

Campuran tepung bawang putih - meniran untuk pencegahan infeksi *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila

Combination of garlic - shatterstone herb powder to control *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia

Ririn Nurul Fauziah, Dinamella Wahjuningrum*, Sukenda, Ranta

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

*Surel: dinamella@yahoo.com

ABSTRACT

This study was aimed at determining potential of combination powder of garlic *Allium sativum*-shatterstone herb *Phyllanthus niruri* supplemented in feed against *S. agalactiae* infection in tilapia. Four concentrations of combination powder of *A. sativum*-*P. Niruri*; 20+5, 20+10, 20+15 and 20+20 ppt respectively were investigated for their ability to inhibit bacterial fish pathogen. Combination dose of 20+15 ppt produced the highest inhibitory zones in *in vitro* test. *In vivo* test consisted of three treatments with three replications, namely positive control (K+), negative control (K-) and the treatment of *A. sativum*-*P. niruri* supplemented in feed (BM). The test performed on tilapia with weight of 10.33 ± 1.63 g and were reared at density of 10 ind/aquarium. The fish was fed for 14 days, then injected intraperitoneally with 0.1 mL *S. agalactiae* at concentration of 10^5 cfu/mL for positive control and BM groups. Survival, growth rate, feed response, hematological and water quality parameters were observed for 10 days. This study showed that the supplemented-feed-fish (BM) showed better growth rate, feed response, and survival (83.3%) than positive control (36.7%) at $P < 0.05$. In addition, *A. sativum*-*P. niruri* supplemented in feed was also able to enhance the immune response by increasing phagocytic activity.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, phytopharmacy, *Allium sativum*-*Phyllanthus niruri*, tilapia

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi campuran tepung bawang putih *Allium sativum*-meniran *Phyllanthus niruri* dalam pakan terhadap pencegahan infeksi bakteri *S. agalactiae* pada ikan nila. Empat konsentrasi campuran tepung bawang putih-meniran yaitu 20+5 ppt, 20+10 ppt, 20+15 ppt dan 20+20 ppt masing-masing diuji kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen pada ikan. Campuran dosis 20+15 ppt menghasilkan zona hambat terbaik dalam uji *in vitro*. Uji *in vivo* terdiri atas tiga perlakuan dengan tiga ulangan yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan pakan yang mengandung bawang putih-meniran (BM). Uji ini dilakukan pada ikan nila berbobot $10,33 \pm 1,63$ g yang dipelihara di akuarium dengan kepadatan 10 ekor/akuarium. Ikan diberi pakan perlakuan selama 14 hari kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan bakteri *S. agalactiae* sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan 10^5 cfu/mL pada perlakuan kontrol positif dan perlakuan BM. Parameter kelangsungan hidup, laju pertumbuhan, respons pakan, parameter hematologi, dan kualitas air diamati selama sepuluh hari. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian BM dalam pakan memberikan laju pertumbuhan, respons pakan, dan sintasan (83,3%) yang lebih baik daripada kontrol positif (36,7%) pada $P < 0,05$. Pakan yang mengandung campuran bawang putih-meniran ini juga mampu meningkatkan respons imun dengan adanya peningkatan aktivitas fagositosis.

Kata kunci: *Streptococcus agalactiae*, fitofarmaka, *Allium sativum*-*Phyllanthus niruri*, ikan nila

PENDAHULUAN

Ikan nila *Oreochromis niloticus* merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Pemerintah mencanangkan peningkatan produksi ikan nila tahun 2009–2014 sebesar 27% per tahun

dengan target 1,25 juta ton pada tahun 2014 untuk memenuhi kebutuhan konsumsi ikan nila (Nurdjana, 2010). Peningkatan produksi ini dapat diwujudkan dengan mengusahakan budidaya intensif. Akan tetapi kondisi ini dapat meningkatkan peluang ikan nila untuk terserang berbagai penyakit salah satunya adalah

streptococcosis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae* (Toranzo *et al.*, 2005).

Penyakit streptococcosis pertama kali dilaporkan terjadi pada budidaya ikan *rainbow trout* *Oncorhynchus mykiss* di Jepang (Evans *et al.*, 2006), sedangkan di Indonesia bakteri *S. agalactiae* telah menyebabkan kematian pada budidaya ikan nila (Lusiastuti *et al.*, 2014). Penyakit streptococcosis dikenal sebagai penyakit yang dapat mengakibatkan kematian massal ikan.

Penggunaan bahan kimia seperti antibiotik umumnya dapat menanggulangi masalah penyakit ini (Park *et al.*, 2009). Namun, saat ini penggunaan antibiotik dibatasi berkaitan dengan dampak yang diakibatkannya pada lingkungan dan resistensi yang dapat timbul pada bakteri. Fitofarmaka merupakan alternatif yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah pengendalian penyakit produk akuakultur seperti ikan. Campuran ekstrak bawang putih dan meniran telah dibuktikan dapat menanggulangi penyakit akibat infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele (Wahjuningrum *et al.*, 2012). Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji efektivitas campuran tepung bawang putih dan meniran dalam pakan untuk pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *S. agalactiae* pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Prosedur penelitian

Ikan uji berasal dari daerah Cijeruk, Bogor yang berukuran rata-rata $10,33 \pm 1,63$ g. Ikan diadaptasikan di dalam akuarium berukuran $60 \times 30 \times 35$ cm³ selama satu minggu dengan kepadatan 10 ekor/akuarium. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *S. agalactiae* nonhemolitik yang didapatkan dari Balai Budidaya Air Tawar, Sempur. Bakteri tersebut diuji terlebih dahulu melalui serangkaian uji karakterisasi biokimia dan fisiologi bakteri untuk memastikan bakteri yang digunakan adalah bakteri *S. agalactiae*. Pengujian yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram, uji oksidatif/fermentatif, uji oksidase, uji katalase, uji motilitas, dan uji hemolisis (Hardi, 2011). Media yang digunakan adalah BHIA (*brain heart infusion agar*), dengan warna koloni putih kekuningan, diameter koloni sekitar 1–2 mm.

Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak fitofarmaka diawali dengan pembuatan bubuk daun meniran. Daun meniran diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman

Rempah dan Obat (BALITTRO), Bogor. Bubuk meniran dibuat dengan cara, daun meniran dikeringkan tanpa terkena matahari langsung kemudian dihaluskan dan disaring. Dosis ekstrak daun meniran yang digunakan dalam uji *in vitro* pada penelitian ini adalah 5 ppt, 10 ppt, 15 ppt, dan 20 ppt. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan melarutkan bubuk meniran sebanyak 50 mg, 100 mg, 150 mg, dan 200 mg masing-masing dalam 10 mL akuades steril. Larutan tersebut direbus pada suhu 90 °C selama 30 menit. Setelah itu, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit agar mengendap, kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan supernatan yang akan digunakan. Bawang putih yang didapatkan dari pasar Dramaga, Bogor. Bubuk bawang putih dibuat dengan cara, bawang putih dikupas, diiris tipis dan dikeringkan tanpa terkena matahari langsung kemudian dihaluskan dan disaring. Ekstrak bawang putih didapatkan dengan melarutkan 200 mg bubuk bawang putih dalam 10 mL akuades steril. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan supernatan yang siap digunakan.

Uji *in vitro*

Uji ini dilakukan untuk mengukur aktivitas antibakteri dari campuran ekstrak meniran dan bawang putih menggunakan metode Kirby-Bauer (Lay, 1994). Uji ini terdiri atas empat campuran konsentrasi yaitu 20 ppt ekstrak bawang putih yang dicampur dengan ekstrak meniran dengan masing-masing konsentrasi yaitu 5 ppt, 10 ppt, 15 ppt, dan 20 ppt. Langkah awal uji *in vitro* adalah menyiapkan campuran ekstrak bawang putih-meniran sesuai konsentrasi yang digunakan dan menyiapkan bakteri dengan kepadatan 10^5 cfu/mL (hasil LD₅₀) yang didapatkan melalui pengenceran berseri. Suspensi bakteri *S. agalactiae* disebar pada media BHIA secara merata. Kertas cakram direndam dalam campuran ekstrak meniran dan bawang putih selama lima menit. Kemudian, kertas cakram diambil menggunakan pinset steril dan ditempatkan di permukaan media yang telah disebar bakteri, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27 °C untuk melihat zona hambat yang dihasilkan. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan menggunakan penggaris dengan ketelitian 1 mm.

Pembuatan tepung meniran *Phyllanthus niruri*

Penepungan dilakukan agar bahan yang

digunakan dapat tercampur merata dalam *repelleting* pakan komersial. Bagian meniran yang digunakan hanya bagian daunnya saja. Daun meniran dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringudarkan tanpa terpapar sinar matahari langsung selama tiga hari. Setelah itu, dilakukan penepungan dan pengayakan menggunakan saringan halus. Selanjutnya, tepung meniran disimpan di dalam wadah kedap udara.

Pembuatan tepung bawang putih *Allium sativum*

Bawang putih digunakan sebagai campuran daun meniran dalam *repelleting* pakan komersial. Bawang putih dikupas dan diiris tipis. Irisan bawang putih ini dikeringkan tanpa sinar matahari langsung selama lima hari, kemudian dilanjutkan dengan pengeringan di dalam oven pada suhu 60 °C selama satu jam. Irisan bawang putih yang telah kering dihaluskan dan diayak menggunakan saringan halus kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara.

Pembuatan pakan perlakuan

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersil berprotein 30% yang telah dicampur dengan bahan fitofarmaka dengan cara *repelleting*. Dosis fitofarmaka yang digunakan didasarkan pada hasil terbaik pengujian secara *in vitro*. *Repelleting* dilakukan dengan cara pakan komersil ditepungkan, kemudian dicampur dengan tepung meniran dan bawang putih serta ditambahkan vitamin C 0,1%. Kemudian campuran pakan diaduk hingga merata dan ditambahkan air sebanyak 30%. Pakan dicetak menggunakan mesin pencetak pakan kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu 60 °C selama 24 jam.

Uji *in vivo*

Pengujian secara *in vivo* dilakukan untuk menguji pengaruh dosis fitofarmaka dalam pakan terhadap kondisi ikan nila yang diinfeksi bakteri *S. agalactiae*. Penelitian ini terdiri atas tiga perlakuan dengan tiga ulangan yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan pakan bawang putih-meniran (BM). Pemberian pakan uji dilakukan selama 14 hari pada ikan perlakuan BM sebelum ujiantang. Ujiantang dilakukan dengan menginjektikan 0,1 mL/ekor dengan kepadatan bakteri 10⁵ cfu/mL (hasil uji LD₅₀) secara intraperitoneal. Setelah ujiantang, ikan uji diberi pakan komersial dan dilakukan pengamatan selama sepuluh hari.

Parameter kinerja pertumbuhan

Respons makan, sintasan, dan laju pertumbuhan harian (α) diamati setiap hari. Persentase respons makan ikan diperoleh dari jumlah pakan yang dikonsumsi per bobot biomassa ikan. Persentase sintasan diperoleh dari perbandingan jumlah ikan hidup di akhir penelitian dengan jumlah ikan awal. Nilai α diperoleh melalui rumus berikut:

$$\alpha (\%) = \left(\sqrt[n]{(W_t/W_o)-1} \right) \times 100$$

Keterangan:

W_t : bobot rata-rata akhir (g)

W_o : bobot rata-rata awal (g)

α : laju pertumbuhan harian (%)

n : periode pengamatan (hari)

Selain itu, diamati pula kualitas air selama penelitian meliputi suhu, pH, *dissolved oxygen* (DO), dan *total ammonia nitrogen* (TAN).

