

STUDI EFEKTIFITAS SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NEES) UNTUK MENCEGAH PENYAKIT *EDWARDSIELLOSIS* PADA IKAN PATIN (*PANGASIUS HYPOPTHALMUS*)

Isje Lukistyowati¹⁾

Diterima : 15 Juni 2012 Disetujui: 30 Juni 2012

ABSTRACT

The aim of the research was to discover the effectiveness of sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) to prevent *Edwardsiella tarda* infection caused by *Edwardsiella tarda* in catfish (*Pangasius hypophthalmus*). Antibacterial activity test has been carried out from sambiloto solution on *E. Tarda* using disc diffusion method. The concentration sambiloto solution use were 0, 1g/l, 2g/l, 3g/l and 4g/l. This research show that sambiloto solution 5g/l forming the largest clear zone average 9,3 mm. The LD₅₀ test of sambiloto solution given by immersion for 24 h at catfish can harm fish survival when given at doses above 7,30 g / l.

Treatment applied was the different dosage of sambiloto by immersion ten minutes give for 30 days. Each fish was immersion with 1 g/l sambiloto (P1), 2 g/l sambiloto (P2) and 4 g/l sambiloto (P3). The fish was feed adlibitum with commercial fish feed pellets. Before 30 days treatment the fish were intramuscularly infected with *E. Tarda* with density of 10⁷ cell/ml in a dose of 0,1 ml/fish.

The best result was obtained in fish after challenged with *E.tarda* show a significantly between treatment in P3 (4g/l) ($P \leq 0.05$), as the survival rate was 100 % and non-specific defence in the catfish show hematocrite level is 22,67 %, total leucocytes is 31,70 thousand cell/mm³ and the percentage of phagocytotic activity at 55,5 %.

Keywords: Catfish, *Andrographis paniculata* , antimicrobial, *Edwardsiella tarda*

PENDAHULUAN

Ikan air tawar yang banyak dibudidayakan di daerah Riau dan mempunyai nilai ekonomis tinggi adalah jenis *catfish* seperti lele dumbo, patin dan baung. Jenis ikan ini sangat rentan terhadap penyakit *Edwardsielliosis* yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella tarda*. Infeksi *E. tarda* dapat menyebabkan mortalitas yang cukup tinggi

sehingga menyebabkan penurunan produktifitas pada ikan *catfish* dan dapat menyebabkan kerugian bagi pembudidaya ikan jenis ini (Anonim, 2011).

Umumnya pembudidaya sering melakukan pemberian berbagai macam antibiotik seperti *ampicillin*, *chloramphenicol*, *tetracycline* dan disinfektan pada ikan. Penggunaan antibiotik secara terus menerus bila penggunaannya tidak tepat dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten, terjadi penimbunan residu obat-

¹⁾ Staf Pengajar di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau Pekanbaru

obatan di dalam tubuh ikan dan lingkungan perairan, akhirnya dapat membahayakan konsumen yang mengkonsumsinya.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, perlu dicari alternatif lain sebagai pengganti antibiotik yang berasal dari tumbuhan alami yang dapat dijadikan sebagai bahan anti bakteri (*herbal medicine*). Salah satu tumbuhan alami yang dapat dijadikan sebagai bahan antibakteri adalah tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Tumbuhan sambiloto diketahui mengandung zat aktif seperti andrografolid, minyak atsiri, flavonoid dan tannin yang berfungsi sebagai anti bakteri, antiracun dan anti-infeksi (Sugiyanti, 2005; Maryani dan Rosita, 2006; Kadar, 2009). Tumbuhan ini telah dicobakan untuk pengendalian penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) secara *in vitro* dengan waktu perendaman yang tidak terbatas, dosis terbaik 0,4 g/l dengan persentase kelulushidupan 42,22 % (Taukhid dkk., 2005).

Zat aktif yang terkandung pada sambiloto bermanfaat bagi kesehatan, seperti andrografolid, minyak atsiri dan flavonoid yang berfungsi untuk mencegah penggumpalan darah, menghambat dan menghancurkan inti kanker, anti bakteri, anti racun, serta anti infeksi, dapat juga digunakan sebagai antibiotik untuk melawan serangan bakteri dan virus (Sudewo, 2004). Oleh karena itu, penulis tertarik

melakukan penelitian mengenai studi efektifitas sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) untuk mencegah penyakit *Edwardsiellosis* pada ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*).

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Nopember 2011 – Maret 2012 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.

Bahan dan Materi Penelitian

Sampel bakteri *E. tarda* yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Stasiun Karantina Ikan Kelas 1 Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru, sampel ikan patin yang digunakan berukuran 12-15 cm diperoleh dari petani ikan desa Kubang, Kabupaten Kampar Riau. Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.

Media tumbuh bakteri yang digunakan antara lain TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*), Aquabides, alkohol, ethanol 70 %, untuk membius ikan digunakan minyak cengkeh dan zat untuk pemeriksaan darah diperlukan EDTA, larutan Turk, lilin virtex, Giemsa, larutan sambiloto pembuatan menurut metode yang dilakukan Yulita (2002).

Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (Sujana, 1991), yaitu menguji sensitivitas larutan sambiloto terhadap *E. tarda*, menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor dengan 6 taraf perlakuan dan tiga kali ulangan, dosis yang digunakan adalah : P₀ (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol); P₁ (1g/l); P₂ (2 g/l); P₃ (3 g/l); P₄ (4 g/l) dan P₅ (5 g/l). Uji toksisitas (LD₅₀) larutan sambiloto terhadap ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) yang direndam selama 24 jam menggunakan Rancangan acak lengkap satu faktor dengan 5 taraf perlakuan dan tiga kali ulangan, masing-masing ulangan menggunakan 10 ekor ikan. Dosis yang digunakan adalah : P₀ (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol); P₁ (2g/l); P₂ (4 g/l); P₃ (6 g/l) dan P₄ (10 g/l). Untuk uji kelulushidupan ikan patin sambiloto yang diberikan secara rendaman selama 30 menit. Menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor dengan 5 taraf perlakuan dan tiga kali ulangan, masing-masing ulangan menggunakan 10 ekor. Dosis yang digunakan adalah : Kn (tanpa diberi larutan sambiloto/ kontrol negatif); KP (Tanpa diberi larutan sambiloto dan diinfeksi *E.tarda*); P₁ (1g/l); P₂ (2g/l); P₃ (4g/l). Perendaman dilakukan 30 hari, kemudian ikan patin di uji tantang dengan *E.tarda* secara intra muscular dengan

kepadatan bakteri 10⁷ sel/ml dengan dosis 0,1 ml/ekor. Untuk melihat ketahanan tubuh ikan dilakukan pengamatan hematologi (hematokrit, leukosit dan aktifitas fagositosis).

