

# **Potensi Bahan Hayati Sebagai Imunostimulan Hewan Akuatik**

## UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

### **Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4**

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

### **Pembatasan Pelindungan Pasal 26**

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 113**

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Rudy Agung Nugroho  
Firman M. Nur

# Potensi Bahan Hayati Sebagai Imunostimulan Hewan Akuatik



**POTENSI BAHAN HAYATI SEBAGAI IMUNOSTIMULAN HEWAN AKUATIK**

**Rudy Agung Nugroho & Firman M. Nur**

Desain Cover : Nama  
Tata Letak Isi : Nurul Fatma Subekti  
Sumber Gambar : Sumber

Cetakan Pertama: Januari 2018

Hak Cipta 2018, Pada Penulis

---

Isi di luar tanggung jawab percetakan

---

Copyright © 2018 by Deepublish Publisher  
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**PENERBIT DEEPUBLISH  
(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)**

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman

Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581

Telp/Faks: (0274) 4533427

Website: [www.deepublish.co.id](http://www.deepublish.co.id)

[www.penerbitdeepublish.com](http://www.penerbitdeepublish.com)

E-mail: [cs@deepublish.co.id](mailto:cs@deepublish.co.id)

---

**Katalog Dalam Terbitan (KDT)**

---

**NUGROHO, Rudy Agung**

Potensi Bahan Hayati Sebagai Imunostimulan Hewan Akuatik/oleh Rudy Agung  
Nugroho & Firman M. Nur.--Ed.1, Cet. 1--Yogyakarta: Deepublish, Januari-2018.

xvi, 109 hlm.; Uk:17.5x25 cm

ISBN 978-Nomor ISBN

1. Budidaya Ikan Air Tawar

I. Judul

639.31

## PRAKATA

Intensifikasi di bidang Akuakultur telah menjadi hal penting akhir-akhir ini. Intensifikasi ditujukan untuk meningkatkan produksi budidaya ikan, namun adanya penyakit yang disebabkan mikrobia menjadi hal yang dapat berakibat fatal di bidang Akuakultur. Beberapa senyawa kimia, obat-obatan dan program vaksin telah digunakan baik untuk mencegah atau mengontrol penyakit. Sayangnya tidak dapat tuntas menangani masalah tersebut. Sebagai alternatif, beberapa variasi senyawa dari bahan alam digunakan untuk menstimulasi sistem imun pada hewan akuatik terutama yang dibudidayakan. Sejumlah komponen mikrobia dan produk dari tumbuhan banyak digunakan sebagai imunostimulan di bidang Akuakultur untuk menstimulasi pertumbuhan, sifat antibakteria, dan sistem imun.

Buku ini memaparkan tentang sistem imunitas pada hewan akuatik, bahan hayati dari komponen mikrobia seperti organik selenium dan mannan oligosakarida dari dinding sel yeast, senyawa aktif dari tumbuhan ketapang (*Terminalia catappa*) dan propolis dari lebah *Trigona* sp. yang terbukti dapat digunakan sebagai imunostimulan. Di samping fokus pada sifat imunostimulan, dalam buku ini juga dipaparkan manfaat bahan alam tersebut sebagai pemicu pertumbuhan dan antibakteria. Isi buku ini berasal dari riset-riset yang telah dilakukan penulis selama kurun beberapa tahun terakhir ini, baik riset laboratorium dan telaah pustaka. Beberapa hasil riset telah dipublikasikan di jurnal internasional bereputasi dan berdampak faktor.

Untuk membagi informasi tentang senyawa-senyawa imunostimulan dari bahan hayati, buku tentang “Potensi Bahan hayati sebagai immunostimulan hewan akuatik” ini ditulis. Buku ini disusun sebagai bahan pengetahuan untuk menambah wawasan tentang peran bahan aktif dari alam sebagai imunostimulan, pemicu pertumbuhan, antibakteria yang berasal komponen mikrobia atau tumbuhan. Buku ini diperuntukkan bagi mahasiswa, pengajar yang

melakukan penelitian yang berhubungan dengan bahan hayati imunostimulan di bidang akuatik serta khalayak umum.

Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktur Eksekutif PIU IDB 4 in 1 Project Universitas Mulawarman beserta jajarannya dan FMIPA Universitas Mulawarman atas hibah yang diberikan kepada penulis serta berbagai pihak yang telah membantu dalam pembuatan buku dan proses editing. Buku ini tentu saja jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat dibutuhkan untuk perbaikan ke depan. Akhir kata, selamat membaca dan semoga berguna.

Samarinda, Januari 2018

Penulis

## SEKAPUR SIRIH



Selamat untuk Dr. Rudy Agung Nugroho atas peluncuran bukunya *Bahan Hayati Imunostimulan Hewan Akuatik*, menurut saya sangat bermanfaat dan layak dibaca oleh akademisi dan praktisi akuakultur

**Prof. Dr. Muchlisin Z.A., S.Pi, MSc.**

Guru Besar Iktiologi Terapan  
FKP Universitas Syiah Kuala

Hadirnya buku “Potensi Bahan Hayati sebagai Imunostimulan Hewan Akuatik” ini dapat meningkatkan khasanah pengetahuan tentang penggunaan bahan-bahan alami untuk mengurangi penggunaan bahan kimia dan antibiotik sebagai imunostimulan pada budidaya hewan akuatik.

**Dr. Indra Suharman, S.Pi., M.Sc**

Staf Pengajar Fakultas Perikanan dan Kelautan

Universitas Riau, Pekanbaru





Buku ini sangat bermanfaat untuk mahasiswa di Fakultas Perikanan, karena menyajikan informasi pemanfaatan tanaman alami sebagai bahan antibacterial dan imunostimulan. Informasi yang disajikan juga merupakan hasil penelitian terbaru yang dapat dijadikan sebagai ide untuk penelitian bagi mahasiswa, maupun untuk pembuatan obat ikan oleh pembudidaya ikan.

**Dr. Esti Handayani Hardi, S. Pi., M.Si**

Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Mulawarman, Samarinda

Buku yang lengkap mengulas tentang potensi bahan-bahan alam sebagai imunostimulan hewan budidaya akuatik

**Drs. Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc**

Staf Pengajar Fakultas Teknobiologi  
Universitas Atma Jaya Yogyakarta;  
Pemerhati Biologi kelautan



## DAFTAR ISI

PRAKATA.....	v	
SEKAPUR SIRIH .....	vii	
DAFTAR ISI.....	ix	
DAFTAR TABEL.....	xi	
DAFTAR GAMBAR .....	xiii	
DAFTAR SINGKATAN.....	xv	
<b>BAB 1</b>	<b>SISTEM IMUN PADA HEWAN AKUATIK .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Pengantar Sistem Pertahanan Tubuh .....	1
1.2.	Sistem Pertahanan Tubuh Ikan .....	2
1.3.	Komponen Sistem Pertahanan Tubuh Ikan.....	5
1.4.	Faktor-faktor yang Berpengaruh terhadap Imunitas Ikan .....	14
1.5.	Sistem Pertahanan Tubuh Crustaceae .....	17
<b>BAB 2</b>	<b>BAHAN HAYATI IMUNOSTIMULAN .....</b>	<b>21</b>
2.1.	Imunostimulan.....	21
2.2.	Hubungan Imunostimulan dengan Sistem Imunitas.....	22
2.3.	Bahan Alam Potensial Immunostimulan .....	23
<b>BAB 3</b>	<b>ORGANIK SELENIUM SEBAGAI IMUSTIMULAN.....</b>	<b>27</b>
3.1.	Selenium.....	27
3.2.	Organik Selenium .....	28
3.3.	Aspek Biologi Selenium .....	28
3.4.	Selenium pada Hewan Akuatik .....	30
3.5.	Pentingnya Selenium pada Aktivitas Antioksidan .....	33
3.6.	Sel-Plex® Sebagai Sumber Organik Selenium .....	35
<b>BAB 4</b>	<b>MANNAN OLIGOSAKARIDA (MOS) .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Telaah MOS.....	39
4.2.	Efek Immunostimulan MOS.....	40

4.3.	MOS Sebagai Antibakteria.....	45
<b>BAB 5</b>	<b>KETAPANG .....</b>	<b>49</b>
5.1.	Biologi Ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> L.).....	49
5.2.	Fitokimia pada Ketapang.....	50
5.3.	Manfaat Daun Ketapang dalam Budidaya Ikan .....	53
5.4.	Imunostimulan pada Ikan Cupang.....	54
5.5.	Sifat Antibakteria Ketapang.....	58
<b>BAB 6</b>	<b>BAWANG TIWAI.....</b>	<b>67</b>
6.1.	Studi Kasus Bawang Tiwai .....	67
6.2.	Potensi <i>Eleutherine americana</i> Merr Sebagai Antimikrobia dan Imunostimulan .....	68
6.3.	Pertumbuhan dan Imunitas.....	70
6.4.	Efek terhadap Enzim Pencernaan .....	72
<b>BAB 7</b>	<b>PROPOLIS .....</b>	<b>75</b>
7.1.	Tinjauan Umum Propolis .....	75
7.2.	Kandungan Propolis.....	76
7.3.	Manfaat Propolis .....	77
7.4.	Efek Propolis terhadap Pertumbuhan dan Profil Darah Ikan Patin .....	78
	DAFTAR PUSTAKA .....	83
	BIODATA PENULIS.....	108

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Tiga macam tipe haemocyte pada crustacea .....	18
Tabel 2.1.	Aktivitas antibakteria 31 ekstrak tanaman terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Pseudomonas</i> sp.....	26
Tabel 3.1.	Aplikasi dan efek diet selenium pada hewan akuatik.....	32
Tabel 3.2.	Spesifikasi Sel-Plex® .....	36
Tabel 4.1.	Penggunaan MOS dalam pakan hewan akuatik serta pengaruhnya.....	41
Tabel 4.2.	Mean ± SE performa pertumbuhan marron dengan variasi suplementasi.....	44
Tabel 4.3.	Mean ± SE immune-kompeten marron dengan variasi suplementasi.....	45
Tabel 4.4.	Aktivitas enzim antioxidant, aktivitas LPO, NRRT dan total solubilitas Se di hemolimph marron dengan pakan variasi suplementasi selama 90 hari.....	45
Tabel 4.5.	Mean ± SE parameter imunitas marron diuji tantang dengan <i>Vibrio mimicus</i> .....	48
Tabel 5.1.	Uji skrining fitokimia ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> ).....	51
Tabel 5.2.	Kualitas air medium pemeliharaan ikan cupang ( <i>Betta</i> sp.) yang diimersi dengan berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak daun ketapang ( <i>Terminalia catappa</i> ).....	55
Tabel 5.3.	Profil darah <i>Betta</i> sp. yang diimersi berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak daun <i>Terminalia catappa</i> selama 30 hari.....	59
Tabel 5.4.	Nilai rerata ( <i>mean±SE</i> ) profil darah ikan cupang pada jam ke-48 pasca uji tantang dengan <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	61
Tabel 6.1.	Rata-rata ± Standard error (SE) parameter pertumbuhan dan profil leukosit ikan patin	

	( <i>Pangasius</i> sp.) yang diberi pakan variasi konsentrasi ekstrak bawang tiwai ( <i>Eleutherine americana</i> ) selama 4 minggu.....	70
Tabel 7.1.	Nilai rerata (Mean±SE) pertumbuhan individu, laju pertumbuhan dan laju pertumbuhan spesifik ikan patin ( <i>Pangasius djambal</i> ) setelah diberi perlakuan variasi ekstrak propolis ( <i>Trigona</i> sp.) selama 4 minggu. ....	80
Tabel 7.2.	Nilai rerata (Mean±SE) profil darah ikan patin ( <i>Pangasius djambal</i> ) setelah perlakuan variasi suplementasi propolis ( <i>trigona</i> sp.) Selama 4 minggu.....	81

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Status kesehatan ikan dan faktor lingkungannya.....	4
Gambar 1.2.	Komponen sistem pertahanan crustacea. ....	17
Gambar 1.3.	Diagram sistem pertahanan tubuh crustacea. ....	19
Gambar 2.1.	Rerata total leukosit fish yang diinjeksi, diberi pakan, dan imersi dengan <i>Boesenbergia pandurata</i> , <i>Solanum ferox</i> dan <i>Zingiber zerumbet</i> A) injeksi, B) oral, C) Imersi. ....	25
Gambar 3.1.	Jalur metabolisme selenium pada hewan.....	29
Gambar 3.2.	Diagram skematis proses produksi Sel-plex® .....	36
Gambar 4.1.	Kelulushidupan marron dengan pakan berbagai variasi suplementasi.....	44
Gambar 4.2.	Mean $\pm$ SE kelulushidupan marron diuji tantang dengan <i>Vibrio mimicus</i> . Beda huruf (a,b) mengindikasikan beda nyata untuk tiap waktu $P < 0.05$ (n = 18). Sumber:Sang (2010) .....	47
Gambar 5.1.	Pohon Ketapang.....	50
Gambar 5.2.	Kelulushidupan (%) ikan cupang ( <i>Betta</i> sp.) diimersi berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak ketapang selama 30 hari.....	56
Gambar 5.3.	Kelulusan hidup ikan cupang pasca uji tantang. ....	60
Gambar 6.1.	Aktivitas enzim pencernaan (Amylase, Protease, dan Lipase) <i>Pangasianodon Hypophthalmus</i> .....	73



## DAFTAR SINGKATAN

APC	=	Antigen Presenting Cell
AWG	=	Average weekly gain
C <sub>3</sub> b	=	Complement component complex b
CNCM	=	Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
COS	=	Chito-Oligosacharida
CpG-ODN	=	Cytidine phosphate guanosine-oligodeoxynucleotid
CRP	=	C-reactive protein
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
FE	=	Feed efficiency
FOS	=	Fructo-Oligosaccharide
GPx	=	Glutathione peroxidase
GST	=	Glutathione-S-transferase
Hb	=	Hemoglobin
Hct	=	Hematocrit
Ig	=	Immunoglobulin (IgA; IgD; IgE; IgM)
IL-2	=	Interleukin 2
INF $\gamma$	=	Interferon $\gamma$
MAF	=	Macrophage activating factors
MHC	=	Major histocompatibility complex
MOS	=	Mannan Oligosakarida
MR	=	Mannan Receptor
NK cell	=	Natural killer cell
NRRT	=	Neutral red retention time
PLT	=	Platelet/Keping darah.
PMN	=	Polimorfonuklear
RBC	=	Red Blood Cell/Sel darah merah
Sel B	=	Limfosit B
Sel T	=	Limfosit T
SE	=	Selenium
SGR	=	Specific growth rate
SOD	=	Superoxide Dismutase
Tc	=	Sel T sitotoksik
TCL	=	<i>Terminalia catappa</i> leaves (Daun ketapang)

Th-1 = Type 1 T helper  
THC = Total hemocyte  
TLR4 = Toll-like receptor 4  
WBC = White Blood Cell/Sel darah putih  
WSSV = White spot syndrome virus

## BAB 1

# SISTEM IMUN PADA HEWAN AKUATIK

### 1.1. Pengantar Sistem Pertahanan Tubuh

Sistem imun dikenal juga dengan sistem kekebalan, merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang berperan dalam tanggapan adanya invasi mikrobia yang akan/telah masuk ke dalam tubuh. Sistem imun juga merupakan mekanisme organisme dalam mempertahankan kondisi tubuh agar tetap homeostasis dan merupakan perlindungan terhadap potensi bahaya yang berasal dari lingkungan sekitar. Sistem imun dalam tubuh hewan akan bekerja karena adanya imunomodulator yang dibutuhkan dalam kondisi terdapat infeksi, misal karena bakteri, fungi, atau virus. Pada saat terjadi kontak dengan patogen dari luar, sistem imun mulai mendeteksi keberadaan patogen tersebut dan umumnya antigen pada tubuh akan mulai merespon dengan cepat.

Antigen mempunyai peranan dalam menstimulasi sistem imun tubuh. Melalui mekanisme stimulasi tersebut, antigen secara tidak langsung akan melindungi tubuh dari serangan berbagai patogen dari luar seperti bakteri, virus, jamur, dan berbagai kuman penyebab penyakit. Tubuh akan kehilangan daya tangkal terhadap patogen apabila sistem imun atau antigen tidak bekerja dengan baik dan optimal. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja optimal sistem imun diantaranya adalah: faktor lingkungan, makanan, gaya hidup sehari-hari, stres, umur dan hormon.

Fungsi sistem imun bagi tubuh dapat dibedakan menjadi tiga hal, yaitu: 1). Pertahanan tubuh untuk menangkal patogen dari luar atau benda asing lainnya yang akan masuk ke tubuh. 2) menjaga homeostasis fungsi tubuh terutama keseimbangan komponen yang sudah tua. 3) Sebagai penjaga dan pengawas (*Surveillance immune system*) serta menghancurkan sel-sel yang telah bermutasi dan bersifat ganas. Sistem imun dibedakan menjadi dua kelompok yaitu sistem imun nonspesifik dan spesifik. Sistem pertahanan diri sebagai

contoh pada ikan (terutama kelompok teleostei) terhadap patogen dapat berupa lendir, sisik, dan kulit. Organ-organ tersebut merupakan penghalang fisik agar patogen penyebab infeksi tidak masuk ke dalam tubuh. Sementara pertahanan berikutnya adalah pertahanan humoral dan sel-sel fagositik. Di bagian terluar, penghalang utama patogen penyebab infeksi adalah sisik dan kulit. Bagian sisik dan kulit melindungi ikan dari kemungkinan adanya luka, mencegah kuman masuk, dan sangat penting peranannya dalam mengendalikan osmolaritas tubuh. Jika terjadi kerusakan sisik atau kulit akan menyebabkan patogen mudah masuk ke tubuh dan menginfeksi insang. Selain kulit dan sisik, mukus juga mempunyai kemampuan untuk menahan masuknya patogen dengan cara menghambat kolonisasi mikrobia yang ada di kulit, insang maupun bagian mukosa. Adanya immunoglobulin yang ada di mukus juga menyebabkan mukus dapat menghancurkan mikrobia yang akan menginvasi ikan.

### **1.2. Sistem Pertahanan Tubuh Ikan**

Ikan mempunyai hubungan yang kuat dengan lingkungan sekitarnya, terpapar dengan sumber patogen serta penyebab penyakit seperti bakteri, virus maupun parasit lainnya yang mempunyai potensi untuk menimbulkan infeksi serta penyakit. Sebagai pertahanan diri ikan terhadap paparan lingkungan yang berpotensi menimbulkan penyakit dan infeksi, ikan mempunyai sistem pertahanan tubuh yang merespon adanya sumber penyakit yang akan masuk ke dalam tubuh. Sistem tersebut dinamakan sistem imun. Sistem imun pada ikan tersebut dapat dibedakan menjadi dua macam, berdasarkan sifat responnya, yaitu: sistem imun nonspesifik (alamiah) dan sistem imun spesifik (adaptif) .

Sistem imun nonspesifik bersifat alamiah dan merupakan pertahanan pertama tubuh ikan untuk menghadapi serangan penyakit atau patogen yang akan masuk ke dalam tubuh. Dikatakan non spesifik, karena tidak hanya merespon terhadap jenis patogen tertentu (tidak spesifik). Sistem imun ini sudah ada semenjak lahir/menetas, sehingga dikatakan alamiah. Sistem imun nonspesifik pada ikan contohnya adalah fisik (kulit, sisik, lendir), humoral

(lisozim, asam lambung, laktoferin, komplemen, interferon) serta selular (fagosit, sel NK).

Sementara itu, sistem imun spesifik merupakan pertahanan kedua dan bersifat spesifik, mengenali patogen atau sumber penyakit yang diartikan sebagai antigen. Dengan kata lain, sistem ini perlu waktu untuk mengenali antigen terlebih dahulu sebelum muncul respon. Respon yang timbul akan menginduksi munculnya memori spesifik antigen. Sistem imun spesifik merupakan mekanisme kerjasama dan interaksi antara fagosit dan limfosit. Munculnya respon spesifik berawal dari kerja sel-sel fagositik atau makrofag atau disebut juga *Antigen Presenting Cell* (APC). APC ini kemudian akan mengenalkannya pada sel-sel imun spesifik yaitu Sel T dan sel B.

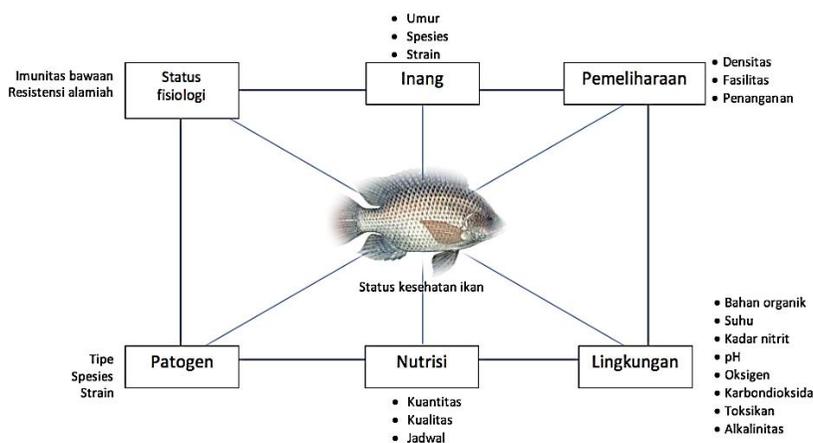
Sistem imun pada ikan akan mengenali dan memberikan tanggapan pada sebagian kecil molekul antigen yang dikenal dengan *antigenic determinant* atau *hapten*. Antigen tersebut akan berikatan dan dikenali secara spesifik dengan reseptor yang ada pada limfosit. Secara alamiah kedua sistem imun baik spesifik atau non spesifik akan saling mendukung dalam bekerja sebagai sistem pertahanan tubuh.

Semua vertebrata, termasuk ikan mempunyai respon imunitas seluler dan humoral, dan pusat organ yang bertanggung jawab serta terlibat dalam sistem imunitas pertahanan tubuhnya. Ikan dan juga mamal menunjukkan beberapa kesamaan dan perbedaan fungsi dari sistem pertahanan tubuh. Sistem pertahanan pada ikan umumnya mirip pada kelompok mamalia. Sistem pertahanan seluler pada ikan, teleostei yaitu sel-sel fagositosis yang mirip dengan makrofag, neutrofil, dan sel pembunuh alamiah (Natural killer cell/NK cell ) serta limfosit T dan B. Teleostei juga mempunyai sistem pertahanan humoral berupa sistem komplemen (Klasik dan jalur alternatif), lisozim, hemolisin natural, transferin, dan *C-reactive protein* (CRP). Adanya sitokin (seperti interferon, interleukin 2 (IL-2), *macrophage activating factors* (MAF) juga pernah dilaporkan ada pada telostei.

Namun demikian, morfologi sistem pertahanan tubuh pada ikan berbeda dengan mamal. Sangat jelas bahwa pada kenyataannya ikan tidak mempunyai sumsum tulang dan nodus limfatikus.

Bagian ginjal ikan akhirnya bertindak sebagai organ limfoid yang utama. Sebagai tambahan, timus serta limpa juga menunjukkan fungsi sebagai sistem pertahanan tubuh pada ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). Beberapa teleostei, seperti ikan-ikan pipih, contoh *Pleuronectes platessa*, menunjukkan adanya sistem limfatikus yang berbeda dengan sistem pembuluh darah, meskipun keberadaannya pada spesies lain masih dalam penelitian.

Untuk lebih memahami tentang sistem pertahanan tubuh ikan yang terkait dengan kesehatannya, perlu dipahami bahwa kesehatan ikan tergantung pada hubungan beberapa komponen utama sistem dalam tubuh ikan dengan lingkungan ikan (Gambar 1.1). Toleransi terhadap variasi faktor tergantung kepada praktek-praktek pemeliharaan. Lingkungan mungkin merupakan faktor kritis terhadap kesehatan ikan karena kualitas lingkungan berpengaruh pada kesehatan fisiologi ikan, spesies yang dikultur, pemberian makanan, laju pertumbuhan, dan kemampuan memelihara resistensi dan imunitas alamiah dan perolehan. Secara keseluruhan, status fisiologi ikan ditentukan oleh praktek-praktek pemeliharaan, kualitas lingkungan, kelayakan nutrisi ikan, adanya patogen, yang kesemuanya itu berpengaruh terhadap imunitas alamiah dan perolehan dari ikan. Suatu hal yang umum bahwa ikan yang stress oleh karena salah satu faktor tersebut menjadi lebih mudah terkena infeksi.



Gambar 1.1. Status kesehatan ikan dan faktor lingkungannya

### 1.3. Komponen Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

#### Komponen Sel dan Jaringan

Tipe organ imunitas sangat bervariasi antar ikan satu dengan yang lainnya. Pada ikan tidak berahang seperti hagfishes dan lampreys, organ limfoid yang sesungguhnya tidak ada. Namun demikian, ikan tersebut bergantung pada daerah jaringan limfoid organ lain yang menghasilkan sel-sel imunitas. Sementara itu, perbedaan genetik mungkin sangat kecil dan beberapa molekul serta komponen selular mempunyai kemiripan, organisasi anatomi dan fungsinya seperti struktur dan bentuk sistem imunitas. Sistem imunitas ikan mempunyai respon imun selular dan humoral, dan organ-organ yang fungsi utamanya terlibat dalam pertahanan imunitas. Sebagian besar organ limfoid sekunder dan generatif ada ditemukan di mamalia dan juga ditemukan pada ikan, kecuali nodus limfatikus dan sumsum tulang. Namun, bagian anterior ginjal yang biasa disebut kepala ginjal, aglomerular, diasumsikan berfungsi hematopoietik dan tidak seperti pada vertebrata tingkat tinggi yang merupakan organ imunitas utama yang bertanggung jawab untuk fagositosis, aktivitas proses antigen dan pembentukan IgM dan memori imunitas melalui pusat melanomakrofagia. Hal penting dari organ dan jaringan imunokompeten ikan termasuk ginjal (anterior/caput dan posterior/ caudal), timus, limpa, liver, dan mukosa yang berasosiasi dengan jaringan limfoid. Pada ikan, myelopoiesis pada umumnya terjadi pada caput ginjal dan atau limpa, sementara timus, ginjal dan limpa merupakan organ utama limfoid. Sementara timus sebagai organ caput ginjal penghasil sel T utama dipertimbangkan juga sebagai organ sel B. Demikian pula caput ginjal dan limpa yang menghasilkan agregat makrofag, juga dikenal sebagai pusat melanomakrofag.

#### Sistem Imun Non Spesifik

Sistem imun nonspesifik dikenal juga dengan sistem imun alamiah atau sistem imun bawaan (innate). Sistem imun nonspesifik berfungsi sebagai sistem pertahanan awal tubuh dalam menahan masuknya patogen ke dalam tubuh organisme. Sistem pertahanan imun nonspesifik ini memberikan respon langsung terhadap patogen

(antigen). Respons tersebut sudah ada di dalam tubuh organisme meskipun sebelumnya belum pernah terpapar antigen atau patogen. Sistem pertahanan ini terdiri atas pertahanan fisik atau mekanik, biokimiawi, humoral, serta seluler.

Sistem pertahanan fisik atau mekanik meliputi: kulit, selaput lendir, silia saluran napas, batuk dan bersin, berfungsi untuk menghambat atau mencegah masuknya patogen ke dalam tubuh organisme. Sistem pertahanan ini terjadi karena adanya asam laktat dan asam lemak yang ada di keringat oleh sekresi kelenjar sebaceous. Asam laktat dan asam lemak akan menghambat patogen yang akan menyerang tubuh organisme. Di samping itu keringat juga bersifat sebagai antimikrobal karena pH yang asam dari keringat dan mengurangi efek infeksi.

Sementara pertahanan biokimia difasilitasi dengan adanya sekresi mukosa pada saluran respirasi serta saluran pendengaran. Adanya lisosim dalam keringat, saliva, air mata, serta air susu merupakan pertahanan biokimiawi terhadap patogen seperti bakteri Gram positif. Dinding bakteri Gram positif yang mengandung peptidoglikan dapat dipecah oleh adanya lisozim. Selain lisozim, air susu ibu mempunyai kandungan laktoferin dan asam neuraminat yang bersifat antibakterial terhadap bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus*. Senyawa biokimiawi lain yaitu asam lambung, enzim-enzim pencernaan, serta empedu di intestinum terutama di usus halus berperan menghancurkan organisme yang masuk ke tubuh sehingga infeksi dapat dicegah. Adanya senyawa spermin (Di dalam semen) dan rendahnya pH di saluran reproduksi wanita (Vagina) juga bermanfaat untuk berkembangnya beberapa mikroorganisme.

### **Pertahanan Humoral**

Respon imun spesifik muncul akibat adanya antigen tertentu dan respon imun spesifik adalah respon imun yang didapat atau dikenal dengan *acquired immunity*. Adanya antigen tertentu tertentu tersebut akan mengaktifasi limfosit dan memicu produksi antibodi. Antibodi yang diproduksi akan bereaksi dengan antigen dan akan dieliminasi. Sementara, limfosit yang bekerja pada respon imun

spesifik terdiri dari dua tipe, yaitu sel T dan sel B. Berbagai bahan dalam sirkulasi berperan pada pertahanan humoral, yaitu komplemen, interferon, dan *C-Reactive protein* (CRP). Komplemen merupakan molekul dari sistem imun nonspesifik yang ditemukan di sirkulasi dalam keadaan tidak aktif, tetapi setiap waktu dapat diaktifkan oleh berbagai bahan seperti antigen. Komplemen berperan meningkatkan fagositosis dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit karena komplemen dapat menghancurkan sel membran banyak bakteri, melepaskan bahan kemotaktik yang dapat melepaskan makrofag ke tempat bakteri dan komponen komplemen lain dapat mengendap pada permukaan bakteri sehingga memudahkan makrofag untuk mengenal dan memakannya.

