahan pencemar seperti insang, hati, dan daging (Dutta, 1996). Pemeriksaan histopatologi pada ikan dapat memberikan gambaran perubahan jaringan ikan yang terinfeksi penyakit. Untuk mengetahui

perubahan patologi pada ikan yang terserang penyakit, perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi adanya komponen-komponen penyakit. (Asniatih, 2013).

Diagnosa penyakit pada ikan merupakan langkah awal yang dilakukan untuk menentukan penyakit. Hal yang perlu dilakukan dalam mendiagonsis penyakit infeksi pada ikan adalah memperhatikan tanda-tanda klinis yang meliputi ciri-ciri ekternal maupun internal serta perubahan patologisnya yang dapat dilakukan dengan pemeriksaan histopatologi (Rahmawati *et al*., 2016). Studi patologi dilakukan untuk mengetahui penyakit yang mencakup fungsional dan perubahan morfologi serta reaksi yang dialami oleh organisme akibat adanya infeksi patogen (Plum, 1994). Pemeriksaan histopatologi organ ikan dilakukan untuk melihat perubahan jaringan yang terjadi akibat infeksi patogen yang memungkinkan terjadinya abnormalitas jaringan (Safratilofa, 2017).

Analisa histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ-organ yang menjadi sasaran utama dari penyakit infeksius dan pengobatan dengan antibiotik seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring perubahan pada jaringan organ dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada organisme.

1.6.8 Hematologi

Darah merupakan komponen yang sangat penting karena berfungsi untuk mengedarkan substansi yang masuk ke dalam tubuh maupun yang dihasilkan tubuh dari proses-proses metabolisme. Oleh karena itu darah menjadi salah satu parameter pokok dalam penelitian praklinik atau biomedik. Hematologi adalah ilmu yang mempelajari cara penilaian darah. Nilai hematologi (profil darah) berguna untuk menilai kondisi kesehatan dan sebagai acuan nilai awal atau kontrol dalam suatu penelitian. Adanya gangguan metabolisme, penyakit, kerusakan struktur dan/atau fungsi organ, pengaruh agen/obat, dan stres dapat diketahui dari perubahan profil darah (Fitria & Sarto, 2014).

Darah ikan tersusun dari sel-sel darah yang tersuspensi dalam plasma dan diedarkan ke seluruh jaringan tubuh melalui sistem sirkulasi tertutup. Sel darah ikan tersusun dari sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) serta cairan darah yang mengandung nutrien dan sisa metabolisme. Sel dan plasma darah mempunyai peran fisiologis yang sangat penting (Wedemeyer,*et al*., 1984). Menurut Meyer dan Harvey (1998) adanya perubahan status fisiologi maupun gangguan kesehatan hewan dapat diketahui melalui komponen darahnya. Manfaat pemeriksaan darah ikan antara lain untuk membantu diagnosis suatu penyakit, mengetahui jalannya suatu penyakit, menentukan proagnosa, mengetahui efek suatu pengobatan, meneliti sistem imun dan untuk mengetahui status kesehatan ikan. Pemeriksaan parameter hematologi ikan meliputi pemeriksaan nilai hematokrit, kadar hemoglobin, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih dan pengamatan parasit yang

terdapat dalam darah (Noercholis *et al*., 2013)

Perubahan pada sel darah merah dapat dijadikan indikator stress yang kuat sehubungan keberadaan zat toksik atau polutan pada lingkungan akuatik (Clarke *et al.,* 1979; Fadil, *et al*., 2011). Reduksi eritrosit dapat menimbulkan anemia pada ikan dimana erat kaitannya dengan hemodilusi akibat lintasan osmoregulasi epitel insang yang melemah (Fitria, 2019). Menurut Iwama dan Nakanishi (1996), leukosit atau sel darah putih merupakan sel darah yang jumlahnya lebih sedikit dari sel darah merah. Leukosit memiliki beberapa tipe yaitu limfosit, trombosit, monosit, granulosit dan sel sitotoksik. Leukosit memiliki mekanisme dalam proses pembekuan darah dan untuk membersihkan tubuh dari material-material asing yang dapat mengganggu sistem imun. Moyle dan Cech (2004), menyatakan dalam membantu memahami kondisi fisiologis dan patologis hewan dapat dilakukan pengukuran perubahan terhadap konsentrasi total leukosit.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Peneltian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2024. Persiapan ekstrak dan penumbuhan bakteri dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit ikan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin dan pemeliharaan ikan dilakukan di Hatchery Mini, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan kerusakan organ dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah sakit Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin, sedangkan uji kualitas air di lakukan di Laboratorium Kualitas Air, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu baskom, selang, aerasi, termometer, pH meter, mikropipet, *laminary air flow*, *hot plale¸ incubator shaker*, oven, vortex, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, *erlenmeyer*, gelas ukur, jarum ose, mikroskop, bunsen dan tabung eppendof.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan Nila (*Oreochrromis niloticus*) yang berasal dari Balai Benih Ikan Air Tawar Gowa Makassar, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diambil dari Balai Pengujian Ksehatan Ikan dan Lingkungan Serang Banten, daun kumis kucing yang diambil dari Kecamatan Anggeraja Enrekang, Etanol, chloramphenicol, kertas saring, alhohol 70%, aquades, plasti warap, aluminium foil,*Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptic Soy Broth* (TSB), formalin 10%, larutan hayem, larutan turk dan pelet.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan 4 perlakuan pemberian ekstrak daun kumis kucing (*Orthosipahon aristatus*) dan 1 kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak daun kumis kucing) dengan masing-masing 3 ulangan tiap perlakuan. Adapun perlakuan yang dicobakan adalah sebagai berikut :

