

**PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN KETAPANG *Terminalia cattapa* UNTUK
PENCEGAHAN DAN PENGOBATAN IKAN PATIN *Pangasionodon hypophthalmus*
YANG TERINFEKSI *Aeromonas hydrophila***

**The use of Cattapa Leaves *Terminalia cattapa* as Preventive and Curative Methods in Patin
Catfish *Pangasionodon hypophthalmus* Infected With *Aeromonas hydrophila***

D. Wahjuningrum, N. Ashry, dan S. Nuryati

*Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*

ABSTRACT

Motile Aeromonad Septicaemia (MAS) caused by *Aeromonas hydrophila* induced serious epidemics of ulcerative disease in freshwater fish including patin catfish *Pangasionodon hypophthalmus*. *In vitro* study for antibacterial test of cattapa leaves *Terminalia cattapa* (TC) were done previous to the *in vivo* test. The *in vitro* susceptibility test was performed at the dosages of 30, 60 and 90 g/l TC. At the *in vivo* test, fish were injected intramuscularly with TC at the dosages of 60 g/l for the prevention and 120 g/l for curative efficacy. Results from blood picture, clinical sign and mortality showed that TC were better and more effective as preventive than curative for MAS in patin catfish.

Keywords : *Terminalia cattapa*, *Aeromonas hydrophila*, patin catfish

ABSTRAK

Penyakit MAS (*Motile Aeromonad Septicaemia*) yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* sering menyebabkan wabah penyakit tukak pada ikan-ikan air tawar termasuk pada ikan patin *Pangasionodon hypophthalmus*. Uji antibakteri secara *in vitro* dari daun ketapang *Terminalia cattapa* (TC) dilakukan sebelum uji *in vivo*. Pada uji *in vitro* dilakukan pengujian aktivitas antibakteri TC terhadap *A. Hydrophila* pada dosis TC 30, 60 dan 90 g/l. Pada uji *in vivo*, ikan diinfeksi secara intramuskular dengan TC, untuk pencegahan dengan dosis 60 g/l TC dan pengobatan pada dosis 120 g/l TC. Hasil yang diperoleh dari gambaran darah, gejala klinis dan kematian ikan patin menunjukkan bahwa TC lebih baik dan sangat efektif untuk pencegahan daripada pengobatan untuk penyakit MAS pada ikan patin.

Kata kunci: *Terminalia cattapa*, *Aeromonas hydrophila*, ikan patin

PENDAHULUAN

Ikan patin, *Pangasionodon hypophthalmus* merupakan jenis ikan konsumsi air tawar, berbadan panjang berwarna putih perak dengan punggung berwarna kebiru-biruan. Ikan patin merupakan ikan yang berprospek cerah karena permintaannya yang tinggi di masyarakat. Hal inilah yang menyebabkan ikan patin mendapat perhatian dan diminati oleh para pengusaha untuk membudidayakannya.

Penyakit merupakan salah satu masalah yang sering dijumpai dalam usaha budidaya

ikan patin. Salah satu yang menjadi ancaman adalah penyakit infeksi oleh bakteri. Bakteri yang sering menyerang ikan patin adalah penyakit bakteri yang juga biasa menyerang ikan-ikan air tawar jenis lainnya, yaitu *Aeromonas hydrophila* (Supriyadi *et al.*, 1998). Bakteri ini menyebabkan penyakit *Motile Aeromonad Septicaemia* (MAS). Ikan yang terserang akan mengalami pendarahan pada bagian tubuh terutama dada, perut, dan pangkal sirip. Ikan patin yang terkena penyakit akibat bakteri mudah menular sehingga harus segera dimusnahkan. Sedangkan yang terinfeksi ringan dapat dicoba dengan beberapa cara pengobatan.

Selama itu, obat-obatan yang digunakan untuk menanggulangi penyakit MAS adalah antibiotik seperti nitrofurantoin dan kalium permanganat. Sebagai ikan konsumsi, pengobatan dengan menggunakan antibiotik sangat berbahaya bagi manusia karena akan membentuk residu di dalam tubuh ikan maupun manusia. Selain itu, pemakaian antibiotik sebagai obat utama dalam penanganan suatu penyakit akan menimbulkan resistensi dari bakteri penyebab penyakit (Noga, 2000).

Salah satu bahan alami yang berpotensi sebagai bahan antibakteri adalah daun ketapang (Hardhiko *et al.*, 2004). Daun ketapang biasanya dikenal berkhasiat untuk menjaga kualitas air pada kegiatan budidaya perikanan. Kulit kayu, buah, dan daun ketapang sudah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, termasuk penyakit kulit, disentri, sakit kepala dan sakit perut pada anak-anak. Zat kimia dalam ekstrak daun ketapang yang diduga bersifat antibakteri adalah tannin (Chee Mun, 2003) dan flavonoid (Tropical Aquaworld, 2006) sehingga diharapkan mampu menjadi bahan alami alternatif dalam pencegahan dan pengobatan penyakit MAS. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas ekstrak daun ketapang sebagai zat antibakteri terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro* dan *in vivo* pada ikan patin (*Pangasionodon hypophthalmus*), sehingga dapat diaplikasikan dalam mencegah maupun mengobati ikan patin yang terinfeksi *A. hydrophila*.

BAHAN & METODE

Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Tahap persiapan dimulai dengan membersihkan akuarium yang berukuran 60×30×33 cm³ dan semua peralatan menggunakan sabun dan disinfektan berupa kaporit. Akuarium diletakkan berjajar di rak dan diisi dengan air tandon yang sebelumnya diaerasi dan diendapkan selama 24 jam sampai ketinggian 23 cm. Instalasi aerasi dipasang pada masing-masing akuarium dan ditutup dengan plastik hitam. Setelah 3 hari proses aerasi, ikan uji dimasukkan kedalam

akuarium dengan kepadatan 10 ekor/akuarium.

Proses sterilisasi parasit dilakukan pada ikan patin yang baru datang dengan perendaman dalam larutan garam 30 ppm selama 5 menit. Masa pemeliharaan diawali dengan proses adaptasi ikan terhadap pakan dan lingkungannya yang baru selama 3 hari. Selama masa adaptasi, ikan uji diberi pakan buatan sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore hari. Untuk menjaga kualitas air selama penelitian dilakukan penyiponan satu hari sekali pada pagi hari.

Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang, *Terminalia cattapa*

Daun ketapang, *Terminalia cattapa* yang digunakan adalah daun yang sudah gugur dari pohonnya karena memiliki sifat antibakteri yang lebih baik daripada daun ketapang segar (Hardhiko *et al.*, 2004). Daun ketapang dicuci dengan air bersih dan ditiriskan pada suhu ruang dengan bantuan cahaya matahari sampai daun mudah dipatahkan. Setelah kering, daun dihaluskan dan diayak menggunakan saringan sampai didapatkan bubuk yang halus. Bubuk daun ketapang halus disimpan dalam tempat tertutup pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung.

Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan beberapa gram bubuk daun ketapang dengan air akuades steril sesuai dosis yang diinginkan. Campuran antara bubuk daun ketapang dengan air akuades steril diseduh pada suhu 50°C selama 15 menit. Hasil seduhan disaring menggunakan kertas Whatman No.42 dan didapatkan ekstrak berupa cairan. Khusus untuk penggunaan saat *in vivo*, bubuk daun ketapang diseduh dengan menggunakan air akuabides steril.