Interferon (IFN) adalah suatu glikoprotein yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh yang mengandung nukleus dan dilepas sebagai respon terhadap infeksi virus. Interferon mempunyai sifat antivirus dengan jalan menginduksi sel yang berada disekitar sel yang terinfeksi virus sehingga menjadi resisten terhadap virus, selian itu interferon juga dapat mengaktifkan sel Natural Killer (sel NK). Sel yang diinfeksi virus akan menjadi ganas dan menunjukkan perubahan pada permukaannya. Perubahan tersebut akan dikenal oleh sel NK yang kemudian membunuhnya sehingga penyebaran virus dapat dicegah. Sekarang diketahui bahwa IFN adalah salah satu molekul tergolong sitokin.

CRP merupakan salah satu contoh dari protein fase akut, yaitu berbagai protein yang kadarnya dalam darah meningkat pada infeksi akut. CRP mengikat 100 x atau lebih dan berperan pada imunitas nonspesifik yang dengan bantuan  $Ca^{2+}$  dapat mengikat berbagai molekul antara lain fosforikolin yang ditemukan pada permukaan bakteri atau jamur, kemudian akan mengikat komplemen.

### **Pertahanan Seluler**

Respon imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (innate immunity) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut. Komponen-komponen utama sistem imun

nonspesifik adalah pertahanan fisik dan kimiawi, misalnya kulit atau substansi antimikroba yang diproduksi oleh kulit; berbagai jenis protein dalam darah termasuk diantaranya komponen-komponen sistem komplemen, mediator inflamasi dan sel-sel fagosit yaitu sel-sel polimorfonuklear, makrofag serta sel natural killer (NK). Fagosit, makrofag, sel NK, dan reaksi inflamasi berperan dalam sistem imun nonspesifik seluler.

1. Fagosit

Kemampuan fagositosis dimiliki oleh beberapa sel dalam tubuh, akan tetapi mononuklear merupakan sel utama yang melakukan fagositosis dan merupakan bagian dari sistem imun nonspesifik. Mononuklear berupa monosit dan makrofag merupakan sistem imun yang aktif menghadapi adanya infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, parasit intraseluler dan sel-sel yang bersifat polimorfonuklear dan juga granulosit yang juga membantu pertahanan terhadap bakteri. Kedua sel berasal dari sel asal hemopoietik, yaitu awalnya sel berkembang menjadi 2 jenis progenitor yaitu limfoid dan mieloid. Progenitor limfoid akan berdiferensiasi menjadi sel limfosit T (sel T) dan sel limfosit B (sel B). Progenitor mieloid berdiferensiasi menjadi sel-sel monosit, mastosit atau basofil, granulosit dan megakariosit.

Proses kerja dari sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran kuman terjadi dalam beberapa tingkat yaitu kemotaksis, menangkap, memakan (fagositosis), membunuh dan mencerna. Kemotaksis adalah gerakan fagosit ke tempat infeksi sebagai respon terhadap berbagai faktor seperti produk bakteri dan faktor biokimiawi yang lepas pada aktivasi komplemen. Jaringan yang rusak atau mati juga dapat melepaskan faktor kemotaktik. Sel polimorfonuklear bergerak cepat dan sudah berada di tempat infeksi dalam 2 sampai 4 jam, sedangkan monosit bergerak lebih lambat dan memerlukan 7 sampai 8 jam ke tempat tujuan. Proses destruksi mikroorganisme dapat terjadi karena didalam selfagosit terkandung berbagai bahan antimikrobal seperti lisosom, hidrogen peroksida dan mieloperoksidase. Tahap terakhir fagositosis adalah pencernaan protein, polisakarida, lipid, dan asam nukleat di dalam sel oleh enzim lisosim. Antibodi dan komplemen

dapat meningkatkan fagositosis (opsonisasi). Antigen yang diikat antibodi akan lebih mudah dikenal oleh fagosit untuk kemudian dihancurkan. Hal ini dikarenakan fagosit mempunyai reseptor terhadap ujung karboksil molekul antibodi (reseptor Fc), sedangkan pada komplemen mempunyai reseptor terhadap fragmen komplemen C3b (reseptor C3b).

## 2. Makrofag

Makrofag mempunyai kemampuan untuk hidup lama dan mengandung beberapa granul serta dapat melepaskan berbagai bahan, antara lain lisozim, komplemen, interferon dan sitokin yang berperan dalam pertahanan nonspesifik dan spesifik.

## 3. Sel pembunuh alamiah (Natural Killer, NK)

Sel ini berasal dari limfoid dalam sumsum tulang. Sel ini mampu mengenali sel-sel tumor tertentu dan perubahan pada permukaan sel yang terinfeksi virus untuk kemudian melisisnya. Sel ini secara morfologis merupakan limfosit granular besar meliputi 15% limfosit dalam darah.

## 4. Reaksi inflamasi

Manifestasi respon imun nonspesifik lainnya adalah reaksi inflamasi. Sel-sel sistem imun tersebar di seluruh tubuh, tetapi bila terjadi infeksi di suatu tempat perlu upaya memusatkan sel-sel sistem imun itu dan produk-produk yang dihasilkannya ke lokasi infeksi. Reaksi inflamasi adalah reaksi tubuh terhadap invasi agen infeksi, antigen lain atau kerusakan jaringan. Selama proses ini berlangsung, terjadi 3 proses penting, yaitu peningkatan aliran darah di area infeksi, peningkatan permeabilitas kapiler akibat retraksi sel-sel endotel yang mengakibatkan molekul-molekul besar (antibodi dan komplemen) dapat menembus dinding vaskular untuk mencapai lokasi inflamasi dan migrasi leukosit ke luar vaskuler. Reaksi ini dapat terjadi akibat dilepaskannya mediator-mediator tertentu oleh beberapa jenis sel misalnya histamin yang dilepaskan oleh basofil dan mastosit, amin vasoaktif yang dilepaskan oleh trombosit, serta anafilaktoksin berasal dari komponen komplemen yang merangsang

pelepasan mediator-mediator oleh mastosit dan basofil sebagai reaksi umpan balik. Mediator-mediator ini antara lain merangsang Bergeraknya sel-sel polimorfonuklear (PMN) menuju lokasi masuknya antigen serta meningkatkan permeabilitas dinding vaskular yang mengakibatkan eksudasi protein plasma dan cairan.

### **Sistem Imun Spesifik**

Sistem imun spesifik atau dikenal dengan sistem imun didapat atau adaptif, muncul karena adanya antigen tertentu pada tubuh yang pernah terpapar sebelumnya. Antigen atau material asing pertama-tama akan segera dikenal oleh sistem imun spesifik dan menyebabkan sensitivitas sel-sel sistem imun tersebut. Apabila terjadi paparan antigen asing yang sama kedua kalinya atau seterusnya sama maka benda asing yang terakhir ini akan dikenal lebih cepat oleh sistem imun spesifik, sehingga dengan cepat akan dihancurkan. Disebut sistem imun spesifik karena sistem pertahanan ini dapat menghancurkan antigen asing yang sebelumnya telah dikenali. Sistem imun spesifik dibedakan menjadi sistem imun spesifik humoral dan sistem imun spesifik seluler. Sistem imun humoral difasilitasi oleh limfosit B dan sistem imun seluler difasilitasi oleh limfosit T.

Sistem imun spesifik humoral dikenal dengan nama lain imunitas sel-B. Limfosit B atau sel B dalam hal ini berperan sangat penting dalam sistem imun spesifik humoral. Sistem ini membentuk antibodi yang bersirkulasi yaitu molekul globulin yang mampu menyerang agen penginfeksi dalam darah. Antibodi merupakan protein dan disebut globulin yang sekarang dikenal dengan immunoglobulin. Immunoglobulin (Ig) dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen.

Setiap sel B mempunyai reseptor permukaan (IgM atau IgD) yang dapat bereaksi terhadap satu antigen atau kelompok antigen yang serupa. Suatu antigen akan berinteraksi dengan limfosit B yang mempunyai reseptor permukaan yang paling sesuai. Setelah berikatan dengan antigen sel B akan terstimulasi untuk berproliferasi dan membentuk klon sel. Sel-sel B yang terpilih ini akan segera

berubah menjadi sel plasma dan mensekresi antibodi yang spesifik terhadap antigen.

Antibodi mempunyai fungsi utama sebagai sistem pertahanan tubuh terhadap adanya infeksi yang berasal dari luar sel (Ekstraseluler) misal virus dan bakteri serta berperan dalam menetralkan toksinnya. Cara kerja antibodi berlangsung melalui dua cara yaitu: secara langsung menyerang penyebab penyakit tersebut dan kemudian mengaktifkan sistem komplemen serta merusak sumber bibit penyakit tersebut. Secara struktur Kimiawi, antibodi termasuk dalam glikoprotein yang tersusun dari 4 rantai polipeptida dasar, 2 rantai berat (heavy H, berat molekul 50.000-77.000) dan 2 rantai ringan (light L, berat molekul 25.000) yang identik dan keduanya dihubungkan dengan ikatan disulfida kovalen. Antibodi atau juga disebut dengan Immunoglobulin dapat dibedakan lagi menjadi 5 jenis yaitu IgG, IgM, IgA, IgD, dan IgE.

1. Immunoglobulin G (IgG)

IgG adalah imunoglobulin utama pada serum manusia karena kadarnya antara 70-75% dari semua imunoglobulin. IgG ditemukan dalam berbagai cairan antara lain cairan serebrospinal dan urin. IgG adalah satu-satunya antibodi yang dapat melewati plasenta dan masuk ke fetus serta berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9 bulan. IgG dan komplemen bekerja sama sebagai opsonin pada pemusnahan antigen. Opsonisasi adalah proses melapisi partikel antigen oleh antibodi dan atau oleh komponen komplemen sehingga lebih mudah dan cepat dimakan fagosit. IgG dapat mengopsonisasi karena sel-sel fagosit yaitu monosit dan makrofag mempunyai reseptor untuk fraksi Fc dari IgG sehingga dapat mempererat hubungan antara sel fagosit dengan sel sasaran.

2. Immunoglobulin M (IgM)

IgM adalah antibodi pertama yang dibentuk dalam respon imun. Nama M berasal dari makroglobulin karena merupakan imunoglobulin terbesar. IgM mempunyai rumus bangun pentamer yang terdiri dari 5 unit  $H_2L_2$  yang diikat oleh rantai J (joining, penghubung) pada fraksi Fc. Sel B umumnya mengandung IgM pada permukaannya sebagai reseptor antigen. IgM dibentuk lebih dahulu

pada respon imun primer dibandingkan dengan IgG, karena itu kadar IgM yang tinggi merupakan petunjuk adanya infeksi dini. Bayi yang baru dilahirkan hanya mempunyai IgM 10% dari kadar IgM dewasa, karena IgM ibu tidak dapat menembus plasenta. Fetus umur 12 minggu sudah mulai membentuk IgM bila sel B-nya dirangsang oleh infeksi tertentu seperti sifilis kongenital, rubella, toksoplasmosis dan virus sitomegalo. Kadar IgM anak akan mencapai kadar IgM dewasa pada usia satu tahun. IgM dapat mencegah gerakan mikroorganisme patogen, memudahkan fagositosis, dan merupakan aglutinator kuat terhadap antigen. IgM juga merupakan antibodi yang dapat mengaktifkan komplemen dengan kuat.

### 3. Imunoglobulin A (IgA)

IgA ditemukan dengan jumlah sedikit dalam serum tetapi kadarnya dalam cairan sekresi saluran napas, saluran cerna, saluran kemih, air mata, keringat, ludah dan air susu lebih tinggi dalam bentuk IgA sekretori (sIgA). IgA dalam serum dan dalam sekresi dapat menetralkan toksin atau virus dan mencegah terjadinya kontak antara toksin atau virus dengan sel sasaran seperti pada membrane mukosa. IgA dalam serum dapat mengaglutinasi dan mengganggu motilitas kuman sehingga memudahkan fagositosis. IgA dapat juga meningkatkan fungsi sel polimorfonuklear (opsonisasi) oleh karena sel tersebut memiliki reseptor untuk Fc dari IgA. IgA dapat mencegah kontak antara mikroorganisme dengan selaput lendir, sehingga mikroorganisme tidak akan dapat menembus dan berkembang biak dalam tubuh. IgA juga dapat menetralkan toksin dan meninggikan efek bakteriolitik dengan cara mengaktifkan komplemen.

### 4. Imunoglobulin D (IgD)

IgD ditemukan dengan kadar yang sangat rendah dalam sirkulasi karena IgD tidak dilepas oleh sel plasma dan sangat rentan terhadap degradasi pada proses proteolitik. IgD berfungsi sebagai reseptor antigen karena ditemukan bersama IgM pada permukaan sel B, selain itu merupakan penanda dari diferensiasi sel B yang lebih matang. IgD diduga dapat mencegah terjadinya toleransi imun

apabila sel terpajan oleh antigen, tetapi mekanismenya belum dapat dijelaskan.

#### 5. Immunoglobulin E (IgE)

IgE mudah berikatan dengan permukaan sel mast, basofil dan eosinofil yang pada permukaanya memiliki reseptor untuk fraksi Fc dari IgE. IgE yang terikat berfungsi sebagai reseptor antigen (alergen) dan kompleks antigen-antibodinya memicu terjadinya respon alergi melalui pelepasan mediator. Jumlah IgE pada serum normal sangat sedikit kurang lebih 0,004% tetapi jumlahnya dapat meningkat pada penderita reaksi alergi. Kadar IgE yang tinggi juga dapat ditemukan saat penderita terinfeksi cacing, skistosomiasis, dan diduga berperan pada imunitas parasit. Perlindungan terhadap invasi parasit seperti cacing karena dilepaskannya berbagai granul eosinofil yang toksik untuk parasit.

### **Sistem Imun Spesifik Seluler**

Pada sistem imun spesifik seluler yang berperan adalah limfosit T atau sel T. Limfosit T dibentuk di dalam sumsum tulang tetapi berproliferasi dan berdiferensiasi di dalam kelenjar timus sebelum berpindah ke jaringan perifer. Secara umum sel T mempunyai 2 fungsi penting yaitu sebagai regulator dan efektor. Fungsi regulasi dilakukan oleh sel T helper (sel Th) yang akan mengenali mikroorganisme atau antigen yang terdapat pada sel makrofag atau sel yang terinfeksi melalui reseptor T cell receptor (TCR) dan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas-II. Sinyal yang diterima dari sel terinfeksi ini akan menginduksi limfosit untuk memproduksi berbagai jenis limfokin, termasuk diantaranya interferon yang dapat membantu makrofag menghancurkan mikroorganisme tersebut.

Fungsi efektor dilakukan oleh sel T sitotoksik (Tc) yang berfungsi untuk membunuh sel-sel yang terinfeksi virus atau mikroorganisme intraseluler melalui atau bersama-sama dengan MHC kelas I dengan cara kontak langsung antar sel. Sel T sitotoksik juga menghasilkan  $\gamma$ -interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke sel-sel yang lain. Fungsi efektor juga menjadi

mediator reaksi hipersensitivitas tipe lambat terhadap antigen tertentu dan sensitivitas kontak pada kulit terhadap zat-zat kimia biasa.

#### **1.4. Faktor-faktor yang Berpengaruh terhadap Imunitas Ikan**

Respon imunitas pada tubuh ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: suhu, stress, nutrisi, senyawa pencemar atau polutan, mikronutrien, serta adanya senyawa immunomodulator.

##### **1. Faktor suhu**

Ikan digolongkan dalam kelompok poikilotermik, artinya bahwa proses fisiologi yang terjadi pada tubuh ikan berkaitan erat dengan suhu disekitarnya atau lingkungannya. Pada umumnya pengaturan sistem pertahanan tubuh pada ikan sangatlah bergantung kepada suhu lingkungan atau disebut *temperature-dependent*, Ikan akan dapat tumbuh dan berkembang lebih cepat pada suhu lingkungan yang optimal. Apabila suhu lingkungan lebih dingin, maka suhu menjadi faktor pembatas metabolisme tubuh ikan dan akan melemahkan induksi pertahanan tubuhnya. Beberapa hasil riset telah membuktikan bahwa respon imunitas tubuh ikan berlangsung relatif lebih lambat pada suhu rendah. Sebaliknya jika suhu lingkungan lebih tinggi, maka akan berdampak pada kekebalan tubuh yaitu terjadi penurunan imunitas tubuh ikan.

Suhu lingkungan sangat terkait dengan reaksi antigen-antibodi yang berawal dari kerjasama selular atau *cellular co-operation* sel makrofag bersama dengan sel limfosit. Sel limfosit akan bekerja dengan baik tergantung kepada adaptasi homoviscous pada lapisan lipid membran sel. Lapisan lipid membran sel yang terdiri atas asam lemak beserta suhu lingkungan menjadi faktor yang mempengaruhi tingkat fluiditas dan permeabilitas membran sel dan aktivitas antara enzim-enzim yang berhubungan erat dengan reseptornya di membran sel.

##### **2. Stres**

Kondisi stres berpengaruh negatif terhadap kondisi tubuh ikan. Kondisi stres dapat terjadi karena faktor biologis, kimiawi dan/atau fisik. Jika terjadi stres maka akan diikuti dengan turunnya

kandungan limfosit dalam darah ikan serta di dalam organ-organ limfoidnya. Kondisi stres dalam tubuh ikan juga akan memicu peningkatan kadar gula dalam darah yang disebabkan oleh naiknya adrenalin. Naiknya kadar gula akibat katabolisme glikogen di hati, untuk ketersediaan energi jika sewaktu-waktu dibutuhkan. Kondisi lain adalah terjadinya kekacauan dalam osmoregulasi karena adanya perubahan metabolisme mineral dalam tubuh. Ikan, terutama air tawar, dalam kondisi stres pada umumnya akan mengabsorpsi air dari lingkungan sekitar atau disebut kondisi *over-hydrate*. Sementara itu, jenis ikan air laut pada umumnya lebih kehilangan air dari dalam tubuh atau disebut kondisi *dehydrate*. Dengan adanya kondisi stress tersebut di atas maka diperlukan ekstra energi agar keseimbangan osmoregulasi tetap terjaga. Kondisi stres pada ikan juga akan menyebabkan laju pernafasan dan tekanan darah meningkat, persediaan sel darah merah akan dibebaskan ke sistem sirkulasi darah, serta respon inflamasi akan mengalami penurunan oleh karena adanya tekanan dari hormon dari kelenjar adrenalin.

### 3. Polutan

Adanya polutan yang masuk ke lingkungan air bahkan juga logam berat akan sangat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh ikan. Akibat yang ditimbulkan dengan masuknya polutan tersebut sangatlah variatif, tergantung kepada jenis (kualitas) dan kuantitas dari polutan atau bahan pencemar. Tidak hanya logam berat, senyawa obat-obatan, bahan kimia serta antibiotik dapat menjadi polutan dan bersifat *immunosuppressive*. Contoh bahan pencemar lain seperti pestisida, insektisida, limbah industri, limbah rumah tangga dalam ambang yang melampaui daya tahan ikan dapat mengakibatkan ikan sakit dengan berbagai kondisi dan bahkan kematian. Bahan pencemar logam berat yang mempunyai toksisitas tinggi pada ikan seperti Hg, Cd, Cu, Zn, Ni, Pb, Cr, Al dan Co. Tingkat toksisitas logam berat tersebut pada ikan akan meningkat apabila komposisi ion-ion di dalam air terdiri dari jenis-jenis ion yang sinergistik. Sebaliknya, tingkat toksisitas akan melemah apabila kandungan ion-ion tersebut bersifat antagonistik. Sementara itu tingkat kelarutan ion-ion logam dipengaruhi oleh pH air, umumnya tingkat kelarutan

dan aktivitas ion logam akan meningkat jika pH air rendah. Dampak yang ditimbulkan dari sifat toksik logam berat (Misal Hg) diantaranya menyerang sistem saraf pada ikan serta unsur Cd yang bersifat cyto-toksikan terhadap bagian insang ikan. Terjadinya kontaminasi ringan unsur logam berat di lingkungan perairan akan mengalami akumulasi di induk ikan dan dikonsentrasikan dalam minyak yang tersimpan dalam telur-telur. Dampak selanjutnya akan menyebabkan kematian telur-telur yang berkembang dan akhirnya tidak dapat menjadi larva.

#### **4. Nutrisi dan mikronutrien**

Faktor nutrisi yang terkandung di dalam pakan ikan, baik secara kualitas dan kuantitas harus sesuai dengan kebutuhan optimal ikan agar dapat mengoptimalkan sistem kekebalan tubuh ikan dan pertumbuhan ikan. Selain kualitas dan kuantitas nutrisi dalam pakan, unsur mikronutrien juga perlu diperhatikan. Mikronutrien yang berperan sebagai antioksidan, seperti vitamin C dan E vitamin E (a-tocopherol) serta unsur imunostimulan lainnya seperti Glukan, Lipopolisakarida, telah terbukti dapat mengoptimalkan imunitas ikan yaitu sistem pertahanan nonspesifik (cellular immunity). Unsur-unsur imunostimulan tersebut berpotensi sebagai immunomodulator bagi sistem pertahanan tubuh ikan dalam dosis yang tepat dan berkesinambungan. Keberadaan unsur karotin pakan ikan juga pengaruh nyata terhadap status kesehatan ikan, terutama pada ikan-ikan berpigmen.

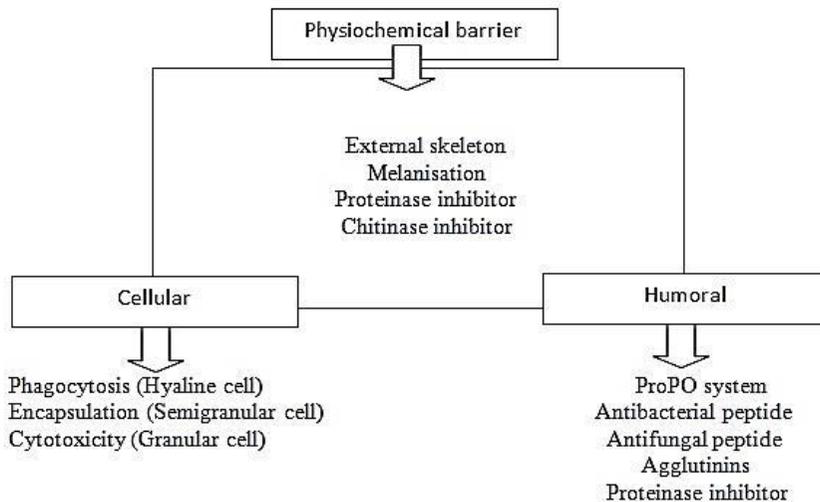
#### **5. Immunomodulators**

Suatu unsur yang dicampur dengan antigen dalam vaksinasi dan meningkatkan efektivitas vaksin (meningkatkan level respon kekebalan spesifik) disebut sebagai Adjuvant. Adjuvant juga dapat memicu produksi sel-sel fungsional yang terkait dengan sistem kekebalan nonspesifik. Unsur adjuvant merupakan materi yang memperlambat proses pelepasan antigen, dengan demikian antigen akan berikatan lebih lama dengan sel makrofag dan limfosit. Makin lama ikatan maka meningkatkan kualitas respon kekebalan spesifik (antibodi) yang dihasilkannya. Beberapa unsur immunostimulator

seperti vitamin C dan E vitamin E (a-tocopherol) dan unsur imunostimulan lainnya seperti Glukan, Lipopolisakarida, muramil peptida, lipopolisakarida dapat digunakan sebagai immunomodulator dalam sistem pertahanan nonspesifik.

### 1.5. Sistem Pertahanan Tubuh Crustaceae

Sistem imunitas crustacea tergantung pada sifat fisio-kimia, humoral dan sistem selular (Gambar 1.2). Fisio-kimiawi merupakan mekanisme pertama sistem imunitas untuk melindungi crustacea dari serangan patogen. Mekanisme pertahanan kedua adalah humoral dan selular yang bertindak jika patogen berhasil masuk ke dalam rongga tubuh dari crustacea.



Gambar 1.2. Komponen sistem pertahanan crustacea.  
Sumber: Soderhall and Soderhall (2002).

Pada mekanisme pertahanan selular dan humoral, hemosit memainkan peranan penting pada sistem imunitas. Fagositosis, enkapsulasi, pembentukan nodul, dan mediasi sitotoksik merupakan fungsi penting dari hemosit yang akan mensekresikan protein mikrobisidal yang mampu membunuh patogen. Normalnya hemosit dihasilkan dari Jaringan hematopoetik yang berada di bagian dorsal anterior thorak dan bagian atas lambung kardia atau jantung. Pada dasarnya ada tiga tipe hemosit yang dapat dibedakan berdasarkan

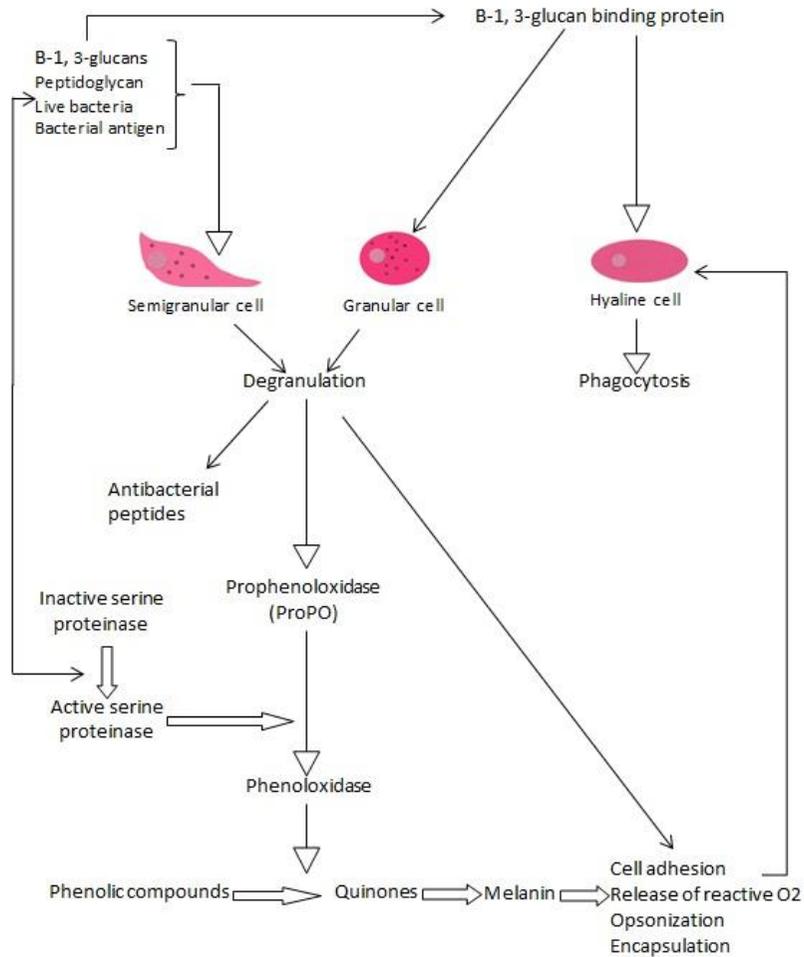
morfologi dan fungsi biologinya (Tabel 1.1 and Gambar 1.3). Fungsi morfologi hemosit didasarkan pada bentuk, nukleus, retikulum endoplasma, ribosom bebas, Golgi, granula, lisosom, dan mitokondria. Hemosit yang berbeda terlibat dalam fungsi biologi yang berbeda pula. Ada tiga jenis hemosit yang dapat diidentifikasi sebagai granulosit, semigranulosit dan hyalinosit.

Tabel 1.1. Tiga macam tipe haemocyte pada crustacea

Kriteria	Semigranulosit	Granulosit	Hyalinosit
Shape	oval atau spindle	oval	round atau oval
Nucleus	pusat atau eccentric, oval, berlobus	eccentric, kidney shape	pusat, round, besar
Retikulum endoplasma	halus, melimpah	halus, moderat	Halus kasar, jarang
Ribosom bebas	melimpah	moderat	ada
Golgi	1 atau lebih	0 atau 1	0 atau 1
Granula	moderat	melimpah	0 atau beberapa
Lysosom	ada	ada	-
Mitokondria	melimpah	melimpah	moderat

Granulosit mempunyai fungsi spesifik untuk pertahanan seperti fungsi fagositosis terhadap bakteri dan partikel-partikel kecil lainnya, mekanisme enkapsulasi terhadap parasit metazoa, sistem pembekuan hemolymph jika distimulasi oleh masuknya mikrobia dan sistem aktivasi propenoloksidase. Semigranulosit juga berpartisipasi dalam aktivitas fagositosis, khususnya dalam mekanisme enkapsulasi dan sistem aktivasi propenoloksidase (proPO). Selain berkontribusi dalam pembentukan dan pengerasan kutikula saat moulting, sel hyaline mempunyai aktivitas dalam mekanisme pembekuan hemolymph dan juga mengeksekusi beberapa aktivitas fagositosis namun tidak menunjukkan aktivitas proPO di sel jenis ini. Kualitas dan kuantitas granular, semigranular dan sel hyaline dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi *trace*, untuk meningkatkan imunitas crustacea dan lebih lanjut akan menambah resistensi terhadap penyakit. Nutrisi *trace* seperti selenium pada diet atau pakan telah dinyatakan sebagai nutrient

*trace* atau element mikro yang bermanfaat untuk memacu imun sistem pada crustacea.



Gambar 1.3. Diagram sistem pertahanan tubuh crustacea.  
 Sumber: Smith et al. (2003).



## BAB 2

### BAHAN HAYATI IMUNOSTIMULAN

#### 2.1. Imunostimulan

Imunostimulan merupakan senyawa yang dapat digunakan untuk meningkatkan sistem pertahanan spesifik dan non spesifik pada tubuh hewan. Senyawa ini juga menyebabkan adanya induksi sistem pertahanan seluler dan humoral. Imunostimulan dapat berasal dari bahan yang dapat memicu resistensi organisme terhadap adanya infeksi patogen. Dengan penambahan bahan imunostimulan, maka sistem imun nonspesifik dapat diaktifkan, yaitu makrofag pada vertebrata dan haemosit pada avertebrata. Selain meningkatkan aktivitas makrofag, imunostimulan juga memicu adanya reaksi komplemen, pengaktifan fagosit, limfosit, dan non spesifik sel sitotoksik, sehingga terjadi perlawanan dan perlindungan dari tubuh organisme yang mendapat imunostimulan terhadap berbagai penyakit.