A : Ekstrak daun kumis kucing 50 ppm
B : Ekstrak daun kumis kucing 75 ppm
C : Ekstrak daun kumis kucing 100 ppm
D : Ekstrak daun kumis kucing 125 ppm
E : Kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak)

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Persiapan Sampel

Sampel daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) diambil di Kecamatan Anggeraja, Kabupaten Enrekang. Daun kumis kucing yang terkumpul selanjutnya di bersihkan dari kotoran yang menempel kemudian di kering anginkan pada suhu ruang sampai benar-benar kering. Daun yang telah kering dii haluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk dan selanjutnya di timbang.

Adapun isolat bakteri uji yang digunakan adalah bakteri Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari Koleksi Kultur Laboratorium balai

pengujian kesehatan ikan dan lingkungan Serang.

2.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

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 121^0C tekanan 1 atmosfir, kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven selama 30 menit.

2.4.3 Ekstraksi Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus)*

Proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi kinetik merujuk pada metode sebelumnya (Zainuddin *et al*., 2019; 2020). Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Proses ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g simplisia direndam dengan 1.500 ml pelarut (1:3) dalam labu erlenmeyer dan diekstraksi menggunakan inkubator shaker dengan putaran sedang kemudian di saring menggunakan kertas saring whatman no. 1 untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat kemudian dipekatkan secara terpisah dengan bantuan rotary evaporator pada kecepatan 90 rpm dibawah vakum agar pelarut dapat menguap dengan sempurna. Ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam botol vial bersih dan steril.

2.4.4 Kultur Bakteri dan Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media dilakukan dengan menimbang media agar TSA 40 gram yang dilarutkan dengan 1000 ml akuades dalam tabung erlenmeyer, lalu dihomogenkan dengan magnetik stirer, sambil dipanaskan diatas hotplat sampai mendidih. Selanjutnya erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil untuk disterilisasi dengan autoclave dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian di dinginkan hingga suhu 50°C. Lalu dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 mL untuk setiap cawan petri dan ditutup rapat.

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 2 g ditambahkan akuades sebanyak 50 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfir selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampe media membeku.

Pembuatan TSB dimulai dengan menimbang media TSB sebanyak 2,16 g lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyar yang berisi 72 ml akuades lalu di homogenkan sambil dipanaskan hingga mendidih menggunakan hot plate. Setelah itu dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL untuk satu tabung. Selanjutnya media TSB disterilikan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1 atmosfir selama 20 menit.

Pemeliharaan stok kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan cara stok murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil sebanyak satu ose kemudian di isolasi pada media TSA secara aseptik lalu diinkubasi pada suhu 37 ºC selama 24 jam untuk mendapatkan koloni bakteri segar yang tumbuh. Kemudian

koloni di pindahkan kembali pada media TSB cair steril dan diinkubasi pada suhu 37℃ selama 24 jam untuk mendapatkan suspense uji bakteri yang segar dan di pertahankan pada suhu 4℃.

2.4.5 Pemeliharaan Ikan

Ikan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diperoleh dari Balai Budidaya Ikan Air Tawar Kabupaten Gowa. Ikan akan dipelihara pada wadah berupa bak fiber bulat dengan pemberian volume air 300 L dan dilengkapi dengan aerasi. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 300 ekor dengan ukuran antara 10-13 cm dengan kepadatan 1 ekor/liter. Setelah itu ikan nila di aklimatisasi dengan tempat yang baru. Proses aklimatisasi dilakukan selama 3 hari dan selama proses tersebut diberi pakan komersial dengan tetap memperhatikan kualitas air. Pemberian pakan dilakukan sebanyak 2 kali sehari pada pagi hari pukul 08.00 dan sore hari pukul 15.00.