Jalan Penelitian

1. Sensitivitas bakteri (*Clear Zone*).

Pengamatan zona hambatan dilakukan dengan menggunakan metode cakram KIRBY-BAUER (Harmita dan Radji, 2008), dengan cara *disk blank* diberi larutan sambiloto sebanyak 50 µl dengan konsentrasi yang telah ditentukan (1g/l, 2g/l, 3g/l, 4g/l, 5g/l) dan akuades sebagai kontrol. *Disk blank* yang telah diberi larutan simplisia sambiloto diletakkan di atas media TSA yang telah berisi inokulan *E. tarda*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan zona hambatan yang terbentuk, kemudian diukur menggunakan penggaris.

2. Uji LD₅₀ larutan simplisia sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*).

Dosis yang digunakan untuk masing-masing perlakuan berdasarkan uji sensitifitas adalah (2 g/l, 4 g/l, 6 g/l dan 10 g/l), dijadikan untuk larutan sambiloto volume air 20 liter, ikan patin berukuran 12-15 cm dimasukkan sebanyak 10 ekor ke dalam masing-masing *aquarium* yang telah berisi larutan sambiloto. Pengamatan dilakukan selama 24 jam. Data yang didapat ditabulasi dengan perhitungan *analysis probit* (Harmita dan Radji, 2008)

3. Kelulus hidupan ikan patin setelah diinfeksi *E.tarda*

Ikan patin sebanyak 150 ekor dengan ukuran 12-15 cm dimasukkan secara acak ke dalam aquarium, masing masing aquarium diisi 10 ekor. Ikan yang direndam larutan sambiloto 30 menit dengan berbagai dosis diberikan selama 30 hari, kemudian ikan di uji tantang dengan *E. tarda* secara intra muscular dengan kepadatan bakteri 10^7 sel/ml dengan dosis 0,1 ml/ekor. Kelulushidupan ikan dihitung menurut Effendi (1979).

4. Pemeriksaan darah setelah perendaman dengan larutan sambiloto dan setelah ikan diinfeksi dengan *E.tarda*

4.1. Perhitungan Hematokrit

Ikan dibius dengan menggunakan minyak cengkeh 0,5 ml/l air, setelah ikan tenang darah diambil dengan menggunakan jarum suntik yang telah dibasahi dengan EDTA di vena caudalis sebanyak 0,3 ml. Darah ditampung dalam ependof, kemudian dimasukkan ke dalam kapiler hematokrit, ditutup dengan vitrex (penutup lilin), disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Nilai hematokrit dihitung dengan rumus menurut Anderson dan Siwicki (1994).

4.2. Pemeriksaan Total Leukosit

Sampel darah ikan dihisap dengan pipet leukosit sampai skala 0,5, dilanjutkan dengan menghisap larutan Turk sampai skala 11, dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyangkan pipet tersebut agar bercampur merata, dimasukkan ke dalam hemositometer

dan ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan total leukosit dihitung menurut Blaxhall dan Daisley (1973).

4.3. Aktifitas Fagositosis

Pengukuran aktifitas fagositosis dilakukan dengan metode ulas menurut Anderson dan Siwicki (1994), sampel darah ikan diambil sebanyak 50 μ l dimasukkan dalam mikrotiter plate kemudian ditambah suspensi *Staphylococcus aureus* dengan kepadatan 10^7 se//ml dalam *Phosphat Buffer Saline* sebanyak 50 μ l kemudian dimasukkan ke dalam mikrotiter plate, dihomogenkan, inkubasi selama 20 menit. Hasil inkubasi diambil sebanyak 5 μ l dibuat preparat ulas, diwarnai dengan pewarna Giemsa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Sensitivitas Larutan Simplisia Sambiloto (Andrographis paniculata Nees) Terhadap Edwardsiella tarda

Hasil uji *in vitro* menunjukkan bahwa larutan sambiloto mempunyai sifat anti bakteri terhadap *Edwardsiella tarda*. Hal ini dapat dilihat dari masing-masing rata-rata zona hambat yang terbentuk. Dosis P_5 (5 g/l) menghasilkan zona hambat sebesar 9,3 mm dan dosis P_4 (4 g/l) menghasilkan zona hambat 4,6 mm, sedangkan pada dosis P_3 (3 mg/l), P_2 (2 g/l) dan P_1 (1 g/l) tidak memperlihatkan adanya zona hambat. Zona hambat yang dihasilkan larutan sambiloto pada

dosis P₅ (5 g/l) memiliki sifat antibakteri yang kuat dibandingkan dengan dosis P₄ (4 g/l), hal ini dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi dari berbagai zat yang terkandung dalam sambiloto. Pertumbuhan bakteri tersebut terhambat disebabkan oleh konsentrasi zat toksik. Terhambatnya pertumbuhan bakteri dapat disebabkan karena perusakan dinding sel, perubahan permeabilitas sel, perubahan molekul protein, asam nukleat penghambatan kerja enzim dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Pelczar dan Chan, 1986). Besar kecilnya daerah zona hambatan yang terbentuk disekitar disk cakram tergantung dari konsentrasi bahan obat yang digunakan, bila bahan obat mengandung antibiotik maka pertumbuhan bakteri akan terhenti

dan disekitar disk cakram akan terlihat bening (Dwijoseputro, 1987).

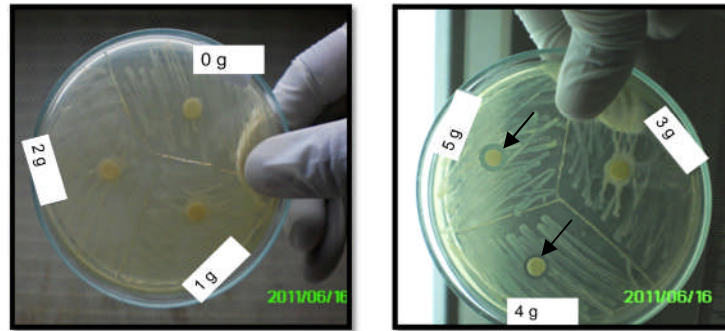
Hasil uji ANAVA menunjukkan zona hambat antar perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$). Pemberian larutan sambiloto dapat menghambat pertumbuhan *Edwardsiella tarda*. Zona hambat yang dihasilkan dari larutan sambiloto diduga karena kandungan senyawa utama *andrographolide* yang berperan sebagai antibiotik dan antibakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Susilo dkk., (1995) dan Kadar (2009) yang menyatakan bahwa tumbuhan sambiloto mengandung zat *andrographolide* yang berfungsi sebagai anti viral, bakteriostatik dan anti jamur, sedang minyak atsiri pada sambiloto juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji sensitivitas larutan sambiloto terhadap *E. tarda* dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Hasil uji sensitivitas larutan sambiloto (*Andrgraphis paniculata* Nees) terhadap *E. tarda*