Sumber imunostimulan diantaranya berasal dari bahan alam. Bahan alam dapat menjadi agensia imunostimulan dengan mempertimbangkan beberapa aspek yaitu: penggunaannya efektif serta bersifat ramah lingkungan dan tidak memiliki efek samping serta dapat memberikan berbagai perlindungan, dapat meningkatkan sistem pertahanan terhadap berbagai penyakit. Beberapa jenis imunostimulan yang sering digunakan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh dari hewan-hewan akuatik yaitu Organik selenium, Mannan oligosakarida (MOS),  $\beta$ -Glucan, Chito-Oligosakarida (COS), herbal mix dan DNA sintetik. Agensia terakhir yang disebut yaitu DNA sintetik merupakan agensia yang paling efektif dalam meningkatkan respon imun pada mamalia, ikan dan udang. DNA sintetik tersebut merupakan nukleotida spesifik dikenal sebagai motif *unmethylated cystidine phosphate guanosine-oligodeoxynucleotid* (CpG-ODN).

## 2.2. Hubungan Imunostimulan dengan Sistem Imunitas

Telah dijabarkan sebelumnya bahwa imunostimulan merupakan senyawa khusus yang mampu memicu sistem pertahanan tubuh secara non spesifik (*innate immunity*) dan spesifik (*adaptive immunity*). Peningkatan pertahanan tersebut diikuti dengan induksi spesifik melalui mekanisme pertahanan seluler dan humoral. Suplementasi imunostimulan sebenarnya dimaksudkan untuk tindakan pencegahan yaitu melalui peningkatan sistem pertahanan tubuh, mereduksi dan mengeliminasi patogen atau senyawa asing yang menginvasi kedalam tubuh dan berpotensi menimbulkan penyakit.

Imunostimulan bekerja dengan cara menginduksi sistem imunitas atau pertahanan non spesifik dan spesifik. Sistem pertahanan non spesifik terhadap benda asing atau antigen ini dikenal dengan istilah paramunitas dan zat berhubungan dengan penginduksi disebut induktor paramunitas. Jenis induktor ini pada umumnya jumlahnya sedikit atau bahkan tidak ada bekerja pada antigen, namun kerjanya dapat sebagai mitogen.

Mitogen berperan dalam meningkatkan proliferasi sel yang berfungsi pada imunitas. Sel sasaran dari imunostimulan adalah sel-sel makrofag, granulosit, limfosit T dan B. Sementara itu, induktor paramunitas bekerja dengan cara menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Mitogen mempunyai dua mekanisme kerja yaitu bekerja langsung maupun tak langsung. Kerja mitogen diantaranya melalui sistem komplemen atau limfosit, melalui produksi interferon atau enzim lisosomal) dengan tujuan meningkatkan aktivitas fagositosis mikro dan makro. Baik mekanisme pertahanan spesifik maupun non spesifik bekerja saling berpengaruh dan saling menguatkan .

Penelitian-penelitian mengenai imunostimulan terus dikaji, terutama di bidang akuakultur yaitu peningkatan imunitas pada ikan dengan menggunakan agensia bahan alam imunostimulan, termasuk didalamnya aspek pengembangan dan pemanfaatan lebih lanjut. Dari hasil berbagai penelitian yang telah dilakukan, hasilnya menunjukkan signifikansi positif bahwa imunostimulan dari bahan alam mampu meningkatkan ketahanan ikan terhadap patogen dan

pada akhirnya meningkatkan kualitas hidup ikan. Salah satu hasil penelitian tersebut adalah mengenai pemanfaatan peptidoglikan yang telah terbukti memicu kekebalan tubuh non spesifik pada ikan kerapu macan, yaitu pemberian peptidoglikan 20 mg kg<sup>-1</sup> berat tubuh ikan telah mampu meningkatkan sintasan sebesar 72% dibandingkan jika dibandingkan dengan kontrol (18,67%) tanpa imunostimulan. Pemberian tersebut juga menaikkan aktivitas fagositosis sebesar 19,5% dibanding dengan kontrol (9,67%). Sementara itu indeks fagositosis 1.87 sedangkan kontrol 1.47. Hasil penelitian lain pengaruh imunostimulan pada udang windu menyebutkan bahwa sintasan benih udang windu yang diinfeksi WSSV sangat nyata hasilnya ketika diberikan imunostimulan. Besarnya sintasan adalah 53,33%, 41,66% (vaksin *V. harveyi*), 38,33% (vitamin C), dan 20% (kontrol).

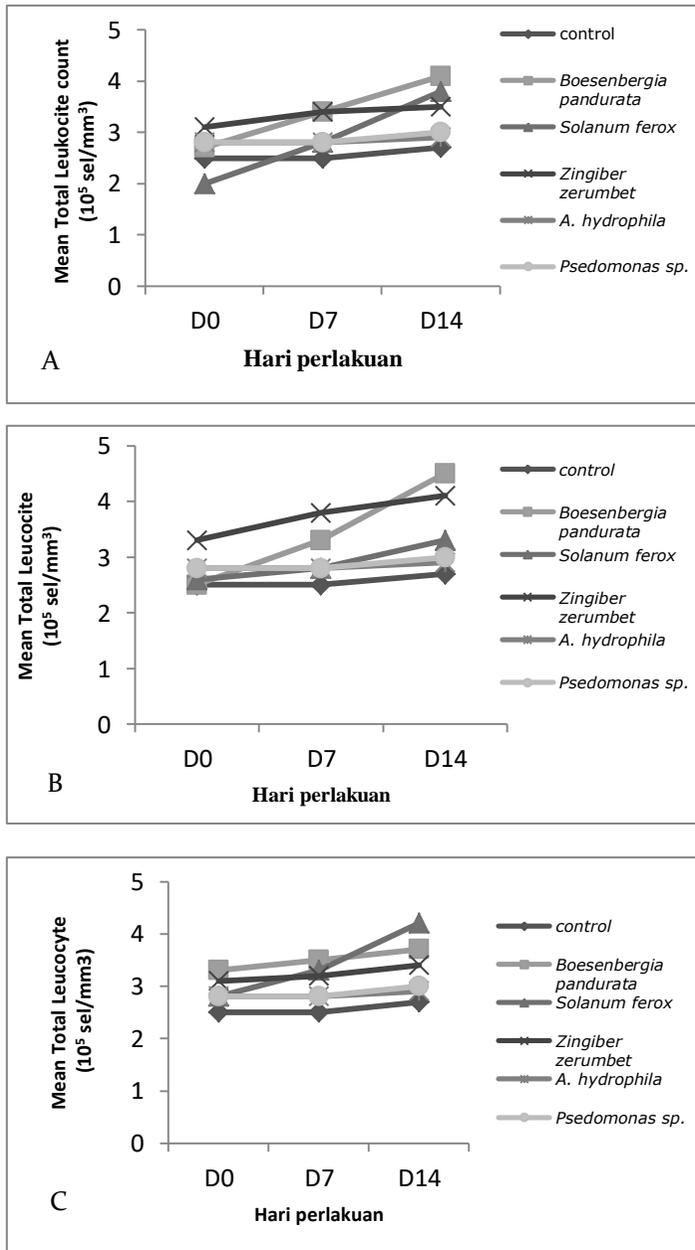
Beberapa jenis imunostimulan lain yang telah dicoba dan dikembangkan yaitu: glukukan, vitamin C, beberapa jenis mineral, ekstraksi ekstrak tanaman, probiotik, dan prebiotik, bagian dari sel mikroorganisme (misal dinding sel yeast) dan masih banyak lagi. Sebagai contoh, penggunaan bahan imunostimulant pada ikan kerapu dapat mengurangi resiko terkena penyakit, dan juga parameter-paramter lain seperti *survival rate* (SR), jumlah konsumsi pakan (KP), laju pertumbuhan harian (PH), efisiensi pakan (EP), retensi protein (RP), dan retensi lemak (RL), nilai rataan total leukosit (TL), total eritrosit (TE), kadar hemoglobin (Hb), dan kadar hematokrit (Ht) sebelum (0 jam) dan setelah (1 jam) pemaparan salinitas 0 ‰ (Rujukan).

### **2.3. Bahan Alam Potensial Imunostimulan**

Dengan adanya dampak negatif penggunaan bahan kimiawi atau antibiotika untuk pengendalian penyakit, maka penggunaan bahan alami untuk mengobati maupun mencegah penyakit pada ikan, termasuk parasit mulai dikembangkan. Lain halnya dengan penggunaan bahan alami untuk pencegahan atau pengobatan penyakit pada ikan, hampir dapat dikatakan tidak signifikan menyebabkan kerusakan lingkungan, resistensi terhadap patogen, residu yang tidak terakumulasi di dalam jaringan atau organ hewan, dan aman baik untuk komoditas budidaya maupun konsumen.

Bahan alami tersebut sebagian besar berasal dari tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia.

Negara Indonesia dengan keanekaragaman yang tinggi memiliki banyak sekali tanaman yang dapat dijadikan sebagai bahan imunostimulan alami yang dapat digunakan untuk pencegahan atau bagi penanggulangan penyakit dalam bidang budidaya perikanan. Berbagai tanaman atau tumbuhan telah diteliti mengandung senyawa yang bersifat antimikroba, baik bakterisidal, bakteristatik, dan fungisidal. Banyak hasil penelitian menunjukkan dan membuktikan bahwa fitofarmaka yang ada pada tumbuhan atau tanaman mampu dan efektif mencegah dan mengatasi penyakit ikan. Penggunaan bahan alami dari tumbuhan tersebut memiliki beberapa keuntungan, yaitu dapat menjadi bahan alami pengganti antibiotik untuk pengendalian penyakit, ramah terhadap lingkungan dan tidak mencemari, mudah didegradasi atau terurai, tidak meninggalkan residu pada ikan dan manusia sebagai konsumen, cukup mudah diperoleh dan jumlahnya tersedia cukup melimpah, ekonomis dari sisi harga. Berikut ini merupakan hasil penelitian berbagai jenis Tumbuhan yang ada di Kalimantan Timur dan berpotensi sebagai immunomodulator dan antibakteria (Tabel 2.1) pada spesies bakteri tertentu.



Gambar 2.1. Rerata total leukosit fish yang diinjeksi, diberi pakan, dan imersi dengan *Boesenbergia pandurata*, *Solanum ferox* dan *Zingiber zerumbet* A) injeksi, B) oral, C) Imersi.

Sumber: Hardi et al. (2017)

Tabel 2.1. Aktivitas antibakteria 31 ekstrak tanaman terhadap *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp.

Spesies Tanaman	Aktivitas Antibakteria	
	<i>Pseudomonas</i> Sp.	<i>Aeromonas</i> <i>Hydrophila</i>
Tetracycline (commercial antibiotic)	+	+
Aquadest (negatif control)	-	-
<i>Alpinia galanga</i>	-	-
<i>Amomum compactum</i>	-	+
<i>Artocarpus camansi</i>	-	+
<i>Boesenbergia pandurata</i>	-	+
<i>Cinnamomum verum</i>	-	-
<i>Citrus hystrix</i>	+	+
<i>Coriandrum sativum</i>	-	-
<i>Cuminum cyminum</i>	-	-
<i>Curcuma aeruginosa</i>	-	+
<i>Curcuma domestica</i>	-	+
<i>Curcuma heyneana</i>	-	-
<i>Curcuma longa</i>	+	-
<i>Cymbopogon citratus</i>	-	-
<i>Cymbopogon nardus</i>	-	-
<i>Etlingera elatior</i>	-	-
<i>Foeniculum vulgare</i>	-	-
<i>Illicium verum</i>	+	+
<i>Kaempferia galanga</i>	-	-
<i>Myristica fragrans</i>	+	-
<i>Nigella sativa</i>	+	+
<i>Ocimum basilicum</i>	-	+
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-
<i>Pandanus amaryllifolius</i>	-	-
<i>Piper nigrum</i> (white pepper)	-	+
<i>Piper nigrum</i> (black pepper)	-	-
<i>Solanum ferox</i>	+	+
<i>Syzygium aromaticum</i>	-	+
<i>Tamarindus indica</i>	+	+
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	-	+
<i>Zingiber officinale</i>	-	-
<i>Zingiber zerumbet</i>	-	+

(+) = Zona hambatan  $\geq$  10 mm; (-) = Zona hambatan  $<$  10 mm.

Sumber: Hardi et al. (2016)

## BAB 3

### ORGANIK SELENIUM SEBAGAI IMUSTIMULAN

#### 3.1. Selenium

Selenium (Se) pertama kali diteliti pada tahun 1817 oleh ilmuwan kimia dari Swedia, Jons Jacob Berzelius dan ditetapkan pada tahun 1957. Pada awalnya Se diduga merupakan mikroelemen yang toksik. Elemen selenium dalam tabel periodik termasuk dalam kelompok VIA, yang mempunyai 6 isotop yang stabil dengan nomor atom 34 dan berat atom 78.96. Selenium mempunyai nomor atom 34, berada di antara sulfur dan tellurium di group VIA, dengan arsenic dan bromide di periode 4. Dengan demikian, sifat-sifat kimia Se mempunyai kesamaan dengan sulfur yang terjadi sebagai bentuk oksidasi kuadrivalen sementara Se merupakan reduksi kuadrivalen. Baik Se dan sulfur mempunyai kesamaan ukuran atom, energi-energi ikatan, potensial ionisasi, afinitas elektron, dan kekuatan ikatan yang tidak dapat dibedakan. Meskipun Se dan sulfur mempunyai kesamaan, mereka tidak dapat saling dipertukarkan dalam sistem biologi dikarenakan perbedaan kekuatan dalam bentuk asam elemen dengan hidrogen selenide ( $H_2Se$ ) yang lebih kuat daripada hidrogen sulfida ( $H_2S$ ).

Di alam, Se dapat ditemukan luas di tanah dan air pada level antara  $0.01-2 \text{ mg kg}^{-1}$  dan  $0.1-0.4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dan dapat ditemukan dalam tahap empat valensi yaitu: selenates ( $Se^{6+}$ ), selenites ( $Se^{4+}$ ), selenides ( $Se^{2+}$ ), dan elemen Se (Se). Se dioksida merupakan senyawa Se yang umum yang digunakan di industri dan yang diproduksi dengan oksidasi Se menggunakan asam nitrat dan diikuti dengan pembakaran Se dalam oksigen atau evaporasi. Elemen selenium dapat dikelompokkan ke dalam inorganik selenium dan organik selenium. Dalam bentuk inorganik, selenium ditemukan dalam bentuk selenate dan selenite. Sementara bentuk organik selenium merupakan selenium yang mengandung asam amino seperti selenometionin. Baik pada jaringan hewan atau tumbuhan, selenate

merupakan bentuk utama inorganik senyawa seleno, sementara selenosistein merupakan bentuk utama asam amino-seleno pada jaringan ketika inorganik selenium diberikan pada hewan.

### **3.2. Organik Selenium**

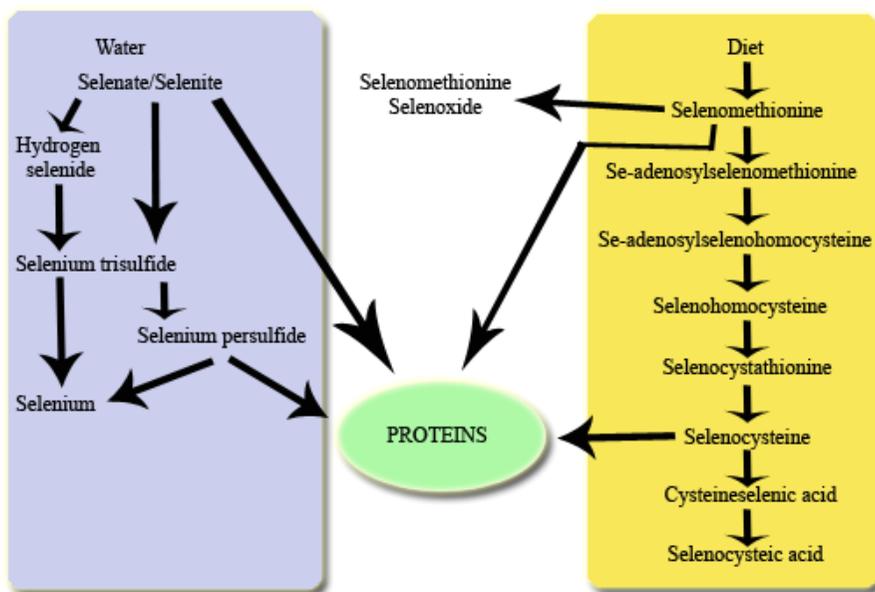
Senyawa organik Se memainkan peranan penting dalam proses biokimiawi. Organik selenium bertautan dengan asam amino, yaitu selenometionin dan selenosistein yang dihasilkan dari yeast. Organik selenium dari yeast berikatan dengan metionin dijumpai sebagai asam amino pada protein yeast dengan cara mengkulturkan pada medium khusus yang mengandung inorganik selenium. Se dari yeast dapat dihasilkan dari proses fermentasi strain spesifik yeast yaitu *Saccharomyces cerevisiae* strain CNCM I-3060, diinkubasi pada kadar Se yang tinggi selama fase pertumbuhan. Organik selenium dari yeast telah terbukti dapat terakumulasi di tubuh dalam konsentrasi yang lebih tinggi, lebih mudah terabsorpsi, kurang toksik dan ketersediaannya lebih tinggi dibanding inorganik selenium (IS). Selenium yang berasal dari yeast mempunyai kemampuan meningkatkan aktivitas selenoenzim dan ketersediaannya ditemukan dalam jumlah lebih besar daripada sumber-sumber inorganik selenium.

Sebaliknya, inorganik selenium sangat rendah tingkat absorpsinya oleh saluran intestinal dan retensinya rendah di dalam tubuh. Organik selenium sebagian besar ditemukan di spesies-spesies umum bakteri dan yeast namun sebagian besar hewan tidak dapat mensintesis sendiri. Sebagai konsekuensinya, selenium ditransfer ke hewan-hewan melalui ikatan protein selenometionin yang dikenal sebagai sumber utama selenium dari tumbuhan dan dari hewan dalam komposisi makanan.

### **3.3. Aspek Biologi Selenium**

Sebagai unsur mikro, selenium mempunyai efek biologi pada hewan yang dibutuhkan agar kerja sistem imun di otot menjadi baik, reproduksi normal, dan mencegah kerusakan jaringan. Beberapa percobaan telah dilakukan untuk mengevaluasi penggunaan dan efek diet selenium pada hewan akuatik. Pada hewan akuatik,

pengambilan atau sumber selenium dapat berasal dari air atau makanan (Gambar 3.1). Sebagai contoh, ikan menyerap air yang mengandung selenium terlarut melalui insang, epidermis atau intestinal. Namun, pengambilan selenium dari pakan merupakan jalur utama perolehan selenium pada hewan tingkat tinggi pada rantai makanan akuatik. Selenomethionin pada makanan dapat ditransport secara aktif melalui membran intestinal dan secara aktif pula terakumulasi di hati dan jaringan otot.



Gambar 3.1. Jalur metabolisme selenium pada hewan  
 Sumber: Tinggi (2003).

Ada tiga tingkatan penting dalam sistem biologi mengenai aktivitas selenium, yaitu: (1) Konsentrasi mikro selenium dibutuhkan untuk fungsi normal pertumbuhan dan perkembangan hewan; (2) Konsentrasi moderat dapat disimpan untuk memelihara fungsi homeostasis dan (3) konsentrasi yang makin tinggi dapat berpotensi toksik. Disarankan bahwa diet selenium seharusnya ada di sekitar konsentrasi moderat namun di bawah konsentrasi toksik.

Sebagaimana selenium dibutuhkan untuk fungsi normal

pertumbuhan dan perkembangan berbeda dengan kebutuhan selenium dalam kondisi stress, kebutuhan dalam kondisi stress meningkat secara gradual dalam rangka meningkatkan sistem imun hewan dan mencegah terjadinya penyakit kronis. Namun, konsentrasi toksik selenium hanya sedikit di atas konsentrasi kebutuhan umum selenium. Studi di hewan salmonid menunjukkan bahwa selenium menjadi racun pada saat diet selenium pada kisaran 10 kali dari konsentrasi normal ( $1-2 \text{ mg kg}^{-1}$ ), menghasilkan mortalitas yang tinggi, mengurangi laju asupan pakan, dan menurunkan laju pertumbuhan.

Mengacu pada bukti-bukti di tingkat molekuler, toksisitas selenium disebabkan oleh substitusi sulfur di protein yang mengandung gugus thiol. Selenium mungkin akan menggantikan posisi sulfur di asam amino metionin dan sistein, sehingga berakibat pada struktur konformasi dan mengubah fungsi pada saat menjadi protein fungsional. Akibat negatif lain dari toksisitas selenium adalah perubahan pada komposisi darah, mengakibatkan edema pada hati dan gonad.

#### **3.4. Selenium pada Hewan Akuatik**

Umumnya, hewan-hewan mengambil organik selenium dalam bentuk asam selenoamino yaitu selenomethionine dan selenocysteine, keduanya merupakan metilasi dan non metilasi melalui makanan. Sementara inorganik selenium dapat diperoleh dari suplementasi. Penyerapan diet organik selenium dari makanan berkisar 80% dari usus kecil.

Praktek-praktek suplementasi selenium telah dilakukan pada beberapa hewan akuatik (Tabel 3.1). Ilmuwan Chiu et al. (2010) menyebutkan bahwa selenium telah terbukti meningkatkan fungsi imunitas dan aktivitas antioksidan yang berakibat pada imunitas yang lebih baik dan daya tahan terhadap penyakit meningkat pada udang air tawar (*Macrobrachium rosenbergii*). Dalam hal sistem imunitas, Spallholz et al. (1990) menyebutkan bahwa selenium mempunyai tiga fungsi penting yaitu: 1) Selenium mengurangi pembentukan peroksida organik dan inorganik dengan cara raksi rantai radikal bebas. 2) Selenium memodulasi produksi hidrogen

peroksida dan superoksida selama periode *respiratory burst*. 3) Selenium terlibat dalam jalur lipooksigenase dan sikooksigenase dari jalur bertingkat arakidonat, yang menghasilkan hidroperoksida yang memicu sintesis leukotrienes, tromboxanes, prostaglandins dan lipoxins.

Studi pada ikan *Ictalurus punctatus* menunjukkan bahwa produksi anion superoksida makrofage intraseluler dipengaruhi oleh suplementasi selenium pada pakannya, khususnya organik selenium meningkatkan kemotaksis makrofag dengan antigen *Escherichia coli* (Wise et al., 1993). Pada ikan *Ictalurus punctatus* yang diuji tantang dengan *E. ictaluri*, mortalitas menurun setelah pemberian pakan yang mengandung selenium dengan konsentrasi hingga 0.4 mg kg<sup>-1</sup>. Potensi untuk menurunkan mortalitas juga meningkat pada pemberian organik selenium dibanding inorganik selenium (Wang and Lovell, 1997). Namun, pada ikan tilapia (*Oreochromis spp.*) yang diuji tantang dengan *E. tarda*, mortalitas tidak dipengaruhi dengan pemberian inorganik selenium dengan konsentrasi 0.2-0.5 mg kg<sup>-1</sup>. Sementara pada ikan salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), prevalensi *Renibacterium salmoninarum* (Bakteri penyebab penyakit ginjal) juga tidak dipengaruhi oleh diet selenite (Thorarinsson et al., 1994). Berdasarkan riset-riset tersebut, pada ikan nampaknya pengaruh selenium pada imunitas bergantung pada spesies patogennya, inang dari patogen dan konsentrasi pemberian selenium dan juga sumber selenium.

Tabel 3.1. Aplikasi dan efek diet selenium pada hewan akuatik

Hewan akuatik	Kadar Se (dalam pakan $\mu\text{g g}^{-1}$ atau air $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sumber Se	Durasi paparan (Hari)	Pengaruh	Referensi
Rainbow trout ( <i>Salmo Gairdneri</i> )	13	Selenite	80	Pertumbuhan dan Mortalitas	(Hilton et al., 1980)
Chinook salmon ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )	18.2	SEM	90	Pertumbuhan	(Hamilton et al., 1990)
Fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	20	Mix	56	Pertumbuhan	(Ogle and Knight, 1989)
Striped bass ( <i>Morone saxatilis</i> )	39	Fish	80	Mortalitas	(Coughlan and Velte, 1989)
Bluegill ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	13	SEM	260	Reproduction	(Wooock et al., 1987)
Razorback sucker ( <i>Xyrauchen texanus</i> )	472	Mix	90	Pertumbuhan	(Hamilton et al., 2000)
Bonytail ( <i>Gila elegans</i> )	236	Mix	90	Pertumbuhan	(Hamilton et al., 2000)
Giant freshwater prawn ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	0.5	Selenate SEM	75	Pertumbuhan, Mortalitas, Imunitas dan resisten penyakit	(Chiu et al., 2010)
African Catfish ( <i>Clarias Gariepinus</i> )	0.1-0.5	OS	84	Pertumbuhan dan respons fisiologi	(Abdel-Tawwab et al., 2007)
Common Carp, ( <i>Cyprinus carpio L.</i> )	0.03	OS	159	Pertumbuhan dan kelulushidupan	(Alina et al., 2009)
Red swamp crawfish ( <i>Procambarus Clarkii</i> )	0.3	OS	50	Pertumbuhan and Enzim Antioxidant	(Dörr et al., 2008)

Keterangan: Se = Selenium; SEM = Selenometionin

Selain sebagai agensia hayati untuk meningkatkan sistem imunitas, suplementasi selenium pada pakan dengan konsentrasi yang direkomendasikan mempunyai kontribusi untuk meningkatkan kelulushidupan dan performa pertumbuhan. Beberapa studi terdahulu menyebutkan bahwa suplementasi organik selenium telah diketahui meningkatkan pertumbuhan mentimun laut muda (*Apostichopus japonicus*) dan ikan *Carassius auratus gibelio*. Diet organik selenium pada pakan akan menyebabkan organik selenium berintegrasi dengan struktur protein dalam jaringan dan kemudian dapat berinteraksi dengan iodine untuk mencegah metabolisme hormonal pertumbuhan yang tidak normal, menghasilkan performa pertumbuhan yang tinggi. Namun sebaliknya, penggunaan diet selenium pada konsentrasi yang tinggi menyebabkan turunnya kelulushidupan, rendahnya pertumbuhan dan efisiensi pakan yang rendah pada ikan *Salmo gairdneri*. Dengan demikian sangatlah penting untuk menetapkan konsentrasi yang tepat suplementasi selenium pada pakan baik itu dalam bentuk organik ataupun inorganik selenium.

Meskipun penelitian mengenai pengaruh inorganik dan organik selenium pada diet di crustaceae masih terbatas, beberapa usaha telah dilakukan pada udang air tawar (*Macrobrachium rosenbergii*), udang vanamei (*Penaeus vannamei*) dan *Procambarus clarkii*. Penggunaan selenium pada diet *Procambarus clarkii* menunjukkan adanya efek positif pada laju pertumbuhan spesifik namun tidak begitu signifikan. Di sisi lain, respon imunitas yang signifikan dari udang *Pacific white shrimp* ditemukan setelah pakannya disuplementasi dengan organik selenium. Lebih lanjut lagi, penambahan selenium pada pakan akan meningkatkan resistensi giant freshwater prawn terhadap penyakit karena *Debaryomyces hansenii* dan meningkatkan aktivitas antioksidan.

### **3.5. Pentingnya Selenium pada Aktivitas Antioksidan**

Selenium merupakan imunomodulator yang mempunyai kemampuan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin E, C, A, dan beta-karoten, akan tetapi dapat menjadi lebih toksik. Semenjak selenium dikenal sebagai bagian penting dari enzim

antioksidan, seperti *glutathione peroxidase* (GPx), ada peningkatan ketertarikan dalam studi mengenai hubungan selenium dengan aktivitas antioksidan.

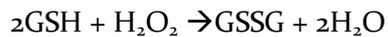
Sejumlah besar selenoprotein dikenal sebagai enzim antioksidan seluler. Antioksidan, sebagian besar merupakan donor elektron dan merupakan potensial indikator kesehatan pada organisme laut, karena aksi mereka menghancurkan radikal bebas dan kemampuannya terhadap stress oksidatif untuk menghasilkan produk akhir berupa air. Antioksidan juga berhubungan dengan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan mewakili mekanisme pertahanan tubuh untuk mengurangi kerusakan sel. Untuk mengurangi kerusakan sel, kadar ROS dan radiakal bebas yang dihasilkan dari metabolisme oksidatif dapat dijaga dengan meningkatkan kadar enzim antioksidan seperti GST (*glutathione-S-transferase*) dan GPx .

Enzim antioksidan GST; EC 2.5.1.18 merupakan protein fungsional dimerik dan komponen penting yang terlibat dalam detoksifikasi Sejumlah besar senyawa toksik dengan cara mengkonjugasikannya ke glutathione. Enzim GST mengkatalisis penambahan nukleofilik gugus thiol dari glutathione untuk membentuk konjugat glutathione, kemudian mentransformasikan menjadi air untuk disekresikan atau eliminasi.

Aktivitas GST dipengaruhi oleh penambahan selenium dalam diet telah terbukti pada udang air tawar *Macrobrachium rosenbergii* yaitu aktivitas GST secara signifikan meningkat setelah adanya penambahan selenium dalam diet pakannya. Beberapa GSTs juga mempunyai aktivitas *glutathione peroxidase*, sehingga menyediakan fungsi detoksifikasi oksigen, sebagai contoh reduksi lipid peroksidase atau LPO. Aktivitas ini khususnya penting di invertebrata, karena biasanya defisiensi dan tergolong vertebrata yang tergantung pada GPx selenium.

