

EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN *Macaranga tanarius* DALAM MENGINAKTIFASI VIRAL NERVOUS NECROSIS IKAN KERAPU TIKUS

Saparuddin^{1*}, A. Ridwan², Z. Arham³

¹Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sembilanbelas November, Kolaka

²Jurusan Biologi Fakultas Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung

³Jurusan Matematika dan Pengetahuan Alam Fakultas Tarbiyah Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Kendari

^{1*}e-mail : saparuddin_pbio@usn.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi senyawa kimia yang terkandung dalam daun *Macaranga tanarius* dan menguji efektivitasnya dalam menghambat virus Viral Nervous Necrosis (VNN) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) secara *invivo* melalui parameter hematologi yang meliputi jumlah leukosit, eritrosit, dan trombosit. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol dengan perendaman selama 72 jam. Berdasarkan hasil uji yang dilakukan melalui pemberian pakan pada ikan kerapu tikus dengan variasi berat ekstrak daun *Macaranga tanarius* yang berbeda diketahui bahwa ekstrak daun *Macaranga tanarius* efektif menaikkan jumlah eritrosit dan menurunkan jumlah leukosit serta memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Jumlah eritrosit tertinggi diperoleh pada perlakuan ke-4 ($3,73 \times 10^6$ sel/ml), sedangkan jumlah leukosit terendah pada perlakuan ke-4 ($7,8 \times 10^5$ sel/ml).

Kata Kunci : *Macaranga tanarius*, Ikan kerapu tikus, VNN, Ekstrak etanol, Parameter hematologi

ABSTRACT

This study aims to extract of the chemical compounds contained in the leaves of *Macaranga tanarius* and test their effectiveness in impede of Viral Nervous Necrosis (VNN) virus in humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) by *invivo* through hematologic parameters including leukocyte count, erythrocytes and platelets. The extraction process was carried out using ethanol solvent with immersion for 72 hours. Based on the results of the tests conducted through feeding on humpback grouper with weight variations different of macaranga tanarius leaf extract, it is known that *macaranga tanarius* leaf extract effectively increase the amount of erythrocytes and decrease the leukocyte count and give significant difference with the control group. The highest amount of erythrocytes was obtained at the 4th treatment (3.73×10^6 cells/mL), while the lowest leukocyte count was in the 4th treatment (7.8×10^5 cells /mL).

Keywords: *Macaranga tanarius*, humpback grouper, VNN, extract of ethanol, hematological parameters

PENDAHULUAN

Dalam beberapa tahun terakhir, VNN dilaporkan sebagai penyebab penyakit mematikan ikan kerapu tikus. Pemberian pakan dengan ikan rucah menyebabkan ikan kerapu tikus terinfeksi VNN (Rizka *et al.*, 2013). VNN akan menyerang organ otak dan secara cepat menyerang reseptor ikan kerapu tikus kemudian menyebar ke otak melalui sirkulasi darah. (Chi, 2006).

Keberadaan VNN dalam tubuh ikan kerapu tikus ditandai dengan munculnya beberapa gejala seperti warna tubuh menjadi gelap, berenang sambil berputar-putar, tubuh ikan menukil kebawah, menabrak dinding kolam, penutupan selaput mata, mengalami buta dan pelemahan syaraf, serta menyebabkan ikan menjadi mati (Yanuhar, 2011). Selain itu, ikan yang terinfeksi menyebabkan perbedaan pada jumlah leukosit, eritrosit, dan trombosit (Lagler *et al.*, 1977).

Irianto (2005) menyatakan bahwa pemeriksaan darah ikan merupakan faktor sangat penting dalam membantu diagnosis, prognosis, dan terapi. Namun sejauh ini pemeriksaan darah ikan kerapu tikus dari aspek hematologi belum banyak yang melaporkan. Sehingga untuk mengetahui status ikan terinfeksi, maka perlu dilakukan pemeriksaan karakteristik darah, yang nantinya dapat digunakan sebagai solusi penanganan VNN pada ikan kerapu tikus. Dimana berdasarkan

studi literatur, cara penanganan infeksi VNN pada budidaya ikan kerapu tikus hingga saat ini belum ditemukan.