Pada uji *in vitro*, konsentrasi daun ketapang yang digunakan sebesar 0, 30, 60, dan 90 g/l, masing-masing konsentrasi didapat dengan cara menyeduh bubuk daun ketapang sebanyak 0, 3, 6, dan 9 gram dalam 100 ml air akuades steril. Sedangkan pada uji *in vivo*, konsentrasi daun ketapang yang dipakai untuk pencegahan yaitu 60 g/l, sesuai dengan dosis efektif yang didapatkan pada *in vitro*. Konsentrasi ini didapat dengan cara

menyeduh bubuk daun ketapang sebanyak 3 gram dalam 50 ml air akuabides steril. Selanjutnya konsentrasi daun ketapang yang dipakai untuk pengobatan yaitu 120 g/l, dua kali dosis yang digunakan saat pencegahan. Konsentrasi ini didapat dengan cara menyeduh bubuk daun ketapang sebanyak 6 gram dalam 50 ml air akuabides steril.

Uji *In Vitro*

Uji *in vitro* dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak daun ketapang terhadap bakteri *A. hydrophila* dengan metode Kirby-Bauer (Lay, 1994) atau kertas cakram. Uji ini menghasilkan dosis optimum ekstrak daun ketapang yang efektif untuk menghambat atau membunuh bakteri *A. hydrophila* yang selanjutnya dijadikan sebagai standar dosis pada uji *in vivo*.

Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode kertas cakram ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Dosis ekstrak daun ketapang yang digunakan adalah 0, 30, 60, dan 90 g/l dengan 3 kali ulangan. Bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi 10^5 cfu/ml sebanyak 0,1 ml disebar pada permukaan media TSA di cawan petri dan didiamkan selama 1 jam. Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak daun ketapang pada berbagai dosis diletakkan di atas media TSA yang sudah disebar bakteri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Diameter zona bening yang terbentuk diukur lebarnya dan semakin lebar zona bening maka makin besar pula daya antibakterinya. Dosis ekstrak daun ketapang yang diambil untuk uji *in vivo* adalah dosis optimum yang diperoleh berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri tersebut.

Uji Patogenitas Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Uji patogenitas dilakukan dengan menyuntikan bakteri *A. hydrophila* pada ikan patin pada konsentrasi 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 cfu/ml/ekor ikan. Sebagai pembanding, disediakan kontrol positif yaitu penyuntikan ikan dengan larutan PBS steril dan kontrol negatif yaitu tanpa penyuntikan. Penyuntikan dilakukan secara intramuskular sebanyak 0,1

ml per ikan, masing-masing 6 ekor tiap akuarium. Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat konsentrasi bakteri yang dapat menyebabkan patogen pada ikan uji (patogenitas bakteri) serta melihat virulensi bakteri yang digunakan.

Uji *In Vivo*

Pada penelitian ini, perlakuan yang diberikan terdiri dari 2 perlakuan dan 2 kontrol dengan masing-masing 3 kali ulangan, sebagai berikut :

1. Kontrol negatif :
ikan disuntik dengan PBS
2. Kontrol positif :
ikan disuntik *A. hydrophila*
3. Perlakuan pencegahan :
ikan disuntik dengan ekstrak daun ketapang dosis 60 g/l pada hari ke (-7) kemudian pada hari ke 0 disuntik *A. hydrophila*
4. Perlakuan pengobatan :
ikan disuntik *A. hydrophila* pada hari ke 0 dan disuntik dengan ekstrak daun ketapang dosis 120 g/l setelah terlihat gejala klinis

Penentuan dosis dan konsentrasi bakteri yang disuntikkan ditentukan berdasarkan hasil uji sebelumnya dan dihitung dengan teknik pengenceran berseri. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu setelah uji tantang dengan parameter yang diamati meliputi gambaran darah, respon makan ikan, pengamatan gejala klinis, pertambahan bobot, dan kematian ikan uji.

Pengamatan Gambaran Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 1, 5, dan 7. Pengaruh ekstrak daun ketapang terhadap gambaran darah didasarkan pada kadar hematokrit, hemoglobin, diferensial leukosit, jumlah sel darah putih dan sel darah merah.

a) Pengambilan sampel darah

Darah ikan diambil dengan menggunakan alat suntik yang ditusukkan sampai vena caudalis. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Sebelumnya, alat suntik dan tabung

ependorf sebagai tempat penyimpanan darah dibilas dengan antikoagulan, yaitu Natrik 3,8 %.

b) Pengukuran hematokrit (Anderson dan Siwicki, 1993)

Darah dihisap menggunakan tabung mikrohematokrit berlapis heparin dengan sistem kapiler. Fungsi heparin adalah untuk mencegah pembekuan darah di dalam tabung (Amlacher, 1970). Setelah darah mencapai $\frac{3}{4}$ bagian tabung, salah satu ujung tabung disumbat dengan *critoseal*. Tabung kapiler yang telah berisi darah dipusingkan (sentrifuse) dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan volume benda darah terhadap volume seluruh darah menggunakan skala hematokrit.

c) Penghitungan sel darah merah (eritrosit) (Nabib dan Pasaribu, 1989)

Penghitungan dilakukan dengan mengencerkan darah menggunakan larutan Hayem di dalam pipet pencampur berskala maksimum 101. Di dalam pipet ini terdapat bulir berwarna merah yang berfungsi sebagai pengaduk.

Darah dihisap dengan pipet pencampur hingga skala 1, lalu dengan pipet yang sama dihisap larutan Hayem hingga skala 101. Kemudian digoyang membentuk angka delapan selama 3-5 menit agar darah tercampur secara merata. Sebelum dilakukan penghitungan, larutan pada bagian ujung pipet yang tidak teraduk dibuang.

Darah yang telah teraduk diteteskan ke dalam hemasitometer tipe *Neubauer Improved* yang sudah terdapat gelas penutupnya melalui bagiannya yang berlekuk hingga memenuhi seluruh bagian yang berskala. Agar volume darah yang dihitung tepat, kelebihan darah dihisap menggunakan kertas tissue. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada 10 kotak kecil hemasitometer.

d) Penghitungan sel darah putih (leukosit) (Nabib dan Pasaribu, 1989)

Penghitungan dilakukan dengan mengencerkan darah dengan

menggunakan Turk's dalam pipet pencampur berskala maksimum 11. Di dalam pipet ini terdapat bulir berwarna putih yang berfungsi sebagai pengaduk.

Darah dihisap dengan pipet pencampur hingga skala 0,5, dan dengan pipet yang sama dihisap larutan Turk's hingga skala 11. Kemudian pipet digoyang membentuk angka delapan selama 3 – 5 menit agar darah tercampur secara merata. Sebelum dilakukan penghitungan, larutan pada bagian ujung pipet yang tidak teraduk dibuang.