Aktivitas GPx (EC 1.11.1.9) pertama kali dideskripsikan oleh Mill (1957) dan dihipotesiskan bahwa berhubungan dengan hemolisis oksidatif sel darah merah. Enzim GPx merupakan sekumpulan enzim yang memproteksi tubuh hewan dari peroksida yang berbahaya dan biasanya dihasilkan dari proses respirasi. Fungsi utama GPx atau

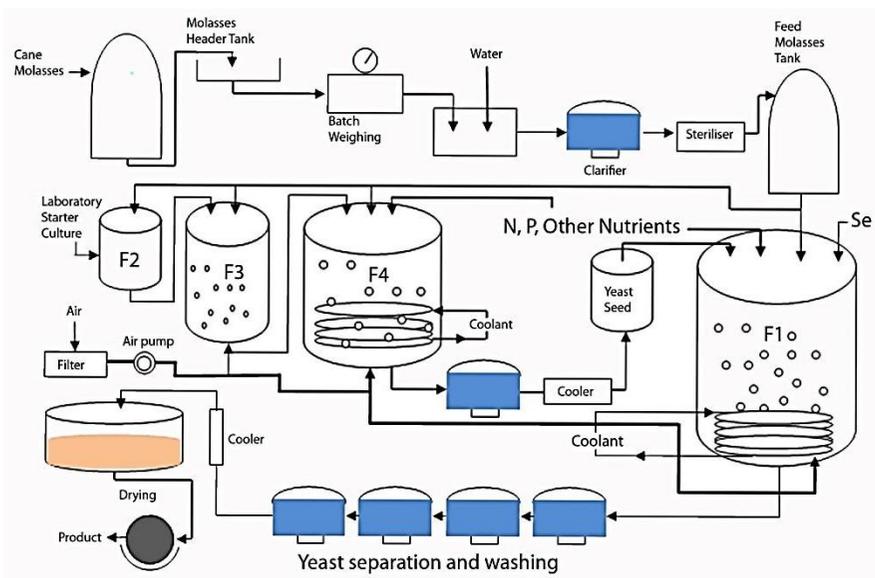
dikenal dengan glutathione peroxidase (GSH) adalah mengkatalisis reaksi pemindahan hidrogen peroksida melalui glutathione. Hidrogen peroksida berbahaya terhadap tubuh hewan, yaitu dapat memicu dan meningkatkan radikal bebas yang dapat merusak sel. Enzim GSH juga merupakan molekul antioksidan penting yang melindungi biomembran dan komponen seluler lainnya dari kerusakan oksidatif dengan mengkatalisis reduksi berbagai hidrogen peroksida (ROOH), menggunakan GSH sebagai substrat yang mereduksi selama fagositosis dan atau metabolisme Fisiologi pada umumnya. Ilmuwan Rotruck et al. (1973) menjabarkan reaksi umum dari GSH seperti di bawah ini:



GSH merupakan glutathione dalam bentuk reduksi dan GSSG merupakan bentuk glutathione oksidasi. Untuk memelihara fungsi berjalan dengan baik aktivitas GSH, enzim GSH harus berkolaborasi dengan selenium.

### **3.6. Sel-Plex® Sebagai Sumber Organik Selenium**

Sel-Plex® merupakan nama komersial selenium dari yeast dalam bentuk kering. Produk ini dibuat Alltech Inc., USA menggunakan yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain CNCM I-3060 yang dikulturkan dengan medium fermentasi yang diperkaya dengan selenium. Proses produksi Sel-Plex® disajikan pada Gambar 3.2. Selama proses pembuatan Sel-Plex®, inorganik selenium diubah menjadi organik dengan kira-kira kandungan selenium total 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Tidak ada formula khusus untuk produk ini yang berasal dari yeast kering yang mengandung selenomethionine (SeMet), selenocysteine (SeCys) dan selenoprotein. Menurut analisis regresi, Sel-plex® stabil disimpan selama kurun waktu 2 tahun pada suhu ruang setelah dibuat dari pabrik dengan kandungan SeMet juga tetap stabil. Sifat-sifat fisik, kimia dan spesifikasi dari Sel-Plex® disajikan pada Tabel 3.3.



Gambar 3.2. Diagram skematis proses produksi Sel-plex®  
 Sumber: Burdock and Cousins (2010)

Tabel 3.2. Spesifikasi Sel-Plex®

Analisis	Metode	Spesifikasi	Rata-rata
			Analisis Batch Hasil (n=5)
Aspek fisika	N/A	Coklat muda hingga coklat tua	
Yeast strain	N/A	Bubuk dengan aroma seperti yeast	
Hilang saat pengeringan	2 <sup>nd</sup> Directive 71/393/EC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain	5.53 ± 0.35
pH	-	CNCM I-3060	6.39 ± 0.18
Abu (total %)	NF V 18-101	Tidak lebih dari 7.0%	6.55 ± 0.9
Protein kasar	NF V 18-100		46.66 ± 0.93
Mesophilic aerobic microorganism	NF V 18-051	-	2.5 x 10 <sup>4</sup> cfu g <sup>-1</sup>
Coliforms	NF V 18-050	Maksimum of 8%	<5 cfu g <sup>-1</sup>
Salmonella	NF V 18-052	Minimum of 45% Kurang dari 0.5 x 10 <sup>4</sup> cfu g <sup>-1</sup> Kurang dari 10 cfu g <sup>-1</sup> Negatif	Negatif
Heavy metal (mg kg <sup>-1</sup> )			

Analisis	Metode	Spesifikasi	Rata-rata
			Analisis Batch Hasil (n=5)
Arsenik	AAS	<3 mg Kg <sup>-1</sup>	0.79 ± 0.08
Pb	AAS	<1 mg Kg <sup>-1</sup>	0.07 ± 0.03
Cadmium	AAS	<3 mg Kg <sup>-1</sup>	0.022 ± 0.005
Mercuri	AAS	<0.5 mg Kg <sup>-1</sup>	<0.005
Total Selenium (mg kg <sup>-1</sup> )		Tidak kurang dari 2000 mg Kg <sup>-1</sup>	2,275 ± 148.5
Total organik selenium	ICP-MS	≥ 98%	99.6 – 99.63%
Selenomethionine	ICP-MS	65% (62-68%)	63.4 – 66.6%
Organik selenium	ICP-MS	33% (32-38%)	33 – 36.2 %
Inorganik selenium sebagai Se(IV)	ICP-MS	≤ 2%	0.37 – 0.4 %
Inorganik selenium sebagai Se(VI)	ICP-MS	≤ 2% (Dikombinasi dengan Se(IV))	Di bawah limit deteksi

AAS = atomic absorption spectrometry; cfu colony forming unit; ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectrometry; N/A = not applicable; mg g<sup>-1</sup> = milligram per gram



## BAB 4

### MANNAN OLIGOSAKARIDA (MOS)

#### 4.1. Telaah MOS

Mannan oligosakarida (MOS) merupakan kompleks glukomannoprotein yang berasal dari dinding sel yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Produk komersial yang umum dijumpai dan mengandung sekitar 25% MOS sebagai contoh dari Bio-Mos (Alltech Inc., USA). MOS dipertimbangkan sebagai bahan prebiotik imunostimulan yang dapat mengaktivasi respon non imunitas bagi spesies yang dibudidayakan. Senyawa tersebut dapat juga meningkatkan efisiensi saluran pencernaan dengan memicu regularitas, integritas dan ketinggian villi pencernaan serta menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas bakteri yang bermanfaat sementara juga menghambat pertumbuhan bakteri patogenik yang berbahaya di saluran pencernaan. Di industri peternakan, MOS mampu menghalangi fimbriae dari bakteri patogenik dan selanjutnya dapat mencegah adhesi terhadap mucus epitelium. Dengan adanya sifat-sifat itulah, MOS saat ini digunakan sebagai imunostimulan dan pemicu pertumbuhan dalam pakan baik untuk organisme terrestrial atau akuatik yang dibudidayakan.

Di dinding sel yeast, mannan oligosakarida berada sebagai kompleks molekul yang terhubung dengan protein. Ada dua Lokasi utama mannan oligosakarida dipermukaan area dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*. Mereka dapat dilekatkan pada dinding sel protein sebagai -o dan gugus -n glycosyl groups serta elemen konstituen sebagian besar polisakarida  $\alpha$ -d-mannanose ( $\alpha$ -d-mannans), yang dibangun dari percabangan  $\alpha$ -(1,2)- dan  $\alpha$ -(1,3)- d-mannose (dari 1 hingga 5 cincin), terikat pada rantai panjang  $\alpha$ -(1,6)-d-mannose. Kombinasi yang spesifik ini menciptakan variasi fungsi yang melibatkan mannan oligosakarida dan protein konjugasi serta sangat hidrofilik dan secara struktur seperti struktur sisir (Brush like) mannan oligosaccharides yang dapat cocok dengan berbagai variasi

reseptor pada saluran pencernaan hewan dan reseptor pada permukaan membran bakteri. Struktur tersebut berakibat munculnya kemampuan bioaktivitas yang terlibat dalam sistem imun hewan dan memainkan peranan penting dalam meningkatkan antioksidan serta pertahanan antimutagenik.

Aplikasi skala besar fungsi oligosakarida dalam industri makanan, pakan, farmasi, kosmetik dan agrokimia, sangat menjanjikan untuk dikembangkan dalam skala yang lebih besar dengan cara metode sintesis. Oligosakarida dapat diekstrak dari sumber alam atau disintesis secara fisik, kimiawi atau metode enzimatik. Metode yang umum diterapkan adalah hidrolisis polisakarida atau sintesis dari substrat disakarida dengan enzim atau perlakuan kimiawi. Oligosakarida rafinosa secara langsung diekstrak dari material tanaman menggunakan air atau methanol atau larutan etanol. Sementara mannose dan rhamnosa orthoesters siap menjadi O-2-(orthoester).

#### 4.2. Efek Immunostimulan MOS

Prebiotik termasuk dalam karbohidrat yang diklasifikasikan sesuai dengan derajat polimerisasinya (Jumlah unit monosakarida), contohnya monosakarida, disakarida dan polisakarida. Penggunaan prebiotik sebagai immunostimulan meningkatkan respon imunitas dan resistensi terhadap penyakit. Prinsip prebiotik sebagai immunostimulan termasuk didalamnya MOS, FOS, dan inulin. MOS merupakan kompleks glukomanoprotein yang berasal dari dinding sel Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dan banyak dikaji penggunaannya untuk ikan.

Struktur dari MOS dari *Saccharomyces cerevisiae* telah dipelajari sebagai hasil dari metilasi dan teknik degradasi asetolisis. Data dari berbagai metode tersebut mengindikasikan bahwa mannan mempunyai percabangan polisakarida dengan percabangan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) dan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) terikat pada rantai utama  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Mannan biasanya mengandung fosfor dan nitrogen. Reseptor manosa merupakan reseptor endositik diekspresikan oleh makrofag dan sel-sel endothelial yang mengenali glikoprotein sendiri dan ligan glikan mikrobia. Penggunaan MOS sebagai bahan suplementasi di bidang

akuakultur mungkin telah membuktikan keuntungan terhadap hewan akuatik dalam meningkatkan imunitas innate, meskipun studi lanjut diperlukan untuk mendeterminasi tingkat suplementasi yang tepat dari MOS di berbagai hewan akuatik.

Diet MOS pada pakan juga telah terbukti menstimulasi hemolitik dan fagositosis pada ikan *Oncorhynchus mykiss* walbaum. Sementara pada ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*) pemberian MOS dalam pakan secara signifikan meningkatkan resistensi terhadap infeksi *Streptococcus agalactia*. Contoh produk komersial dari MOS immunogen®, mengandung  $\beta$ -glucan, juga meningkatkan jumlah leukosit dari ikan *Cyprinus carpio* dan Potensi keuntungan positif dari suplementasi MOS sebanyak 20 atau 40 g kg<sup>-1</sup> meningkatkan kesehatan ikan *Sparus aurata* serta tidak ada efek terhadap kelulushidupan ikan tersebut. Namun, ada perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan dalam hal berat badan. Berikut ini merupakan rangkuman penggunaan MOS pada hewan akuatik dan pengaruh yang ditimbulkannya (Tabel 4.1.)

Tabel 4.1. Penggunaan MOS dalam pakan hewan akuatik serta pengaruhnya

Spesies (g)	Pemberian	Hasil/Manfaat	Referensi
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> ) (200 ± 0.6 g)	10 g kg <sup>-1</sup> - 4 bulan	Menurunkan konsumsi oksigen, meningkatkan konsentrasi protein dan energy di dalam tubuh.	(Grisdale-Helland et al., 2008)
Channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) (16 g)	2 g kg <sup>-1</sup> - 4 minggu	Tidak ada efek terhadap pertumbuhan, hematologi atau fungsi imunitas dan kelulushidupan melawan <i>Edwardsiella ictaluri</i>	(Welker et al., 2007)
Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> ) larva	0.2% - 13 hari setelah menetas	Meningkatkan kelulushidupan larva dan pengaturan mikrovili, mengurangi vakuola supranukleus	(Salze et al., 2008)
European lobster ( <i>Homarus gammarus</i> )	Pengayaan <i>Artemia nauplii</i>	Meningkatkan kelulushidupan larva	(Daniels et al., 2006)
European sea	20 dan 40 g	Meningkatkan	(Torrecillas et

Spesies (g)	Pemberian	Hasil/Manfaat	Referensi
bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) (33.7 ± 7.7 g)	kg <sup>-1</sup> - 67 hari	pertumbuhan, menurunkan vakuolisasi lipid dan mengurangi keberadaan <i>Vibrio alginolyticus</i> di bagian ginjal	al., 2007)
Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) (30 g)	2 g kg <sup>-1</sup> - 90 hari	Meningkatkan pertumbuhan, kelulushidupan, titer antibody dan aktivitas lizosim	(Staykov et al., 2005)
Rainbow trout (37.5 ± 1 g)	1.5, 3 atau 4.5 g kg <sup>-1</sup> - 90 hari	1.5 g kg <sup>-1</sup> meningkatkan laju pertumbuhan 1.5 g dan 3 g kg <sup>-1</sup> meningkatkan villi intestinal	(Yilmaz et al., 2007)
Rainbow trout	2 g kg <sup>-1</sup> - 8 minggu	Meningkatkan absorpsi permukaan di bagian posterior intestinal, meningkatkan densitas mikrovili dan panjang mikrovili	(Yilmaz et al., 2007)
Rainbow trout (13.2 g)	4 g kg <sup>-1</sup> - 12 minggu	Meningkatkan pertumbuhan, haemolitik, dan aktivitas fagositosis, peningkatan berat mucus, kelulushidupan melawan <i>Vibrio anguillarum</i>	(Dimitroglou et al., 2008)
Red drum ( <i>Sciaenops ocellatus</i> L.) (500 g)	10 g kg <sup>-1</sup> - 3 minggu	Meningkatkan protein dan organik digestibilitaas, menurunkan coefisien digestibilitas lipid	(Burr et al., 2008; Rodrigues-Estrada et al., 2008)
Gulf sturgeon ( <i>Acipenser oxyrinchus desotoi</i> ) (130 g)	3 g kg <sup>-1</sup> - 5 minggu	Tidak ada efek terhadap performa pertumbuhan, konversi pakan dan morfologi gastrointestinal	(Pryor et al., 2003)
Hybrid tilapia (9.8 g)	1.5, 3 dan 4.5 g kg <sup>-1</sup> - 80 hari	Tidak ada efek dalam parameter pertumbuhan dan matrik	(Genc et al., 2007b)

Spesies (g)	Pemberian	Hasil/Manfaat	Referensi
Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) (13,6 ± 0.7 g)	2, 4, 6, 8 dan 10 g kg <sup>-1</sup> - 45 hari	tubuh, kandungan bahan kering dan protein fillet meningkat dengan penambahan konsentrasi MOS Tidak ada efek dalam hal hematologi, menurunkan konsumsi pakan harian dengan meningkatnya konsentrasi pemberian MOS	(Sado et al., 2008)
Nile tilapia (0.82 g)	2, 4, dan 6 g kg <sup>-1</sup> - 3 minggu	Meningkatkan berat, panjang, dan pertumbuhan harian ikan yang diberi pakan 4, dan 6 g kg <sup>-1</sup> MOS; meningkatkan kelulushidupan melawan <i>Streptococcus agalactiae</i>	(Samrongpan et al., 2008)
Tiger shrimp ( <i>Penaeus semisulcatus</i> ) (0.34 g)	1.5, 3 dan 4.5 g kg <sup>-1</sup> - 48 hari	3 g kg <sup>-1</sup> meningkatkan pertumbuhan, konversi pakan, dan kelulushidupan, tidak ada efek negatif terhadap jaringan hepatopankreas	(Genc et al., 2007a)

Sumber: Sang (2010)

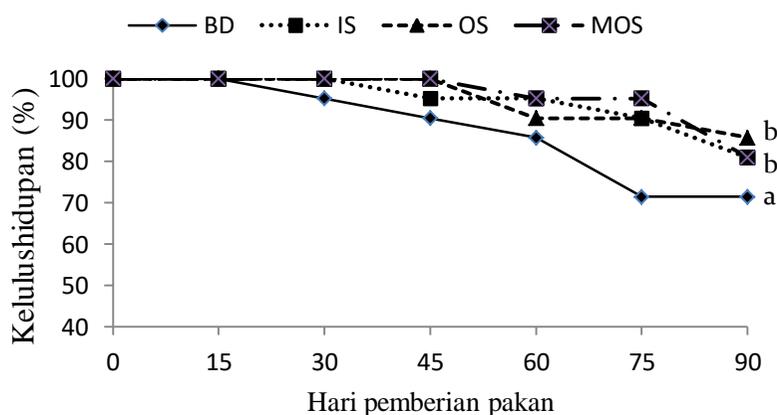
Sementara itu, perbandingan antara organik selenium dan MOS sebagai agensia hayati pemicu pertumbuhan dan immunostimulan juga telah diteliti sebelumnya oleh Nugroho and Fotedar (2013) pada hewan marron (*Cherax canii*). Hasil perbandingan tersebut menyebutkan bahwa setelah 90 hari pemberian dan uji perbandingan, marron yang diberi pakan inorganic selenium, organik selenium dan MOS menunjukkan berat akhir dan SGR (Tabel 4.2), kelulushidupan (Gambar 4.1), total hemocyte (THC), persentase sel hyaline (Tabel 4.3), aktivitas glutathione-S-transferase (GST) dan glutathione peroxidase (GPx) (Tabel 4.4) yang lebih tinggi daripada marron tanpa suplementasi.

Marron dengan suplementasi organik selenium mempunyai THC dan persentase sel hyaline lebih tinggi daripada marron dengan suplementasi inorganic selenium atau MOS. Sementara marron dengan pemberian MOS berat akhirnya, SGR dan persentase sel granular lebih tinggi disbanding dengan marron dengan organik selenium. Namun, tidak ada beda nyata di waktu retensi neutral red (neutral red time retention/NRRT), sedangkan marron dengan suplementasi organik selenium mempunyai aktivitas GPx, GST dan total Se dalam hemolimph yang tinggi akan tetapi rendah aktivitas lipid peroksidasinya.

Tabel 4.2. Mean  $\pm$  SE performa pertumbuhan marron dengan variasi suplementasi

Parameter	Types of supplements			
	BD	IS	OS	MOS
Berat awal (g)	38.68 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	43.17 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	39.57 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	38.80 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>
Berat akhir (g)	40.54 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	45.90 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	45.50 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	47.33 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>
SGR (% day <sup>-1</sup> )	0.052 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.070 $\pm$ 0.003 <sup>ab</sup>	0.157 $\pm$ 0.025 <sup>bc</sup>	0.22 $\pm$ 0.008 <sup>c</sup>

Superscript berbeda pada tiap kolom yang sama menunjukkan beda nyata signifikan  $P < 0.05$ . BD = basal diet; IS = 0.4 mg kg<sup>-1</sup> Se (sodium selenate digunakan sebagai sumber inorganic selenium); OS = 0.2 g kg<sup>-1</sup> Sel-Plex®, setara dengan 0.4 mg kg<sup>-1</sup> organik selenium; MOS = mannan oligosaccharide (0.4% of Bio-MOS®).



Gambar 4.1. Kelulushidupan marron dengan pakan berbagai variasi suplementasi

BD = basal diet; IS = 0.4 mg kg<sup>-1</sup> Se (sodium selenate digunakan sebagai sumber inorganic selenium); OS = 0.2 g kg<sup>-1</sup> Sel-Plex®, setara dengan 0.4 mg kg<sup>-1</sup> organik selenium; MOS = mannan oligosaccharide (0.4% of Bio-MOS®).

Tabel 4.3. Mean  $\pm$  SE immune-kompeten marron dengan variasi suplementasi

Parameter	Tipe suplementasi			
	BD	IS	OS	MOS
THC	1.76 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.41 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	3.13 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	2.28 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Granular (%)	34.33 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	23.66 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	23.00 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	59.00 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>
Semigranular (%)	35.00 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	20.66 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	27.33 $\pm$ 2.02 <sup>ab</sup>	19.66 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
Hyaline (%)	34.33 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	55.66 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>	50.33 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup>	20.66 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>

THC = Total haemocyte count (cells  $\times$  10<sup>6</sup> mL). Superscript berbeda pada tiap kolom yang sama menunjukkan beda nyata signifikan  $P < 0.05$ . BD = basal diet; IS = 0.4 mg kg<sup>-1</sup> Se (sodium selenate digunakan sebagai sumber inorganic selenium); OS = 0.2 g kg<sup>-1</sup> Sel-Plex<sup>®</sup>, setara dengan 0.4 mg kg<sup>-1</sup> organik selenium; MOS = mannan oligosaccharide (0.4% of Bio-MOS<sup>®</sup>).

Tabel 4.4. Aktivitas enzim antioxidant, aktivitas LPO, NRRT dan total solubilitas Se di hemolimph marron dengan pakan variasi suplementasi selama 90 hari.

Parameter	Tipe suplementasi			
	BD	IS	OS	MOS
GST	159.70 $\pm$ 49.46 <sup>a</sup>	319.55 $\pm$ 7.64 <sup>b</sup>	329.49 $\pm$ 15.24 <sup>b</sup>	277.22 $\pm$ 47.01 <sup>b</sup>
GPx	198.04 $\pm$ 65.35 <sup>a</sup>	408.34 $\pm$ 8.62 <sup>b</sup>	616.61 $\pm$ 18.76 <sup>c</sup>	213.48 $\pm$ 9.74 <sup>d</sup>
LPO	0.126 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.095 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.067 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.110 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>
NRRT	65.00 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	115.00 $\pm$ 5.00 <sup>b</sup>	150.00 $\pm$ 8.66 <sup>c</sup>	115.00 $\pm$ 5.00 <sup>b</sup>
Total solubilitas selenium	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

Superscript berbeda pada tiap kolom yang sama menunjukkan beda nyata signifikan  $P < 0.05$ . BD = basal diet; IS = 0.4 mg kg<sup>-1</sup> Se (sodium selenate digunakan sebagai sumber inorganic selenium); OS = 0.2 g kg<sup>-1</sup> Sel-Plex<sup>®</sup>, setara dengan 0.4 mg kg<sup>-1</sup> organik selenium; MOS = mannan oligosaccharide (0.4% of Bio-MOS<sup>®</sup>). GST = Glutathione-S-transferase (nanomoles of CDNB conjugated min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>); GPx = Glutathione peroxidase ( $\mu$ g GSH consumed min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>); LPO = Lipid Peroxidase (nmol malondialdehyde-MDA mg<sup>-1</sup> of protein); NRRT = Neutral red retention time (min). Total solubilitas selenium di haemolimph diekspresikan sebagai  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

### 4.3. MOS Sebagai Antibakteria

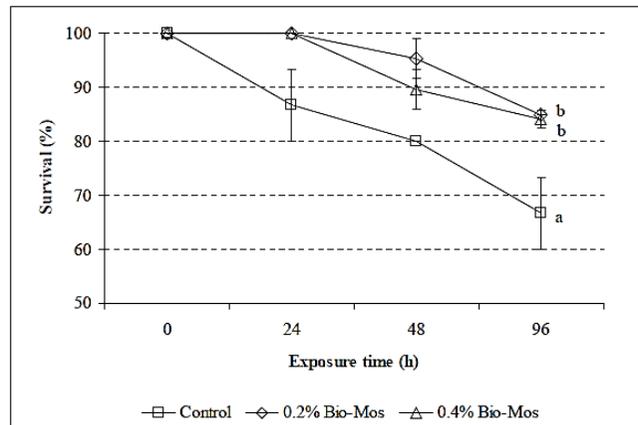
Penyakit infeksi yang disebabkan oleh berbagai bakteri dan virus patogen sangatlah merugikan bidang akuakultur. Untuk mengontrol penyakit tersebut, strategi yang mirip (Vaksinasi dan penggunaan agensia antimikrobia) diberlakukan di bidang

akuakultur sebagai layaknya dibidang peternakan hewan. Umumnya antibiotika merupakan hal rutin yang diberikan, namun antibiotika mempunyai banyak konsekuensi negatif baik terhadap lingkungan maupun kesehatan manusia. Hal tersebut termasuk adanya resistensi strain bakteri, akumulasi residu di jaringan, dan depresi sistem imun. Dengan alasan inilah, penggunaan antibiotika di bidang akuakultur dilarang di beberapa negara di Eropa dan penggunaannya diawasi dengan ketat di USA serta beberapa negara lainnya. Kondisi tersebut menimbulkan tantangan hal baru untuk membuka alternatif strategi dalam hal penanganan penyakit. Perkembangan di sektor akuakultur di akhir dekade ini ditujukan dalam meningkatkan sistem imun hewan akuatik yang dibudidayakan dengan model manipulasi diet pakan. Metode alternatif pencegahan penyakit dengan cara pemberian imunostimulan, probiotik, prebiotik sebagai bahan tambahan di dalam pakan. Pemberian pakan dengan suplementasi tersebut diarahkan menggunakan prebiotik atau probiotik yang tentu saja menguntungkan dalam meningkatkan sistem imunitas, efisiensi pakan, dan performa pertumbuhan pada ikan. Pilihan lain selain prebiotik dan probiotik adalah suplementasi menggunakan bahan medis dari tumbuhan dan ekstraknya sebagai imunostimulan yang lebih dipertimbangkan karena ramah lingkungan.

Salah satu kelompok suplemen yang bermanfaat untuk meningkatkan sistem imun pada ikan atau hewan akuatik lainnya adalah prebiotik yang didefinisikan sebagai makanan yang non digestibel serta menstimulasi pertumbuhan dan atau membatasi jumlah spesies bakteri yang ada di kolon serta meningkatkan kesehatan ikan itu sendiri. Pada kenyataannya prebiotik tidak diserap disalurkan pencernaan atau dihidrolisis oleh enzim pencernaan manusia, namun langsung masuk ke kolon dan bertindak sebagai substrat untuk bakteri endogen yang kemudian menyediakan energi bagi ikan, substrat metabolik, dan suplai nutrient mikro esensial.

Berbagai studi telah banyak dilakukan dalam hal penggunaan prebiotik pada hewan akuatik dengan menggunakan parameter pertumbuhan, mikrobia pencernaan, resistensi terhadap bakteri patogen, dan sistem imun, aktivitas lisosim, aktivitas hemagglutinas,

*respiratory burst*, aktivitas SOD, dan aktivitas fagositosis. Penggunaan MOS sebagai suplementasi untuk agensia antibakteria juga pernah dilakukan pada marron yang diuji tantang dengan *Vibrio mimicus* dengan melihat parameter kelulushidupan (Gambar 4.2), THC, differensial THC, *Vibrio* rank, *haemolymph clotting time*, dan NRRT (Tabel 4.5)



Gambar 4.2. Mean  $\pm$  SE kelulushidupan marron diuji tantang dengan *Vibrio mimicus*. Beda huruf (a,b) mengindikasikan beda nyata untuk tiap waktu  $P < 0.05$  ( $n = 18$ ). Sumber:Sang (2010)

Dari hasil tersebut mengindikasikan bahwa MOS merupakan bahan hayati yang dapat diberikan dalam pakan Marron untuk meningkatkan pertumbuhan, sistem imunitas dan peningkatan kelulushidupan. Dengan kata lain aplikasi MOS dapat secara signifikan meningkatkan kemampuan marron terhadap ketahanan stress missal infeksi bakteri. Peningkatan kelulushidupan marron dengan MOS dan diuji tantang dengan bakteri adalah sebagai konsekuensi meningkatnya status kesehatan dan respon imun yang positif dari marron.

Lebih lanjut lagi, MOS mempunyai pengaruh langsung terhadap sel-sel imunitas melalui molekul mannan. Bagian *Toll-like receptor 4* atau TLR4 dan MR (Mannan reseptor) mungkin terlibat langsung dalam pengenalan mannan. Telah diketahui bahwa MR pada makrofag dan 12 macam sel yang dikenali Mannan,

meningkatkan ekspresi sitokin pada ayam. Makrofag menstimulasi dengan fraksi yang kaya manan dimediasi oleh transitory penurunan dalam ekspresi mRNA TLR4, TLR4 juga mengenali mannan dan molekul yang berasosiasi dengan mannan.