Konsentrasi Perlakuan (g/l)	Zona Daya Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	I	II	III	
P ₀	0	0	0	0 ^a
P ₁	0	0	0	0 ^a
P ₂	0	0	0	0 ^a
P ₃	0	0	0	0 ^a
P ₄	4	6	4	4,6 ^b
P ₅	8	10	10	9,3 ^c

Superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

Keterangan : Dosis larutan sambiloto P₀ (kontrol); P₁ (1g/l); P₂ (2g/l); P₃ (3g/l); P₄ (4g/l); P₅ (5g/l).



Gambar 1. Lebar diameter zona hambatan berbagai dosis larutan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang terbentuk terhadap *E. tarda* (mm)

Sensitifitas sambiloto terhadap *Aeromonas hydrophila* dengan dosis 2 g/60 ml menghasilkan zona hambat sebesar 8,7 mm (Yulita, 2001), dan sensitifitas ekstrak sambiloto terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dosis 1,79 g/l menghasilkan zona hambat sebesar 11 mm (Mustofa, 2009), bila dibandingkan dengan *E. tarda* larutan sambiloto dengan dosis 4 g/l hanya mampu menghasilkan zona hambatan sebesar 4,6 mm. Akan tetapi dengan dosis 4 g/l sudah mampu menghambat ataupun membunuh *Edwardsiella tarda*. Senyawa *andrographolide*, *dehydro andrographolide*, *deoxy andrographolide*, *neon andrographolide* dan *nina andrographolide* pada sambiloto semuanya adalah senyawa diterpen turunan phenol yang diketahui memiliki kemampuan sebagai anti mikroba patogen dan juga terbukti mampu berperan sebagai antimikroba terhadap *E. tarda*. Mekanisme kerja senyawa turunan phenol membunuh bakteri dengan cara merusak membran sel sehingga berakibat terjadinya kebocoran sel yang ditandai dengan keluarnya makro molekul seperti protein dan asam nukleat dari dalam sel sehingga

berakibat terhambatnya aktivitas dan biosintesa enzim enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme sehingga mempengaruhi aktifitas pertumbuhan bakteri (Sugianti, 2005; Black, 1993).

Hasil Uji LD₅₀ (Lethal Dose 50%) Larutan Simplisia Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*)

Hasil uji LD₅₀ larutan simplisia sambiloto selama 24 jam dengan dosis P₀ (kontrol), P₁ (2 g/l) dan P₂ (4 g/l) tidak menimbulkan mortalitas pada ikan patin, sedang pada dosis P₃ (6 g/l) menyebabkan mortalitas sebesar 30% dan pada dosis P₄ (10 g/l) sebesar 100%. Larutan sambiloto tidak bersifat racun bagi ikan bila diberikan dibawah dosis 6 g/l, sehingga bila di aplikasi pada ikan diperlukan pembatasan dosis larutan yang tidak bersifat racun tetapi dapat meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap serangan bakteri. Toksisitas akan dimulai pada saat mekanisme pertahanan sudah habis atau jalur detoksifikasi (biokimia) mengalami kejenuhan sehingga ikan stres, ikan yang tidak tahan mengalami kematian (Darmono, 2001). Untuk

lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2.

Tabel 2. Analisis probit perendaman larutan simplisia sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) selama 24 jam pada ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*).

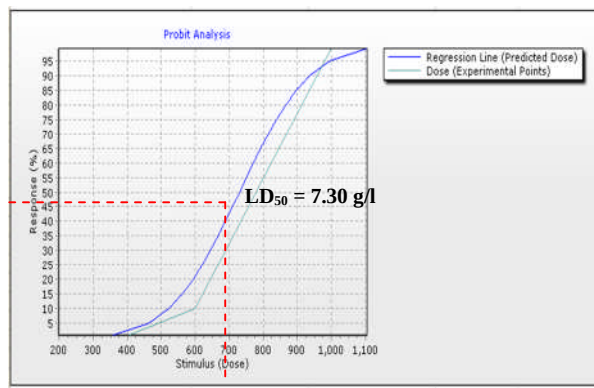
Konsentrasi Perlakuan (g/l)	Kelulushidupan (%)	N	Persentase aktual (%)	Probit
P0	100	30	0.0083	2.6056
P1	100	30	0.0083	2.6056
P2	100	30	0.0083	2.6056
P3	70	30	0.1	3.7183
P4	0	30	0.9917	7.3944

LD₅₀ 729.89 mg/100 ml (7.30 g/l)

Standar Error LD₅₀ 41.6215

Signifikan 0.05

Keterangan : N = jumlah populasi ikan, dimana tiap ulangan terdapat 10 ekor ikan
P0 (kontrol); P1 (2g/l); P2 (4 g/l); P3 (6 g/l) dan P4 (10 g/l).



Gambar 2. Dosis-respon kumulatif LD₅₀ efek toksik larutan simplisia sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*).

Pengetahuan tentang efek toksik dari suatu zat/obat dapat digunakan untuk meningkatkan kemampuan bagi mana menilai bahayanya suatu zat. Selain itu juga bermanfaat dalam melakukan tindakan pencegahan maupun pengobatan jika terjadi efek toksik atau keracunan. Tingkat kelangsungan hidup ikan patin berdasarkan hasil uji LD₅₀ larutan sambiloto menunjukkan bahwa

perlakuan yang memiliki kelulushidupan tertinggi terdapat pada perlakuan P₁ (2 g/l) dan P₂ (4 g/l) mencapai 100%, sedangkan kelulushidupan ikan patin yang terendah terdapat pada perlakuan P₄ (10 g/l) yakni 0%.