Darah yang telah teraduk diteteskan ke dalam hemasitometer tipe *Neubauer Improved* yang sudah terdapat gelas penutupnya melalui bagiannya yang berlekuk hingga memenuhi seluruh bagian yang berskala. Agar volume darah yang dihitung tepat, kelebihan darah dihisap menggunakan kertas tissue. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada 5 kotak kecil hemasitometer.

e) Rumus penghitungan jumlah sel darah (Nabib dan Pasaribu, 1989)

- Jumlah sel darah merah (Σ SDM)

$$\begin{aligned}\Sigma \text{ SDM} &= \text{jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{faktor pengenceran} \\ &= \text{jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{0,05 \times 0,05 \times 0,1 \text{ mm}^3} \times 200 \\ &= \dots \text{ sel/mm}^3\end{aligned}$$

- Jumlah sel darah putih (Σ SDP)

$$\begin{aligned}\Sigma \text{ SDP} &= \text{jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{faktor pengenceran} \\ &= \text{jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{0,2 \times 0,2 \times 0,1 \text{ mm}^3} \times 10 \\ &= \dots \text{ sel/mm}^3\end{aligned}$$

f) Pengukuran hemoglobin (Wedemeyer dan Yasutake, 1977 dalam Alifuddin, 1999)

Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan dengan metode Sahli. Prinsip metode ini adalah mengkonversikan hemoglobin dalam darah ke dalam bentuk asam hematin oleh asam klorida. Darah dihisap menggunakan pipet Sahli sampai skala 20 mm³ dan dipindahkan ke dalam tabung hemoglobin yang berisi HCl 0,1 N

sampai skala 10 (warna kuning), didiamkan 3-5 menit agar hemoglobin bereaksi dengan HCl membentuk asam hematin. Kemudian diaduk dan ditambahkan akuades sedikit demi sedikit hingga warnanya sama dengan warna standar. Pembacaan skala dilakukan dengan melihat tinggi permukaan larutan yang dicocokkan dengan skala lajur Gr %, yang berarti banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 ml darah.

g) Diferensial leukosit (preparat ulas darah) (Amlacher, 1970)

Pengukuran diferensial leukosit (sel darah putih) dilakukan untuk mengetahui persentase tiap macam leukosit yang ada dalam darah. Penghitungan dilakukan dengan mengamati preparat ulas darah.

Setetes darah ditempatkan di atas gelas objek yang bersih (direndam metanol), dan ujung gelas objek kedua ditempatkan di atas gelas objek pertama hingga membentuk sudut 30°. Gelas objek kedua digeser ke arah belakang menyentuh tetesan darah hingga menyebar. Kemudian gelas objek kedua digeser ke arah berlawanan hingga terbentuk lapisan tipis darah, dibiarkan hingga kering. Preparat difiksasi menggunakan metanol absolut selama 5 menit, diangkat dan dibiarkan kering udara. Pewarnaan preparat dilakukan selama 10 menit dalam wadah pewarnaan dengan larutan Giemsa, lalu diangkat, dibilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering udara. Pengamatan preparat dilakukan di bawah mikroskop menggunakan imersi dan diamati dengan perbesaran 400 kali.

Respon Makan dan Gejala Klinis Ikan

Pengamatan respon makan ikan dilakukan secara deskriptif selama 15 hari sejak perlakuan pencegahan sampai hari ke 7 pasca infeksi dengan melihat selang waktu ikan mengkonsumsi pakan yang diberikan dan jumlah pakan yang dimakan. Pengamatan gejala klinis juga dilakukan selama 7 hari pada jam ke 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, kemudian setiap 24 jam pada hari ke 4, 5, 6, dan 7 setelah ujiantang.

Pengamatan dilakukan secara deskriptif.

Pertambahan Bobot Ikan

Pengukuran bobot rata-rata dilakukan pada awal dan akhir perlakuan menggunakan timbangan digital. Ikan pada masing-masing akuarium ditimbang dan dihitung nilai rata-rata bobot tiap perlakuan dan pertambahan bobotnya. Pertambahan bobot ikan dihitung dengan rumus :

$$\Delta W = \bar{W}_t - \bar{W}_o$$

(Zonneveld *et al.*, 1991)

Keterangan : ΔW = pertambahan bobot
 \bar{W}_t = bobot rata-rata akhir
 \bar{W}_o = bobot rata-rata awal

Kematian Ikan Uji dan Kualitas Air

Pengamatan kematian ikan uji dilakukan setiap hari pasca penyuntikan untuk pencegahan sampai akhir penelitian. Tingkat kematian ikan uji (MR) dihitung dengan rumus :

$$MR = \frac{\text{Jumlah Ikan Yang Mati}}{\text{Jumlah Populasi}} \times 100\%$$

(Effendi, 1979)

Parameter kualitas air yang akan diamati meliputi pengukuran suhu, pH, DO, alkalinitas, dan amoniak. Pengukuran parameter kualitas air dilakukan pada awal dan akhir penelitian.

Analisa Data

Data yang antara lain gejala klinis, kematian ikan, respon makan, pertambahan bobot ikan, dan kualitas air dianalisa secara deskriptif. Sedangkan, data yang dianalisa secara statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah gambaran darah yang terdiri dari kadar hematokrit, kadar hemoglobin, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih, dan diferensial leukosit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *In Vitro*

Hasil pengamatan pada uji *in vitro* menunjukkan bahwa daun ketapang dapat menghambat pertumbuhan 10^5 cfu/ml bakteri *A. Hydrophila*. Dengan demikian ekstrak daun ketapang memiliki sifat antibakteri. Hasil uji *in vitro* pada Gambar 1 menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun ketapang terendah yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* yaitu 60 g/l. Zat kimia dalam ekstrak daun ketapang yang diduga bersifat antibakteri adalah tannin (Chee Mun, 2003) dan flavonoid (Tropical Aquaworld, 2006). Flavonoid merupakan perubah respon yang alami, seperti dari hasil beberapa penelitian yang menunjukkan kemampuan flavonoid dalam merubah reaksi tubuh terhadap penyebab alergi, virus, dan penyebab kanker. Zat ini juga memiliki aktivitas anti-alergi, antiradang, antimikroba, dan antikanker (Wikipedia, 2006).

Ekstrak daun ketapang pada dosis 60 g/l memiliki kekuatan antibiotik-antibakteri sedang karena diameter rata-rata zona hambatnya 9,5 mm. Hal ini didasarkan pada Davis Stout *dalam* Hasim (2003) yang menyatakan bahwa daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10 – 20 mm (kuat), diameter hambat 5 – 10 mm (sedang), dan diameter hambat 5 mm atau kurang (lemah).

Uji Patogenitas Bakteri Dengan Menghitung LD 50

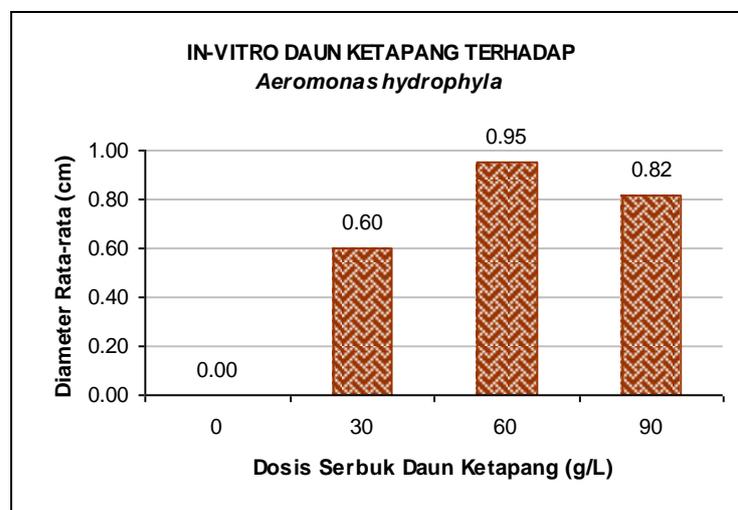
Uji patogenitas bakteri dilakukan untuk mengetahui konsentrasi bakteri yang akan digunakan pada uji *in vivo*. Hasil uji ini menghasilkan tingkat konsentrasi bakteri yang dapat menyebabkan ikan patin mengalami gejala klinis dengan kematian 50% dari populasi, yaitu 10^5 cfu/ml.