Parameter hematologi

Parameter hematologi yang diamati meliputi aktivitas fagositosis, total leukosit, total eritrosit, kadar hematokrit, dan kadar hemoglobin. Parameter ini diamati pada awal pemeliharaan (H0), setelah pemberian pakan perlakuan (H14) yaitu pakan yang mengandung fitofarmaka, setelah ujiantang yaitu pada hari pemeliharaan ke-17 (H17) dan akhir penelitian (H24).

Aktivitas fagositosis merupakan persentase sel yang melakukan fagositosis per 100 sel fagosit. Metode pengukuran aktivitas fagositosis, total leukosit, eritrosit, hematokrit dan hemoglobin mengacu pada Blaxhall dan Daisley (1973).

Analisis data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan. Data diameter zona hambat hasil uji *in vitro*, laju pertumbuhan, sintasan, dan parameter hematologi darah yang meliputi kadar hematokrit, kadar hemoglobin, total eritrosit, total leukosit, dan aktivitas fagositosis dianalisis menggunakan uji analisis ragam (ANOVA) dengan uji F. Apabila berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan*. Respons makan dan kualitas air dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter zona hambat

Ekstrak campuran bawang putih-meniran memberikan zona hambat yang berbeda-beda

pada tiap konsentrasi yang diujicobakan. Zona hambat yang terbentuk merupakan petunjuk adanya kepekaan bakteri terhadap bahan yang digunakan (Belguith *et al.*, 2010). Berdasarkan Tabel 1, rata-rata zona bening tertinggi pada campuran bawang putih-meniran diperoleh dari dosis 20 ppt+15 ppt yaitu 18,3 mm. Berdasarkan hasil analisis statistik pada selang kepercayaan 95%, campuran bawang putih-meniran dengan dosis 20+15 ppt berbeda nyata dengan dosis campuran bawang putih-meniran lainnya. Dosis terbaik dari uji *in vitro* yang digunakan dalam uji *in vivo* adalah 20+15 ppt. Dosis lebih rendah dari 20+15 ppt masih belum memadai untuk menghambat *S. agalactiae*, sedangkan dosis lebih tinggi dari 20+15 ppt diduga terjadi efek penghambatan balik.

Senyawa dalam bawang putih yang diduga berperan sebagai zat antibakteri adalah allicin. Allicin tidak terdapat pada bawang putih utuh, tetapi allicin terbentuk karena adanya kerusakan mekanik pada bawang putih yang menyebabkan enzim alliin-lyase mengubah alliin menjadi allicin (Bakri & Douglas, 2005). Aktivitas antimikroba disebabkan karena allicin dapat mengganggu sebagian sintesis DNA dan protein serta menghambat sintesis RNA. RNA diduga merupakan target utama dari aksi allicin (Bakri & Douglas, 2005). Hal ini sejalan dengan pernyataan Durairaj *et al.* (2009) bahwa allicin menghambat sintesis RNA dan lipid. RNA yang diproduksi dalam jumlah sedikit atau tidak diproduksi sama sekali berakibat pada sintesis protein karena ketiadaan messenger RNA, ribosomal RNA dan transfer RNA. Hal ini tentu sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri tersebut karena asam amino dan protein merupakan zat penting yang diperlukan oleh struktur sel.

Selain itu, gangguan pada sintesis lipid berakibat pada bagian sel lainnya terutama pada fosfolipid biolayer di dinding sel yang tidak dapat dibentuk secara tepat baik pada bakteri Gram positif maupun Gram negatif, sedangkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun

meniran adalah lignan, flavonoid, senyawa terpen, alkaloid, tanin, dan senyawa lainnya (Bagalkotkar *et al.*, 2006). Diduga kontribusi terbesar yang berperan sebagai agen antimikrobal dalam meniran adalah flavonoid, karena dapat memacu proliferasi limfosit dan meningkatkan jumlah sel T yang berperan dalam pembentukan sel imun.

Uji *in vivo*

Pengujian secara *in vivo* memperlihatkan respons makan ikan melalui perbandingan jumlah konsumsi pakan dengan bobot biomassa ikan selama penelitian. Pada ketiga perlakuan, ikan merespons pakan dengan baik pada saat sebelum ujiantang, hal ini dibuktikan dengan grafik respons makan perlakuan BM saling berhimpitan dengan kontrol positif maupun kontrol negatif (Gambar 1). Respons makan ikan cenderung stabil hingga akhir perlakuan. Akan tetapi, setelah ujiantang, ikan uji mengalami penurunan nafsu makan akibat kegiatan penyuntikan dan infeksi bakteri. Pada kontrol negatif, respons makan mengalami penurunan pada hari pertama pengamatan akibat kegiatan penyuntikan, walaupun yang diinjeksikan ke dalam tubuh ikan kontrol negatif adalah *phosphate buffer saline* (PBS).

Penyuntikan diduga mengakibatkan ikan mengalami stres dan berdampak pada nafsu makan ikan yang menurun. Penurunan nafsu makan ikan ini tidak berlangsung lama karena keesokan harinya ikan berangsur-angsur dapat menerima pakan secara normal kembali. Sama halnya dengan kontrol negatif, ikan uji pada kontrol positif dan perlakuan BM juga mengalami penurunan nafsu makan setelah dilakukannya ujiantang. Hal ini diduga diakibatkan oleh penginjeksian bakteri *S. agalactiae* ke dalam tubuh ikan uji yang menyebabkan ikan sakit dan mengalami penurunan nafsu makan. Brunt dan Austin (2005) serta Sheehan *et al.* (2009) menyatakan bahwa salah satu gejala klinis infeksi bakteri *S. agalactiae* adalah dengan respons terhadap pakan yang buruk. Selain itu,

Tabel 1. Diameter zona hambat hasil uji *in vitro*

Dosis bawang putih + meniran (ppt)	Hasil (mm)			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata (mm)
20+5	10	11	11	10,7a
20+10	15	16	16	15,7b
20+15	18	19	18	18,3d
20+20	17	17	17	17,0c

Keterangan: huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

Hardi (2011) juga menyatakan penurunan nafsu makan diduga akibat dari serangan bakteri yang telah mencapai otak dan mengganggu kerja hipotalamus bagian lateral yang mengatur rasa lapar. Terganggunya sel-sel hipotalamus yang berada dalam otak depan akibat infeksi *S. agalactiae* inilah yang menyebabkan turunnya nafsu makan atau bahkan ikan tidak mau makan sama sekali pasca uji tantang. Peningkatan nafsu makan terjadi seiring dengan waktu pemeliharaan, akan tetapi peningkatan respons makan perlakuan BM lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif.