Analisis probit menunjukkan LD₅₀ larutan sambiloto yang diberikan secara rendaman pada ikan selama 24 jam terdapat pada dosis 7,30 g/l (Gambar 2). Bila

dibandingkan dengan Lukistiyowati (2011) yang menggunakan ekstrak bawang putih, LD₅₀ terdapat pada konsentrasi 0,85 g/l, sedangkan pada larutan sambiloto LD₅₀ terdapat pada dosis 7,30 g/l, ini menunjukkan bahwa dosis larutan sambiloto dibandingkan dengan bawang putih lebih aman bila diberikan pada ikan secara rendaman, karena larutan sambiloto dengan dosis 4 g/l sudah bersifat bakteriostatik maupun bakterisidal pada *E. tarda*.

Faktor lain yang menyebabkan mortalitas pada ikan patin adalah adanya zat saponin yang terkandung dalam larutan sambiloto. Saponin merupakan golongan senyawa glikosida yang dapat menimbulkan busa bila dikocok dalam air dan dapat menyebabkan hemolisis eritrosit dan dapat bersifat racun pada hewan akuatik/ikan. Saponin masuk ke dalam peredaran darah melalui insang, ketika mengambil oksigen dari air, saponin masuk ke dalam tubuh dan mengikat hemoglobin sehingga menyebabkan ikan kekurangan darah dan dapat menyebabkan kematian (Wordpress, 2009, Lukistiyowati, 2011).

Harmita dan Radji (2004) menyatakan bahwa dosis dan jumlah kelompok dosis harus cukup, sehingga dapat diperoleh dosis toksik dan dosis tidak berefek. Dosis toksik harus menyebabkan gejala toksik yang nyata pada hewan uji dan terjadi kematian tidak lebih dari 10 %. Sebagai dosis toksik biasanya digunakan 10 – 20 % dari harga LD₅₀ atau LC₅₀. Oleh karena itu dosis

larutan sambiloto yang digunakan dalam pengujian LD₅₀ sebaiknya memiliki toksisitas selektif setinggi mungkin tapi tidak berbahaya bagi hewan uji. Pada uji sensitivitas larutan sambiloto dengan dosis sebesar 4 g/l sudah dapat menghambat atau membunuh *E. Tarda* dan tidak menyebabkan toksik bagi ikan, dosis tersebut sudah mampu untuk mencegah bahkan mungkin dapat juga digunakan untuk mengobati penyakit *Edwardsiellosis* pada ikan.

Kelulushidupan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) setelah diuji tantang dengan *Edwardsiella tarda*.

Perendaman simplisia sambiloto untuk mencegah penyakit *Edwardsiellosis* yang disebabkan bakteri *E. tarda* memberikan pengaruh positif terhadap kelulushidupan ikan patin (*P. hypophthalmus*). Tingkat kelangsungan hidup ikan patin setelah uji tantang dengan *E. tarda* menunjukkan hasil pada P₁(1 g/l) tingkat kelulushidupan sebesar 16,67%, P₂ (2 g/l) sebesar 43,33%, P₃ (4 g/l) 100%, dan kontrol positif (Kp) sebesar 6,67%.

Pada perlakuan sambiloto dengan dosis P₃ (4 g/l) setelah uji tantang dengan *E. tarda* memiliki tingkat kelulushidupan tertinggi sebesar 100%, dibanding dengan kontrol positif sebesar 6,67%, ini menunjukkan bahwa perendaman dengan larutan sambiloto dapat meningkatkan sistem kekebalan

tubuh ikan terhadap serangan *E. tarda* sedangkan rendahnya tingkat kelangsungan hidup pada ikan kontrol positif diduga karena infeksi bakteri yang menyerang mengakibatkan ikan menjadi stres sehingga kondisi ikan menjadi lemah dan memudahkan berkembangnya penyakit yang dapat menyebabkan kematian. Taukhid dkk., (2005)

mengemukakan ikan mas yang terserang penyakit KHV yang diberi perlakuan simplisia sambiloto secara perendaman dengan waktu tidak terbatas dengan konsentrasi 400 mg/l kelulushidupannya sebesar 42,22%, sedangkan kontrol sebesar 12,78%. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kelulushidupan ikan patin pasca uji tantang dengan *E. tarda*

Konsentrasi Sambiloto	Rata-rata ikan hidup (ekor)		Rata-rata Kelulushidupan (%) setelah di infeksi $\pm$ SD
	setelah perendaman	setelah di infeksi	
Kn	10*	10**	100 $\pm$ 0,000 ^d
Kp	10*	0,67	6,67 $\pm$ 5,774 ^a
P ₁	10	1,67	16,67 $\pm$ 5,774 ^b
P ₂	10	4,33	43,33 $\pm$ 5,774 ^c
P ₃	10	10	100 $\pm$ 0,000 ^d

*Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Keterangan: *) tanpa diberi larutan simplisia sambiloto, **) tidak di infeksi *E. tarda*,

Kn: Kontrol negatif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol), Kp: Kontrol positif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto dan di infeksi *E. tarda*), P₁: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 1 g/l dan di infeksi *E. tarda*), P₂: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 2 g/l dan di infeksi *E. tarda*), P₃: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 4 g/l dan di infeksi *E. Tarda*)

Wahjuningrum dkk., (2007) menyatakan bahwa sambiloto dapat meningkatkan nafsu makan ikan sebelum di uji tantang dengan menggunakan bakteri. Penurunan bobot tubuh ikan uji terjadi setelah dilakukan uji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* 10⁵ cfu/ml, disebabkan karena menurunnya respon makan yang mengakibatkan rendahnya suplai energi untuk pertumbuhan. Ikan yang terinfeksi bakteri kehilangan nafsu makan dan penurunan respon makan diduga akibat kerusakan organ dalam seperti terjadinya pembengkakan organ hati dan ginjal (Plumb, 1999). Ikan yang

bertahan hidup disebabkan karena pertahanan non spesifiknya meningkat, ditunjang karena adanya zat aktif yang terkandung dalam larutan sambiloto. Nuratmi dkk., (1996) dan Wahyuningrum dkk., (2007) mengatakan salah satu manfaat daun sambiloto adalah meningkatkan nafsu makan ikan, disamping itu dapat juga menyembuhkan tukak pada ikan uji. Sambiloto juga dapat digunakan sebagai immunomodulator dan berperan pada sistim imun (Sembiring 2009).