Gambaran Darah pada Uji *In Vivo*

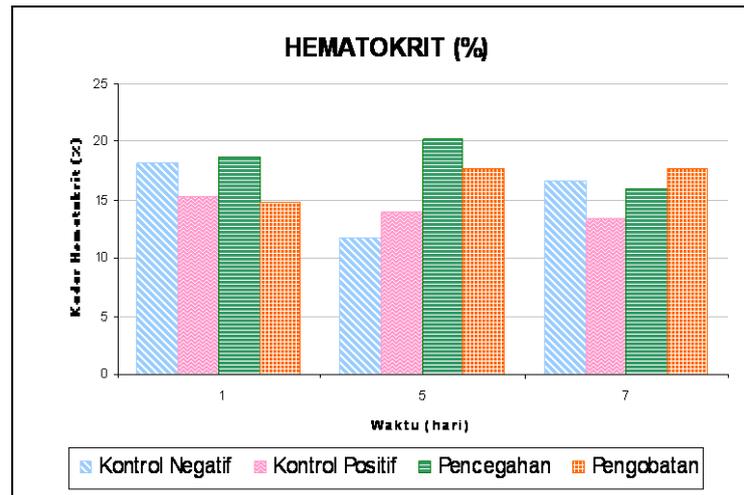
Darah mengalami perubahan yang serius, khususnya saat terjadi infeksi bakteri (Amlacher, 1970). Parameter darah yang diukur selama penelitian adalah kadar hematokrit, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih (leukosit), kadar hemoglobin, dan diferensial leukosit.

Hematokrit merupakan perbandingan antara volume sel darah dengan plasma darah (Sastradipraja *et al.*, 1989). Menurunnya kadar hematokrit dapat dijadikan petunjuk mengenai adanya rendahnya kandungan protein pakan, defisiensi vitamin atau ikan mendapat infeksi (Anderson dan Siwicki, 1993). Rataan kadar hematokrit ikan patin ditunjukkan pada Gambar 2.

Setelah ikan patin terinfeksi oleh bakteri *A. Hydrophila* (pasca infeksi), rata-rata kadar hematokrit pada ikan kontrol positif dan perlakuan pengobatan cenderung menurun, sedangkan pada perlakuan



Gambar 1. Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Ketapang *Terminalia cattapa* terhadap *A. hydrophila*



Gambar 2. Kadar Hematokrit Selama Perlakuan (%)

pencegahan cenderung meningkat. Pada saat terjadinya luka pada tubuh ikan, ternyata dapat menyebabkan penurunan nilai hematokrit. Hal ini terjadi karena pada stadia Menurut Amlacher (1970), selain dari infeksi bakteri, respon makan pun dapat memberi pengaruh pada komposisi darah termasuk jumlah sel darah merah yang juga berpengaruh terhadap kadar hematokrit karena hematokrit adalah persentase volume sel darah merah di dalam darah yang diwakili dari sampel darah total yang ada di tabung kapiler.

Pada perlakuan pencegahan, diduga ikan sudah membentuk suatu sistem pertahanan tubuh bersama dengan aktivitas flavonoid dalam ekstrak daun ketapang yang dapat menghambat proses peradangan (Wikipedia, 2006) sehingga kadar hematokrit tidak mengalami penurunan pada hari pertama pasca infeksi. Pada hari kelima terjadi peningkatan kadar hematokrit karena flavonoid juga dapat meningkatkan kerja organ-organ penghasil darah sehingga produksi darah dapat ditingkatkan (DeNoon, 2004). Pada perlakuan pengobatan, kadar hematokrit mengalami peningkatan setelah ikan diberikan ekstrak daun ketapang (hari ke 2). Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan setiap hari ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang tidak mempengaruhi kadar hematokrit.

Sel darah merah bersifat pasif dan melaksanakan fungsinya dalam pembuluh darah, sedangkan sel darah putih mampu

keluar dari pembuluh darah menuju jaringan dalam melaksanakan fungsinya. Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah sel darah merah adalah jenis hewan, perbedaan induk (genetik), kondisi nutrisi, aktivitas fisik, dan umur (Dellman dan Brown, 1989). Jumlah sel darah merah ikan ditunjukkan pada Gambar 3.

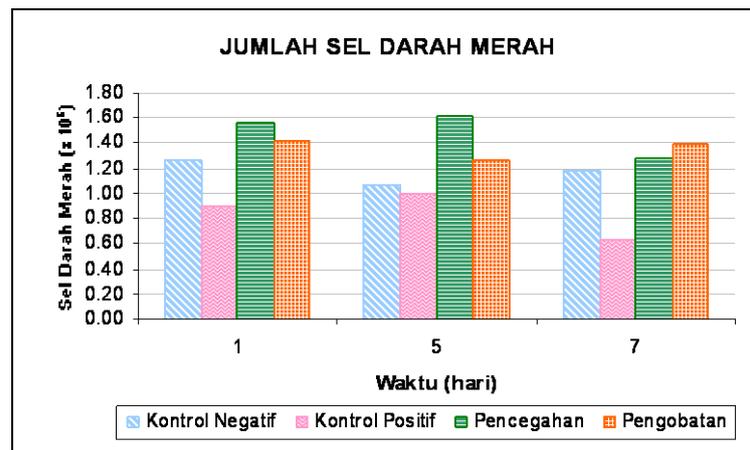
Setelah terinfeksi bakteri (pasca infeksi), jumlah sel darah merah pada ikan kontrol positif cenderung menurun hingga akhir pengamatan. Penurunan jumlah sel darah merah dikarenakan adanya luka sehingga darah keluar dari pembuluhnya. Pada hari pertama dan kelima pasca infeksi, jumlah sel darah merah pada perlakuan pencegahan terlihat meningkat dan mendekati normal saat akhir pengamatan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang yang kaya akan flavonoid memiliki aktivitas antiradang dan antimikroba (Wikipedia, 2006) sehingga dapat menghambat darah yang keluar dari pembuluhnya dan menghambat aktivitas bakteri dalam memproduksi toksin (Angka *et al.*, 2004). Sedangkan pada perlakuan pengobatan, jumlah sel darah merah pasca infeksi hingga akhir pengamatan meningkat. Peningkatan jumlah sel darah merah pada hari pertama pasca infeksi menurut Wedemeyer dan Yasutake (1977) dalam Alifuddin (1999) diduga akibat ikan dalam keadaan stres. Pada hari kelima dan ketujuh terjadi peningkatan jumlah sel darah merah karena flavonoid dapat meningkatkan kerja organ-organ penghasil darah sehingga

produksi darah dapat ditingkatkan (DeNoon, 2004). Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan setiap hari ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang tidak mempengaruhi jumlah sel darah merah.

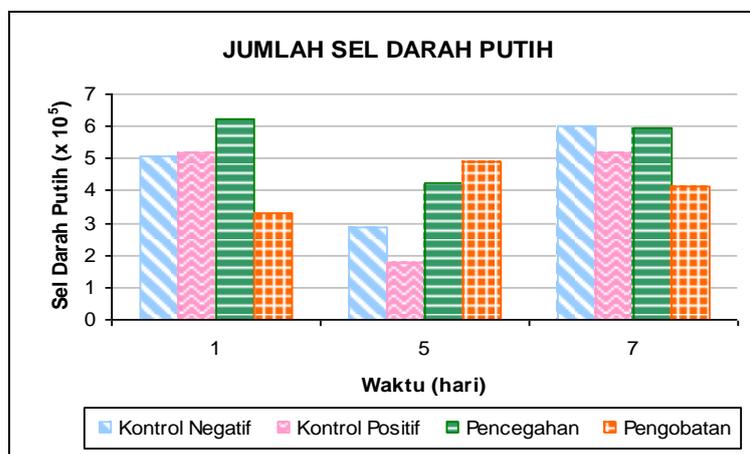
Alasan utama keberadaan sel darah putih dalam darah adalah karena sel diangkut dari sumsum tulang atau jaringan limfoid ke area-area tubuh yang memerlukan (Guyton dan Hall, 1997). Jadi diduga bahwa masa beredar sel-sel darah putih di dalam darah mungkin saja sangat singkat (Affandi dan Tang, 2002). Jumlah sel darah putih ikan ditunjukkan pada Gambar 4.