Tabel 4.5. Mean  $\pm$  SE parameter imunitas marron diuji tantang dengan *Vibrio mimicus*

Parameters	Time after infection (h)	Test diets		
		Control	0.2% Bio-Mos	0.4% Bio-Mos
THCs (million cells/mL)	0 <sup>*</sup>	13.26 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	13.66 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	13.77 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
	24	21.73 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	14.56 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	13.67 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
	48	12.85 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	13.70 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	13.33 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
	96	12.30 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	12.91 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	13.90 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Granular cells (%)	0 <sup>*</sup>	135.40 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	114.64 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	120.09 $\pm$ 2.20 <sup>c</sup>
	24	21.86 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	113.11 $\pm$ 3.32 <sup>b</sup>	1213.35 $\pm$ 2.93 <sup>b</sup>
	48	36.86 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	110.78 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	1214.05 $\pm$ 1.34 <sup>c</sup>
	96	123.73 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	114.18 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	211.70 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>
Semi-granular cells (%)	0 <sup>*</sup>	18.80 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	17.38 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	129.95 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>
	24	16.47 $\pm$ 2.63 <sup>a</sup>	113.80 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>	14.88 $\pm$ 2.57 <sup>a</sup>
	48	110.73 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	110.81 $\pm$ 2.58 <sup>a</sup>	215.04 $\pm$ 1.73 <sup>a</sup>
	96	17.16 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	17.05 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	15.92 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
Hyaline cells (%)	0 <sup>*</sup>	1285.79 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	1277.97 $\pm$ 2.48 <sup>ab</sup>	169.96 $\pm$ 4.37 <sup>b</sup>
	24	291.66 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>	173.08 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	281.76 $\pm$ 3.90 <sup>b</sup>
	48	182.4 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>	278.4 $\pm$ 1.94 <sup>ab</sup>	170.90 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>
	96	1289.1 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	278.75 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	282.37 $\pm$ 2.16 <sup>b</sup>
<i>Vibrio</i> rank	0 <sup>*</sup>	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	24	22.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	11.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	48	310.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	11.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	11.67 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>
Haemolymph clotting time (s)	0 <sup>*</sup>	174.00 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup>	172.33 $\pm$ 21.53 <sup>a</sup>	172.67 $\pm$ 10.27 <sup>a</sup>
	24	166.33 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>	157.33 $\pm$ 6.06 <sup>a</sup>	159.67 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>
	48	172.67 $\pm$ 9.06 <sup>a</sup>	158.67 $\pm$ 10.68 <sup>a</sup>	144.67 $\pm$ 4.98 <sup>a</sup>
	96	165.33 $\pm$ 13.2 <sup>a</sup>	166.33 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>	153.33 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>
NRRT (min)	0 <sup>*</sup>	> 120	> 120	> 120
	24	123.33 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>	126.67 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>	126.67 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>
	48	115.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	255.00 $\pm$ 7.64 <sup>b</sup>	253.33 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>
	96	240.00 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	3111.67 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	393.33 $\pm$ 8.82 <sup>b</sup>

Beda huruf superscript pada baris yang sama mengindikasikan beda  $P < 0.05$ . Rerata untuk tiap parameter imunitas di tiap kolom tidak didahului dengan subscript yang sama menunjukkan beda nyata  $P < 0.05$ . 0<sup>\*</sup> merupakan waktu sebelum injeksi. Sumber: Sang (2010)

## BAB 5

### KETAPANG

#### 5.1. Biologi Ketapang (*Terminalia catappa* L.)

*Terminalia catappa* L. atau yang biasa disebut dengan nama ketapang berasal dari famili Combretaceae, dikenal luas dengan nama *Indian almond*, *Malabar Almond* serta *Tropical almond*. Ada sekitar 250 spesies dalam genus *Terminalia* tropis dari famili Combretaceae. Beberapa berbuah kecil dengan 2-5 tonjolan, sayap kasar, yang lain menghasilkan drupes-bulat, oval, atau berbentuk almond yang tipis agak tebal di lapisan luar daging. Di beberapa jenis seperti *T. chebula* Retz. dan setengah lusin lainnya "*myrobalans*" buah yang begitu kaya akan tanin (hingga 53 %) menjadi sangat penting dalam industri penyamakan. Hal lainnya, dengan kandungan tanin rendah, digunakan untuk obat-obatan pribumi. Beberapa *T. edulis* Hindia, *T. oblongata*, *T. platyphylla*, *T. sericocarpa* dari Queensland dan *T. solomonensis* Kepulauan Solomon.

Pohon ketapang (Gambar 5.1) berasal dari famili Combretaceae, berbentuk pohon atau perdu, seringkali berupa liana, berhadapan. Bunga tersusun dalam bulir atau tandan, banci atau berkelamin tunggal, aktinomorf, biasanya kecil-kecil. Daun kelopak berjumlah 4-8, daun mahkota sama banyaknya dengan daun kelopak, kadang-kadang tidak ada. Benang sari 4-10 atau banyak. Bakal buah tenggelam dengan 1 tangkai putik, beruang 1, bakal biji 2-6. Buah dengan kulit yang bergigi atau bersayap, berisi 1 biji, sedikit atau tidak membuka. Biji berisi lembaga yang mempunyai daun lembaga terpuntir atau terlipat dengan akar lembaga pendek, tanpa endosperm. Famili ini meliputi sekitar 450 jenis, terbagi dalam  $\pm 20$  genus, tersebar di daerah tropika Contoh-contoh: *Terminalia*: *T. catappa* (ketapang) salah satu penyusun hutan pantai, buahnya dapat dimakan, *T. belerica*, *T. tomentosa*, *T. augustifolia*, *T. chebula*.

Menurut Keng (1978), klasifikasi ketapang yaitu kingdom: Plantae; divisi: Spermatophyta; subdivisi: Angiospermae; kelas:

Dicotyledoneae; ordo: Myrtales, famili: Combretaceae; genus: *Terminalia*; spesies: *Terminalia catappa* L.



Gambar 5.1. Pohon Ketapang

#### Kandungan dan Khasiat

Ketapang merupakan tanaman dengan batang berkayu, bercabang dan berwarna hijau. Bagian ketapang yang digunakan sebagai obat yaitu biji, kulit kayu dan daun. Biji ketapang mengandung minyak, kulit kayu mengandung tanin, sedangkan daun mengandung saponin dan tanin. Biji ketapang berkhasiat sebagai pencahar dan pelancar ASI. Kulit kayu tanaman ini mempunyai efek diuretik, yakni memperbanyak pengeluaran air seni. Daunnya berkhasiat untuk mengatasi disentri, lepra, obat cacung, pencahar, kudis, rematik. Bagian yang digunakan untuk terapi hepatitis secara empiris adalah kulit kayu.

#### **5.2. Fitokimia pada Ketapang**

Daun tanaman ini membuat makanan ternak berkualitas baik. Kayunya digunakan untuk membuat alat-alat dekoratif dan

perabotan rumah tangga. Fitokimia tanaman ini termasuk tanin (punicalagin, punicalin, asam chebulagic, geranin, granatin B, corilagin), flavonoid (isovitexin, vitexin, isoorientin, rutin) serta triterpenoid. Ekstrak daun dan kulit dari *T. catappa* ini telah dilaporkan sebagai antikanker, antidiabetes, antioksidan, antijamur serta antibakteri. Sari dari daun *T. catappa* direkomendasikan untuk sakit, termasuk sakit kepala. Kulit kayu dan daun (serta cangkang buah dan akar) digunakan untuk pewarnaan atau mewarnai kain, penyamakan kulit dan pembuatan tinta.

Sejumlah ekstrak tanaman yang mempunyai senyawa aktif dan aktivitas biologi telah dilaporkan sehubungan dengan suplementasi di bidang akuakultur. Namun, data mengenai fitokimia ketapang dan pengaruhnya pada ikan, sebagai contoh ikan cupang jarang dijumpai. Secara praktis, skrining kimia senyawa fitokimia ketapang sangatlah penting dilakukan untuk menemukan manfaat senyawa bioaktif pada ikan. Penggunaan etanol sebagai agensia ekstraktor karena mampu mengikat senyawa fitokimia seperti tannin, polifenol, flavonoid, terpenoids, dan saponin. Penelitian tentang senyawa fitokimia daun ketapang coklat menunjukkan bahwa ekstrak mengandung saponin, triterpenoid, kuinon, fenolik, tannins, dan flavonoid pada ekstrak daun ketapang (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Uji skrining fitokimia ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa*)

Fitokimia	Hasil uji
Alkaloid	-
Saponin	+
Steroid	-
Triterpenoid	+
Quinon	+
Fenolik	+
Tanin	+
Flavonoid	+

Sumber: Nugroho et al. (2016a)

Saponin dipertimbangkan sebagai senyawa anti nutrisi dalam bidang akuakultur. Namun, hasil Penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa saponin mempunyai beberapa efek menguntungkan pada beberapa ikan contoh pada ikan *Cyprinus car-*

*pio* dan *Oreochromis niloticus*. Juga disebutkan bahwa kadar saponin yang rendah meningkatkan laju pertumbuhan, efisiensi konversi pakan, penggunaan protein, dan mengurangi konsumsi oksigen. Saponin juga mempunyai efek fisiologi seperti meningkatkan jumlah sel darah merah, hemoglobin, hematokrit, pengambilan dan pengikatan oksigen pada ikan Perch (*Anabas testudineus*).

Selain saponin, kelompok fitokimia lain yaitu: triterpenoid, kuinon, fenolik juga merupakan senyawa aktif tumbuhan yang dapat ditemukan di ekstrak daun ketapang dan dilaporkan memicu berbagai aktivitas seperti anti stress, memicu pertumbuhan, stimulasi nafsu makan, sebagai tonik dan memicu imunitas. Sementara itu, tanin dan flavonoid yang juga ada pada ekstrak daun ketapang, merupakan kelompok utama senyawa fenolik tumbuhan yang bertindak sebagai antioksidan atau *free radical scavengers*. Menurut Chansue and Assawawongkasem (2008), tanin dari ekstrak air *T. catappa* mempunyai kemampuan sebagai substansi antibakteria pada ikan ornamen. Tanin dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada usus ikan dengan mengikat logam dan membentuk kelat. Di sisi lain, flavonoid merupakan kelompok besar fitokimia pada tumbuhan yang menunjukkan aktivitas reproduksi pada ikan Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Saponin juga bermanfaat sebagai antimikrobia pada ikan, dan sebagai promotor pertumbuhan pada ikan *Pargus major* muda, *Carassius auratus*, *Catla catla*. Dengan demikian keberadaan metabolit sekunder di ekstrak daun ketapang memainkan peranan penting terhadap kelulushidupan dan profil darah ikan cupang.

Peneliti Gao *et al.* (2004) telah mengidentifikasi berbagai macam fitokonstituen dari buah, biji, dan batang dari ketapang. Bagian mesokarp kering buah ketapang mempunyai kandungan tanin. Sementara bagian batang mengandung glikosida, tanin, minyak volatile, saponin, steroid, dan fenol. Diklasifikasikan dalam kelompok asam linoleat, minyak batang ketapang mengandung banyak asam lemak tidak jenuh, khususnya oleat (hingga 31.48%) dan linoleat (hingga 28.93%).

Lebih lanjut lagi, hasil riset Mininel *et al.* (2014) menyebutkan bahwa telah dapat mengisolasi senyawa punicalagin (polyfenol), beserta dengan derivat dan senyawa lain dari daun ketapang. Daun

dari ketapang dibuktikan mengandung 1-degalloyl-eugeniin, 2,3-(4,4',5,5',6,6' - hexahydroxy - diphenoyl) - glucose, asam chebulagic, asam gentisic, corilagin, geraniin, granatin B, kaempferol, punicalagin, punicalin, quercetin, tercatatin, tergalagin, terflavin A, dan terflavin B. Bagian biji mengandung karbohidrat, protein, lemak, serat, besi, asam askorbat, asam arachidic,  $\beta$ -carotene, asam linoleat, asam myristic, asam oleat, asam palmitat, asam plmitoleat, asam stearat, fosforus, potassium, niacin, riboflavin, thiamin, dan air. Bagian buah mengandung glukosa, pentosan, corilagin, brevifolin asam karboksilat,  $\beta$ -karotene, cyanidin-3-glucoside, asam ellagic, asam gallic, dan tannin. Mandloi *et al.* (2013) telah mengidentifikasi keberadaan quercetin di daun ketapang. Fitokonstituen seperti flavonoids, karotenoids, dan senyawa fenolik, mungkin bertanggung jawab terhadap khasiat tanaman ketapang dalam penggunaannya sebagai obat tradisional.

### **5.3. Manfaat Daun Ketapang dalam Budidaya Ikan**

Daun ketapang yang disebut daun *Indian almond* (Amerika) dan daun *Huu Kwang* (Thailand) ini merupakan tanaman kayu yang berasal dari daerah Asia Tenggara, seperti Malaysia, Thailand, Kamboja, Vietnam, Brunei dan Indonesia. Daun ini memiliki khasiat sebagai ramuan obat untuk mengobati beberapa penyakit seperti sakit kulit, disentri, sakit kepala dan hipertensi. Namun selain untuk manusia, daun ketapang juga digunakan untuk menunjang kesehatan ikan cupang. Daun ketapang ini terbukti sangat baik untuk memelihara dan membudidayakan ikan cupang hias. Daun ini bisa menyebabkan air berubah warna menjadi kuning gelap dan ikan cupang sangat menyukai hidup di dalam air yang berwarna gelap di alam bebas.

Daun ketapang ini merupakan resep tradisional yang mengandung bahan organik yang bermanfaat bagi kesehatan ikan cupang. Daun ketapang membuat ikan tidak mudah terserang jamur dan bisa mencerahkan warna tubuh ikan. Setelah melalui penelitian, diketahui bahwa daun ketapang mengandung sejenis bahan aktif yang mampu membunuh jamur dan parasit. Daunnya mengandung *organik acid*, zat tanin dan flavonoid. Dalam pemeliharaan ikan

cupang, getah yang terdapat pada daun ketapang bisa meningkatkan pH air dan menyerap bahan beracun yang berbahaya bagi kesehatan ikan. Sementara, mineral-mineral seperti sulfur, nitrogen, fosfor, magnesium dan tembaga yang terkandung di dalam asam humat juga terdapat pada daun ketapang. Mineral-mineral tersebut mampu menumbuhkan bakteri *cyano* baik dalam air yang berguna bagi kesehatan ikan dan juga mampu mendetoksifikasi air dan menyerap berbagai senyawa berbahaya seperti klorin dan aluminium.

Daun ketapang yang akan digunakan dalam memelihara ikan cupang harus daun yang benar-benar kering dan tidak terdapat getah karena getah tersebut justru akan membahayakan kesehatan ikan cupang. Untuk memperoleh air rendaman yang banyak, daun ketapang juga bisa direndam dalam toples atau wadah. Jika hendak menggunakan air rendaman tersebut, tinggal meneteskannya ke dalam akuarium secukupnya. Pada pembudidayaan ikan cupang, daun ketapang tersebut dimasukkan ke dalam wadah pemijahan dan dibiarkan mengambang di permukaan air dan juga bisa digunakan oleh ikan cupang sebagai sarang telur.

#### **5.4. Imunostimulan pada Ikan Cupang**

Hasil penelitian Nugroho et al., 2016 menyebutkan bahwa ikan cupang yang diimersi dengan ekstrak etanol daun ketapang pada medium air pemeliharaan ikan cupang menunjukkan kualitas air yang baik dan memberikan respon positif terhadap kelulushidupan dan nilai hitung darah. Ikan pada umumnya mempunyai hubungan yang erat dengan lingkungan akuatik sekitarnya. Kebanyakan ikan akuarium seperti ikan cupang (*Betta* sp.) hidup di sistem yang tertutup yang berarti air suatu saat harus dikuras dan ditambah dengan yang baru. Kandungan senyawa aktif daun ketapang atau *Terminalia catappa leaves* (TCL) yang diimersikan dalam medium air mengandung tanin dapat dihidrolisa, yaitu terflavins A, terflavins B, tergalagin, tercatin, punicalin, punicalagin, chebulagic acid, geraniin, granatin B, and corilagin (Tanaka et al., 1986; Chen & Li, 2006).

Berdasarkan hasil Penelitian tersebut di atas, suhu, DO tidak dipengaruhi oleh adanya imersi berbagai konsentrasi, namun imersi

TCL sebesar 625 ppm menunjukkan nilai pH yang rendah ( $5.05 \pm 0.10$ ) pada medium air pemeliharaan (Tabel 5.2). Penurunan nilai pH dikarenakan adanya senyawa tanin yang ada pada ekstrak daun ketapang.

Tabel 5.2. Kualitas air medium pemeliharaan ikan cupang (*Betta sp.*) yang diimersi dengan berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa*)

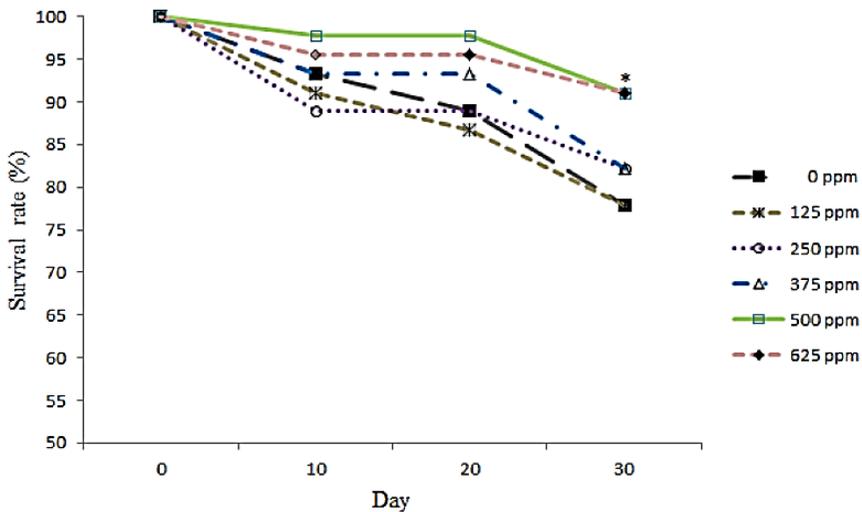
Variabel	Kontrol	125 ppm	250 ppm	375 ppm	500 ppm	625 ppm
Suhu	$25.57 \pm 0.030$	$25.58 \pm 0.016$	$25.57 \pm 0.054$	$25.73 \pm 0.223$	$25.62 \pm 0.014$	$25.62 \pm 0.014$
DO	$3.35 \pm 0.193$	$3.48 \pm 0.073$	$3.37 \pm 0.073$	$3.05 \pm 0.220$	$3.43 \pm 0.166$	$3.43 \pm 0.166$
pH	$6.14 \pm 0.008^a$	$6.125 \pm 0.014^a$	$6.175 \pm .014^b$	$6.21 \pm 0.464^b$	$6.25 \pm 0.166^b$	$5.05 \pm 0.100^c$

Data merupakan rerata (Mean  $\pm$  SE). Superscript yang berbeda (a, b, c) pada baris yang samamenunjukkan beda nyata signifikan  $P < 0.05$ . Ekstrak daun *Terminalia catappa* ditambahkan ke medium air sebagai bahan imersi. Suhu = ( $^{\circ}\text{C}$ ); DO = ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). Sumber: Nugroho et al. (2016a)

### Kelulushidupan

Fitokimia seperti alkaloids, flavonoids, pigments, fenolik, dan terpenoids merupakan metaobilt sekunder yang dijumpai ditumbuhan pada umumnya. Fitokimia yang terkandung di tumbuhan mungkin meningkatkan sistem imunitas bawaan yang ada pada ikan. Selanjutnya, fitokimia juga meningkatkan kelulushidupan ikan. Beberapa penelitian sebelumnya telah mengevaluasi penggunaan fitokimia dari berbagai ekstrak bagian tanaman untuk meningkatkan tingkat kelulushidupan dari ikan *Cyprinus carpio*; ikan ornamental laut dan ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sementara hasil pengujian ekstrak daun ketapang terhadap kelulushidupan ikan cupang menunjukkan bahwa, ikan cupang yang diimersi dengan TCL di atas konsentrasi 375 ppm menunjukkan signifikansi kelulushidupan. Kelulushidupan yang tertinggi (Gambar 5.2) ditemukan pada ikan cupang yang diimersi dengan 625 ppm TCL. Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa tidak ditemukan adanya mortalitas yang signifikan pada ikan cupang setelah diekspose oleh fitokimia. Lebih lanjut lagi Ashraf and Bengtson (2007) menyatakan bahwa adanya tanin di pakan mempunyai efek yang positif terhadap kelulushidupan larva ikan

striped bass (*Morone saxatilis*). Namun, beberapa studi terdahulu, menyatakan bahwa tanin yang dominan di tumbuhan mempunyai efek buruk pada ikan *Channa straitus* dan *Cyprinus carpio*. Penggunaan tanin dapat menyerap senyawa kimia berbahaya, memberikan lingkungan atau medium air yang cocok untuk ikan yang dibudidayakan.



Gambar 5.2. Kelulushidupan (%) ikan cupang (*Betta sp.*) diimersi berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak ketapang selama 30 hari.  
 (\*) kelulushidupan tertinggi (625 ppm of TCL)

Pengaruh biologi saponin terhadap kelulushidupan dan sistem imun pada ikan juga telah dipelajari dan di review oleh beberapa ilmuwan. Saponin ditemukan pada tumbuhan, mengandung baik steroid dan triterpenoid aglikon yaitu dengan satu atau lebih rantai gula. Lebih jauh lagi, penggunaan 1 dan 2 mg L<sup>-1</sup> saponin pada udang putih *Litopenaeus vannamei* meningkatkan kelulushidupan udang. Sebaliknya, saponin murni pada konsentrasi yang tinggi menyebabkan penyakit stress dan kematian, setelah pemberian dosis 200 mg L<sup>-1</sup>.

## **Profil Darah**

Saat ini, aplikasi fitokimia terhadap profil hematologi sangat umum dijumpai pada praktek kultur budidaya perikanan. Parameter hematologi meningkat sifat kepentingannya di akuakultur dikarenakan nilai-nilainya yang dapat meningkatkan status kesehatan ikan. Parameter hematologi seperti: sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, limfosit, dan total protein memegang peranan penting dalam penentuan kondisi fisiologi ikan. Berdasarkan hasil penelitian Nugroho et al. (2016a), kelompok ikan yang diperlakukan dengan TCL di atas 375 ppm mempunyai nilai sel darah merah, sel darah putih, dan hemoglobin yang lebih tinggi di dibandingkan kelompok lain atau kontrol, sementara limfosit yang tinggi diperoleh pada ikan dengan perlakuan 125 ppm. Namun, total protein pada ikan tidak dipengaruhi oleh pemberian variasi ekstrak ketapang. Sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, limfosit digunakan sebagai indikator status hematologi ikan yang berhubungan dengan pertahanan tubuh bawaan dan regulasi fungsi imunitas pada organisme.

Mekanisme TCL dapat meningkatkan status hematologi pada ikan cupang masih belum jelas diketahui dan di pahami. Akan tetapi, beberapa ilmuwan seperti Nair et al. (2002); Lyu and Park (2005) menyatakan bahwa flavonoid dari tumbuhan mungkin bisa saja berkontribusi dalam mempromosikan imunitas selular dengan memodulasi Th-1 dari sitokin seperti IL-2 (Interleukin 2) dan INF $\gamma$  (Interferon). Flavonoid dapat juga sebagai biokatalisator untuk menghasilkan leukosit dan menstimulasi leukosit sebagai imunitas selular non spesifik. Di samping itu, flavonoid juga berdampak positif dengan mencegah terjadinya hemolisis sel darah merah, dengan cara melindungi membran biologi sel darah merah dari radikal bebas.

Hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak daun ketapang dengan berbagai variasi konsentrasi menunjukkan adanya pengaruh terhadap jumlah sel darah merah (Red blood cell/RBC), sel darah putih (White blood cell/WBC) dan jumlah haemoglobin (Hb). Adanya kenaikan parameter tersebut menunjukkan adanya efek stimulasi dari ekstrak daun ketapang yang ditambahkan sebagai imersi di medium pemeliharaan ikan cupang.

## 5.5. Sifat Antibakteria Ketapang

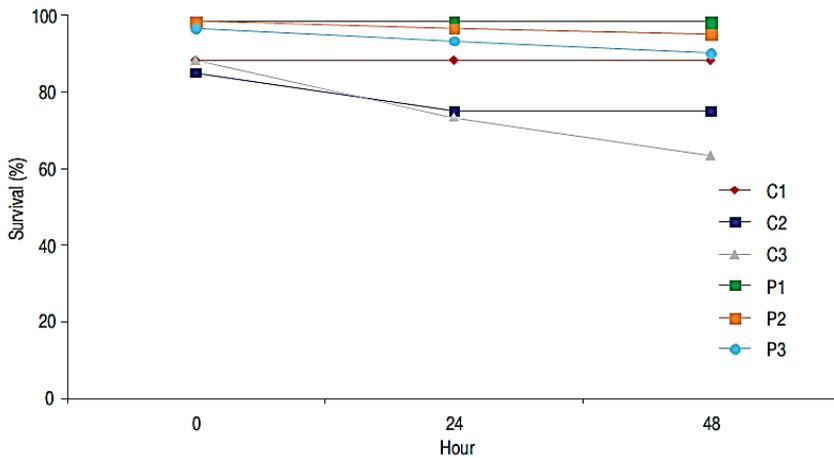
Adanya mikrobia patogen merupakan agensia berbagai macam penyakit dan kematian. Berbagai macam obat tersedia di pasaran namun juga mempunyai efek samping yang tak kalah merugikan. Untuk mengatasi hal tersebut, banyak sumber-sumber dari alam yang dapat dimanfaatkan, salah satunya tanaman ketapang. Beberapa hasil riset menyebutkan bahwa ekstrak metanol dari akar daun ketapang menunjukkan aktivitas sebagai antimikrobia terhadap mikroorganisme Gram positif dan Gram negatif. Sementara itu, ekstrak kloroform akar ketapang menunjukkan antimikrobia terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*, sedangkan ekstrak petroleum eter akar ketapang.

Hasil penelitian Nugroho et al. (2017); Nugroho et al. (2016a), menyebutkan bahwa ekstrak daun ketapang mempengaruhi kelulusan hidup ikan cupang selama masa ujiantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* (Gambar 5.3 dan Tabel 5.3). Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh data bahwa kelulusan hidup ikan cupang pasca ujiantang dengan *Aeromonas hydrophila* berkisar antara 60% hingga 100%. Penurunan kelulusan hidup ikan cupang terjadi antara jam ke-0 hingga jam ke-24 pada kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak cair daun ketapang dan diinjeksi bakteri (C<sub>3</sub>). Perbandingan kelulusan hidup pada C<sub>3</sub> dengan kelompok lain disajikan pada Gambar 5.3. Jika diamati dari Gambar 5.3 tersebut dapat diketahui bahwa terdapat beda nyata signifikan ( $p < 0,05$ ) kelulusan hidup ikan cupang antara kelompok kontrol (C<sub>3</sub>) dibandingkan dengan kelompok-kelompok lain yaitu kelompok kontrol yang tanpa pemberian ekstrak cair daun ketapang yang tidak diinjeksi bakteri (C<sub>1</sub>), kelompok kontrol yang tanpa pemberian ekstrak cair daun ketapang diinjeksi placebo (C<sub>2</sub>), kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak cair daun ketapang yang tidak diinjeksi (P<sub>I</sub>), kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak cair daun ketapang yang diinjeksi placebo (P<sub>II</sub>) dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak cair daun ketapang yang diinjeksi bakteri (P<sub>III</sub>). Akan tetapi, tidak terdapat adanya beda nyata ( $p > 0,05$ ) antara C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, P<sub>I</sub>, P<sub>II</sub> dan P<sub>III</sub>.

Tabel 5.3. Profil darah *Betta* sp. yang diimersi berbagai variasi konsentrasi (ppm) ekstrak daun *Terminalia catappa* selama 30 hari

Parameter	Groups (ppm)					
	Control	125	250	375	500	625
RBC ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	1.846 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.842 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.846 ± 0.019 <sup>a</sup>	1.853 ± 0.027 <sup>a</sup>	2.014 ± 0.050 <sup>b</sup>	2.014 ± 0.033 <sup>b</sup>
WBC ( $10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	4.345 ± 0.073 <sup>a</sup>	4.376 ± 0.071 <sup>ab</sup>	4.606 ± 0.265 <sup>ab</sup>	5.006 ± 0.313 <sup>abc</sup>	5.138 ± 0.306 <sup>bc</sup>	5.430 ± 0.227 <sup>c</sup>
Haemoglobin (g dL <sup>-1</sup> )	7.400 ± 0.048 <sup>a</sup>	7.520 ± 0.015 <sup>ab</sup>	7.749 ± 0.197 <sup>ab</sup>	7.748 ± 0.070 <sup>ab</sup>	8.414 ± 0.076 <sup>c</sup>	8.581 ± 0.117 <sup>c</sup>
Limfosit ( $10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	65.533 ± 0.371 <sup>a</sup>	62.600 ± 1.205 <sup>b</sup>	64.000 ± 0.577 <sup>a</sup>	63.000 ± 0.808 <sup>ab</sup>	62.866 ± 0.480 <sup>ab</sup>	63.466 ± 0.751 <sup>ab</sup>
Total protein serum (mg dL <sup>-1</sup> )	0.492 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.518 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.492 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.509 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.500 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.506 ± 0.005 <sup>a</sup>

Data yang diberikan merupakan rerata (Mean ± SE). Superscript yang berbeda (a, b, c) pada baris yang sama menunjukkan beda nyata rerata  $P < 0.05$ . Ekstrak daun *Terminalia catappa* ditambahkan sebagai imersi. RBC = Red Blood Cells/Sel darah merah; WBC = White Blood Cells/Sel darah putih.



Gambar 5.1. Kelulusan hidup ikan cupang pasca ujiantang.  
 Keterangan: C<sub>1</sub> = kontrol tanpa penginjeksian, C<sub>2</sub> = kontrol yang diinjeksi garam fisiologis (placebo), C<sub>3</sub> = kontrol yang diinjeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*, P<sub>1</sub> = ikan yang diberi ekstrak cair daun ketapang, P<sub>2</sub> = ikan yang diberi ekstrak cair daun ketapang dan diinjeksi garam fisiologis (placebo), P<sub>3</sub> = ikan yang diberi ekstrak cair daun ketapang dan diinjeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* terdapat beda nyata signifikan ( $p < 0,05$ ) antara K+ (a) dan K-, KP, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> (b). (\*)= berbeda signifikan.