Berdasarkan uji *invitro*, ekstrak etanol daun *Macaranga tanarius* dilaporkan memiliki efektivitas yang baik dalam menghambat perkembangan virus pada ikan. Daun *Macaranga tanarius* mengandung senyawa kimia yang bersifat fenolik seperti senyawa flavonoid, tannin, terpenoid dan lignan (Lim *et al.*, 2008). Senyawa flavonoid (quercetin, morin, rutin, dan hesperidin) memiliki kemampuan secara *invitro* untuk menghambat siklus replikasi virus yaitu pada tahap adsorpsi dan penetrasi (Calvalho *et al.*, 2013). Senyawa tanin dapat menghambat pertumbuhan virus immunodeciency human (HIV) dan virus herpes simpleks (HSV) (Lee *et al.*, 2000).

Dalam penelitian ini kami melaporkan efektivitas ekstrak etanol daun *Macaranga tanarius* dalam menginaktivasi virus VNN pada ikan kerapu melalui pemberian pakan yang selanjutnya diuji secara *invivo* melalui parameter hematologi. Berdasarkan studi literatur yang kami lakukan, uji secara *invivo* dari senyawa kimia yang terkandung dalam daun *Macaranga tanarius* khususnya pada ikan kerapu tikus belum dilaporkan.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun *M. tanarius* diawali dengan pengeringan pada suhu ruang dan dilanjutkan dengan

penghalusan. Serbuk halus kemudian direndam dengan menggunakan etanol 80% selama 72 jam yang disertai dengan pengadukan. Ekstrak daun *Macaranga tanarius* diuapkan dengan evaporator pada suhu 65°C hingga berbentuk pasta.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dengan berat badan rata-rata $824,4 \pm 156,23$ g. Hewan uji tersebut diperoleh dari petani budidaya dengan diberikan pakan ikan rucah selama pemeliharaannya. Menurut Rizka *et al.*, (2013) bahwa pemberian pakan dengan ikan rucah akan terinfeksi VNN. Hewan uji diseleksi sesuai dengan gejala-gejala klinik yang disebabkan oleh VNN yaitu warna tubuh menggelap, berenang berputar-putar, tubuh ikan menukil kebawah, ikan menabrak dinding kolam, penutupan selaput mata, mengalami buta dan pelemahan syaraf dan ikan mati (Yanuhar, 2011).

Perlakuan

Sebanyak 25 ekor ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN dibagi ke dalam 5 kelompok jaring apung. Setiap kelompok berisi 5 ekor ikan dengan lima kali ulangan. Perlakuan 1, 2, 3 dan 4 masing-masing diberikan ekstrak daun *M. tanarius* dicampur dengan pakan ikan komersil berturut-turut 2 g, 3 g, 4 g dan 5 g. Ikan kontrol hanya diberikan pakan komersil.

Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah diambil pada hari ke-0, hari-10, hari ke-20 dan hari ke-30 setelah pemberian pakan 2 kali/hari. Pengambilan sampel darah menggunakan *syringe* melalui vena caudalis dekat ekor di antara sisik ikan kerapu tikus. Sampel darah dihisap perlahan sebanyak 3 mL setiap ekor, kemudian dipindahkan ke dalam tabung hampa udara yang telah dibasahi terlebih dahulu dengan antikoagulan.

Penghitungan Jumlah Eritrosit

Sampel darah ikan dihisap dengan pipet toma eritrosit hingga tanda 0,5 dengan aspirator. Selanjutnya, larutan Heyem dihisap hingga tanda 101. Diteteskan pada hemositometer yang terpasang kaca penutup. Penghitungan menggunakan mikroskop pada 5 kotak kecil hemositometer. Jumlah eritrosit per mL darah adalah jumlah sel x 10000.

Penghitungan Jumlah Leukosit

Sampel darah ikan dihisap dengan pipet leukosit hingga tanda 0,5 dengan aspirator. Selanjutnya, larutan turk dihisap hingga mencapai tanda 11. Cairan dalam pipet diteteskan ke dalam hemositometer yang terpasang kaca penutup. Perhitungan menggunakan mikroskop pada 4 kotak besar perhitungan leukosit. Jumlah leukosit per mL darah adalah jumlah sel x 50.