Setelah ikan patin diinfeksi bakteri (pasca infeksi), jumlah sel darah putih pada kontrol positif mengalami penurunan, namun jumlah sel darah putih pada perlakuan pencegahan menunjukkan peningkatan. Peningkatan jumlah sel darah putih

menunjukkan bahwa sistem limfe yang diaktifkan oleh flavonoid (Angka *et al.*, 2004) dapat meningkatkan produksi sel darah putih. Pada perlakuan pengobatan terjadi penurunan jumlah sel darah putih pada hari pertama pasca infeksi yang diduga disebabkan karena sel darah putih meninggalkan pembuluh darah menuju daerah yang terinfeksi. Kemudian terjadi peningkatan setelah pemberian ekstrak daun ketapang pada ikan patin. Pada hari ketujuh, jumlah sel darah putih pada perlakuan pengobatan menurun. Hal ini kemungkinan disebabkan produksi sel darah putih di limfoid tidak sebanding dengan sel darah putih yang dikirim ke jaringan tubuh yang terinfeksi. Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan setiap hari ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang tidak mempengaruhi jumlah sel darah putih.



Gambar 3. Jumlah sel darah merah selama perlakuan (10^6 sel/ mm^3)



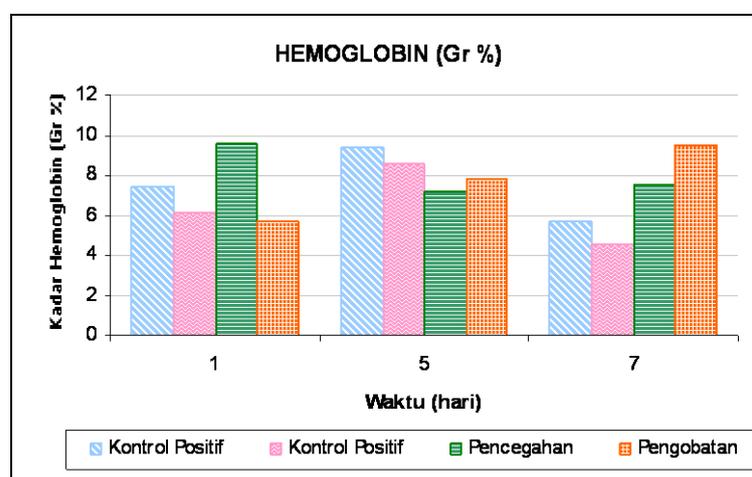
Gambar 4. Jumlah sel darah putih selama perlakuan (10^5 sel/ mm^3)

Sel darah merah mengandung hemoglobin yang berfungsi mengangkut oksigen dari insang ke jaringan. Rataan kadar hemoglobin ikan ditunjukkan pada Gambar 5. Dari Gambar 5 terlihat bahwa pada hari pertama pasca infeksi, kadar hemoglobin mengalami peningkatan pada perlakuan pencegahan. Penurunan kadar hemoglobin terjadi pada hari kelima pasca infeksi, namun mengalami peningkatan pada saat akhir pengamatan meningkat. Meningkatnya kadar hemoglobin diduga karena aktivitas flavonoid dalam ekstrak daun ketapang dapat meningkatkan kerja organ-organ penghasil darah sehingga produksi darah dapat ditingkatkan (DeNoon, 2004). Sedangkan pada perlakuan pengobatan, kadar hemoglobin pasca infeksi mengalami penurunan, namun meningkat setelah pemberian ekstrak daun ketapang pada hari kedua hingga akhir pengamatan. Menurut Lagler *et al.* (1977), kadar hemoglobin dalam darah ikan berkaitan dengan jumlah sel darah merah. Penurunan jumlah sel darah merah dikarenakan adanya luka sehingga darah keluar dari pembuluhnya dan menyebabkan kadar hemoglobin ikut rendah. Secara statistik, kadar hemoglobin ikan uji perlakuan pengobatan pada hari ketujuh berbeda nyata dengan ikan uji kontrol positif ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang mempengaruhi kadar hemoglobin.

Leukosit berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh ikan, yang bereaksi terhadap gangguan dari luar termasuk infeksi patogen (Moyle dan Cech, 1988). Ada

beberapa jenis leukosit pada ikan yang mempunyai peran spesifik. Jenis leukosit yang diamati pada diferensial leukosit dari ikan patin adalah limfosit, monosit, neutrofil, dan trombosit. Keempat jenis leukosit tersebut ternyata menunjukkan perubahan seperti terlihat pada Gambar 6.

Persentase limfosit ditemukan lebih tinggi dari monosit dan neutrofil dari awal sampai akhir pengamatan. Moyle dan Cech (1988) menyatakan bahwa limfosit berfungsi sebagai penghasil antibodi untuk kekebalan tubuh dari gangguan penyakit. Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan pencegahan dan pengobatan dengan kontrol negatif dan kontrol positif pada hari pertama pasca infeksi ($p < 0,05$). Persentase limfosit pada perlakuan pencegahan terjadi penurunan. Hal ini diduga disebabkan limfosit yang berfungsi sebagai penghasil antibodi sedang menyerang dan menghancurkan antigen berupa bakteri di tempat infeksi. Peningkatan limfosit pada perlakuan pencegahan terjadi pada hari ketujuh sehingga diduga antibodi sudah mengenali antigen berupa bakteri dan memproduksi limfosit lagi untuk meningkatkan pertahanan tubuh. Sedangkan pada perlakuan pengobatan, persentase limfosit semakin menurun hingga akhir pengamatan. Hal ini diduga karena limfosit yang diproduksi tidak sebanding dengan limfosit yang dikirim ke jaringan tubuh yang terinfeksi. Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan pencegahan dan pengobatan pada hari ketujuh pasca infeksi ($p < 0,05$).

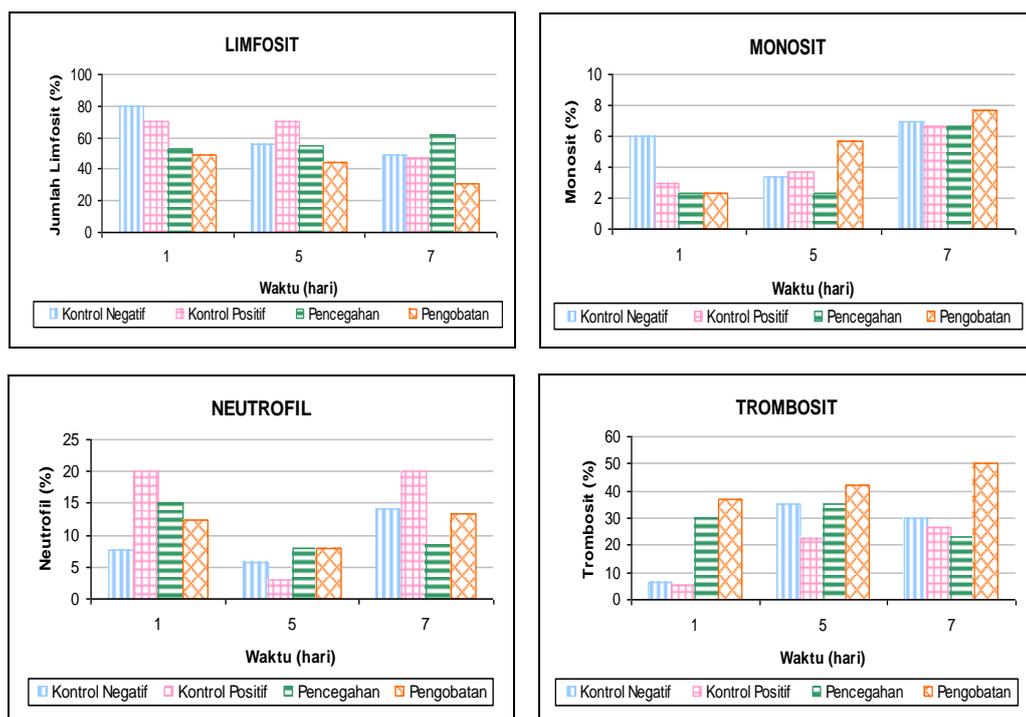


Gambar 5. Kadar hemoglobin selama perlakuan (gr %)