Laju pertumbuhan pada BM $1,53 \pm 0,15$ dalam penelitian ini tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif $1,56 \pm 0,005$ tetapi berbeda nyata dengan kontrol positif $1,21 \pm 0,16$ seperti yang terlihat pada Gambar 2. Laju pertumbuhan diukur selama pemeliharaan ikan, yaitu sebelum uji tantang sampai setelah uji tantang. Hal tersebut diduga karena senyawa-senyawa dalam fitofarmaka yang digunakan memberikan kontribusi positif. Meniran diketahui dapat merangsang nafsu makan (Wahjuningrum *et al.*, 2012) dan flavonoid dalam meniran mampu berfungsi sebagai kontrol hormon pada pertumbuhan. Mekanisme flavonoid sebagai kontrol hormon pada pertumbuhan diduga berkaitan dengan kemampuannya dalam merangsang kelenjar *prosimal pars distalis* mensekresi hormon pertumbuhan (somatotropin).

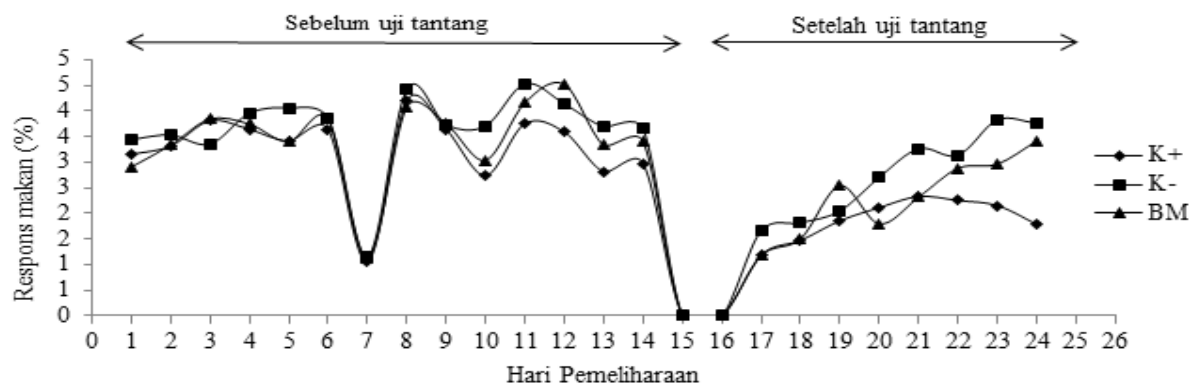
Sementara itu, bawang putih dapat meningkatkan pemanfaatan makanan dalam saluran pencernaan dengan meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme menguntungkan sehingga pertumbuhan ikan dapat maksimum (Nya & Austin, 2009). Bawang putih memiliki fruktooligosakarida (FOS) yang dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhan mikroflora normal dalam saluran pencernaan (Kusharto,

2006) sehingga membantu menekan populasi bakteri merugikan dan meningkatkan penyerapan sari makanan. Peran meniran sebagai kontrol hormon dan bawang putih sebagai prebiotik inilah yang diduga menyebabkan laju pertumbuhan BM tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif walaupun jumlah konsumsi pakan BM lebih sedikit.

Akibat infeksi penyakit, sintasan ikan kontrol positif menurun tajam hingga mencapai $36,7 \pm 15,28\%$ yang disajikan pada Gambar 3. Pada perlakuan kontrol negatif tidak ditemukan gejala-gejala yang menunjukkan ikan uji terserang penyakit tersebut dan sintasannya memiliki nilai tertinggi yaitu $93,3 \pm 5,77\%$. Pada perlakuan BM, ikan mengalami gejala klinis yang sama dengan kontrol positif. Akan tetapi, sintasan BM jauh lebih baik dari kontrol positif dengan persentasenya yaitu $83,3 \pm 15,28\%$. Hal ini membuktikan bahwa BM bereaksi positif melawan infeksi bakteri *S. agalactiae* karena pemberian pakan yang mengandung fitofarmaka ini memungkinkan zat antibakteri dan imunostimulan masuk ke dalam tubuh ikan dan memberikan pengaruh pada sistem pertahanan tubuh sehingga menjadi lebih baik (Wahjuningrum *et al.*, 2012; Reverter *et al.*, 2014). Gejala klinis ikan yang terinfeksi bakteri *S. agalactiae* dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 5.

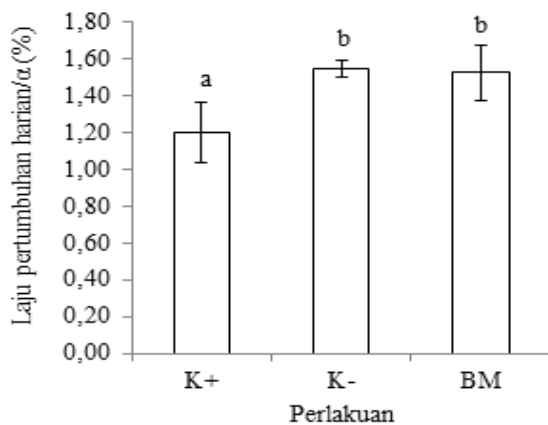
Aktivitas allicin yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dan meningkatkan pemanfaatan sari makanan dalam pencernaan, hal tersebut pula yang menyebabkan tingginya sintasan pada perlakuan BM. Selain itu, kandungan flavonoid pada meniran memiliki fungsi untuk meningkatkan kekebalan tubuh ikan (Sabir & Rocha, 2008).