Tabel 5.4. Nilai rerata (*mean*±*SE*) profil darah ikan cupang pada jam ke-48 pasca uji tantang dengan *Aeromonas hydrophila*

Parameters	Jam	Groups					
		Control		500 ppm			
		C1	C2	C3	P1	P2	P3
WBC ( $10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0	18,00±0,50 <sup>a</sup>	18,43±0,31 <sup>b</sup>	18,53±0,43 <sup>c</sup>	18,13±0,32 <sup>a</sup>	18,13±0,27 <sup>a</sup>	18,03±0,34 <sup>a</sup>
	24	18,50±0,18 <sup>a</sup>	10,43±0,42 <sup>b</sup>	11,70±0,41 <sup>c</sup>	18,43±0,22 <sup>a</sup>	18,56±0,22 <sup>a</sup>	18,36±0,22 <sup>a</sup>
	48	18,33±0,19 <sup>a</sup>	9,13±0,44 <sup>b</sup>	12,36±0,19 <sup>c</sup>	18,43±0,13 <sup>a</sup>	18,90±0,25 <sup>a</sup>	18,86±0,22 <sup>a</sup>
RBC ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	0	1,43±0,13 <sup>a</sup>	1,83±0,50 <sup>a</sup>	1,66±0,27 <sup>a</sup>	1,70±0,18 <sup>a</sup>	1,76±0,22 <sup>a</sup>	1,70±0,25 <sup>a</sup>
	24	1,76±0,26 <sup>a</sup>	1,80±0,18 <sup>a</sup>	1,66±0,19 <sup>a</sup>	1,76±0,22 <sup>a</sup>	1,70±0,18 <sup>a</sup>	1,73±0,13 <sup>a</sup>
	48	1,66±0,13 <sup>a</sup>	1,73±0,13 <sup>a</sup>	1,73±0,22 <sup>a</sup>	1,80±0,18 <sup>a</sup>	1,63±0,22 <sup>a</sup>	1,66±0,13 <sup>a</sup>
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	0	16,00±1,41 <sup>a</sup>	16,66±1,49 <sup>a</sup>	16,00±1,41 <sup>a</sup>	16,33±1,45 <sup>a</sup>	15,33±1,33 <sup>a</sup>	16,66±1,49 <sup>a</sup>
	24	16,33±1,45 <sup>a</sup>	15,33±1,33 <sup>a</sup>	16,33±1,45 <sup>a</sup>	16,66±1,49 <sup>a</sup>	15,66±1,37 <sup>a</sup>	16,33±1,45 <sup>a</sup>
	48	16,66±1,49 <sup>a</sup>	16,66±1,49 <sup>a</sup>	16,00±1,41 <sup>a</sup>	17,00±1,52 <sup>a</sup>	15,66±1,37 <sup>a</sup>	16,33±1,45 <sup>a</sup>
Hct (%)	0	16,33±0,91 <sup>a</sup>	20,66±1,53 <sup>a</sup>	19,00±1,57 <sup>a</sup>	15,66±0,43 <sup>a</sup>	17,66±0,71 <sup>a</sup>	16,66±0,71 <sup>a</sup>
	24	18,33±0,83 <sup>a</sup>	17,00±0,57 <sup>a</sup>	17,00±0,75 <sup>a</sup>	18,33±0,43 <sup>a</sup>	17,00±0,57 <sup>a</sup>	17,33±0,71 <sup>a</sup>
	48	16,66±0,62 <sup>a</sup>	18,00±0,57 <sup>a</sup>	17,33±0,71 <sup>a</sup>	16,66±0,43 <sup>a</sup>	18,33±0,43 <sup>a</sup>	16,66±0,43 <sup>a</sup>
PLT ( $10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	0	36,66±1,20 <sup>a</sup>	34,00±0,93 <sup>a</sup>	34,66±1,03 <sup>a</sup>	33,00±0,57 <sup>a</sup>	40,00±1,20 <sup>b</sup>	34,33±1,58 <sup>b</sup>
	24	41,66±1,78 <sup>a</sup>	32,00±1,47 <sup>a</sup>	40,00±1,07 <sup>a</sup>	33,33±0,43 <sup>a</sup>	46,00±1,81 <sup>b</sup>	49,33±1,28 <sup>b</sup>
	48	31,66±0,71 <sup>a</sup>	32,00±0,75 <sup>a</sup>	33,33±0,71 <sup>a</sup>	31,66±0,98 <sup>a</sup>	33,00±0,57 <sup>b</sup>	34,00±0,57 <sup>b</sup>

Keterangan: Alfabet yang berbeda (a, b, c) menunjukkan adanya beda nyata signifikan  $P < 0,05$ . Numerik subskrip berbeda (1, 2) menunjukkan adanya beda nyata signifikan  $P < 0,05$ . WBC = Sel darah putih; RBC = Sel darah merah; Hct = Hemoglobin; Hct = nilai hematokrit; PLT = Keping darah. C1 = kontrol tanpa penginjeksian, C2 = kontrol yang diinjeksi garam fisiologis (placebo), C3 = kontrol yang diinjeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*, P1 = ikan yang diberi ekstrak cair daun ketapang, P1I = ikan yang diberi ekstrak cair daun ketapang dan diinjeksi garam fisiologis (placebo), P1II = ikan yang diberi ekstrak dan diinjeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Sumber: Nugroho et al. (2017).

Berdasarkan uraian Tabel 5.4. nilai WBC subgroup kontrol ikan cupang yang diuji tantang dengan *A. hydrophila* menunjukkan peningkatan signifikan WBC setelah 24 jam injeksi, sementara jumlah WBC subgroup ikan yang diimersi dengan daun ketapang tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Nilai RBC, Hb, dan Hct subgroup ikan selama uji tantang tidak terpengaruh oleh pemberian ekstrak daun ketapang. Hasil tersebut selaras dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa peningkatan jumlah WBC ikan tilapia setelah infeksi. Pourmoghim et al., (2015) juga menemukan hal yang sama bahwa diet ekstrak *Origanum vulgare* yang dicampur dengan pakan uji tidak berpengaruh signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap RBC, WBC, Hct, dan hemoglobin.

Meskipun mekanisme pengaruh imersi ekstrak daun ketapang terhadap peningkatan WBC ikan cupang belum dapat dipahami sepenuhnya, namun Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010) dan (Reverter et al., 2014) melaporkan bahwa flavonoid dari metabolit Tumbuhan mungkin saja berkontribusi sebagai antibakteria. Flavonoids yang terkandung dalam TCL mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Dengan demikian jelas bahwa subgroup ikan yang diimersi dengan TCL tidak menunjukkan peningkatan WBC were able to inhibit the bacteria's growth. Sebagai tambahan, flavonoids juga mempunyai efek positif dalam mengurangi hemolysis RBC yang mungkin dikarenakan infeksi bakteri. Dengan cara melindungi membran biologi RBC. Beberapa peneliti juga melaporkan bahwa antioksidan yang ada di dalam ekstrak tumbuhan mungkin memicu eritropoiesis dan memelihara kadar Heme besi dalam kondisi ferrous.

Selain total WBC, differential WBC seperti limfosit, monosit, dan sel granular berfungsi untuk menghasilkan antibody, untuk mengenali dan merespon antigen, serta mediator respon imun selular dan humoral. Sebagai contoh dalam percobaan ikan cupang yang diimersi dengan ekstrak daun ketapang 500 ppm menunjukkan persentase limfosit yang rendah namun persentase monosit dan granular tinggi. Jumlah limfosit dari berbagai kelompok ikan uji coba cenderung stabil selama uji tantang, akan tetapi jumlah monosit dan sel granular tiap subgroup ikan cupang meningkat secara signifikan

24 jam setelah ujiantang. Jumlah tertinggi monosit dan sel granular ditemukan pada ikan perlakuan imersi yang diujiantang dengan *A. hydrophila* 48 h setelah injeksi. Peningkatan signifikan monosit dan sel granular juga ditemukan dalam percobaan sebelumnya oleh Gabriel et al., (2015) yang menyatakan bahwa persentase monosit dan granulosit dari ikan tilapia yang diinfeksi oleh *Streptococcus iniae* meningkat setelah ujiantang. Sebagai tambahan, Aly et al., (2015) menyebutkan bahwa ikan nila tilapia yang divaksinasi dengan *A. hydrophila* tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit dibandingkan dengan ikan nila tilapia yang tidak divaksinasi.

Meningkatnya monosit dan sel granular ikan yang diimersi dengan ekstrak daun ketapang berarti menunjukkan peningkatan respon imun nonspesifik. Namun, jumlah limfosit yang stabil selama ujiantang mungkin mengindikasikan tidak adanya peningkatan dalam induksi imun spesifik. Seperti diketahui bahwa, monosit memainkan peranan penting dalam system pertahanan tubuh ikan. Monosit dapat bertransformasi menjadi makrofag dan mempunyai aktivitas fagositosis melawan patogen pada saat pengenalan pertama kali dan infeksi berikutnya. Sementara itu sel granular seperti neutrophil, bertanggung jawab pada saat infeksi pertama dan memfagositosis bakteri selama ujiantang. .

Selain penjabaran di atas, berdasarkan penelitian Aminah et al., (2014), di dalam ekstrak daun ketapang terdapat senyawa aktif yang memiliki sifat antibakteri sehingga mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa golongan alkaloid dan flavonoid adalah senyawa-senyawa yang berperan sebagai antibakteri di dalam daun ketapang. Hal tersebut juga pernah dikemukakan oleh Wahjuningrum et al., (2008) bahwa senyawa antibakteri pada ekstrak daun ketapang adalah flavonoid, tanin dan saponin. Manzur et al. (2011) melaporkan ekstrak daun ketapang mampu menghambat 70% bakteri gram positif dan 63% bakteri gram negatif dan ekstrak daun ketapang menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dari antibiotik yang digunakan secara komersial. Penelitian serupa oleh Muhammad and Mudi (2011) menyebutkan ekstrak daun ketapang ditemukan untuk menghambat *Escherichia coli* dan *Salmonella Typhi* pada 500 mg/disc dan mereka juga mengungkapkan bahwa ekstrak

tanaman tersebut mengandung fitokimia yang bertanggung jawab atas aktivitas terhadap *Salmonella Typhi*.

Hasil riset serupa yaitu oleh Nurjannah et al., (2013) yang menggunakan ekstrak daun sirsak dan diujikan ke ikan Mas diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* menyebutkan bahwa ikan uji dapat bertahan hidup setelah diinjeksi bakteri tersebut. Hal ini diduga karena penambahan ekstrak dari daun sirsak tersebut yang mengandung senyawa alami yang dapat mempengaruhi sistem ketahanan tubuh ikan. Seperti yang dikemukakan oleh Adewole and Caxton-Martins (2006) bahwa sirsak (*Annona muricata*) kaya akan berbagai macam senyawa seperti tanin, lakton dan alkaloid isokunolina dan bersifat antibakteri terhadap sejumlah bakteri patogen.

Di samping senyawa tersebut di atas, senyawa flavonoid merupakan senyawa yang efektif sebagai senyawa antimikroba karena disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan responnya terhadap infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme. Flavonoid termasuk salah satu senyawa polifenol yang memiliki bermacam-macam efek antara lain efek antioksidan, anti-tumor, anti radang, antibakteri dan antivirus.

Sementara itu, Nuria et al., (2009) menyatakan bahwa mekanisme senyawa tanin sebagai antibakteri bekerja dengan cara menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga bakteri tidak dapat terbentuk. Aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh tanin berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan sel. Sedangkan untuk mekanisme kerja flavonoid, (Cowan, 1999) menyebutkan bahwa flavonoid yang pada umumnya dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri Gram positif dan Gram negatif, membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Alkaloid sendiri mempunyai kemampuan dalam menginterkalasi dinding sel dan DNA sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

Kerusakan dinding sel akan menghambat sel-sel bakteri untuk tumbuh dan akhirnya bakteri akan mati. Secara umum, kerja

dari bahan kimia sebagai zat antibakteri tersebut dapat mengakibatkan perubahan yang menyebabkan kerusakan serta menghambat pertumbuhan sel bakteri. Terhambatnya pertumbuhan bakteri tersebut diduga dikarenakan peningkatan jumlah leukosit dalam tubuh ikan cupang setelah pemberian ekstrak cair daun ketapang.

Menurut Wahjuningrum et al., (2008) ketapang mengandung senyawa flavonoid yang bisa meningkatkan jumlah leukosit. Sukenda et al., (2008) menyebutkan bahwa leukosit adalah salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai pertahanan nonspesifik yang akan melokalisasi patogen secara fagositosis. Pada ikan Teleostei, leukosit adalah salah satu bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bersifat nonspesifik. Lengka et al., (2013) dalam penelitiannya juga menyebutkan, pada suatu jenis ikan, jumlah leukosit dapat berubah-ubah tergantung pada kesehatan ikan itu sendiri. Jumlah leukosit meningkat atau menurun apabila ada suatu bakteri patogen yang menginfeksi ikan tersebut. Hal ini didukung oleh pernyataan Martins et al., (2004), jika pada tubuh ikan terdapat infeksi dan ikan tersebut berupaya untuk melawan maka produksi leukosit akan tinggi, dikarenakan kinerja sistem imun ikan dalam mereduksi serangan patogen. Peningkatan jumlah leukosit tersebut tergantung pada jenis stress yang dialami ikan. Penelitian sebelumnya oleh Sang and Fotedar (2010) juga menunjukkan bahwa leukosit pada Marron (*Cherax tenuimanus*) meningkat secara signifikan setelah diberi dengan Bio-Mos. Penggabungan Bio-Mos dalam diet dapat merangsang dan meningkatkan tingkat proliferasi hemosit marron untuk mengimbangi hilangnya hemosit karena infeksi *Vibrio mimicus*.

Pasca injeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi*, leukosit ikan cupang pada kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak cair daun ketapang menurun secara signifikan. Antar jam ke-0 dan jam ke-96 tidak terdapat beda nyata yang signifikan kemungkinan dikarenakan pada rentang jam tersebut terjadi fluktuasi darah. Penurunan leukosit setelah injeksi bisa dikaitkan dengan haemolimph penggerak ke tempat injeksi dan hemosit lisis akibat kegiatan pertahanan. Leukosit berfungsi sebagai pertahanan tubuh yang bereaksi dengan

cepat ketika antigen masuk ke dalam tubuh ikan. Namun, leukosit dari kelompok yang diberi ekstrak cair daun ketapang tidak menurun setelah injeksi *Salmonella Typhi*. Sequeira et al., (1996) menemukan bahwa hemosit *Penaeus japonicus* memiliki kapasitas untuk berkembang biak dan tingkat proliferasi dapat meningkat tiga kali ketika udang yang diinjeksikan dengan lipopolisakarida imunostimulan.

## BAB 6

### BAWANG TIWAI

#### 6.1. Studi Kasus Bawang Tiwai

Salah satu tumbuhan obat yaitu bawang tiwai (*Eleutherine americana* Merr), merupakan tumbuhan yang biasa digunakan suku di Kalimantan sebagai obat tradisional. Bawang Tiwai, dikenal juga dengan bawang Dayak atau bawang Mekah, diakui dapat menyembuhkan berbagai penyakit dan berperan sebagai antibakteria dan antifungal, penyakit hati, kanker payudara, antiinflamasi, antitumor, dan agensia anti pendarahan, mempunyai efek hipoglikemik, anti hiperkolesterolemia karena adanya senyawa bioaktif fitokimia .

Hasil penelitian menyebutkan bahwa komponen bioaktif yaitu fenol, flavonoids, alkaloids, glikosida, steroid, triterpenoid dan tannins ditemukan di *Eleutherine palmifolia* Merr. Ekstrak daun *Eleutherine americana* Merr menunjukkan aktivitas antioksidan dan terdapat vitamin C. Lebih lanjut lagi, umbi dari *Eleutherine americana* Merr mengandung senyawa naphtoquinones (elecanacine, eleutherine, eletherol, eleutherinone) yang dikenal mempunyai sifat-sifat antimikrobia, antifungal, antiviral, dan antiparasitik. Selain naphtoquinones, anthraquinones yang mempunyai sifat-sifat antifungal juga ditemukan pada studi fitokimia *Eleutherine americana* Merr.

Penelitian yang dilakukan oleh Citarasu (2010) menyebutkan bahwa faktor pertumbuhan, antistress, aktivitas antimikrobia dan respon imunitas ikan dapat ditingkatkan dengan menambahkan senyawa fitokimia. Fitokimia merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan yang umumnya dijumpai di berbagai tumbuhan tropis. Sesuai dengan strukturnya, senyawa aktif dari tumbuhan dapat dikelompokkan menjadi senyawa alkaloids, flavonoids, pigments, phenolics, terpenoids, steroids dan minyak esensial. Penelitian lain menyebutkan bahwa fitokimia dari tanaman herbal dapat diberikan

pada ikan dan berguna sebagai antibakteria dan imunostimulan alamiah.

## **6.2. Potensi *Eleutherine americana* Merr Sebagai Antimikrobia dan Imunostimulan**

Berbagai macam masalah berhubungan dengan produksi akuakultur seperti penggunaan agensia antimikrobia dan senyawa kimia untuk meningkatkan imun respon harus dihindari. Meskipun antibiotika dan beberapa bahan kimiawi mempunyai efek positif pada ikan dan udang, hal tersebut seharusnya tidak diimplementasikan di akuakultur karena adanya efek residu yang tertinggal di otot ikan atau udang. Antibiotika mungkin menyebabkan beberapa strain bakteri menjadi resisten dan mengurangi pertumbuhan larva dan juga menghambat mekanisme pertahanan larva ikan.

Aplikasi antibiotika di udang juga akan meningkatkan biomagnifikasi, mengakibatkan penolakan terhadap ekspor udang ke berbagai wilayah. Lebih lanjut lagi, penggunaan antibiotika dan kemoterapi mungkin meningkatkan resiko pada manusia akan residu kimia di makanan dan resistensi antibiotika yang ada di patogen ke dalam manusia. Oleh karena itu, penggunaan tanaman atau tumbuhan obat seperti bawang tiwai sebagai antibakteria dan agensia imunostimulan untuk mencegah bakteri patogen dan meningkatkan efek imunostimulan di bidang akuakultur harus menjadi pertimbangan.

Phoem and Voravuthikunchai (2012) menyatakan bahwa bawang tiwai mempunyai zona hambat terhadap bakteri patogen gram positif tetapi tidak dapat melawan mikrobia intestinal. Aktivitas antimikrobia ekstrak bawang tiwai melawan *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp., dan *Penicillium* spp. telah diinvestigasi oleh Temilade (2009). Senyawa fenolik dan flavonoid dari herbal memainkan peranan penting dalam mencegah dan mengontrol infeksi mikrobia. Infeksi bakteri pada udang dapat dicegah dengan suplementasi bawang dengan mencampurkannya pada pakan tiap harinya .

Selain sebagai antimikrobia, bawang tiwai juga berpotensi sebagai imunostimulan yang dapat memodulasi mekanisme pertahanan atau imun respon agar ikan atau udang lebih tahan terhadap bakteri patogen. Imunostimulan dapat diaplikasikan sebagai bagian antisipasi untuk meningkatkan mekanisme pertahanan non spesifik. Imunostimulant merupakan kunci penting untuk memfasilitasi fungsi sel fagositosis, meningkatkan aktivitas bakterisidal dan menstimulasi sel pembunuh alami (*Nature killer cell*), meningkatkan sistem komplemen, memacu aktivitas lisozim, dan menaikkan respon antibodi pada ikan dan sejenisnya yang pada akhirnya meningkatkan proteksi terhadap infeksi penyakit.

Bawang tiwai telah diteliti mengandung senyawa tannin yang meningkatkan parameter imunitas pada ikan muda *Labeo rohita* fingerlings. Dalam masa 60 hari eksperimen, *Labeo rohita* yang diberi pakan mengandung tannin (2.5, 5.0, 10.0, 15.0 or 20.0 g kg<sup>-1</sup> pakan), menghasilkan peningkatan signifikan ( $P < 0.01$ ) total sel darah putih dan aktivitas *respiratory burst* dibandingkan dengan ikan kontrol. Sebagai tambahan, sejumlah senyawa aktif dari tumbuhan seperti saponin juga dilaporkan meningkatkan imunitas bawaan pada ikan sementara pemberian secara oral saponin meningkatkan migrasi leukosit pada ikan *yellowtail king*. Sangatlah mungkin bahwa senyawa bioaktif dan senyawa kimia tumbuhan obat, seperti bawang tiwai juga menunjukkan efek positif pada sistem imunitas pada ikan, oleh karena itu sangat disarankan suplementasi bawang tiwai pada pakan ikan akan bermanfaat meningkatkan respon imunitas ikan.

Bawang tiwai bermanfaat sebagai herbal yang mempunyai karakteristik kemampuan antimikrobia dan sebagai tonik yang meningkatkan imunitas karena senyawa-senyawa aktif seperti: alkaloids, flavanoids, phenolics, steroids dan tannin. Bawang tiwai juga diduga juga bermanfaat dalam industri Akuakultur karena kandungan fitokimianya yang berguna dalam menangani adanya infeksi penyakit pada ikan; meningkatkan kesehatan ikan, keamanan pangan dan kualitas sementara tetap menjadi lingkungan akuatiknya. Kondisi ini juga akan mengurangi efek samping penggunaan antibiotika dan senyawa kimia serta menerapkan akuakultur yang ramah lingkungan. Oleh sebab itu, beberapa peneliti

banyak melakukan percobaan dengan menggunakan bawang tiwai sebagai suplementasi pada berbagai hewan akuatik terhadap pertumbuhan dan respon imunitas.

Sementara itu selain bawang tiwai, ekstrak daun ketapang yang kaya akan tannin, flavonoid, triterpenoid, dan fenol juga merupakan agensia antibakteria terhadap ektoparasit ikan tilapia dan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pertumbuhan dua strain *A. hydrophila* dihambat dengan penambahan 0.5 mg mL<sup>-1</sup> ekstrak ketapang. Penelitian pada ikan ornamental (*Betta* sp.) juga membuktikan bahwa pemberian 500 ppm ekstrak ketapang secara imersi pada medium pemeliharaan ikan cupang efektif dalam menangkal *Aeromonas hydrophila*. Komponen aktif antibakteria pada tanaman mungkin akan bekerja dengan cara melisiskan dinding sel patogen, menghalangi sintesis protein, sintesis DNA, dan menghambat sekresi enzim.

### 6.3. Pertumbuhan dan Imunitas

Hasil pengujian Nugroho et al., (2016b), menyebutkan bahwa indikator pertumbuhan, kelulushidupan, efisiensi pakan, profil hematologi ikan patin yang diberi lima macam konsentrasi suplementasi ekstrak bawang tiwai, berbeda secara signifikan.

Tabel 6.1. Rata-rata ± Standard error (SE) parameter pertumbuhan dan profil leukosit ikan patin (*Pangasius* sp.) yang diberi pakan variasi konsentrasi ekstrak bawang tiwai (*Eleutherine americana*) selama 4 minggu.

Parameter	Kelompok				
	C	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
Berat awal (g)	16.21 ± 0.40 <sup>a</sup>	15.35 ± 0.54 <sup>a</sup>	16.72 ± 0.82 <sup>a</sup>	16.81 ± 0.52 <sup>a</sup>	15.71 ± 0.44 <sup>a</sup>
Berat akhir (g)	32.72 ± 1.37 <sup>a</sup>	40.01 ± 3.24 <sup>a</sup>	51.50 ± 4.63 <sup>b</sup>	51.44 ± 3.83 <sup>b</sup>	49.86 ± 2.99 <sup>abc</sup>
AWG (g)	4.12 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.85 <sup>a</sup>	8.69 ± 1.19 <sup>b</sup>	8.65 ± 1.01 <sup>b</sup>	8.53 ± 0.71 <sup>b</sup>
SGR (% per day)	2.33 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.71 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.69 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.83 ± 0.18 <sup>b</sup>
FE (%)	55.68 ± 0.01 <sup>a</sup>	67.38 ± 3.84 <sup>b</sup>	73.71 ± 4.36 <sup>b</sup>	73.80 ± 3.70 <sup>b</sup>	75.69 ± 2.02 <sup>b</sup>
Leukosit (10 <sup>6</sup> per mm <sup>3</sup> )	22.61 ± 1.47 <sup>a</sup>	18.45 ± 1.11 <sup>a</sup>	16.05 ± 0.36 <sup>ab</sup>	14.93 ± 0.91 <sup>ab</sup>	38.75 ± 2.31 <sup>c</sup>
Neutrofil (%)	7.00 ± 0.57 <sup>a</sup>	6.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.57 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.57 <sup>a</sup>	7.00 ± 0.57 <sup>a</sup>
Limfosit (%)	72.33 ± 2.18 <sup>a</sup>	68.66 ± 0.88 <sup>ab</sup>	69.00 ± 0.57 <sup>ab</sup>	67.33 ± 1.45 <sup>b</sup>	67.00 ± 1.15 <sup>b</sup>
Monosit (%)	20.66 ± 2.27 <sup>a</sup>	27.33 ± 1.20 <sup>b</sup>	25.00 ± 0.57 <sup>b</sup>	26.66 ± 0.88 <sup>b</sup>	26.00 ± 1.52 <sup>b</sup>
Aktivitas fagositosis (%)	76.67 ± 2.84 <sup>a</sup>	58.00 ± 2.51 <sup>b</sup>	64.67 ± 2.40 <sup>b</sup>	60.33 ± 2.84 <sup>b</sup>	68.33 ± 4.04 <sup>b</sup>

Rerata pada baris yang sama dan mempunyai huruf supersript (a, b, c) yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata signifikan ( $P < 0.05$ ). C = Kontrol groups P<sub>1</sub>= 15 g kg<sup>-1</sup>; P<sub>2</sub>= 30 g kg<sup>-1</sup>; P<sub>3</sub>= 45 g kg<sup>-1</sup>; P<sub>4</sub>= 60 g kg<sup>-1</sup>. AWG = Average weekly gain, FE = feed efficiency, SGR = Specific growth rate.

Setelah 4 minggu pemberian ekstrak bawang tiwai, ikan yang diberi suplementasi Ekstrak bawang tiwai 30-45 g kg<sup>-1</sup> dalam diet ikan patin mempunyai efek positif terhadap berat dan AWG dengan kisaran nilai 49.86- 51.50 g dan 8.53-8.69%. Tidak ada efek signifikan pada SGR (3.16-3.83% per hari tiap ikan) dan FE (67.38-75.69%) menunjukkan ditemukan pada ikan yang diberi suplementasi empat konsentrasi yang berbeda dalam diet ikan tersebut.

Studi tersebut juga menunjukkan nilai tertinggi leukosit (38.75 10<sup>6</sup> per mm<sup>3</sup>) ada pada ikan yang diberi suplementasi 60 g kg<sup>-1</sup> ekstrak bawang tiwai. Namun, persentase neutrophil kelompok ikan yang diberi berbagai variasi ekstrak bawang tiwai tidak menunjukkan ada perbedaan nyata dengan kelompok kontrol. Sementara itu, monosit dan aktivitas fagositosis tidak dipengaruhi oleh variasi konsentrasi pemberian ekstrak bawang tiwai.

Kemampuan fitokimia sebagai pemicu pertumbuhan dan imunomodulator pada diet berbagai ikan telah dipublikasikan. Sebagai contoh, suplementasi herba *Thymus vulgaris* dan vitamin E menghasilkan peningkatan performa pertumbuhan dan efisiensi pakan pada ikan *Acipenser stellatus*. Sementara itu, Dorojan et al., (2015) juga melaporkan bahwa ikan yang diberi pakan mengandung setidaknya 200 mg kg<sup>-1</sup> of ginseng (Ginsana G115) selama 17 minggu menunjukkan peningkatan pertumbuhan yang signifikan, efisiensi pakan dan profil hematologi yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan ginseng. Hasil yang mirip juga ada pada percobaan penambahan ekstrak tanaman *Yucca schidigera* dan *Quillaja saponaria* extracts (Nutrafito Plus®), pada ikan patin (*P. hypophthalmus*) yang menunjukkan pertumbuhan lebih baik, penggunaan pakan, dan parameter hematologi.

Laporan dari penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ada tiga kelompok senyawa penting yang telah dapat diisolasi dari bawang tiwai yaitu: naphthalene, naphtoquinones, dan anthraquinone. Sementara itu, Liu et al., (2010a) dan Kumar et al., (2015) menyatakan bahwa diet anthraquinone akan meningkatkan berat badan dan efisiensi pakan pada udang *Macrobrachium rosenbergii* serta memacu performa pertumbuhan, jumlah total leukosit pada kepiting *Cirrhinus mrigala* muda. Penelitian terkini

juga menemukan bahwa suplementasi umbi bawang tiwai pada diet ikan patin meningkatkan berat akhir dan AWG. Hasil tersebut selaras dengan penelitian Xie et al., (2008) dan Babak et al., (2012) yang menyatakan bahwa kelompok ikan *Rutilus frisii* yang diberi suplementasi dengan ekstrak 0.5%-2.0% antraquinone dari tumbuhan *Rheum palmatum* secara signifikan meningkatkan pertumbuhan.

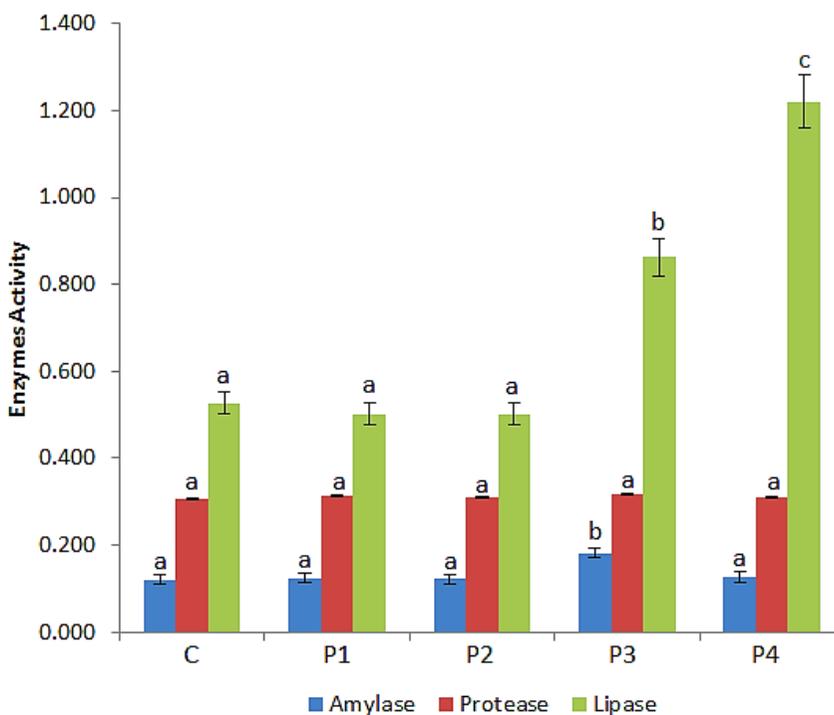
Selain meningkatkan performa pertumbuhan, suplementasi ekstrak bawang tiwai menaikkan kompetensi profil hematologi dan imunitas pada ikan patin. Nilai tertinggi hitung leukosit ditemukan pada ikan yang diberi suplementasi ekstrak bawang tiwai sebanyak 60 g kg<sup>-1</sup> EAE. Hal tersebut dimungkinkan karena adanya sifat-sifat pemicu imunitas dari senyawa anthraquinone yang dapat ditemukan pada ekstrak bawang tiwai. Hasil riset tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kumar et al., (2015) yang menyebutkan bahwa diet anthraquinone sebesar 1% menaikkan parameter hematologi.