Hasil uji ANAVA menunjukkan kelulushidupan ikan

patin yang diberi larutan sambiloto secara rendaman selama 30 hari kemudian di uji tantang dengan *E. tarda* menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol positif ($P < 0.05$). Hal ini disebabkan karena sambiloto mengandung laktone yang terdiri dari *deoxy-andrografolid*, *andrografolid*, *neandrografolid*, *14-deoxy-11-12-didehydroandrografolid* dan *homoandrografolid*, juga terdapat *flavonoid*, *alkane*, *ketone*, *aldehyde*, kalium, kalsium, natrium, asam kersik dan damar, dimana efek farmakologi tumbuhan tersebut dapat meningkatkan daya tahan tubuh, sebagai antibiotik, antipiretik (pereda demam), anti inflamasi (anti radang), hepatoprotektor, hipotensif, hipoglikemik, antibakteri, detoksikasi (penawar racun) dan analgesik (Tjitrosoepomo, 2005, Anonim, 2005).

Pemeriksaan Darah Ikan ikan Patin (*P. hypophthalmus*)

1. Hematokrit ikan Patin (*P. hypophthalmus*) yang direndam larutan sambiloto

Rata-rata persentase nilai hematokrit ikan patin setelah perendaman dengan berbagai dosis larutan sambiloto selama 30 menit yang diberikan selama 30 hari menunjukkan adanya peningkatan. Nilai hematokrit tertinggi terdapat pada perlakuan P_3 (4 g/l) yaitu sebesar 40,0%, dilanjutkan P_2 (2 g/l) sebesar 33,7%, P_1 (1 g/l) sebesar 30 %, dan Kp: Kontrol positif (tanpa

perendaman simplisia sambiloto) sebesar 26% demikian juga Kn (kontrol negatif). Nilai hematokrit dapat berubah tergantung dari suhu, pemberian pakan yang sehat serta ketahanan tubuh ikan (Bond, 1979). Nilai hematokrit pada ikan berkisar antara 35-50 %, bila nilai hematokrit rendah menunjukkan kondisi anemia. Nilai hematokrit dapat digunakan untuk mengetahui dampak pemakaian immunostimulan, karena itu dapat digunakan sebagai petunjuk kondisi kesehatan ikan setelah pemaparan dengan immunostimulan (Anderson dan Siwicki, 1995).

Pada saat ikan di uji tantang dengan *E. tarda* nilai hematokrit mengalami penurunan akan tetapi nilai hematokrit ikan patin pada perlakuan P_3 (4 g/l) masih dalam batas normal dan nilainya mendekati perlakuan kontrol negatif (tanpa diinfeksi) yaitu sebesar 22,67 %, sedangkan pada perlakuan P_2 (19,33 %), P_1 (14,00 %) dan Kp (10,67 %). Nilai hematokrit cenderung rendah apabila ikan terserang penyakit atau kehilangan nafsu makan akan tetapi walaupun nilai hematokrit tersebut mengalami fluktuatif, akan tetapi keadaan tersebut masih tergolong normal dan menunjukkan kondisi ikan secara umum dalam keadaan baik/sehat. Menurunnya nilai hematokrit dapat dijadikan petunjuk mengenai rendahnya kandungan protein, defisiensi vitamin atau ikan mendapatkan infeksi (Wedemeyer dan Yasutake 1977). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai rata-rata hematokrit ikan patin (*P. hypophthalmus*)

Konsentrasi Sambiloto	Rata-rata Nilai Hematokrit (%)		Rata-rata Nilai Hematokrit (%)
	setelah perendaman	setelah di infeksi	setelah di infeksi $\pm$ SD
Kn	26,0*	24,3**	24,33 $\pm$ 0,577 ^e
Kp	26,0*	10,7	10,67 $\pm$ 0,577 ^a
P ₁	30,0	14,0	14,00 $\pm$ 1,000 ^b
P ₂	33,7	19,3	19,33 $\pm$ 0,577 ^c
P ₃	40,0	22,7	22,67 $\pm$ 0,577 ^d

*Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Keterangan: *) tanpa diberi larutan simplisia sambiloto, **) tidak di infeksi *E. tarda*,

Kn: Kontrol negatif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol), Kp: Kontrol positif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto dan di infeksi *E. tarda*), P₁: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 1 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₂: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 2 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₃: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 4 g/l dan di infeksi *E. tarda*.

Setelah dilakukan uji ANAVA menunjukkan pemberian berbagai dosis larutan sambiloto pada ikan patin mempunyai pengaruh berbeda nyata terhadap nilai hematokrit setelah ikan diuji tantang dengan *E. tarda* ($P < 0,05$). Perendaman larutan sambiloto mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan saat terjadi infeksi *E. tarda* dibanding ikan yang tidak direndaman dengan larutan sambiloto (kontrol positif). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian sambiloto secara rendaman dapat meningkatkan nilai hematokrit ikan patin.

2. Total Leukosit ikan Patin (*P. hypophthalmus*) yang direndam larutan sambiloto

Perendaman larutan sambiloto memberikan pengaruh terhadap rata-rata total leukosit dalam menghadapi infeksi *E. tarda* pada ikan patin. Menurut Anderson

(1992) leukosit merupakan salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminir patogen melalui fagositosis. Leukosit pada ikan *channel catfish* sekitar $64,75 \times 10^3$ sel/mm³. Leukosit pada ikan akan meningkat, merupakan salah satu indikasi adanya fase pertama infeksi dan stres (Chinabut dkk., 1991).

Rata-rata total leukosit ikan patin berbeda-beda pada setiap perlakuan. Ikan patin yang diberi perlakuan berbagai dosis sambiloto secara rendaman leukositnya meningkat berkisar antara 36,3 – 57 ribu/mm³. Peningkatan jumlah leukosit disebabkan karena sambiloto mengandung *flavonoid* yang dapat mengaktifkan sistem limfe sehingga dapat meningkatkan produksi sel darah putih. Sambiloto dapat menyebabkan meningkatkan jumlah leukosit, karena masa beredar sel-sel darah putih di dalam darah sangat

singkat (Angka dkk., 2004). Rata-rata total leukosit ikan patin dapat

dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata Total Leukosit Ikan Patin (*P. hypophthalmus*)

Konsentrasi Sambiloto	Rata-rata Leukosit (ribu/mm ³)		Rata-rata Total Leukosit (ribu/mm ³) setelah di infeksi $\pm$ SD
	setelah perendaman	setelah di infeksi	
Kn	31,0*	32,80**	32,80 $\pm$ 1,000 ^c
Kp	31,0*	8,67	8,67 $\pm$ 0,577 ^a
P ₁	36,3	10,33	10,33 $\pm$ 1,528 ^a
P ₂	50,3	17,67	17,67 $\pm$ 0,577 ^b
P ₃	57	31,70	31,70 $\pm$ 0,577 ^c

*Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Keterangan: *) tanpa diberi larutan simplisia sambiloto, **) tidak di infeksi *E. tarda*,

Kn: Kontrol negatif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol), Kp: Kontrol positif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto dan di infeksi *E. tarda*), P₁: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 1 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₂: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 2 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₃: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 4 g/l dan di infeksi *E. tarda*.