Sehari pasca uji tantang, ikan uji pada kontrol positif mulai menunjukkan gejala klinis berupa



Gambar 2. Respons makan ikan nila selama penelitian. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran.

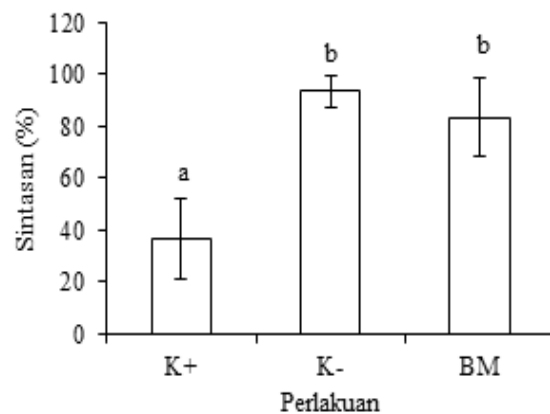
perubahan warna tubuh menjadi lebih hitam dengan garis vertikal pada tubuh yang terlihat lebih jelas. Perlakuan kontrol positif mengalami gejala klinis yang mencakup perubahan warna tubuh, penampakan garis vertikal tubuh, pembengkakan pada mata (*exophthalmia*), kekeruhan mata (*opacity*), mata memutih (*purulens*), haemoragi pada mata, perubahan pola renang dan pembengkokan bagian tubuh (Gambar 5). Gejala klinis yang ditunjukkan ini sesuai dengan gejala klinis penyakit akibat infeksi *S. agalactiae* yang dikemukakan oleh Abuseliana *et al.* (2011). Hardi (2011) juga mengatakan bahwa keberadaan *S. agalactiae* pada mata akan menyebabkan perubahan pada mata, keberadaannya pada organ otak akan menyebabkan perubahan cara berenang ikan menjadi abnormal dan keberadaannya pada ginjal menyebabkan warna tubuh lebih hitam.



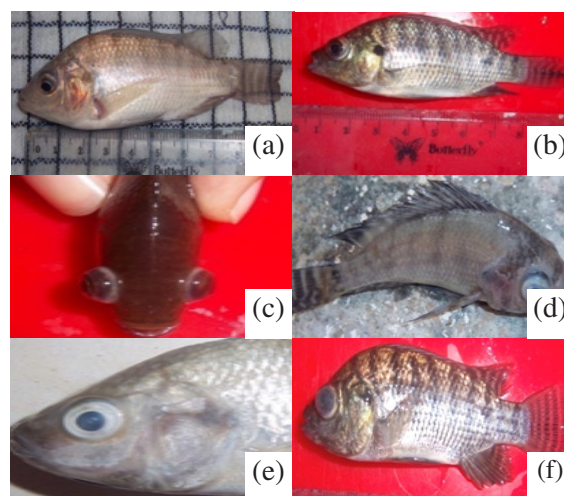
Gambar 3. Laju pertumbuhan harian ikan nila selama pemeliharaan. K+: kontrol positif, K-: kontrol negatif, BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

Parameter hematologi

Status kesehatan ikan dapat diketahui dari hematologi ikan tersebut. Penelitian ini menguji aktivitas fagositosis, total leukosit, total eritrosit, kadar hematokrit, dan kadar haemoglobin pada ikan uji. Fagositosis merupakan pertahanan pertama dari respons seluler yang dilakukan oleh monosit (makrofag) dan neutrofil (granulosit) yang merupakan bagian dari sel darah putih. Proses fagositosis sendiri terdiri atas tahap kemotaksis, pelekatan, penelanan, dan pencernaan (Overland *et al.*, 2010). Aktivitas fagositosis pada ikan awal mencapai nilai 27,5% (Gambar 6) dengan nilai total sel darah putih $3,92 \pm 0,43 \times 10^5$ sel/mm³. Terjadi peningkatan aktivitas fagositosis dan jumlah sel darah putih atau leukosit setelah pemberian pakan perlakuan. Peningkatan kedua parameter ini berlangsung



Gambar 4. Sintasan ikan nila selama pemeliharaan. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).



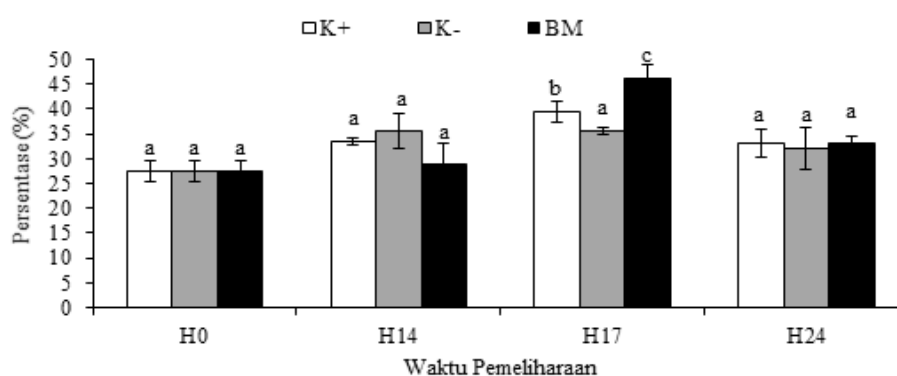
Gambar 5. Gejala klinis pada organ ikan nila; (a) ikan normal, (b) garis vertikal tubuh menghitam, (c) pembengkakan mata (*exophthalmia*), (d) tubuh membentuk huruf 'C', (e) mata berkabut (*opacity*), (f) mata putih (*purulens*).

hingga pascauji tantang. Hal ini terjadi akibat infeksi bakteri patogen dalam tubuh ikan sehingga ikan akan melakukan pertahanan dengan cara meningkatkan produksi leukosit pada saat terjadi infeksi.