Moyle dan Cech (1988) menyatakan bahwa monosit berfungsi sebagai fagosit terhadap benda-benda asing, termasuk agen penyakit. Jumlah monosit perlakuan pencegahan pada hari pertama pasca infeksi hingga akhir pengamatan mengalami penurunan, hal ini diduga karena monosit meninggalkan pembuluh darah menuju daerah yang terinfeksi dan memfagosit bakteri. Selain itu, jumlah neutrofil juga meningkat karena kedua jenis leukosit ini memiliki fungsi yang sama, namun kemampuan monosit memfagosit lebih besar dari neutrofil (Fujaya, 2004). Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan perlakuan lainnya pada hari pertama pasca infeksi ($p < 0,05$). Pada perlakuan pengobatan, terjadi peningkatan monosit setelah pemberian ekstrak daun ketapang. Meningkatnya persentase monosit diduga disebabkan karena flavonoid mengaktifkan limfe untuk meningkatkan produksi monosit. Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan pencegahan dan pengobatan pada hari kelima pasca infeksi ($p < 0,05$). Sedangkan pada akhir pengamatan, persentase monosit mulai normal.

Neutrofil merupakan jenis leukosit pertama yang meninggalkan pembuluh darah karena mengandung enzim untuk menghancurkan organisme yang dimakannya (Roberts, 1978 dalam Bastiawan *et al.*, 1995). Persentase neutrofil pada ikan perlakuan pencegahan pasca infeksi cenderung meningkat karena dalam tubuh ikan telah terbentuk sistem pertahanan tubuh sehingga saat terjadinya infeksi bakteri maka neutrofil diproduksi oleh limfe untuk dikirim ke tempat infeksi. Semakin hari jumlah neutrofil pada perlakuan pencegahan semakin menurun karena tubuh ikan sudah tidak memerlukan neutrofil lagi. Sedangkan pada perlakuan pengobatan, pemberian ekstrak daun ketapang pasca infeksi dapat meningkatkan jumlah neutrofil. Menurut Dellman dan Brown (1989), pada saat terjadi infeksi bakteri, biasanya jumlah neutrofil dalam darah meningkat yang disebabkan oleh keperluan limfoid dalam melepas leukosit untuk melawan infeksi. Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan setiap hari ($p > 0,05$).

Trombosit meningkat akibat adanya hemoragi dan tukak karena trombosit diproduksi agar darah membeku guna mencegah terjadinya pendarahan lebih



Gambar 6. Jumlah limfosit, monosit, neutrofil, dan trombosit selama perlakuan (%)

banyak (Angka *et al.*, 2004). Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan pencegahan dan pengobatan dengan kontrol negatif dan kontrol positif pada hari pertama ($p < 0,05$). Trombosit pada perlakuan pencegahan meningkat pada hari pertama pasca infeksi. Diduga ikan mengalami infeksi sehingga trombosit diproduksi untuk menjaga kebocoran pembuluh darah (Fujaya, 2004). Kemudian jumlah trombosit mulai menurun hingga akhir pengamatan karena tubuh sudah tidak membutuhkan trombosit lagi. Sedangkan pada perlakuan pengobatan, terjadi peningkatan pasca infeksi yang kemungkinan disebabkan oleh terjadinya luka. Peningkatan trombosit kembali terjadi setelah pemberian ekstrak daun ketapang sampai akhir pengamatan yang diduga akibat adanya luka pada ikan yang semakin besar karena efek awal pemberian daun ketapang membuat respon makan berkurang sehingga pertahanan tubuhnya melemah. Secara statistik, terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan pencegahan dan pengobatan pada hari ketujuh ($p < 0,05$).

Respon Makan Ikan

Respon makan pada ikan menjadi faktor yang sangat menunjang dalam upaya pencegahan dan pengobatan pada ikan patin. Ikan dengan respon makan yang baik dapat mempercepat proses penyembuhan. Hal ini terkait dengan asupan nutrisi yang tercukupi sehingga ikan memiliki cukup energi untuk proses penyembuhan.

Ikan patin pada kontrol negatif tidak memiliki masalah pada respon makan pada uji *in vivo*. Sedangkan pada kontrol positif, ikan mengalami penurunan respon makan setelah diinfeksi bakteri sampai satu hari setelahnya, namun meningkat kembali sejak hari kedua dan stabil hingga akhir pengamatan.

Respon makan ikan pada perlakuan pencegahan dan pengobatan menunjukkan pola yang sama yaitu mengalami penurunan selama dua hari setelah pemberian ekstrak daun pohon ketapang. Diduga hal ini disebabkan karena tubuh ikan sedang berusaha beradaptasi dengan benda asing

yang masuk. Ikan patin pada perlakuan pencegahan mulai menunjukkan respon makan pada hari ketiga walau kurang, tapi semakin meningkat sejalan dengan waktu pemeliharaan. Setelah ikan diinfeksi bakteri, respon makan ikan berkurang namun tidak berlangsung lama karena kembali meningkat hingga akhir pengamatan. Sedangkan pada perlakuan pengobatan, respon makan setelah infeksi bakteri meningkat keesokan harinya, namun kembali menurun setelah pemberian ekstrak daun pohon ketapang. Peningkatan respon makan ikan pada perlakuan pengobatan mulai terjadi sejak hari kedua setelah pengobatan dan stabil hingga akhir pengamatan. Kurangnya asupan nutrisi pada perlakuan pengobatan menyebabkan kurangnya gizi dan energi untuk proses penyembuhan luka.