Rata-rata total leukosit ikan patin (*P. hypophthalmus*) setelah direndam dengan larutan sambiloto kemudian diuji tantang dengan *E. tarda* mengalami penurunan disebabkan karena *E. tarda* mampu menginfeksi ikan patin, ikan yang tidak dapat bertahan mengalami kematian. Besarnya total leukosit bervariasi berkisar antara 8,67 – 32,80 ribu/mm³. Pada perlakuan P₃ dosis 4 g/l menghasilkan rata-rata total leukosit terbesar 31,70 ribu/mm³ yang hasilnya mendekati perlakuan Kontrol negatif/Kn sebesar 32,80 ribu/mm³. Pemberian larutan sambiloto dapat meningkatkan ketahanan tubuh ikan dan juga ditunjang dengan kelulushidupan ikan sebesar 100 % pada P₃(4g/l). Hal ini sesuai dengan pendapat Tjitrosoepomo (2005) mengemukakan bahwa efek farmakologi tumbuhan sambiloto

dapat meningkatkan daya tahan tubuh.

Berdasarkan uji ANAVA menunjukkan hasil rata-rata total leukosit ikan patin setelah pemberian simplisia sambiloto secara rendaman kemudian diuji tantang dengan *E. tarda* berbeda nyata ($P < 0,05$). Leukosit berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh ikan, yang bereaksi terhadap gangguan dari luar termasuk infeksi patogen dimana sel diangkut dari jaringan *limphomieloid* ke area-area tubuh yang memerlukan. Organ *limphomieloid* adalah gabungan jaringan *limphoid* dan *mieloid*, berfungsi sebagai organ pembentuk respon kekebalan dan darah (Anderson, 1992; Moyle dan Cech, 1988). Selain itu *andrographolide* pada sambiloto dapat meningkatkan daya fagositosis sel darah putih dan meningkatkan kekebalan tubuh dan bersifat bakteriostatik yang berperan

dalam sistim imun (Sembiring, 2009).

3. Aktivitas Fagositosis ikan Patin (*P. hypophthalmus*) yang direndam larutan sambiloto

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan patin yang diberi perlakuan sambiloto menunjukkan rata-rata persentase aktivitas fagositosisnya meningkat. Rata-rata persentase aktivitas fagositosis pada perlakuan P₃ (4 g/l) mengalami peningkatan setelah ikan diuji

tantang dengan *E.tarda* sebesar 55,50 %, sedang pada perlakuan P₁ (1 g/l) sebesar 27,43 % dan P₂ (2 g/l) sebesar 42,00 % . Fagositosis merupakan proses yang normal didalam tubuh, tetapi biasanya dipicu oleh adanya bakteri yang masuk ke dalam tubuh dan tubuh berupaya untuk mempertahankan diri dengan meniadakan antigen tersebut secara non spesifik dengan cara memfagositosis (Scombes, 1996). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 6

Tabel 6. Rata-rata persentase leukosit ikan patin (*P. hypophthalmus*) yang melakukan aktivitas fagositosis.

Konsentrasi Sambiloto	Rata-rata Leukosit yang melakukan aktivitas fagositosis (%)		Rata-rata Leukosit yang melakukan aktivitas fagositosis setelah perendaman %
	setelah perendaman	setelah di infeksi	
Kn	31,28*	26,65**	26,65 ^a
Kp	28,44*	20,00	20,00 ^a
P ₁	35,19	27,43	27,43 ^a
P ₂	42,35	42,00	42,00 ^b
P ₃	53,44	55,50	55,50 ^c

*Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Keterangan: *) tanpa diberi larutan simplisia sambiloto, **) tidak di infeksi *E. tarda*,

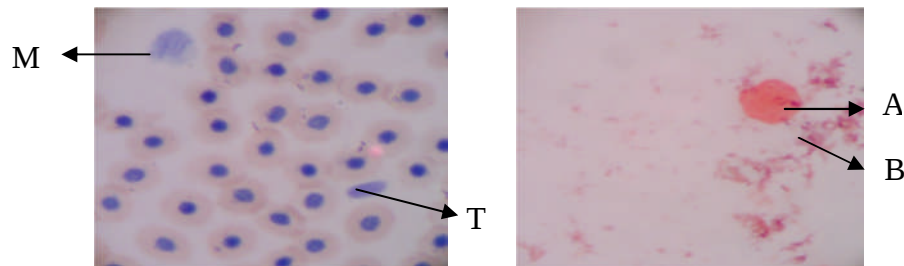
Kn: Kontrol negatif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto sebagai kontrol), Kp: Kontrol positif (tanpa diberi larutan simplisia sambiloto dan di infeksi *E. tarda*), P₁: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 1 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₂: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 2 g/l dan di infeksi *E. tarda*, P₃: Pemberian larutan simplisia sambiloto dengan dosis 4 g/l dan di infeksi *E. tarda*.

Berdasarkan uji ANAVA hasil aktivitas sel leukosit yang melakukan aktivitas fagositosis setelah pemberian larutan sambiloto pada ikan patin secara rendaman kemudian diuji tantang dengan *E. tarda* berbeda nyata (P<0,05). Adanya zat aktif dalam sambiloto seperti lakton yang terdiri dari *deoksiandrografolid*, *andrografolid*, *neoandrografolid*, *flavonoid*,

saponin, *alkane*, *keton*, *aldehid*, *mineral* (kalsium, kalium, natrium) mampu meningkatkan sel leukosit melakukan aktivitas fagositosis dengan jalan menstimulasi produksi antibodi spesifik, meningkatkan proliferasi dan meningkatkan fagositosis makrofag, air rebusan sambiloto dapat merangsang daya fagositosis sel leukosit (Anonim, 2005). Sel monosit dan neutrofil ikan

patin yang berperan dalam fagositosis dapat dilihat pada

Gambar 3.



Gambar 3. Jenis leukosit ikan patin setelah Infeksi *E.tarda*. Monosit (M), Trombosit (T), sel neutrofil yang melakukan aktifitas fagositosis (A), masa bakteri (B).