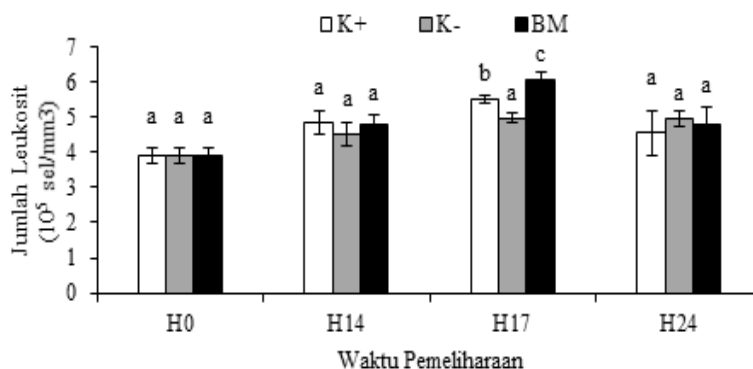
Jumlah leukosit ikan uji yang diukur selama penelitian disajikan pada Gambar 7. Dengan meningkatnya jumlah leukosit maka proses fagositosis yang dilakukan sel-sel fagosit juga semakin tinggi karena jumlah sel-selnya yang bertambah banyak. Martins *et al.* (2008) menyatakan bahwa jumlah leukosit pada ikan yang diinjeksi bakteri patogen mengalami peningkatan sebagai upaya meningkatkan mekanisme pertahanan tubuhnya terhadap bakteri tersebut. Selain itu, bahan aktif yang terdapat dalam fitofarmaka yang digunakan terutama meniran yang bertindak sebagai imunostimulan meningkatkan mekanisme pertahanan non-spesifik (Sabir & Rocha, 2008). Pemberian ekstrak meniran diketahui mempunyai efek terhadap respons imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis, kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil (Obiagwu *et al.*, 2014) dan

meningkatkan proliferasi sel limfosit T. Penurunan aktivitas fagositosis pada akhir pengamatan diduga karena mulai adanya penurunan infeksi *S. agalactiae* terhadap ikan, karena bakteri tersebut telah difagosit oleh sel fagosit. Penurunan infeksi ini juga diduga berdampak pada penurunan jumlah leukosit sebagai upaya mengembalikan kondisi tubuh ke keadaan normal.

Total eritrosit pada penelitian ini mengalami peningkatan setelah pemberian pakan perlakuan terutama pada perlakuan BM seperti yang disajikan pada Gambar 8. Total eritrosit pascauji tantang ini masih berada dalam kisaran normal karena menurut Affandi dan Tang (2002) jumlah eritrosit dalam keadaan normal ikan bertulang keras adalah $1,05-3,0 \times 10^6$ sel/mm³. Dapat dikatakan bahwa pemberian pakan yang mengandung fitofarmaka tidak mengganggu kesehatan ikan uji. Setelah dilakukan uji tantang, jumlah eritrosit ikan uji mengalami penurunan. Jumlah eritrosit tertinggi setelah uji tantang terdapat pada perlakuan BM ($2,13 \pm 0,05 \times 10^6$) dan jumlah terendah terdapat pada perlakuan kontrol positif ($1,09 \pm 0,02 \times 10^6$). Terjadinya penurunan



Gambar 6. Aktivitas fagositosis ikan nila selama penelitian. H0: hari ke-0, H14: hari ke-14, H17: hari ke-17, H24: hari ke-24. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

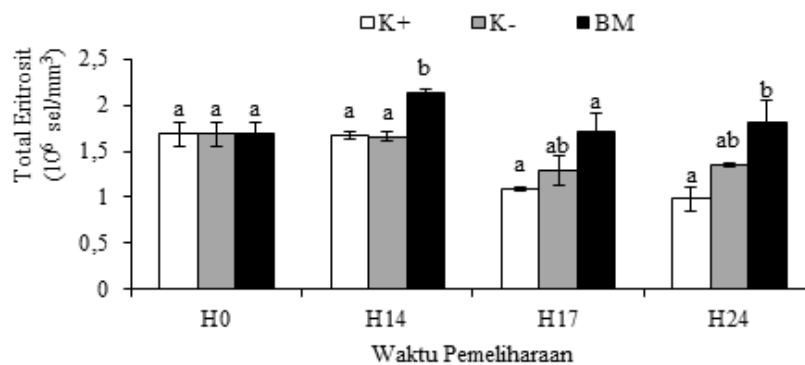


Gambar 7. Total leukosit ikan nila selama penelitian. H0: hari ke-0, H14: hari ke-14, H17: hari ke-17, H24: hari ke-24. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