Gejala Klinis

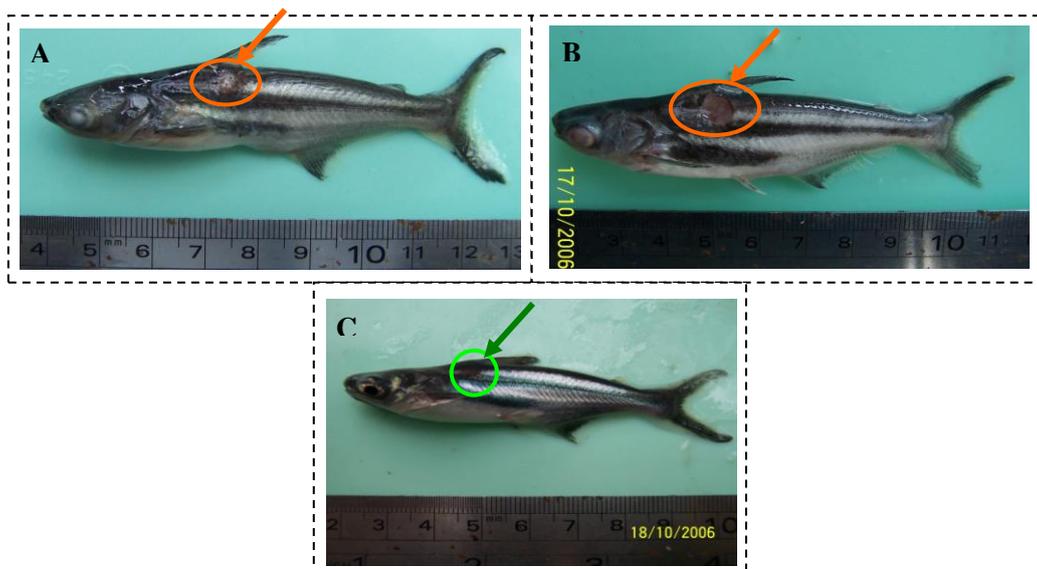
Pada kontrol negatif, ikan yang disuntik dengan PBS tidak memperlihatkan gejala klinis hingga akhir penelitian. Sedangkan pada kontrol positif, ikan yang disuntik dengan bakteri *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis yang semakin hari semakin parah, dimulai dari radang pada bagian punggung kemudian berkembang menjadi nekrosis dan sebagian kecil berakhir dengan kematian. Namun respon makan yang semakin baik menyebabkan perkembangan nekrosis mulai menurun sejak hari ketiga.

Pada perlakuan pencegahan dengan dosis ekstrak daun ketapang 60 g/l tidak terdapat gejala klinis pasca infeksi, namun pada awal penyuntikan hingga hari kedua, ikan terlihat berenang lemah dan tidak beraturan. Sedangkan pemberian ekstrak daun ketapang pada perlakuan pengobatan (120 g/l) dilakukan setelah terlihat gejala. Ikan pun mengalami kelainan yaitu berenang lemah dan tidak beraturan hingga hari keempat setelah infeksi atau hari kedua setelah pemberian obat. Kelainan klinis pada perlakuan pengobatan sama dengan kontrol positif, namun ikan pada perlakuan pengobatan belum menunjukkan proses penyembuhan hingga akhir penelitian karena rendahnya respon makan.

Tabel 1. Respon makan ikan patin selama perlakuan

Hari ke	Respon Makan											
	Kontrol Negatif			Kontrol Positif			Pencegahan			Pengobatan		
	U 1	U 2	U 3	U 1	U 2	U 3	U 1	U 2	U 3	U 1	U 2	U 3
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
-5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	+++
-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+++
-3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+	-	-
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+	-	+
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	++
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	++
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	++
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	++

Keterangan :
 - = ikan tidak mau makan
 + = sebagian ikan makan sebanyak 25% dari jumlah pakan yang diberikan
 ++ = ikan makan sebanyak 50% dari jumlah pakan yang diberikan beberapa saat setelah pakan diberikan
 +++ = ikan langsung memakan seluruh pakan yang diberikan



Gambar 7. Kondisi ikan patin pasca infeksi : (A) Radang; (B) Nekrosis; dan (C) Sembuh pada perlakuan pencegahan

Pertambahan Bobot Ikan

Pertambahan bobot ikan hanya terjadi pada kontrol negatif yang memiliki respon makan cukup baik dari awal hingga akhir pengamatan, sedangkan ikan-ikan pada perlakuan yang lain memperlihatkan bobot yang cenderung menurun. Penurunan bobot ini kemungkinan disebabkan karena kurangnya respon makan ikan sehingga ikan tidak mendapatkan nutrisi yang cukup untuk tumbuh.

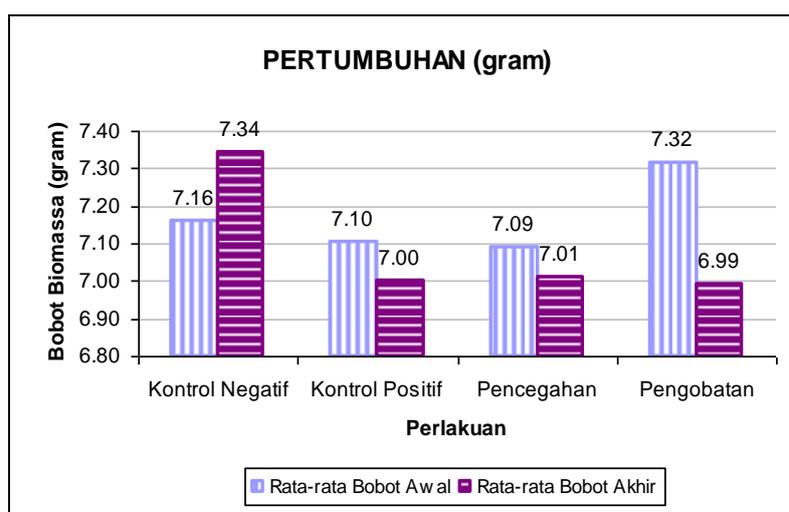
Kematian Ikan Patin

Selama penelitian, tidak ditemukan ikan mati pada kontrol negatif. Ikan kontrol positif mengalami kematian sejak hari kedua dan meningkat hingga hari keempat sebesar 13,33%, kemudian kondisi ikan membaik sehingga tidak ada lagi ikan yang mati. Pada perlakuan pencegahan, ikan yang terinfeksi hingga mengalami kematian terdapat saat hari pertama dan kedua sebesar 6,67%, hal ini kemungkinan karena ada sebagian ikan yang kondisinya sudah lemah setelah pemberian ekstrak daun ketapang sehingga tubuhnya tidak mampu untuk menahan serangan bakteri saat diinfeksi. Sedangkan kematian terbanyak dialami oleh ikan pada perlakuan pengobatan yaitu sebesar 30%. Hal

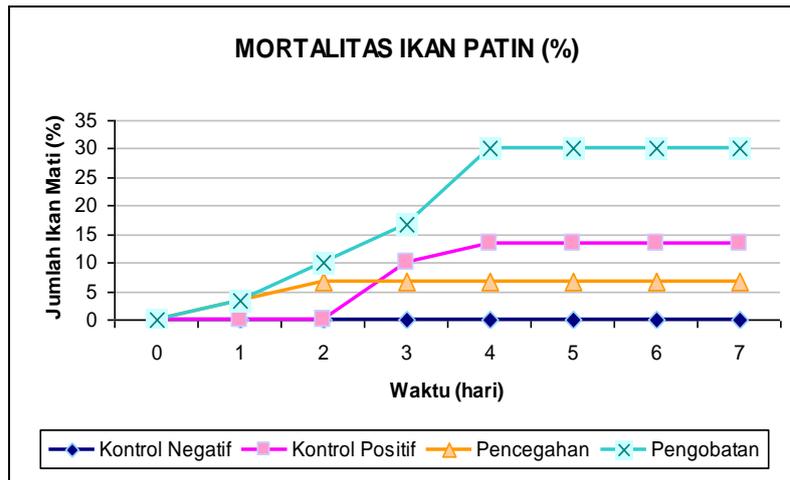
ini diduga karena infeksi bakteri yang menyerang ikan dan efek pengobatan pada saat awal pemberian yang memerlukan proses adaptasi membuat ikan stres dan respon makan berkurang sehingga daya tahan tubuhnya semakin berkurang.