Dalam fagositosis makrofag memegang peranan penting demikian juga sel neutrofil, monosit dan eosinofil (Scombes, 1996). Sambiloto mengandung *flavonoid* yang berfungsi mengaktifkan sistem limfe sehingga dapat meningkatkan produksi sel darah putih. Pemberian sambiloto dapat meningkatkan proses penyembuhan tukak pada ikan bila dibanding dengan ikan kontrol, sambiloto diduga berkhasiat dapat menghilangkan pembengkakan, anti radang, bakteriostatik, dan dapat meningkatkan fagositosis sel leukosit. Selain *andrographolide*, sambiloto juga mengandung *saponin*, *flavonoid* dan *tannin* yang berperan sebagai senyawa anti bakteri dan memicu system kekebalan tubuh (Giyarti, 2000).

4.Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi timbulnya penyakit pada ikan. Kualitas air yang berada di luar kisaran optimum untuk kehidupan ikan akan dapat menyebabkan ikan mengalami stres, sehingga ikan mudah terserang penyakit.

Menurut BSNI (2002), kisaran suhu untuk kegiatan pembesaran di kolam ikan patin adalah 25-30 °C dan pH antara 6,5-8,5. Suhu dan pH setiap perlakuan selama penelitian masih berada dalam kisaran kebutuhan hidup ikan patin. Suhu media selama penelitian berkisar antara 26,2-28,3 °C dan pH berkisar antara 6,3-6,9. Data kualitas air dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Kisaran Kualitas Air Selama Penelitian

Perlakuan	Parameter Kualitas Air			
	Suhu (°C)	pH	DO (mg/l)	NH ₃ (mg/l)
Kn	26,2-28,2	6,3-6,8	5,3-5,7	0,03-0,05
Kp	26,2-28,3	6,3-6,9	5,2-5,6	0,04-0,05
P ₁	26,2-28,3	6,3-6,8	5,2-5,5	0,04-0,05
P ₂	26,2-28,3	6,3-6,8	5,2-5,5	0,04-0,06
P ₃	26,2-28,3	6,3-6,8	5,2-5,5	0,04-0,06
Normal (BSNI)	25-30	6,5-8,5	>4	<0,001

Nilai pH terendah sebesar 6,3 masih dapat ditolerir oleh ikan. Batas terendah yang menyebabkan kematian ikan adalah pH 4,0 (Boyd, 1982). Kisaran pH pada pemeliharaan ikan uji cenderung stabil karena selama pemeliharaan dilakukan pembersihan akuarium dengan penyiponan setiap hari sehingga kisaran pH tersebut layak untuk pemeliharaan ikan. Ikan patin mempunyai kelangsungan hidup yang tinggi dan mampu beradaptasi dengan baik terhadap kondisi perairan yang ekstrim seperti kandungan oksigen terlarut dan pH yang rendah (Slembrouck dkk, 2005).

Konsentrasi oksigen terlarut (DO) selama penelitian berkisar antara 5,2-5,7 mg/l. Kondisi tersebut masih dianggap layak untuk budidaya ikan, nilai ini masih dalam kisaran normal sesuai dengan pendapat Boyd (1982), bahwa oksigen terlarut kurang dari 1 mg/l akan menyebabkan kematian ikan dan oksigen terlarut antara 1-5 mg/l cukup mendukung kehidupan ikan.

Kadar amoniak yang didapatkan selama pemeliharaan ikan uji berkisar antara 0,03-0,06 mg/l. Boyd (1982) menyebutkan konsentrasi amoniak dalam air bagi kehidupan ikan tidak boleh melebihi 1 mg/l, karena jika konsentrasinya berlebih akan meningkatkan konsumsi oksigen pada jaringan tubuh dan menyebabkan kerusakan pada insang. Batas konsentrasi kandungan amoniak yang dapat

mematikan kehidupan ikan adalah antara 0,1-0,3 mg/l air.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Larutan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terbukti efektif menghambat pertumbuhan *E. tarda* pada konsentrasi P₄ (4 g/l) dengan rata-rata zona hambat sebesar 4,6 mm. Hasil uji LD₅₀ ikan patin yang direndam larutan sambiloto terdapat pada konsentrasi 7,30 g/l. Larutan sambiloto terbukti aman digunakan untuk mencegah penyakit *Edwardsiellosis* pada ikan patin, pada dosis P₃ (4 g/l) setelah diuji tantang dengan *E. tarda* kelulushidupan mencapai 100 %.

Larutan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terbukti efektif dalam pembentukan sistem kekebalan tubuh ikan patin (*P. hypophthalmus*). Perendaman simplisia sambiloto dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi rata-rata nilai hematokrit, total leukosit dan aktifitas fagositosis ikan patin (*P. hypophthalmus*). Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi terbaik terdapat pada P₃ (4 g/l) dengan nilai hematokrit sebesar 22,67% dan total leukosit sebesar 31,70 ribu/mm³ dan aktifitas fagositosis sebesar 55,50 %.

Saran

Disarankan untuk menggunakan larutan sambiloto metode perendaman dibawah dosis 7,30 g/l. Perlu dilakukan penelitian

pengobatan terhadap penyakit *Edwardsiellosis* dengan cara perendaman, maupun dicampaur dalam pakan untuk mempermudah pemberian pada ikan baik digunakan untuk pencegahan maupun pengobatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulant, Adjuvant and Vaccine Carrier in Fish : Application to Aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 21 : 281-307
- , and A.K. Siwicki. 1994. *Simplified Assays for Measuring Nonspecific Defense Mechanisms In Fish*. Rough Draft for Presentation at the Fish health Section / American Fisheries Society Meeting . Seattle, Washington . 26 ps
- , and A.K. Siwicki. 1995. *Basic Haematology and Serology for Fish health program*. In : Diseases in Asia Aquaculture II. Shariff, M., J.R. Arthur, P.P. Subangsinghe (Eds). Fish Health section Asian Fisheries Society. p. 185 – 202.
- Angka SL, BP Priosoeryanto, BW Lay, E Harris. 2004. Penyakit *Motile Aeromonad Septicaemia* pada ikan lele dumbo *Clarias sp.* *Forum Pascasarjana*, 27: 339-350.
- Anonim. 2005. Tanaman Obat Indonesia. www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id diakses 10 September 2012
- Anonim. 2011. http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Edwardsiella_tarda#classification. Diakses tanggal 19 maret 2011
- Bastiawan, D., A. Wahid., M. Alifudin, dan I. Agustawan. 2001. Gambaran Darah Lele Dumbo (*Clarias spp*) yang Diinfeksi Cendawan *Aphanomyces sp* pada pH yang Berbeda. *Jurnal Penelitian Indonesia* 7(3) : 44-47.
- Black, J.G. 1993. *Microbiology Principle and Applications*. Englewood Cliffs. New Jersey.
- Blaxhall, P.C. 1972. The Haematological Assesment of The Health Of Freshwater Fish. *Journal of Fish Biology*. 4 : 593 – 605.
- Blaxhall, P.C. and K.W. Daisley. 1973. Routine Haematology Methods for Use With Fish Blood. *Journal of Fish Biologi* 5 : 577-581
- Bond, C.E. 1979. *Biology of Fishes*. Sounders College Publishing Philadelpia. 514 p