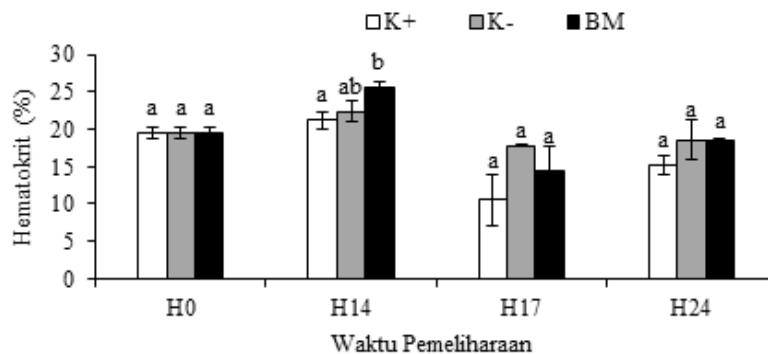
jumlah eritrosit menunjukkan adanya infeksi serta menandakan ikan menderita anemia (Silva *et al.*, 2011). Infeksi ginjal ini diduga akibat adanya serangan *S. agalactiae* yang diinjeksikan ke dalam tubuh ikan uji sehingga mengakibatkan penurunan jumlah eritrosit. Palacios *et al.* (2007) mengatakan bahwa salah satu toksin yang dikeluarkan oleh bakteri *S. agalactiae* adalah *hyaluronidase* yang berfungsi sebagai faktor penyebaran. Van Calsteren *et al.* (2010) dan Tang *et al.* (2012) juga menyatakan toksin lain yang dihasilkan oleh *S. agalactiae* adalah *superoxide dismutase* dan kapsul polisakarida. Toksin-toksin ini diduga mempengaruhi ginjal dan menyebabkan infeksi pada ginjal yang merupakan salah satu organ penghasil sel darah merah pada ikan (Aksakal *et al.*, 2011). Peningkatan jumlah sel darah merah mulai terlihat pada akhir pengamatan pada perlakuan BM dan kontrol negatif, tetapi kontrol positif masih mengalami penurunan jumlah eritrosit. Peningkatan ini diduga akibat serangan bakteri telah menurun, dan merupakan upaya pemulihan pada tubuh ikan pasca uji tantang. Tubuh ikan memproduksi sel

darah lebih banyak untuk menggantikan eritrosit yang menurun akibat infeksi patogen.

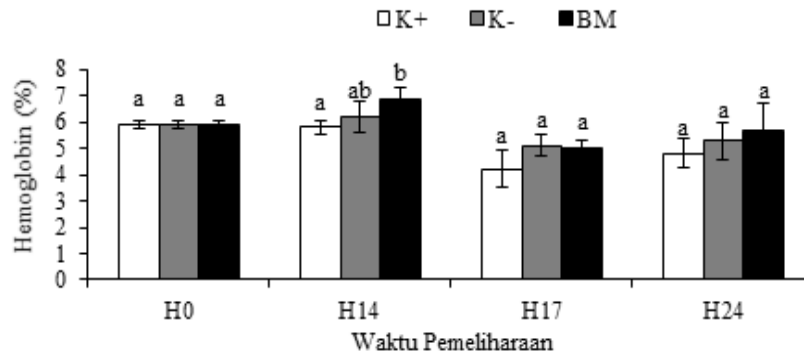
Kadar hematokrit merupakan perbandingan antara padatan sel-sel darah merah dalam darah yang dinyatakan dalam persen. Dalam penelitian ini nilai awal kadar hematokrit yaitu $19,52 \pm 0,00\%$ (Gambar 9). Kadar hematokrit ini meningkat setelah pemberian pakan fitofarmaka dengan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan BM ($25,60 \pm 0,84\%$). Kisaran nilai kadar hematokrit setelah perlakuan ini masih berada dalam kisaran normal. Bond (1979) menyatakan kadar hematokrit ikan normal berkisar antara 20–30%. Kadar hematokrit mengalami penurunan pasca uji tantang pada semua perlakuan. Nilai kadar hematokrit yang rendah dapat menjadi petunjuk kurangnya protein dalam pakan, defisiensi vitamin atau ikan terkena infeksi yang menyebabkan nafsu makan turun (Nagel *et al.*, 2012). Rendahnya nafsu makan ikan akibat serangan *S. agalactiae* diduga menjadi faktor yang menyebabkan ikan kekurangan nutrisi dan vitamin setelah uji tantang. Peningkatan kadar hematokrit saat akhir pengamatan diduga karena



Gambar 8. Total eritrosit ikan nila selama penelitian. H0: hari ke-0, H14: hari ke-14, H17: hari ke-17, H24: hari ke-24. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).



Gambar 9. Kadar hematokrit ikan nila selama penelitian. H0: hari ke-0, H14: hari ke-14, H17: hari ke-17, H24: hari ke-24. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).



Gambar 10. Kadar hemoglobin ikan uji selama penelitian. H0: hari ke-0, H14: hari ke-14, H17: hari ke-17, H24: hari ke-24. K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; BM: bawang putih-meniran. Huruf berbeda di atas diagram batang menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

terjadi peningkatan sel darah merah. Terdapat keterkaitan antara jumlah sel darah merah dan kadar hematokrit (Ololade & Oginni, 2010).

Selain kadar hematokrit, parameter lain yang diukur adalah kadar hemoglobin. Berdasarkan hasil penelitian, kadar haemoglobin awal ikan uji adalah $5,90 \pm 0,14$ g% yang dapat dilihat pada Gambar 10. Setelah pemberian pakan perlakuan, kadar hematokrit ikan uji meningkat terutama pada perlakuan BM dan kontrol negatif. Nilai hematokrit dan hemoglobin tidak selalu menunjukkan nilai yang tetap. Terdapat penurunan kadar hemoglobin pada semua perlakuan pascauji tantang. Penurunan ini dapat diakibatkan karena terjadinya penurunan jumlah eritrosit ikan uji akibat infeksi bakteri *S. agalactiae*. Menurut Ololade dan Oginni (2010) terdapat korelasi kuat antara kadar hemoglobin, sel darah merah dan hematokrit. Semakin rendah jumlah sel darah merah, semakin rendah pula kadar hematokrit dan kadar hemoglobinya. Pada akhir pengamatan mulai terjadi peningkatan kadar hemoglobin pada kontrol positif dan perlakuan BM. Peningkatan ini disebabkan tubuh ikan mulai mengalami penyembuhan dan mulai memproduksi sel darah merah kembali. Kadar hemoglobin perlakuan kontrol negatif stabil.