2.4.6 Uji Daya Hambat Minimum

Metode uji daya hambat menggunakan prosedur yang dijelaskan oleh Anarkhis (2022) dengan metode dilusi cair. Hal pertama yang dilakukan yaitu menyiapkan tabung reakasi steril. Tabung reaksi diisi dengan media TSB steril sebanyak 4,5 ml. Kemudian ditambahkan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) sebanyak 0.5 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi TSB dengan konsentrasi tertentu. Tabung reaksi 1 sampai dengan 5 diisi ekstrak daun kumis kucing (Orthosiphon aristatus) dengan konsenterasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Tabung ke 6 dan 7 diisi 2 kontrol, yaitu kontrol negatif dan kontrol positif, dimana kontrol positif dengan pemberian antibakteri sintetis (Chloramphenicol) sebanyak 50 ppm dengan volume 0,5 ml dan kontrol negatif tanpa perlakuan. Kemudian, masing-masing tabung diberi 0,1 ml isolat bakteri (10^7 CFU/ml) selanjutnya diinkubasi pada suhu 32^0C selama 24 jam. Kemudian, media uji diperiksa tingkat kekeruhan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (panjang gelombang 600 nm). Kemudian dapat dilihat kekeruhan pada media TSB yang telah dimasukan ekstrak dan ditanam bakteri yang di inkubasi selama 24 jam dan dilakukan perbandingan dengan tabung kontrol.

2.4.7 Uji Toksisitas Ekstrak Daun kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*) dengan LC50

LC50 (*Lethal Concentration*) adalah tingkat konsentrasi zat yang dapat menyebabkan kematian 50% organisme uji dalam sebuah pengujian **(**Meyer & Adams., 2020)**.** Penentuan nilai LC50 menggunakan konsentrasi ekstrak berdasarkan hasil uji daya hambat yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Sebanyak 150 ekor ikan nila dibagi dalam 15 wadah yang berisi air 10 L dengan beberapa konsentrasi ekstrak kasar daun kumis kucing kemudian diamati selama 24 jam. Setelah perlakuan perendaman ekstrak, tingkah laku ikan uji diamati serta dicatat jumlah ikan yang mati hingga 50%.

2.5 Pelaksanaan Penelitian

2.5.1 Penginfeksian Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada Ikan Nila (*Oreochromis* ***niloticus*****)**

Penginfeksian bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada ikan nila dilakukan menggunakan metode yang mengacu pada Budianto *et al*., (2022), bahwa penginfeksian dilakukan dengan cara perendaman ikan nila selama 15 menit dalam 10 liter air yang telah di campur suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Ikan diamati tingkah lakunya berupa pergerakan ikan. Setelah ikan diindikasikan terinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, kemudian di pindahkan ke dalam baskom yang berisikan larutan ekstrak daun kumis kucing dengan konsentrasi yang berbeda-beda dan dilakukan perendaman selama 24 jam.

2.5.2 Pemberian Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*)

Ekstrak kasar daun kumis kucing *(O. aristatus)* dengan dosis berbeda-beda dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan kemudian di aduk hingga ekstrak menyatu dengan air. Ikan nila yang telah terinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dimasukkan ke dalam wadah yang berisikan ekstrak dan dilakukan perendaman selama 24 jam. Setelah perendaman ekstrak daun kumis kucing selama 24 jam kemudian ikan nila dipindahkan pada wadah yang berisi air bersih dan dipelihara selama 7 hari. Selama masa pemeliharaan dilakukan pemberian pakan dan pengukuran kualitas air seperti pH dan suhu pada pukul 08.00 dan 16.00.

2.5.3 Pengambilan Darah Ikan Nila

Pengambilan darah dilakukan pada akhir penelitian setelah pemeliharaan selama 7 hari. Pengambilan darah dilakukan di bagian linea lateralis pada pangkal ekor dengan menggunakan spoit 1 ml. Darah diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendof yang berisi antikoagulan EDTA agar darah tidak membeku.

2.5.4 Pengambilan Jaringan Ikan Nila

Pengambilan jaringan insang dan hati dilakukan pada akhir penelitian setelah pemeliharaan selama 7 hari. Pengambilan insang dan hati dilakukan dengan menggunakan *sectio set*. Kemudian insang dan hati dibersihkan dengan aquades dan dimasukkan dalam botol film.Setelah itu diberi larutan formalin 10% sebagai pengawet kemudian dilakukan pembuatan preparat untuk histopatologi.

2.5.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan dan pengamatan preparat hasil histopatologi ada beberapa tahapan. Adapun tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut:

1. Tahap Fiksasi
   Sampel insang diambil untuk diamati jaringannya, kemudian direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.
2. Tahap Dehidrasi
   Tahap dehidrasi dilakukan dengan memasukkan ke dalam botol yang berisi alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96% dan alkohol *absolute*.