Parameter hematologi seperti seperti leukosit, limfosit, neutrophil, dan monosit merupakan parameter penting untuk mengetahui kondisi Fisiologi ikan. Leukosit, neutrophil, limfosit, dan monosit yang digunakan sebagai indikator status hematologi pada ikan yang berhubungan dengan sistem imun pertahanan tubuh ikan dan regulasi fungsi imunologi pada organisme. Mekanisme ekstrak bawang tiwai dalam memicu parameter hematologi pada ikan patin tidak diketahui sepenuhnya. Diduga senyawa flavonoid yang juga ada di umbi bawang tiwai berperan dalam modulasi imun selular. Flavonoid yang ditemukan pada ekstrak bawang tiwai dapat bertindak sebagai biokatalisator terhadap produksi leukosit dan menstimulasi leukosit sebagai imunitas seluler nonspesifik.

#### **6.4. Efek terhadap Enzim Pencernaan**

Peningkatan parameter pertumbuhan dan profil hematoimunologi ikan sangat berhubungan erat dengan aktivitas enzim-enzim pencernaan yang memecah biomolekul besar ke molekul sederhana dan dapat diserap oleh usus. Hasil riset menunjukkan bahwa suplementasi EAE dalam diet meningkatkan

aktivitas enzim pencernaan pada ikan patin (*Pangasianodon hypophthalmus*). Aktivitas amilase dan lipase yang tertinggi ditemukan pada ikan patin yang diberi pakan bersuplementasi EAE konsentrasi lebih dari 30 g kg<sup>-1</sup> in the diet (Gambar 6.1).



Gambar 6.1. Aktivitas enzim pencernaan (Amylase, Protease, dan Lipase) *Pangasianodon Hypophthalmus*

Peningkatan aktivitas pencernaan mengindikasikan metabolisme yang lebih baik dalam hal penggunaan nutrient dan menghasilkan berat akhir dan pertumbuhan serta imunitas ikan yang baik. Aktivitas amylase yang tinggi ditunjukkan pada ikan yang diberi suplementasi pakan ekstrak bawang tiwai/*Eleutherine americana* extract (EAE) sebanyak 45 g kg<sup>-1</sup> dalam pakan ikan tersebut. Peningkatan aktivitas terjadi karena adanya senyawa aktif yang terkandung di dalam EAE yang kemudian menstimulasi aktivitas pencernaan, mengurangi waktu pencernaan dan pembuangan sisa makanan. Namun demikian, peningkatan diet EAE

dalam pakan sebesar 60 g kg<sup>-1</sup> menurunkan aktivitas amylase pada ikan patin. Penurunan aktivitas amylase juga pernah dilaporkan oleh Ieyama et al., (2011) yang menyatakan bahwa ekstrak metanol umbi bawang tiwai menunjukkan Potensi penghambatan aktivitas dan menekan pencernaan karbohidrat. Penghambatan terjadi karena adanya senyawa aktif dalam bawang tiwai yang dinamakan eleutherinoside dan terbukti dapat menekan pencernaan karbohidrat.

Selain amilase, pemberian EAE lebih dari 30 g kg<sup>-1</sup> dalam pakan ikan menunjukkan peningkatan yang signifikan aktivitas lipase. Hal yang serupa juga dilaporkan oleh Ojha et al., (2014) yang memaparkan bahwa suplementasi ekstrak etanol *Mucuna pruriens* yang mempunyai kemiripan kandungan senyawa aktif dengan bawang tiwai, memicu secara signifikan peningkatan aktivitas lipase interstinal pada *Labeo rohita*. Namun demikian, aktivitas protease pada ikan tidak menunjukkan beda nyata dengan pemberian EAE dalam pakan ikan patin. Penemuan ini juga sejalan dengan Penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa aktivitas tripsin dari *Mesopotamichthys sharpeyi* tidak dipengaruhi oleh suplementasi ekstrak jahe.

## BAB 7

### PROPOLIS

#### 7.1. Tinjauan Umum Propolis

Kata propolis telah dikenal sejak zaman Yunani kuno, dalam bahasa Yunani, kata propolis terdiri dari 2 kata yaitu *pro* dan *polis*. *Pro* memiliki arti pertahanan dan *polis* memiliki arti “kota”. Secara umum arti kata propolis adalah pertahanan kota. “Kota” yang dimaksud dalam hal ini adalah sarang lebah, yaitu tempat dimana lebah bekerja dan hidup. Serangan dan gangguan yang mengancam kehidupan lebah dan tempat tinggal mereka bisa berupa bakteri yang menimbulkan penyakit, bisa pula berupa binatang-binatang kecil yang berusaha masuk untuk mengganggu mereka. Propolis adalah bahan perekat atau dempul yang bersifat resin yang dikumpulkan oleh lebah pekerja dari kuncup, kulit tumbuhan atau bagian-bagian lain dari tumbuhan.

Lebah madu pengelana mengumpulkan propolis hanya pada hari-hari tertentu, yakni ketika udara hangat agar cairan resin menjadi lebih lembut dan elastis. Biasanya, lebah pengelana pemburu propolis mendekati sumber resin, lalu menggigitnya dengan rahang hingga membentuk sebuah bongkahan kecil. Bongkahan kecil selanjutnya disimpan di dalam kantong pollen di kaki lebah. Prosedur ini dilakukan berulang kali hingga kantong pollen di kedua kakinya penuh dan seimbang. Proses ini bisa dilakukan hingga satu jam, berpindah dari satu sumber ke sumber yang lain. Setelah kantong penuh, lebah pengelana pulang ke sarang dan bertemu dengan lebah sarang atau lebah rumah yang akan membantunya mengangkat resin yang terkumpul.

Para lebah rumah menggigit bongkahan resin dan mencampur bahan tersebut dengan enzim yang disekresikan dari kelenjar mandibula lebah, meskipun demikian komponen yang terdapat dalam propolis tidak mengalami perubahan sama sekali. Kemudian, lebah akan mencampurkan propolis dengan lilin lebah

dan menekan kuat ke area sarang yang dibutuhkan. Proses ini membutuhkan waktu berjam-jam hingga resin dikantong pollen tak tersisa. Setelah itu, lebah pengelana akan terbang ke luar sarang lagi untuk mencari resin baru.

Propolis diproduksi oleh lebah dari getah yang diambil dari bagian tumbuh-tumbuhan yang menghasilkan getah terutama tunas tumbuhan. Getah inilah yang menjadi bahan dasar pembentuk propolis. Getah ini dibawa ke dalam sarang lebah oleh para lebah pekerja dan dicampur dengan *wax* (Sejenis lilin) dan serbuk sari bunga. Dengan bantuan air liur lebah, campuran ini dibuat menjadi lentur dan ini yang disebut dengan propolis. Propolis memiliki variasi warna antara coklat kehijauan dan coklat tua. Bagi para lebah, propolis merupakan zat penting yang sangat fundamental yang mereka perlukan untuk sterilisasi sarang lebah dari serangan bakteri, jamur dan penyakit. Telah diperkirakan bahwa 200.000 lebah madu mampu menghasilkan 20 gr propolis per tahunnya. Propolis umumnya lembut, lentur dan lengket pada suhu 25°C - 45°C, tetapi pada suhu dibawah 15°C propolis bertekstur keras dan rapuh. Pada suhu 60-70°C propolis berwujud cairan. Beberapa jenis propolis memiliki titik didih sampai diatas 100°C.

## 7.2. Kandungan Propolis

Sarang lebah terdiri dari sekitar 50% senyawa resin (Flavonoid dan asam fenolat), 30% lilin lebah, 10% minyak aromatik, 5% polen dan 5% berbagai senyawa aromatik. Senyawa kimia utama dalam propolis terdiri atas senyawa golongan flavonoid, fenolik dan berbagai senyawa aromatik. Senyawa-senyawa tersebut sulit larut dalam air, sebagian besar mudah larut dalam alkohol dan kadang sulit larut dalam pelarut hidrokarbon. Propolis juga mengandung minyak, terpena, polen, dan lilin lebah yang kurang berperan secara signifikan dalam bioaktivitasnya. Sebagai tambahan bahan aktif lain yang ditemukan dalam propolis adalah sebagai berikut:

1. Resin

Resin yang ada di propolis berkisar antara 45 - 55%. Resin bagi tumbuhan berperan untuk melindungi tanaman dari serangan penyakit dan ancaman cuaca. Resin mengandung beberapa macam

yaitu senyawa keton, asam benzoat, steroid, lakton, dan sejumlah vitamin (vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, A, C, dan E).

2. Senyawa lilin

Lilin yang dibawa oleh lebah pekerja merupakan hasil sekresi dari kelenjar lilin dan dibawa ke bawah perut lebah. Lilin dikelompokkan menjadi dua yaitu lilin putih atau cera alba dan lilin kuning atau cera flava. Lilin lebah mengandung senyawa antara lain ikatan ester, asam lemak, dan rantai alkohol hidrokarbon.

3. Pollen

Pollen atau zat tepung yang dari sari bunga jantan, dibawa kaki lebah pekerja. Protein dan asam amino merupakan unsur utama dalam pollen. Dengan demikian dalam propolis banyak terdapat kandungan arginin dan prolin.

4. Mineral

Mineral-mineral banyak terdapat di dalam propolis. Di antaranya adalah zat besi, magnesium, seng, fosfor, kalium, mangan, flour, kalsium, dan natrium. Mineral dengan jumlah terbanyak dalam propolis adalah zat besi dan seng.

### 7.3. Manfaat Propolis

Pada saat ini kemajuan teknologi telah membawa manusia menemukan kekayaan manfaat propolis dalam berbagai segi kehidupan, terutama dibidang pencegahan dan pengobatan penyakit. Saat ini, dengan semakin meningkatnya kecenderungan orang untuk kembali kepada alam (*Back to nature*), yakni dengan mencari pengobatan alternatif yang lebih aman dan metode produksi yang menghindari pencemaran lingkungan maka keberadaan propolis pun semakin dimanfaatkan oleh manusia.

Beberapa khasiat dari propolis di bidang kesehatan dan kedokteran, yang telah dibuktikan melalui beberapa penelitian dan studi kasus yaitu antibodi, antioksidan, antispasme, antikoagulan, antifungal, antiinflamasi, antikanker, analgenik, antivirus, antiseptik, antidiabetik, antitumor dan anti-alergi. Selain itu, propolis memiliki manfaat dalam dunia kosmetik dan kesehatan kulit yaitu propolis mampu memberikan efek yang positif dalam meregenerasi dan memperbaiki jaringan.

Propolis disebut “antibiotik alami” karena kemampuan anti mikrobya. Senyawa aktif yang memberikan efek antibakteri adalah *pinocembrin*, *galangin*, asam *kafeat* dan asam *ferulat*. Senyawa antifunginya adalah *pinocembrin*, *pinobaksin*, asam *kafeat*, benzil ester, *sakuranetin* dan *pterostilbena*. Senyawa antiviralnya yaitu asam *kafeat*, *lutseolindan* *quersetin*. Asam *ferulat* berperan dalam pembekuan darah sehingga bisa dimanfaatkan untuk mengobati luka dan diberikan dalam bentuk salep. Asam *ferulat* inilah yang bersifat antibiotik, Zat ini efektif terhadap bakteri gram positif dan negatif .

Kelebihan propolis sebagai antibiotik alami dibandingkan dengan bahan sintetik adalah lebih aman serta efek samping yang kecil. Satu-satunya efek samping yang terjadi dan itu pun jarang yaitu timbulnya reaksi alergi jika digunakan secara lokal sedangkan bila diberikan secara peroral tidak menimbulkan alergi. Selain itu propolis sebagai antibiotik memiliki selektivitas tinggi. Propolis hanya membunuh penyebab penyakit sedangkan mikroba yang berguna seperti flora usus tidak terganggu.

Propolis yang sering digunakan dalam berbagai keperluan riset dapat berasal dari lebah madu *Trigona* sp. Lebah ini merupakan serangga sosial yang hidup berkelompok membentuk suatu koloni. Lebah ini mudah dijumpai di daerah tropis dan subtropis di Amerika Selatan, setengah bagian Afrika Selatan dan Asia Tenggara. Koloninya terdiri atas 300-800.000 ekor lebah. Jumlah madu yang dihasilkan lebah ini lebih sedikit dan lebih sulit diekstrak, namun jumlah propolis yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan lebah jenis lain.

#### **7.4. Efek Propolis terhadap Pertumbuhan dan Profil Darah Ikan Patin**

Propolis diduga dapat berfungsi sebagai pemicu pertumbuhan (Tabel 7.1) dan imunostimulan (Tabel 7.2). Imunostimulan digunakan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan. Pemberian ekstrak propolis pada pakan selain sebagai promotor pertumbuhan dalam penelitian ini juga digunakan untuk mengetahui kesehatan ikan patin melalui profil darahnya. Hasil analisis (Tabel 7.2) terhadap jumlah leukosit ikan patin yang diberi propolis

menunjukkan pengaruh tidak beda nyata signifikan ( $P > 0,05$ ). sebaliknya eritrosit dan hemoglobin menunjukkan adanya beda nyata signifikan ( $P < 0,05$ ). Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penambahan ekstrak propolis tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap total leukosit namun memberikan pengaruh terhadap total eritrosit dan hemoglobin pada ikan patin.

Tabel 7.1. Nilai rerata (Mean±SE) pertumbuhan individu, laju pertumbuhan dan laju pertumbuhan spesifik ikan patin (*Pangasius djambal*) setelah diberi perlakuan variasi ekstrak propolis (*Trigona* sp.) selama 4 minggu.

Parameter Uji	Perlakuan					
	K	P1	P2	P3	P4	P5
Pertumbuhan (gr)	0.0933±0.008 <sup>a</sup>	0.2533±0.02 <sup>b</sup>	0.3267±0.02 <sup>bc</sup>	0.3167±0.07 <sup>bcd</sup>	0.3733±0.03 <sup>cde</sup>	0.8367±0.11 <sup>f</sup>
Laju Pertumbuhan (%)	1.086667±0.01 <sup>a</sup>	1.2667±0.003 <sup>b</sup>	1.3933±0.05 <sup>bc</sup>	1.3467±0.06 <sup>bcd</sup>	1.4333±0.04 <sup>cde</sup>	2.0133±0.012 <sup>f</sup>
Laju Pertumbuhan Spesifik (x10 <sup>-2</sup> ) (%)	0.1789±0.07 <sup>a</sup>	0.2001±0.004 <sup>a</sup>	0.1617±0.03 <sup>a</sup>	0.01940±0.10 <sup>a</sup>	0.2141±0.03 <sup>a</sup>	0.5745±0.06 <sup>b</sup>

Keterangan: K = kontrol tanpa penambahan ekstrak propolis, P1 = Perlakuan 1 dengan penambahan ekstrak propolis 2 gr/kg pakan, P2 = perlakuan 2 dengan penambahan ekstrak propolis 4 gr/kg pakan, P3 = Perlakuan 3 dengan penambahan ekstrak propolis 6 gr/kg pakan, P4 = perlakuan 4 dengan penambahan ekstrak propolis 8gr/kg pakan, P5 = perlakuan 5 dengan penambahan ekstrak propolis 10gr/kg pakan. Retata yang diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang berbeda pada tiap parameter uji menunjukkan tidak ada beda nyata signifikan

Tabel 7.2. Nilai rerata (Mean±SE) profil darah ikan patin (*Pangasius djambal*) setelah perlakuan variasi suplementasi propolis (*trigona* sp.) Selama 4 minggu.

Variabel	Kelompok				
	K	P1	P2	P3	P5
Eritrosit ( $10^6 \mu\text{L}$ )	0.11	0.06	0.05	0.20	0.14
Leukosit ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0.9	1.1	0.6	2.17	1.17
Hemoglobin (g/dL)	0.93	0.7	0.73	0.83	0.77

Keterangan: K = kontrol tanpa penambahan ekstrak propolis, P1 = Perlakuan 1 dengan penambahan ekstrak propolis 2 gr/kg pakan, P2 = perlakuan 2 dengan penambahan ekstrak propolis 4gr/kg pakan, P3 = Perlakuan 3 dengan penambahan ekstrak propolis 6 gr/kg pakan, P4 = perlakuan 4 dengan penambahan ekstrak propolis 8gr/kg pakan, P5 = perlakuan 5 dengan penambahan ekstrak propolis 10gr/kg pakan.

Sistem peredaran darah berfungsi sebagai transport oksigen, karbondioksida, sari-sari makanan dan hasil metabolisme. Darah membawa substansi dari tempatnya dibentuk ke semua bagian tubuh dan menjaga tubuh dapat melakukan fungsinya dengan baik. Sel darah merah membawa oksigen, sel darah putih menjaga tubuh dari serangan organisme penyerbu. Pada masing-masing spesies jumlah sel darah juga berbeda-beda tergantung pada aktivitas ikan.

Hasil pemeriksaan hematologis selama pemberian propolis pada ikan patin memperlihatkan bahwa hemoglobin berkisar antara  $0,70-0,93 \text{ g dL}^{-1}$  dan eritrosit berkisar antara  $0,06-0,20 \times 10^6 \mu\text{L}$  (Tabel 4.2). Lukistryowati *dkk.*, (2007) menyebutkan bahwa, jumlah eritrosit ikan patin berukuran minimal 20 cm berkisar  $1,175-2,910 \times 10^6 \text{ sel/mm}$ , nilai ini jauh diatas dari rata-rata nilai eritrosit yang diperoleh dari hasil penelitian di atas, namun penambahan ekstrak propolis tetap memberikan pengaruh beda nyata signifikan antar masing-masing perlakuan. Menurut Dallman dan Brown *dalam* Susanto *et al.*, (2014), faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah eritrosit adalah perbedaan induk, nutrisi pakan, ukuran, aktivitas fisik dan umur. Dalam penelitian ini ukuran hewan uji yang digunakan jauh lebih kecil dibandingkan ikan yang digunakan dalam penelitian Lukistryowati yakni hanya berkisar 4-5 cm, sehingga ukuran ikan menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi jumlah eritrosit dan hemoglobin pada hewan uji.

Berdasarkan hasil penelitian Lukistryowati *et al.*, (2007) jumlah leukosit ikan patin berukuran minimal 20 cm berkisar  $230-416 \times 10 \text{ sel/mm}^3$ , nilai ini jauh lebih tinggi dibandingkan data yang diperoleh pada penelitian, hal ini diduga karena menurut Mardin *dalam* Susanto *et al.*, (2014) jumlah leukosit pada ikan bervariasi hal ini dipengaruhi oleh umur dan ukuran ikan, saat pengambilan darah ikan, ikan masih tergolong kecil panjang tubuh ikan berkisar 4-5 cm sehingga diduga hal inilah yang mempengaruhi jumlah leukosit (Lukistryowati *et al.*, 2007).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and S. Pillai. 2010. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Abdel-Tawwab, M., M. A. A. Mousa, and F. E. Abbass. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture* 272: 335-345.
- Abidin, S. 2010. Peran Propolis *Trigona* sp. Asal Padeglang Terhadap Tiga Bakteri Asam Laktat, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB Bogor.
- Adewole, S. O., and E. A. Caxton-Martins. 2006. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-Cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research* 9: 173 - 187.
- Ahmed, S. M., V. S. BM, P. G. R. Dhanapal, and V. Chandrashekara. 2005. Anti-Diabetic Activity of *Terminalia catappa* Linn. Leaf Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics* 4 (1): 36-39.
- Akah, P., O. Okpi, and C. Okoli. 2008. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial activities of bark of *Afzelia africana*. *Niger. J. Nat. Prod. Med.* 11: 48-52.
- Al-Ghais, S. M., and B. Ali. 1995. Xenobiotic metabolism by glutathione S-transferase in gill of fish from Arabian gulf. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology* 55: 201208.
- Alina, R. A., A. Sara, A. Barbu, and F. Molnar. 2009. The influence of organic selenium on the growth and survival performances of the common carp (*Cyprinus carpio* L.), galitian and lausitz variety, juveniles. *Bulletin UASVM Animal Science Biotechnology* 66: 1-2.
- Almendras, J. M. E., and E. S. Catap. 2002. Immunity and biological methods of disease prevention and control *Health*

- management in aquaculture. p 111-136. SEAFDEC Aquaculture Department.
- Al-Mohanna, S. Y., and M. N. Subrahmanyam. 2001. Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War. *z. Environmental International* 27: 321-326.
- Aly, S. M., A. S. Albutti, A. H. Rahmani, and N. M. A. Atti. 2015. The response of new-season Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8: 4508-4514.
- Aminah, S. B. Prayitno, and Sarjito. 2014. Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa*) Terhadap Kelulushidupan dan Histologi Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 3 (4): 118-125.
- Anggraini, A. D. 2006. Potensi propolis lebah madu *Trigona* spp. sebagai bahan antibakteri. Skripsi.
- Arthur, J. R. 2001. The glutathione peroxidases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1825-1835.
- Arts, I. C., and P. C. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S.
- Asgary, S., G. H. Naderi, and N. M. S. Askari. 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol.* 10: 88-90.
- Ashraf, M., and D. A. Bengtson. 2007. Effect of tannic acid on feed intake, survival and growth of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Int. J. Agric. Biol.* 9: 751-754.
- Babak, N., M. Reza, and A. Shabani. 2012. Effects of anthraquinone extract from *Rheum palmatum* on growth indices of *Rutilus frisii kutum*. *The African Journal of Animal and Biomedical Sciences* 7: 123-132.
- Babula, P., R. Mikelova, D. Patesil, V. Adam, R. Kizek, L. Havel, and Z. Sladky. 2005. Simultaneous determination of 1,4-naphthoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection. *Biomedical Paper* 149: 25.
- Ballarin, L., M. Dall'Oro, D. Bertotto, A. Libertini, A. Francescon, and A. Barbaro. 2004. Haematological parameters in *Umbrina*

- cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 138: 45-51.
- Baraboi, V. A., and E. N. Shestakova. 2004. Selenium: the biological role and antioxidant activity. *Ukrainskii khimicheskii zhurnal* 76: 23-32.
- Baratawidjaya, K. 2012. *Imunologi Dasar Edisi ke 10*. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. hal.
- Baratawidjaya, K. G. 2009. *Imunologi dasar*. 8 ed. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Barceloux, D. G. 1999. Selenium. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 37: 145-172.
- Bauchau, A. G. 1981. Invertebrate blood cells. In: N. A. Ratcliff and A. F. Rowley (eds.) *Crustacean*. Academic Press, New York.
- Bradley, J., and J. Jackson. 2008. Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. *Parasitology* 135: 807-823.
- Burdock, G. A., and R. J. Cousins. 2010. Amendment to the dossier in support of the generally recognized as safe (GRAS) status of Sel-Plex<sup>(R)</sup> as a food ingredient fusing science and compliance. p 1-173. Burdock group consultants, Orlando, Florida.
- Burk, R. F. M. 2002. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutrition and Clinical Care* 5: 75-79.
- Burk, R. F., and K. E. Hill. 1993. Regulation of selenoprotein. *Annual Review of Nutrition* 13: 65-81.
- Burr, G., M. Hume, W. H. Neill, and D. M. Gatlin III. 2008. Effects of prebiotics on nutrient digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 39: 1680-1686.
- Cardenas, W., J. A. Jenkins, and J. R. Dankert. 2000. A flow cytometric approach to the study of crustacean cellular immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 112-119.
- Chakraborty, S. B., P. Horn, and C. Hancz. 2014. Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture* 6: 1-19.

- Chansue, N., and N. Assawawongkasem. 2008. The in vitro Antibacterial Activity and Ornamental Fish Toxicity of the Water Extract of Indian Almond Leaves (*Terminalia catappa* Linn.). *KKU. Vet. J.* 18 (1): 36-45.
- Chapman, P. M. 2000. Selenium-fate and effects in the aquatic environment. . In: *Proceedings mine reclamation symposium*, William Lake, British Columbia, Canada. p 148-159.
- Chitmanat, C., K. Tongdonmuan, P. Khanom, P. Pachontis, and W. Nunsong. 2005. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. *Acta Horticultura* 678: 179-182.
- Chiu, S. T., S. L. Hsieh, S. P. Yeh, S. J. Jian, W. Cheng, and C. H. Liu. 2010. The increase of immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by feeding with selenium enriched-diet. *Fish Shellfish Immunology* 29: 623-629.
- Cho, C. 1987. La energía en la nutrición de los peces. *Nutrición en Acuicultura* 2: 197-243.
- Citarasu, T. 2000. Developing Artemia enrichment ayurvedic diet for promoting growth and reducing stress induced diseases in *Penaeus* spp, MS University, Tamil Nadu.
- Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int* 18: 403-414.
- Citarasu, T., K. Venkatramalingam, M. Micheal Babu, R. Raja Jeya Sekar, and M. Petermarian. 2003b. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International* 11: 581-595.
- Citarasu, T., R. Rajajeyasekar, K. Venketramalingam, P. S. Dhandapani, and M. P. Marian. 2003a. Effect of wood apple *Aegle marmelos*, *Correa* (Dicotyledons, Sapindales, Rutaceae) extract as an antibacterial agent on pathogens infecting prawn (*Penaeus indicus*) lariviculture. *Indian Journal of Marine Science* 32: 156-161.

- Cotter, P. A., S. R. Craig, and E. McLean. 2008. Hyperaccumulation of selenium in hybrid striped bass: a functional food for aquaculture?. *Aquaculture Nutrition* 14: 215-222.
- Coughlan, D. J., and J. S. Velte. 1989. Dietary toxicity of selenium-contaminated red shiners to striped bass. *Transactions of the American fisheries society* 118: 400-408.
- Courtois, J. 2009. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current opinion in microbiology* 12: 261-273.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Cuesta, A., M. A. Esteban, and J. Meseguer. 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular immunology* 43: 1275-1285.
- Daniels, C., D. Boothroyd, S. Davies, R. Pryor, D. Taylor, and C. Wells. 2006. Bio-Mos® improves the growth and survival of cultured European lobster. *Fish Farmer* 29: 24-27.
- Davis, M., C. Maxwell, G. Erf, D. Brown, and T. Wistuba. 2004. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *Journal of animal science* 82: 1882-1891.
- Dimitroglou, A., S. Davies, and J. Sweetman. 2008. The effect of dietary mannan oligosaccharides on the intestinal histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 150: S63.
- Dorojan, O. G. V., V. Cristea, M. Crețu, M. Coadă, L. Dediu, I. R. Grecu, and S. Plăcintă. 2015. Effect of thyme (*Thymus vulgaris*) and vitamin E on growth performance and body composition of *Acipenser stellatus* juveniles. *AAFL Bioflux* 8.
- Dörr, A. J. M., M. C. Abete, M. Prearo, N. Pacini, G. La Porta, M. Natali, and A. C. Elia. 2013. Effects of selenium supplemented diets on growth and condition indexes in juvenile red swamp crawfish, *Procambarus clarkii*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 484-492.

- Dörr, A. J. M., N. Pacini, M. C. Abete, M. Prearo, and A. C. Elia. 2008. Effects of a selenium-enriched diet on antioxidant response in adult crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere* 73: 1090-1095.
- El-Bayoumy, K. 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research* 475: 123-139.
- Ellis, A. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 827-839.
- Fatoni, A. 2008. Pengaruh propolis *Trigona* spp asal Bukittinggi terhadap beberapa bakteri usus halus sapi dan penelusuran komponen aktifnya. Tesis.
- Felton, G. W. 1995. Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates. In: S. Ahmad (ed.) *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. p 356-434. Chapman and Hall, New York.
- Felton, G. W., and C. B. Summers. 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29: 187-197.
- Firdaus-Nawi, M., and M. Zamri-Saad. 2016. Major Components of Fish Immunity: A Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 39.
- Foster, L. H., and S. Sumar. 1997. Selenium in health and disease: a review. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 37: 211-228.
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan*. Penerbit Rhineka Putra, Jakarta.
- Gabriel, N. N., J. Qiang, J. He, X. Y. Ma, M. D. Kpundeh, and P. Xu. 2015. Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish & shellfish immunology* 44: 504-514.
- Gadagbui, B. K. M., and M. O. James. 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquaculture Toxicology* 49: 27-37.
- Gao, J., X. Tang, H. Dou, Y. Fan, X. Zhao, and Q. Xu. 2004. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and

- its two triterpenoids. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 56: 1449-1455.
- Genc, M. A., E. Yilmaz, E. Genc, and M. Aktas. 2007b. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid Tilapia. *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) *Israel Journal of Aquaculture* 59: 10-16.
- Genc, M., M. Aktas, E. Genc, and E. Yilmaz. 2007a. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquaculture Nutrition* 13: 156-161.
- George, S. G. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. In: D. C. Malins and G.K.Ostrander (eds.) *Aquatic toxicology, molecular biochemical and cellular perspectives* p27-86 Lewis Publishers, Ann Arbor.
- Gerhard, N. S. 2001. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *Journal of The American College of Nutrition* 20: 1-4.
- Goda, A. M. A. S. 2008. Effect of dietary ginseng herb (Ginsana® G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society* 39: 205-214.
- Goyer, R. A. 1991. Toxic effects of metals. Casarett and Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. p 658-660. Pergamon Press, New York.
- Grisdale-Helland, B., S. J. Helland, and D. M. Gatlin. 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 283: 163-167.
- Guemouri, L., Y. Artur, B. Herbeth, C. Jeandei, G. Cuny, and G. Siest. 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clinical Chemistry* 37: 1932-1937.