Analisis kualitas air

Ikan akan dengan mudah terserang penyakit apabila kondisi media hidupnya kurang baik, oleh karena itu kualitas air dalam pemeliharaan ikan harus dijaga. Penyifonan dan pergantian air dalam penelitian ini sebanyak 60% volume total air dilakukan satu kali setiap hari untuk menjaga kualitas air pemeliharaan ikan uji. Nilai parameter kualitas air yang diukur dalam penelitian ini (Tabel 2) masih berada dalam kisaran normal untuk kehidupan ikan. Kisaran

toleransi kualitas air untuk ikan air tawar yaitu, suhu berkisar $25-32$ °C, nilai pH $6,5-8,5$, nilai DO ≥ 3 mg/L dan TAN < 1 ppm (SNI, 2009). Hal ini membuktikan bahwa ikan uji yang terserang penyakit dan mengalami kematian bukan disebabkan oleh kualitas air tetapi dikarenakan infeksi bakteri *S. agalactiae*.

KESIMPULAN

Penambahan campuran tepung bawang putih 2% dan meniran 1,5% dalam pakan efektif mencegah infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. Penggunaan tepung bawang putih-meniran berpengaruh dalam peningkatan sistem imun ikan melalui perbaikan parameter hematologi, memberikan kelangsungan hidup, laju pertumbuhan harian, dan respons makan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Abuseliana AF, Daud HHM, Aziz SA, Bejo SK, Alsaid M. 2011. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia *Oreochromis* sp. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10: 914–919.
- Affandi R, Tang UM. 2002. *Fisiologi Hewan Air*. Pekanbaru: Unri Press.
- Aksakal E, Ekinci D, Erdoğan O, Beydemir Ş, Alım Z, Ceyhun SB. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock Science* 141: 69–75.
- Bagalkotkar G, Sagineedu SR, Saad MS, Stanslas J. 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus*

- niruri* Linn. and their pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58: 1.559–1.570.
- Bakri IM, Douglas CWI. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 50: 645–651.
- Belguith H, Kthiri F, Chati A, Sofah AA, Hamida JB, Ladoulsi A. 2010. Inhibitory effect of aqueous garlic extract *Allium sativum* on some isolated *Salmonella serovars*. *African Journal of Microbiology Research* 4: 328–338.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. The routine haematological methods for use with blood fish. *Journal of Fish Biology* 5: 577–581.
- Boyd CE. 1979. *Biology of Fishes*. Philadelphia: WB. Saunders Company.
- Brunt J, Austin B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 28: 693–701.
- Durairaj S, Srinivasan S, Lakshmanaperumalsamy P. 2009. *In vitro* antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *Electronic Journal of Biology* 5: 5–10.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. 2006. An overview: Streptococcus in warm-water fish. *Aquaculture Health International* 7: 10–14.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Karakteristik dan patogenisitas *Streptococcus agalactiae* tipe β -hemolitik dan nonhemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner* 12: 152–164.
- Kusharto CM. 2006. Serat makanan dan peranannya bagi kesehatan. *Jurnal Gizi dan Pangan* 1: 45–54.
- Lay BW. 1994. *Analisis mikroba di laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Lusiastuti AM, Textor M, Seeger H, Akineden Ö, Zschöck M. 2014. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. *Aquaculture Research* 45: 1.260–1.263.
- Martins ML, Mourino JLP, Amara GV, Vieira FN, Dotta G, Jatoba AMB, Pedrotti FS, Jeronimo GT. 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* 68: 657–661.
- Nagel F, von Danwitz A, Tusche K, Kroeckel S, van Bussel CG, Schlachter M, Adem H, Tressel R, Schulz C. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot *Psetta maxima* L.: Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility, and blood physiology. *Aquaculture* 356: 357–364.
- Nurdjana ML. 2010. Program Peningkatan Produksi Perikanan Tahun 2010–2014 dalam rangka Feed The World, di dalam: Seminar Nasional Feed The World. Jakarta, 28 Januari 2010.
- Nya EJ, Austin B. 2009. Use of garlic *Allium sativum* to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32: 963–970.
- Obiagwu IN, Okechalu OB, Njoku MO. 2014. Studies on antibacterial effect of the leaves of *Phyllanthus niruri* on some enteric pathogens. *Nigerian Journal of Biotechnology* 23: 22–27.
- Ololade IA, Oginni O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2: 14–19.
- Øverland HS, Pettersen EF, Rønneseth A, Wergeland HI. 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon *Salmo salar* L. and Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Fish and Shellfish Immunology* 28: 193–204.
- Palacios GC, Gonzales MN, Beltran M, Arredondo JL, Torres J, Solorzano F. 2007. High virulence clone of group B streptococci unable to grow at high temperature is present in serotypes other than type III. *Journal of Current Microbiology and International* 54: 42–47.
- Park YK, Nho SW, Shin GW, Park SB, Jang HB, Cha IS, Jung TS. 2009. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Veterinary Microbiology* 136: 76–81.
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture* 433: 50–61.
- Sabir SM, Rocha JBT. 2008. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct *in vitro* anti-oxidant and *in vivo* hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. *Journal of Food Chemistry* 111: 845–851.
- Sheehan B, Labrie L, YengSheng L, WeeKeng

- L, Wong F, Chan J, Komar C, Wendover N, Grisez L. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific* 5: 26–29
- Silva DGH, Junior EB, de Souza Torres L, Júnior OR, de Castro Lobo C, Bonini-Domingos CR, de Almeida EA. 2011. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms, and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 47: 23–28.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2009. Produksi ikan nila *Oreochromis niloticus* Bleeker kelas pembesaran di kolam air tenang. Badan Standardisasi Nasional/BSN. SNI 7550: 2009.
- Tang Y, Zhang X, Wu W, Lu Z, Fang W. 2012. Inactivation of the sodA gene of *Streptococcus suis* type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice. *Veterinary Microbiology* 158: 360–366.
- Toranzo AE, Margarinos B, Romalde JL. 2005. A review of the main bacterial diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37–61.
- Wahjuningrum D, Kurniawan D, Setyotomo K, Setiawati M. 2012. Penggunaan campuran tepung meniran dan bawang putih dengan metode *repelleting* dalam pakan untuk pencegahan dan pengobatan *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo *Clarias* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 11: 11–16.