3. Tahap *Clearing*
   Tahap *clearing* digunakan untuk mentransparankan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan. *Clearing* dilakukan dengan mencelupkan ke dalam larutan xylol 1 selama 1 jam, xylol 2 selama 2 jam.
4. Tahap Impregnasi
   Tahap impregnasi dilakukan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (*embedding*). *Embedding* dilakukan dengan mencelupkan bahan ke paraffin cair dengan suhu 56-60^{o}C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali ke dalam paraffin cair dengan suhu 56-60^{o}C selama 2 jam.
5. Tahap *Embedding* (Pengeblokan)
   Tahapan ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam *waterbath* (suhu 45^{o}C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass untuk persiapan pewarnaan HE (*Haematoxylin Eosin*). Kemudiaan keringkan pada oven dengan suhu 45^{o}C selama 24 jam.
6. Teknik Pewarnaan Jaringan dengan Menggunakan HE (*Haematoxylin Eosin*)
   Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu deparafinisasi, hidrasi, cat utama, dehidrasi dan clearing.
7. Tahap *Mounting*
   Tahap ini merupakan prosedur terakhir dalam pembuatan preparat yang bertujuan untuk mempermudah saat pengamatan. Preparat direkatkan dengan menggunakan *entelen new*, lalu ditutup dengan *cover glass*. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 400x.

2.6 Parameter Uji

2.6.1 Pengamatan Histopatologi Insang dan hati Ikan Nila

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan pengamatan pada histopatologi insang dan hati ikan nila (*O. niloticus*) agar mengetahui gambaran insang dan hati pada ikan diinfeksi tanpa pengobatan dan pada ikan yang diberi pengobatan dengan ektrak kasar daun kumis kucing *(O. aristatus).*

2.6.2 Perhitungan Eritrosit

Perhitungan sel darah merah atau eritosit berdasarkan metode Klontz (1994) yaitu sampel darah diambil dari tabung eppendof dengan menggunakan alat hisap eitrosit berupa kapiler dengan batu kecil di dalamnya berwarna merah hingga garis menunjukkan 0,5 ml. Selanjutnya ditambah dengan larutan hayem hingga larutan mencapai 101 ml. Setelah itu larutan dihomogenkan dengan cara menggoyangkannya dengan bentuk angka delapan. Darah dibuang dua tetes untuk membuang gelembung udara, lalu diteteskan pada kamar hitung yang ditutup dengan cover glass. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x10 dengan 5 lapang pandang di kotak kecil pada kamar hitung hemacytometer dan dilakukan perhitungan dengan rumus:

Jumlah eritrosit = n x 10^4 sel/mm^3

Keterangan :

n = jumlah sel eritrosit yang ada pada 5 kotak kecil kamar hitung

10^4 = faktor pengenceran

2.6.3 Perhitungan Leukosit

Perhitungan sel darah putih atau leukosit dilakukan berdasarkan metode Klontz (1994) yaitu sampel darah diambil dari tabung eppendof dengan menggunakan alat hisap eritrosit berupa kapiler dengan batu kecil di dalamnya berwarna merah hingga garis menunjukkan 0,5 ml. Selanjutnya larutan hayem ditambahkan hingga larutan mencapai 101 ml. Setelah itu larutan yang ada dalam alat hisap berupa pipa kapiler dihomogenkan dengan cara menggoyangkannya dengan bentuk angka delapan. Darah dibuang dua tetes untuk membuang gelembung udara. Darah diteteskan pada kamar hitung hemacytometer, dan ditutup dengan cover glass. Kemudian darah diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x40 dengan 4 lapang pandang di kotak besar pada kamar hitung hemacytometer dan dilakukan perhitungan dengan rumus:

Jumlah Leukosit = n x 500 sel/mm^3

Keterangan :

n = Jumlah sel leukosit yang ada pada 4 kotak besar kamar hitung

500 = faktor pengenceran

2.6.4 Kelangsungan Hidup

Survival rate (SR) adalah persentase kelangsungan hidup ikan dibandingkan dengan jumlah tebar dan dinyatakan dalam persen. Persen kelangsungan hidup ikan diperoleh dengan cara menghitung secara manual jumlah ikan yang masih hidup pada setiap satuan percobaan pada awal dan akhir penelitian. Tingkat kelangsungan hidup dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Effendie, 1997 dalam Asni *et al*., 2020):

$$SR = \frac{Nt}{N0} \times 100\%$$

Keterangan :

SR = kelangsungan hidup (%)

Nt = jumlah ikan uji yang hidup pada akhir pengamatan (individu)
N0 = jumlah ikan uji yang ditebar pada awal pengamatan (individu)

2.6.5 Kualitas Air

Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran parameter kualitas air sebagai data penunjang penelitian, antara lain suhu, pH, dan oksigen terlarut.

2.6.7 Analisis Data

Data histopatolgi kerusakan organ insang dan hati, perubahan gambaran darah, data jumlah eritrosit dan leukosit, kelangsungan hidup dan kualitas air dianalisis secara deskriptif.