- Boyd, C. E. 1982. Water Quality Criteria in Warmwater Fish Ponds. United States of Amerika. Auburn. 359 p.
- [BSNI] Badan Standarisasi Nasional Indonesia, 2002. Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*) Produksi kelas pembesaran di kolam (SNI 01-6483.5-2002). wordpress.com. (20 November 2010).
- Chinabut S, C Limsuwan, P Kitsawat. 1991. Histology of The Walking Catfish *Clarias batrachus*. Department of Fisheries Thailand.
- Darmono. 2001. Lingkungan Hidup Dan Pencemaran Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). 179 hal.
- Dwijoseputro, D., 1987. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta.
- Effendi, M.I. 1979. Metode Biologi Perikanan. Yayasan Dewi Sri. Bogor. 128 hal
- Giyarti, D. 2000. Efektifitas Ekstrak Daun Jambu biji (*Psidium guajava*), Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) dan Sirih (*Piper betle* L) terhadap Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Bogor
- Harmita, M. Radji. 2008. Analisis Hayati. Buku Ajar Departemen Farmasi FMIPA Ed. 3. Jakarta: EGC. 167 halaman.
- Kadar VR. 2009. Peningkatan Kadar Andrografolid dari Kultur Sel *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex Ness Melalui Teknik Amobilisasi Sel Dalam Bioreaktor. Bandung : Program Studi Magister Bioteknologi SITH. Tesis
- Kuswardani, Y. 2006. Pengaruh pemberian Resin Lebah Terhadap Gambaran Darah Maskoki *Carassius auratus* Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Lukistyowati, I. 2005. Analisis Penyakit Ikan. Universitas Riau Press. Pekanbaru.
- Lukistyowati, I. 2011. Efektifitas Bawang Putih (*Allium sativum* L) Untuk meningkatkan Ketahanan tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) terhadap Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia*. Disertasi Program Doktor Ilmu Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hawan Universitas Gadjah Mada 242 hal
- Maryani dan Rosita. 2006. Efektivitas Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*), dan Daun Sirih (*Piper Betle* L.) Dalam Menanggulangi Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Journal Penelitian Taruma Negara.

- Moyle, P.B. and J.J. Chech Jr. 1988. *Fish. An Introduction to Ichthyology*. Prentice-Hall Inc. A Division of Simon and Schuster Engelwood Cliffs. New Jersey. 597 p.
- Mustofa. 2009. Aktivitas Antibakterial Ekstrak Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus* Asal Susu Sapi Perah Penderita Mastitis. *J. Penelit. Med. Eksakta*. Vol. 8, No. 1, April 2009:39-45
- Nuratmi, Adjiri, B., Paramita. D.I. 1996. Beberapa Penelitian Farmakologis Sambiloto (*Andrographis paniculata*). Kumpulan Abstrak. Warta Tumbuhan Obat Indonesia, 3 (1): 1-24; 33-34.
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1986. Dasar Dasar Mikrobiologi 2. Penerbit Universitas Indonesia 443 hal.
- Plumb, J.A. 1999. Health Maintenance of Cultured fish. Principal Microbial Diseases. Ch III Pathology. CRS. Press In Boca Raton. Florida. pp 37- 45.
- Secombes, C.J. 1996. *The Non-specific Immune System, Cellular Difference in the Fish Immune System* edited by Iwama, G and T. Nakamishi. Academic Press. New York. 367 p.
- Sembiring, B.Br. 2009. Pengaruh Konsentrasi Bahan Pengisi Dan Cara Pengeringan Terhadap Mutu Ekstrak Kering Sambiloto. *Jurnal Bul. Littro*. Vol. 20 (2) : 173-181.
- Singh P, Srivastava MM, Khemani LD. 2009. Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* Nees in rats. *Upsala Journal of Medical Sciences* 114:136-139
- Slembrouck, J.; Komarudin, O.; Maskur dan Legendre, M. 2005. Petunjuk Teknis Pembenihan Ikan Patin Indonesia (*Pangasius djambal*). [Terjemahan dari: Technical Manual for Artificial Propagation of The Indonesian Catfish]. Subandi A dan Khan Z (penerjemah). Kerjasama IRD dengan PRPB-BRKP. Karya Pratama. Jakarta
- Sudewo, B. 2004. Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit. Jakarta: Agromedia Pustaka. 142 hlm.
- Sudjana. 1991. Metode Statistik. Tarsito. Bandung. 486 hal.
- Sugianti, B. 2005. Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional Dalam Pengendalian Penyakit Ikan. Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS-702) Sekolah Pasca sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Susilo J, Hanani E, Soemiati A, dan Hamzah L. 1995. Bagian Parasitologi FKUI dan Jurusan Farmasi FMIPA UI Warta Perhipba Warta Perhipba No.Flll, Jan-Maret
- Taukhid, I. suharni dan H. Supriyadi. 2005. Efektifitas Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) Bagi Pengendalian Penyakit Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan

- Mas (*Cyprinus carpio* L). Balai Riset Perikanan.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 447 hlm.
- Wahyuningrum, D. Tarono dan S.L. Angka. 2007. Efektifitas Rebusan Campuran Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness), Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Dan Daun Sirih (*Piper Betle* L) Untuk Mencegah Penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicaemia*) Pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp)
- Wedemeyer, G.A. and W.T. Yasutake. 1977. *Clinical Method for the Assessment of The Effect of Enviromental Stress on Fish Health*. Technical paper of the U.S. Fish and Wildlife Service. Us Department of the Interior. *Fish and Wildlife Service*. 89 : 1-171.
- Wordpress. 2010. Saponin. <http://purwaisontheway.wordpress.com/2010/04/13/saponin-menyebabkan-kematian-ikan>. Diakses pada tanggal 28/2/2012.
- Yulita, 2002. Efektifitas Bubuk Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.), Daun Sirih (*Piper betle* L.), dan Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burn F.) Untuk Pencegahan dan Pengobatan Pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) Yang Terinfeksi Dengan Bakteri *Edwardsiella tarda*. Skripsi. IPB. Bogor.