Kualitas Air

Menurut Khairuman dan Sudenda (2002), pembesaran ikan patin tidak memerlukan sumber air yang senantiasa mengalir sepanjang waktu. Kualitas air yang kurang baik dapat menyebabkan ikan mudah terserang penyakit. Selama perlakuan, semua parameter kualitas air yang diukur berada dalam kisaran yang baik untuk media budidaya ikan patin. Kandungan oksigen terlarut yang dibutuhkan bagi kehidupan ikan patin berkisar antara 3 – 6 mg/l (Khairuman dan Sudenda, 2002). Alkalinitas yang baik antara 80 – 250, sedangkan suhu air media pemeliharaan yang optimal berada dalam kisaran 28 – 30°C. Nilai pH yang normal bagi kehidupan ikan patin adalah antara 5 – 9 (Khairuman dan Sudenda, 2002). Batas konsentrasi kandungan amoniak yang dapat mematikan kehidupan ikan patin adalah antara 0,1-0,3 mg/liter .



Gambar 8. Pertambahan bobot tubuh ikan patin (gram) selama perlakuan



Gambar 9. Tingkat kematian ikan patin pasca infeksi (%)

Tabel 2. Kualitas air selama perlakuan

Perlakuan	Parameter Kualitas Air				
	DO (mg/L)	Suhu (°C)	pH	Alkalinitas (mg/L)	Amoniak (mg/L)
Kontrol Negatif	6,04 - 6,22	24 - 30	7,32 - 7,46	88,088 - 112,112	0,022 - 0,042
Kontrol Positif	4,02 - 5,15	24 - 30	7,02 - 7,34	96,096 - 120,12	0,015 - 0,028
Pencegahan	5,92 - 6,62	24 - 30	7,36 - 7,54	48,048 - 104,104	0,006 - 0,033
Pengobatan	5,41 - 5,97	24 - 30	7,31 - 7,54	88,088 - 120,12	0,031 - 0,052

KESIMPULAN

Daun ketapang berpotensi sebagai antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Dosis ekstrak daun ketapang sebesar 60 g/l merupakan dosis terendah yang efektif untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* pada uji *in vitro*.

Pada uji *in vivo* terhadap ikan patin, pencegahan menggunakan ekstrak daun ketapang dengan dosis 60 g/l menunjukkan hasil yang lebih efektif dalam mencegah infeksi *A. hydrophila* dibandingkan pengobatan dengan dosis ekstrak daun ketapang 120 g/l. Pada perlakuan pencegahan menunjukkan kadar hematokrit, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih, kadar hemoglobin dan limfosit meningkat pasca infeksi, respon makan baik, tidak terdapat gejala klinis pasca infeksi, penurunan bobot yang lebih kecil dibanding ikan perlakuan pengobatan yaitu 0,08 gram dan kematian

ikan uji akibat infeksi dapat ditekan sebesar 6,67 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Alifuddin, M. 1999. Peran imunostimulan (Lipopolisakarida, *Saccharomyces cerevisiae* & Levamisol) Pada gambaran respon imunitas ikan jambal siam (*Pangasius hypophthalmus* Fowler). Tesis. Sekolah Pasca Sarjana. Fakultas Perikanan. IPB. Bogor.
- Affandi, R dan Tang, U.M. 2002. Fisiologi hewan air. Unri Press. Pekanbaru. 213 hal.
- Amlacher E. 1970. Textbook of fish disease. Conroy D.A., R.L. Herman (Eds.) TFH Publ. Neptune. New York. 302p.

- Anderson, D. P and A. K. Siwicki. 1993. Basic haematology and serology for fish health programs. Paper Presented in second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and The Environment". Phuket, Thailand. 25-29 Oktober 1993. p. 185-202.
- Angka SL, BP. Priosoeryanto, BW. Lay dan E. Harris. 2004. Penyakit Motile Aeromonad Septicaemia pada ikan lele dumbo: Upaya pencegahan dan pengobatannya dengan fitofarmaka. Forum Pascasarjana, 27: 339-350
- Bastiawan, D., Taukhid, M. Alifuddin dan T.S. Dermawati. 1995. Perubahan hematologi dan jaringan ikan lele dumbo *Clarias gariepinus* yang diinfeksi cendawan *Aphanomyces sp.*
- Chee Mun, F. 2003. Ketapang (*Cattapa*) leaves-black water : Understanding black water. INBS Forum Index. <http://www.joyabetta.com/>. Kunjungan : Tuesday, September 05, 2006, 3:58:28 PM
- DeNoon, D. 2004. A dark chocolate a day keeps the doctor away : daily dark chocolate good for the heart, loaded with flavonoids. WebMD Medical News. <http://www.webmd.com/content/article/88/99702/htm>.
- Dellman, H.D. dan Brown, E.M. 1989. Buku teks histologi veteriner I. Hartono (Penerjemah). UI Press. Jakarta.
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi ikan : dasar pengembangan teknologi perikanan. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 1997. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi 9 (Terjemahan). Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hardhiko, R.S., A.G. Suganda, dan E.Y. Sukandar. 2004. Aktivitas antimikroba ekstrak etanol, ekstrak air daun yang dipetik dan daun gugur pohon ketapang (*Terminalia cattapa* L.). Acta Pharmaceutica Indonesia. XXIX, 129-133.
- Hasim. 2003. Menanam rumput, memanen antibiotik. <http://www.Kehati.or.id/news/view.php?q=166&qLang=1&categ=Kliping%20Berita>. Kunjungan : 20 November 2006.
- Khairuman, Amd dan Sudenda, D. 2002. Budidaya patin secara intensif. Aspek produksi budidaya pembesaran ikan patin. TEKNOLOGI TEPAT GUNA : WARINTEK - Menteri Negara Riset dan Teknologi. <http://www.google.com/>. Kunjungan : Saturday, May 07, 2005, 9:32:11 PM.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller and D. R. M. Passino. 1977. Ichthyology. John Wiley and Sons Inc. New York. 506 p.
- Lay, B.W. 1994. Analisis mikroba di laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Moyle, P.B. dan Cech Jr, J.J. 1988. Fishes : An Introduction to Ichthyology. Prentice Hall, Inc. USA. 559 p.
- Nabib, R dan F. H. Pasaribu. 1989. Patologi dan penyakit ikan, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor, hal 158.
- Sastradipraja, D., S. H. S. Sikar, R. Widjajakusuma, T. Ungerer, A. Maad, H. Nasution, R. Suriawinata, R. Hamzah. 1989. Penuntun praktikum fisiologi veteriner. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati IPB. Bogor. 329 hal.
- Supriyadi, H., O. Komarudin, dan J. Slembrouck. 1998. Preliminary study of the source of *Aeromonas*

- hydrophila* infection on *Pangasius hypophthalmus* larvae. In Marc Legendre dan A. Pariselle (Eds.) The Biological diversity and aquaculture of clariid and Pangasid Catfishes in South East Asia. *Proceedings of The Mid-Term Workshop of The "Catfish Asia Project" Cantho, Vietnam 11-15 May 1998*. p. 219-222.
- Tropical Aquaworld. 2006. *Terminalia cattapa* L. [Http://www.tropical-aquaworld.com/terminaliae.htm](http://www.tropical-aquaworld.com/terminaliae.htm). Kunjungan : Tuesday, September 05, 2006, 3:19:06 PM.
- Wikipedia. 2006. Flavonoid. [Http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid](http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid). Kunjungan : Saturday, November 04, 2006, 11:24:52 AM.
- Wikipedia. 2006. Tannin. [Http://en.wikipedia.org/wiki/Tannin](http://en.wikipedia.org/wiki/Tannin). Kunjungan : Saturday, November 04, 2006, 11:23:38 AM.
- Zonneveld, N., E.A. Huisman, J.H. Boon. 1991. Prinsip-prinsip budidaya ikan. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.