- Guo, X., and L. Wu. 1998. Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotus indica* L. grown in selenium-laden soils. *Ecotoxicology Environmental Safety* 39: 207-214.
- Güroy, B., S. Mantoğlu, D. L. Merrifield, and D. Guroy. 2016. Effects of dietary nutrafito plus on growth, haematological parameters and total ammonia-nitrogen excretion of juvenile striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Research* 47: 1770-1777.
- Hall, G., and A. Guyton. 1997. Buku ajar fisiologi kedokteran. Setiawan, I., penerjemah. Terjemahan dari: Textbook of medical physiology Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hamilton, S. J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment* 326: 1-31.
- Hamilton, S. J., K. J. Buhl, F. A. Bullard, and E. E. Little. 2000. Chronic toxicity and hazard assessment of an inorganic mixture simulating irrigation drainwater to razorback sucker and bonytail. *Environmental and Toxicology* 15: 48-64.
- Hamilton, S. J., K. J. Buhl, N. L. Faerber, R. H. Wiedmeyer, and F. A. Bullard. 1990. Toxicity of organic selenium in the diet to chinook salmon. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 347-358.
- Han, A. R., H. Y. Min, J. W. Nam, N. Y. Lee, A. Wiryawan, W. Suprpto, S. K. Lee, K. R. Lee, and E. K. Seo. 2008. Identification of a new naphthalene and its derivatives from the bulb of *Eleutherine americana* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 56: 1314-1316.
- Hardi, E. H., G. Saptiani, I. W. Kusuma, W. Suwinarti, and R. A. Nugroho. 2017. Immunomodulatory and antibacterial effects of *Boesenbergia pandurata*, *Solanum ferox*, and *Zingiber zerumbet* on tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)* 10.
- Hardi, E. H., I. W. Kusuma, W. Suwinarti, I. Abbas, and R. A. Nugroho. 2016. Antibacterial activities of some Borneo plant extracts against pathogenic bacteria of *Aeromonas hydrophila*

- and *Pseudomonas* sp. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux) 9.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram, and M.-S. Heo. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317: 1-15.
- Hideaki, A., O. Ichiro, and M. Katsuyoshi. 1993. Cell type-specific roles in the hemocyte clotting system of the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 105: 11-15.
- Hilton, J. W., P. V. Hodson, and S. J. Slinger. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of Nutrition* 110: 2527-2535.
- Hilton, J. W., P. V. Hodson, and S. J. Slinger. 1982. Absorption, distribution, half-life and possible routes of elimination of dietary selenium in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemical and Physiology Part C* 71: 49-55.
- Hooge, D. M. 2004. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int. J. Poult. Sci* 3: 163-174.
- Hose, J. E., and G. G. Martin. 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 335-346.
- Hose, J. E., G. G. Martin, and A. S. Gerard. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. *The Biological Bulletin* 178: 33-45.
- Hose, J. E., G. G. Martin, and A. S. Gerard. 1992. Patters of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Biology bulletin* 183: 185-199.
- Hryniewiecka-Szffter, Z., and A. Babula. 1996. Total haemocyte counts and haematopoiesis in *Saduria Entomon* (Linnaeus, 1758) (Isopoda, Valvifera) from the Baltic sea infected with the yeast *Cryptococcus La Urentii* (Kufferath) Skinner\*). *Crustaceana* 69: 485-493.

- HSDB. 1995. Hazardous substance data bank. Denver, CO: Micromedex, Inc, Bethesda MD.
- Huang, Q. L., T. Liang, D. Wei, Zhang, and Z. Q-Y. 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemical and Physiology Part C* 147: 96-100.
- Ieyama, T., M. D. P. T. Gunawan-Puteri, and J. Kawabata. 2011.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chemistry* 128: 308-311.
- Insanu, M., S. Kusmardiyani, and R. Hartati. 2014. Recent studies on phytochemicals and pharmacological effects of *Eleutherine americana* Merr. *Procedia Chemistry* 13: 221-228.
- Irwin, R. J., M. VanMouwerik, L. Stevens, M. D. Seese, and W. Basham. 1997. Environmental contaminants encyclopedia National Park Service, Water Resources Division. Fort Collins, CO.
- Jacques, K. A. 2001. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. Science and Technology in the feed industry. In: Proceedings of Alltech's 17th annual symposium. p 319-348.
- Jang, Y. D., H. B. Choi, S. Durosoy, P. Schlegel, B. R. Choi, and Y. Y. Kim. 2010. Comparison of bioavailability of organic selenium sources in finishing pigs. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences* 23: 931-936.
- Johansson, M. W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, and K. Soderhall. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Jussila, J. 1997. Carapace mineralization and hepatopancreatic indices in natural and cultured populations of marron (*Cherax tenuimanus*) in Western Australia. *Mar Freshwater Res* 48: 67-72.
- Karimi, S. H., P. Kochinian, and A. P. Salati. 2013. Short Paper: The effect of sexuality on some haematological parameters of the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* in Persian Gulf. *IJVR* 14: 65-68.

- Keng, H. 1978. Orders and Families of Malayan Seed Plants. Singapore University Press, Singapore.
- Kim, Y. Y., and D. C. Mahan. 2003. Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian-australasian Journal of Animal Science* 16: 435-444.
- Kitagawa, S., H. Fujisawa, and H. Sakurai. 1992. Scavenging effects of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by elektron spin resonance spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 304-307.
- Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. Vlkova, and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal of Ethnopharmacology* 99 (2): 309-312.
- Kogan, G., and A. Kocher. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109: 161-165.
- Köllner, B., B. Wasserrab, G. Kotterba, and U. Fischer. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters* 131: 83-95.
- Kotob, M. H., S. Menanteau-Ledouble, G. Kumar, M. Abdelzaher, and M. El-Matbouli. 2016. The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research* 47: 98.
- Kresno, S. B. 1984. *Imunologi: diagnosis dan prosedur laboratorium*. Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kresno, S. B. 1996. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi ke 2.
- Kucukbay, F. Z., H. Yazlak, I. Karaca, N. Sahin, M. Tuzcu, M. N. Cakmak, and K. Sahin. 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition* 15: 569-576.
- Kum, C., and S. Sekkin. 2011. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs *Recent Advances in Fish Farms*. InTech.

- Kumar, S., C. Prakash, S. K. Gupta, N. K. Chadha, K. K. Jain, M. M. Ghughuskar, and P. K. Pandey. 2015. Effects of dietary anthraquinone extract on growth, metabolic and haemato-immunological responses of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fingerlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*: 1-10.
- Kuncoro, V. K. 2013. Natural red Colouring of Saltine Crackers with Bawang Dayak (*Eleutherine americana* Merr.), Swis German University, Indonesia.
- Kuntorini, E. M., and L. H. Nugroho. 2010. Structural development and bioactive content of red bulb plant (*Eleutherine americana*); a traditional medicines for local Kalimantan people. *Biodiversitas* 11: 102-106.
- Lengka, K., H. Manoppo, and M. E. F. Kolopita. 2013. Peningkatan Respon Imun Non Spesifik Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) Melalui Pemberian Bawang Putih (*Allium Sativum*). *Budidaya Perairan* 1 (2): 21-28.
- Liu, B., J. Xie, X. Ge, P. Xu, A. Wang, Y. He, Q. Zhou, L. Pan, and R. Chen. 2010a. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. *Fish Shellfish Immunology* 29: 49-57.
- Liu, J., K. Zhang, X. Ren, G. Luo, and J. Shen. 2004. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity. *Analitica Chimica Acta* 504: 185-189.
- Liu, K., X. J. Wang, Q. Ai, K. Mai, and W. Zhang. 2010b. Dietary selenium requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquaculture Research* 41: e594-e601.
- Lohner, T. W., R. J. Reash, V. E. Willet, and L. A. Rose. 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50: 203-216.
- Lukistyowati, I., Windarti, and M. Riauwati. 2007. Analisis Hematologi Sebagai Penentu Status Kesehatan Ikan Air Tawar di Pekanbaru. Laporan Hasil Penelitian. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau, Pekanbaru.

- Lyu, S. Y., and W. B. Park. 2005. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *Archives of pharmacal research* 28: 573-581.
- Mahan, D. C., and N. A. Parrett. 1996. Selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue swine. *The Journal of Animal Science* 74: 2967-2974.
- Mandloi, S., R. Mishra, R. Varma, B. Varughese, and J. Tripathi. 2013. Study on phytochemical and antifungal activity of leaf extracts of *Terminalia catappa*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4: B1385-B1393.
- Manzur, A., A. Raju, and S. Rahman. 2011. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa* extracts against some pathogenic microbial strains. *Pharmacology and Pharmacy* 2 (4): 299-305.
- Martins, M. L. et al. 2009. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 219-222.
- Martins, M. L., D. T. Nomura, D. M. Y. Myiazaki, F. Pilarsky, K. Ribeiro, M. P. d. Castro, and C. F. M. d. Campos. 2004. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to single and consecutive stress of capture. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 26 (4): 449-456.
- Mayland, H. 1994. Selenium in plant and animal nutrition. In: W. Frankenberger and S. B. (Jr) (eds.) *Selenium in the environment*. p 29-45. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Miksen, C., and D. Media. 2016. Aquariums: How does tannic acid affect aquariums? <http://pets.thenest.com/tannic-acid-affect-aquariums-12501.html> Accessed 12 November 2016.
- Mininel, F. J., C. S. Leonardo Junior, L. G. Espanha, F. A. Resende, E. A. Varanda, C. Q. Leite, W. Vilegas, and L. C. Dos Santos. 2014. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity.

- Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2014: 676902.
- Morton, J. F. 1984. Indian Almond (*Terminalia catappa*), salt-tolerant, useful, tropical tree with "Nut" worthy of improvement Economic Botany 39 (2): 101-112.
- Muhammad, A., and S. Y. Mudi. 2011. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of *Terminalia catappa*, Leaf Extracts. Biokemistri 23 (1): 35-39.
- Mussatto, S. I., and I. M. Mancilha. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydrate Polymers 68: 587-597.
- Nadkarni, K. M. 1976. Indian Materia Medica, 4th edn. Popular Prakashan, Bombay.
- Nagesh, T. S., N. Jayabalan, C. V. Mohan, T. S. Annappaswamy, and T. M. Anil. 1999. Survival and histological alterations in juvenile tiger shrimps exposed to saponin. Aquaculture International 7: 159-167.
- Nair, M. P. N., C. Kandaswami, S. Mahajan, K. C. Chadha, R. Chawda, H. Nair, N. Kumar, R. E. Nair, and S. A. Schwartz. 2002. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN $\gamma$ ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1593: 29-36.
- Navid, H. 2011. Selenomethionine in the diet can be actively transported through intestinal membrane and active accumulation in liver and muscle tissue (Navid, 2011). Advances in Environmental Biology 5: 1832-1835.
- Ninomiya, M., H. Hatta, M. Fujiki, M. Kim, T. Yamamoto, and R. Kusuda. 1995. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponin. Fish and Shellfish Immunology 5: 325-328.
- Nugroho, R. A., and R. Fotedar. 2013. Comparing the effects of dietary selenium and mannan oligosaccharide supplementation on the growth, immune function, and antioxidant enzyme

- activity in the cultured marron *Cherax cainii* (Austin, 2002). *Aquaculture International* 22: 585-596.
- Nugroho, R. A., and R. Fotedar. 2015. Effects of dietary organic selenium on immune responses, total selenium accumulation and digestive system health of marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002). *Aquaculture Research* 46: 1657-1667.
- Nugroho, R. A., H. Manurung, D. Saraswati, D. Ladyescha, and F. M. Nur. 2016a. The effects of *Terminalia catappa* L. leaves extract on the water quality properties, survival and blood profile of ornamental fish (*Betta* sp) cultured. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education* 8: 241-248.
- Nugroho, R. A., H. Manurung, F. M. Nur, and W. Prahastika. 2017. *Terminalia catappa* L. extract improves survival, hematological profile and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Betta* sp. *Archives of Polish Fisheries* 25: 103-115.
- Nugroho, R. A., Meylianawati, O. F. Asokawati, Y. P. Sari, and E. H. Hardi. 2016b. The effects of dietary *Eleutherine americana* on the growth, leukocyte profile, and digestive enzymes activity of *Pangasianodon hypophthalmus*. *Biology*. p 12. FMIPA, Universitas Mulawarman, Samarinda.
- Nur, A. M. 2011. Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik, pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nuria, M. C., A. Faizatun, and Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408.5 (2): 26-37.
- Nurjannah, R. D. D., S. B. Prayitno, Sarjito, and A. M. Lusiastuti. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Profil Darah Dan Kelulushidupan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 2 (4): 72-83.

- Oda, K., H. Matsuda, T. Murakami, S. Katayama, T. Ohgitani, and M. Yoshikawa. 2003. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. *Vaccine* 21: 2145-2151.
- Ogle, R. S., and A. W. Knight. 1989. Effects of elevated foodborne selenium on growth and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 795-803.
- Ojha, M., N. Chadha, V. Saini, S. Damroy, and S. Chandraprakash. 2014. Effect of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* on growth, metabolism and immunity of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings. *International Journal Fauna Biology Study* 5: 01-09.
- Parubak, A. S. 2013. Senyawa Flavonoid Yang Bersifat Antibakteri Dari Akway (*Drimys beccariana*.Gibbs). *Chemistry Progress* 6 (1): 34-37.
- Payne, R. L., and L. L. Southern. 2005. Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. *Poultry Science*.84: 898-902.
- Persson, M., L. Cerenius, and K. Soderhall. 1987. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases* 10: 471-477.
- Phoem, A., and S. Voravuthikunchai. 2012. Growth stimulation/inhibition effect of medicinal plants on human intestinal microbiota. *Food Sci Biotechnol* 21: 739-745.
- Phulwaria, M., K. Ram, Harish, A. K. Gupta, and N. S. Shekhawat. 2012. Micropropagation Of Mature *Terminalia catappa* (Indian Almond), a Medicinally Important Forest Tree. *Journal of Forest Research* 17 (2): 202-207.
- Platel, K., and K. Srinivasan. 2000. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Food/Nahrung* 44: 42-46.
- Pond, W. G., D. C. Church, and K. R. Pond. 1995. Inorganic mineral elements Basic animal nutrition and feeding. p 167-224. John Wiley and Sons, New York.

- Pourmoghim, H., M. Haghghi, and M. S. Rohani. 2015. Effect of dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on non-specific immune responses and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 4: 33-39.
- Pratiwi, D., S. Wahdaningsih, and Isnindar. 2013. The Test of Antioxidant Activity from Bawang Mekah Leaves (*Eleutherine americana* Merr) Using DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Method. *Traditional Medicine* 18: 9-16.
- Prusty, A. K., N. P. Sahu, A. K. Pal, A. K. Reddy, and S. Kumar. 2007. Effect of dietary tannin on growth and haemato-immunological parameters of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Animal Feed Science and Technology* 136: 96-108.
- Pryor, G., J. Royes, F. Chapman, and R. Miles. 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *North American journal of aquaculture* 65: 106-111.
- Rahimi Yadkooari, N., N. Zanguee, S. M. Mousavi, and M. Zakeri. 2015. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) extract on digestive enzymes and liver activity of *Mesopotamichthys sharpeyi* fingerlings. *Journal of the Persian Gulf* 6: 1-10.
- Rattanachaiakunsopon, P., and P. Phumkhachorn. 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J. Med. Plants Res.* 4: 393-396.
- Rayman, M. P. 2000. The Importance of Selenium to Human Health. *The Lancet* 356: 233-241.
- Reilly, C. 2006. Selenium in food and health. Springer Science and Business Media, New York, USA.
- Retnowati, Y., N. Bialangi, and N. W. Posangi. 2011. Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Media Yang Diekspos Dengan Infus Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Saintek* 6 (2).
- Reverter, M., N. Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs, and P. Sasal. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to

- chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquacult.* 433: 50-61.
- Rodrigues-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi, and J. Sweetman. 2008. Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*, and poly hydrobutyric acid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In: 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan. p 158.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Sado, R. Y., Á. J. D. A. Bicudo, and J. E. P. Cyrino. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of the world Aquaculture Society* 39: 821-826.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92.
- Saleh, C. 2010. Hypoglycemic Test of Crude Ethanol from *Eleutherine americana* Merr Bulb. *Mulawarman Scientifie* 9: 33-36.
- Salze, G., E. McLean, M. Schwarz, and S. Craig. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture* 274: 148-152.
- Samrongpan, C., N. Areechon, R. Yoonpundh, and P. Sirsapoome. 2008. Effects of mannan oligosaccharide on growth survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* linnaeus) fry. In: 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. p 345-353.
- Sang, H. M., and R. Fotedar. 2010. Dietary Mannan Oligosaccharide Improves Health Status Of The Digestive System Of Marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912). *Journal of the World Aquaculture Society* 42 (2): 230-241.
- Sang, H. Y. 2010. Role of immunostimulants in the culture of decapod crustacean, Curtin University, Perth, Western Australia.

- Saragih, B., M. Pasiakan, Saraheni, and D. Wahyudi. 2014. Effect of herbal drink plants Tiwai (*Eleutherine Americana* Merr) on lipid profile of hypercholesterolemia patients. *International Food Research Journal* 21: 1199-1203.
- Sari, W., L. Indrawati, and O. G. Djing. 2008. *Care Yourself, Hepatitis*. Penebar Plus, Jakarta.
- Saroj, P., V. M, J. KK, and P. M. 2012. An overview on immunomodulation. *J. Adv. Scient. Res.* 3(1): 7-12.
- Schrauzer, G. N. 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. In: L. T. Steve (ed.) *Advances in Food and Nutrition Research* No. Volume 47. p 73-112. Academic Press.
- Schütt, D. A., J. Lehmann, R. Goerlich, and R. Hamers. 1997. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *Journal of Applied Ichthyology* 13: 83-89.
- Schwarz, K., and C. M. Foltz. 1957. Selenium as an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society* 79: 3292-3293.
- Sequeira, T., D. Tavares, and M. Arala-Chaves. 1996. Evidence for Circulating Hemocyte Proliferation in the Shrimp *Penaeus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology* 20: 97-104.
- Sequeira, T., M. Vilanova, A. Lobo-da-Cunha, L. Baldaia, and M. Arala-Chaves. 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and female *Penaeus japonicus*. *The Biological Bulletin* 189: 376-380.
- Shatoor, A. S. 2011. Acute and sub-acute toxicity of *Crataegus aronia* syn. *azarolus* (L.) whole plant aqueous extract in wistar rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 6: 37-45.
- Shoemaker, C. A., P. H. Klesius, and J. J. Evans. 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American journal of veterinary research* 62: 174-177.
- Sidharta, E. P., and M. Sitanggang. 2009. *Mencetak Cupang Jawara Kontes*. PT. Agromedia Pustaka, Jakarta.

- Singboottra, P., F. Edens, and A. Kocher. 2006. Mannan induced changes in cytokine expression and growth of enteropathogenic *E. coli*-challenged broilers. *Reproduction Nutrition Development* 46: 134.
- Sivagurunathan, A., K. A. Meera, and B. X. Innocent. 2011. Investigation of immunostimulan potential of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in *Cirrhinus mrigala* exposed to *Pseudomonas aeruginosa*-haematological assessment. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2: 899-904.
- Smith, V. J., and K. Soderhall. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Research* 233: 295-303.
- Smith, V. J., J. H. Brown, and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immunology* 15: 71-90.
- Soderhall, I., and K. Soderhall. 2002. Immune Reaction. In: D. M. Holdich (ed.) *Biological of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd.
- Soderhall, K., and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Disease* 2: 3-23.
- Soderhall, K., M. W. Johansson, and V. J. Smith. 1988. Internal defense mechanism. In: D. M. Holdich and R. S. Lowery (eds.) *Freshwater crayfish: biology, management, and exploitation*. Croom Helm, London.
- Soltanian, S., and M. S. Fereidouni. 2016. Effect of henna (*Lawsonia inermis*) extract on the immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Int. Aquat. Res.*: 1-15.
- Spallholz, J. E., M. Boylan, and H. S. Larsen. 1990. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 587: 123-139.
- Speier, C., S. S. Baker, and P. E. Newburger. 1985. Relationships between in vitro selenium supply, glutathione peroxidase activity, and phagocytic function in the HL-60 human

- myeloid cell line. *Journal of Biological Chemistry* 260: 8951-8955.
- Sritunyalucksana, K., A. Intaraprasong, A. Piyachat, K. Filler, and D. F. Fegan. 2011. Organic selenium supplementation promotes shrimp growth and disease resistance to Taura syndrome virus. *Scienceasia* 37: 24-30.
- Staykov, Y., S. Denev, and P. Spring. 2005. The effects of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) on the growth rate and immune function of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus* G.) growth in net cages. Lessons from the past to optimise the future. *European Aquaculture Society, Special Publication*: 427-432.
- Stolz, J. F., and R. S. Oremland. 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 615-627.
- Su, B. K., and J. C. Chen. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology* 24: 74-81.
- Suely, A., H. Zabed, A. B. A. Ahmed, J. Mohamad, M. Nasiruddin, J. N. Sahu, and P. Ganesan. 2016. Toxicological and hematological effect of *Terminalia arjuna* bark extract on a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 42: 431-444.
- Sukenda, L., Jamal, D. Wahjuningrum, and A. Hasan. 2008. Penggunaan Kitosan Untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7(2): 159-169.
- Sunde, R. A. 1997. Selenium. In: B. L. O'Dell and R. A. Sunde (eds.) *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. p 493-556. Marcel Dekker, New York.
- Supriyadi, H., G. Taukhiddan, and Mukti. 1997. Sistem kekebalan (imunitas) pada ikan.
- Suranto, A. 2010. *Dahsyat Propolis Untuk Menggempur Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Susanto, A., H. T. Ferdinand, and Marsi. 2014. Toksisitas Limbah Cair Lateks Terhadap Jumlah Eritrosit, Jumlah Leukosit Dan Kadar

- Glukosa Darah Ikan Patin (*Pangasius sp.*). *Jurnal Aku. Raw. Indonesia* 2(2): 135-149.
- Suseno, D. 2009. Aktivitas Antibakteri Propolis *Trigona spp.* Pada Dua Konsentrasi Berbeda Terhadap Cairan Rumen Sapi. Skripsi.
- Sweetman, J., and S. Davies. 2006. Improving growth performance and health status of aquaculture stocks in Europe through the use of Bio-Mos®. In: *Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA, 23-26 April 2006.* p 445-452.
- Tapiero, H., D. M. Townsend, and K. D. Tew. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedical Pharmacy*.57: 134-144.
- Taylor, J. B., J. W. Finley, and J. S. Caton. 2005. Effect of the chemical form of supranutritional selenium on selenium load and selenoprotein activities in virgin, pregnant, and lactating rats. *The Journal of Animal Science* 83: 422-429.
- Temilade, I. B. O. 2009. *Effect of Eleutherine americana Merr. Bulb Extracts on Food Poisoning Staphylococcus aureus and its Application in Food Systems* Prince of Songkla University, Thailand.
- Thorarinsson, R., M. L. Landolt, D. G. Elliott, R. J. Pascho, and R. W. Hardy. 1994. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 121: 343-358.
- Tinggi, U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letter* 137: 103-110.
- Tinggi, U. 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine* 13: 102-108.
- Tjandrawinata, R., S. Maat, and D. Noviarny. 2005. Effect of standardized *Phyllanthus niruri* extract on changes in immunologic parameters: correlation between preclinical and clinical studies. *Medika* 6: 367-371.

- Tjitrosoepomo, G. 2010. Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Todd, S. A. 2006. Metabolism of selenium in cats and dogs, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Torrecillas, S., A. Makol, M. Caballero, D. Montero, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort, and M. Izquierdo. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & shellfish immunology* 23: 969-981.
- Tort, L., J. Balasch, and S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22: 277-286.
- Uboh, F. E., I. E. Okon, and M. B. Ekong. 2010. Effect of aqueous extract of *Psidium guajava* leaves on liver enzymes, histological integrity and hematological indices in rats. *Gastroenterol. Res.* 3: 32-38.
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, and G. Moran. 2011. Innate And Adaptive Immunity In Teleost Fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56 (10): 486-503.
- USEPA. 2004. Draft aquatic life water quality criteria for selenium. p 334. Office of water, Office of Science and Technology, Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- Vacca, L. L., and M. Fingerman. 1993. The role of hemocytes in tanning during the molting cycle: a histochemical study of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *The Biological Bulletin* 165: 758-777.
- Van de Braak, C. B. T., M. H. A. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W. P. W. van der Knaap, and J. H. W. M. Rombout. 2002. The Role Of The Haematopoietic Tissue In Haemocyte Production And Maturation In The Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology* 12 (3): 253-272.
- Verlecar, X. N., K. B. Jena, and G. B. N. Chainy. 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. *Chemosphere* 71: 1977-1985.
- Viswaranjan, S., S. Beena, and A. Palavesam. 1988. Effect of tannic acid on the protein, carbohydrate and lipid levels in the

- tissues of the fish *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Ecology* 6: 289-292.
- Wahab, A. S., and M. Julia. 2002. Sistem imun, imunisasi dan penyakit imun. Widya Medika. Jakarta. 101p.
- Wahjuningrum, D., N. Ashry, and S. Nuryati. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Daun Ketapang *Terminalia cattapa* Untuk Pencegahan Dan Pengobatan Ikan Patin *Pangasionodon hypophthalmus* Yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7 (1): 79-94.
- Wan, L. 2007. Determination of total selenium and seleno-amino acids in yeast and aquatic organism by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, University of Missouri-Columbia, Columbia.
- Wang, C., and R. T. Lovell. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152: 223-234.
- Wang, J. Q., W. Zhi-xiang, Y. Hong-yan, J. Yu-sheng, and Z. Jiang-cheng. 2011. Effects of dietary selenium sources on growth and immune indices in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University* 4: 4-40.
- Wang, Y., H. Jianzhong, L. Weifen, and X. Zirong. 2007. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology* 134: 243-251.
- Welker, T. L., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy, R. Shelby, and P. H. Klesius. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of the world Aquaculture Society* 38: 24-35.
- Winingsih, W. 2004. Kediaman lebah sebagai antibiotik dan antikanker. Pustaka Pikiran Rakyat, Jakarta.

- Wise, D. J., J. R. Tomasso, D. M. Gatlin, S. C. Bai, and V. S. Blazer. 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red bloods cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 177-182.
- Woock, S. E., W. R. Garrett, W. E. Partin, and W. T. Bryson. 1987. Decreased survival and teratogenesis during laboratory selenium exposures to bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 998-1005.
- Xie, J., B. Liu, Q. Zhou, Y. Su, Y. He, L. Pan, X. Ge, and P. Xu. 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture* 281: 5-11.
- Yeh, S. P., K. F. Liu, S. T. Chiu, S. J. Jian, W. Cheng, and C. H. Liu. 2009. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunology* 27: 181-191.
- Yilmaz, E., M. A. Genc, and E. Genc. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 59: 182e188.
- Zhan, X., Y. Qie, M. Wang, X. Li, and R. Zhao. 2010. Selenomethionine: an effective selenium source for sow to improve Se distribution, antioxidant status and growth performance of pig offspring. *Biological Trace Element Research*: 1-11.

## BIODATA PENULIS

### Penulis 1



**Rudy Agung Nugroho.** Saat ini adalah dosen tetap di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman Samarinda. Setelah menamatkan studi S<sub>3</sub> nya dari Curtin University Perth Western Australia, kembali mengabdikan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Samarinda, Kalimantan Timur dan mengampu mata kuliah fisiologi hewan, struktur perkembangan hewan, dan Metodologi penelitian.

Beberapa publikasi internasional terindeks Scopus telah diterbitkan dan pernah mengikuti seminar internasional di Prague, Czech Republic, Melbourne, Australia, Jeju, South Korea sebagai pembicara. Buku “Potensi Bahan Hayati sebagai Immunostimulan Hewan Akuatik” ini merupakan buku ke 4 yang telah ditulis dan diterbitkan. Sementara tulisan ilmiah lain yang telah ditulis diantaranya adalah: suplementasi bahan organik untuk peningkatan pertumbuhan dan imunitas pada hewan akuatik, A short review: the potential application of bawang tiwai (*Eleutherine* sp) as antibacterial and immunostimulan in aquaculture, Manual Histologi, Mengenal mencit sebagai hewan laboratorium, Penanganan hewan uji dan beberapa tulisan lainnya. Bidang yang ditekuni saat ini mengenai suplementasi bahan organik, prebiotik, probiotik, untuk peningkatan pertumbuhan dan imunitas pada hewan akuatik.

Kontak: rudysatriana@yahoo.com  
rudyangung.nugroho@fmipa.unmul.ac.id

## Penulis 2



**Firman M. Nur**, Lulusan S1 dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman, Menyelesaikan S1 dengan dengan menulis skripsi yang berjudul “Pengaruh Supplementasi Ekstrak Propolis *Trigona* sp. Terhadap Laju Pertumbuhan dan Profil Darah Ikan Patin (*Pangasius djambal*)”. Saat ini bekerja sebagai Pranata Laboratorium Pendidikan di Laboratorium Fisiologi, Perkembangan dan Molekuler Hewan, Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman.

Beberapa publikasi international terindeks Scopus telah diterbitkan seperti Effects of propolis (*Trigona* sp.) extract supplementation on the growth and blood profile of *Pangasius djambal* dan penulis juga pernah mengikuti seminar international Masyarakat Akuakultur Indonesia (Jakarta, 2015), International Conference on Mathematics, Science, and Computer Science (Balikpapan, 2016), dan International conference on tropical studies and its applications (Samarinda, 2017).

Kontak: [firmanmn19@gmail.com](mailto:firmanmn19@gmail.com)  
[firmanm.nur@fmipa.unmul.ac.id](mailto:firmanm.nur@fmipa.unmul.ac.id)