Penghitungan Jumlah Trombosit

Sampel darah ikan dihisap dengan pipet berskala sampai 0,5. Selanjutnya cairan Rees Ecker dihisap hingga mencapai

tanda 101. Cairan di teteskan ke dalam hemositometer yang terpasang kaca penutup. Penghitungan dilakukan menggunakan mikroskop pada seluruh bidang besar tengah. Jumlah leukosit per mL darah adalah jumlah trombosit x 2000.

Analisis Data

Pengaruh ekstrak etanol daun *M. tanarius* melalui data hematologi ikan kerapu tikus dianalisis secara sidik ragam (ANOVA). Jika analisis menunjukkan berpengaruh nyata atau $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka dilanjutkan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

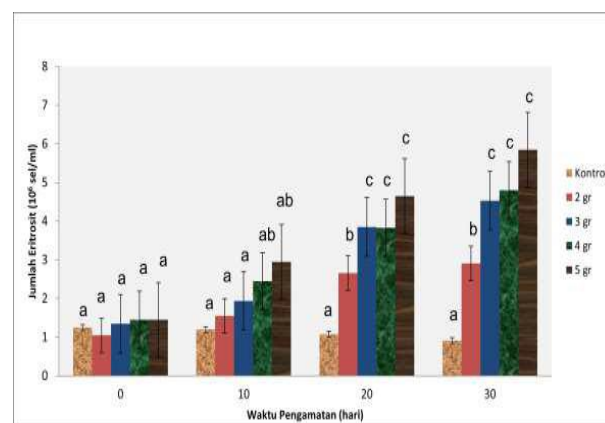
Parameter hematologi yang diukur meliputi jumlah eritrosit, jumlah leukosit, dan jumlah trombosit dengan dosis perlakuan pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius* yang dicampur dengan pakan ikan komersil yaitu kontrol (tanpa ekstrak), P_1 (2 gr), P_2 (3 gr), P_3 (4 gr) dan P_4 (5 gr) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata jumlah eritrosit, jumlah leukosit dan jumlah trombosit ikan kerapu tikus setelah 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, ab, b, dan c) pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$)

Dosis	Eritrosit (10^6 sel/ml)	Leukosit (10^6 sel/ml)	Trombosit (10^5 sel/ml)
Kontrol	1.11 ± 0.15^a	2.12 ± 0.31^a	1.45 ± 0.18^a
P_1 (2 gr)	2.04 ± 0.88^{ab}	1.58 ± 0.58^b	1.81 ± 0.18^a
P_2 (3 gr)	2.91 ± 1.51^{bc}	0.99 ± 0.49^c	1.37 ± 0.25^a
P_3 (4 gr)	3.14 ± 1.48^c	0.91 ± 0.48^c	1.44 ± 0.58^a
P_4 (5 gr)	3.73 ± 2.04^c	0.78 ± 0.57^c	1.65 ± 0.43^a

Jumlah Eritrosit

Eritrosit adalah cakram bikonkaf tidak berinti yang berdiameter $\pm 8 \mu\text{m}$, tebal bagian tepi $2 \mu\text{m}$ dan ketebalan bagian tengah menjadi $1 \mu\text{m}$. Komponen utama eritrosit adalah hemoglobin protein yang mengangkut sebagian besar oksigen (O_2) dan sebagian kecil fraksi karbon dioksida (CO_2). Menurut Kabata (1985) dan Bijanti, (2005) bahwa eritrosit diproduksi pada organ hematopoietik, yang terdapat di ginjal dan limpa. Jika organ ini tidak dapat memproduksi darah untuk mengganti darah yang diinfeksi oleh mikroorganisme, maka jumlah eritrosit yang dapat berfungsi dengan baik makin berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Esteban, (2001) dan Dugenci *et al* (2003) bahwa jumlah eritrosit menurun setelah terinfeksi mikroorganisme. Data hasil penelitian menunjukkan peningkatan kadar eritrosit pada semua perlakuan ekstrak daun *M. tanarius* sampai pengukuran hari ke-30 (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata jumlah eritrosit ikan kerapu tikus selama 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, ab, b, dan c) pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$)

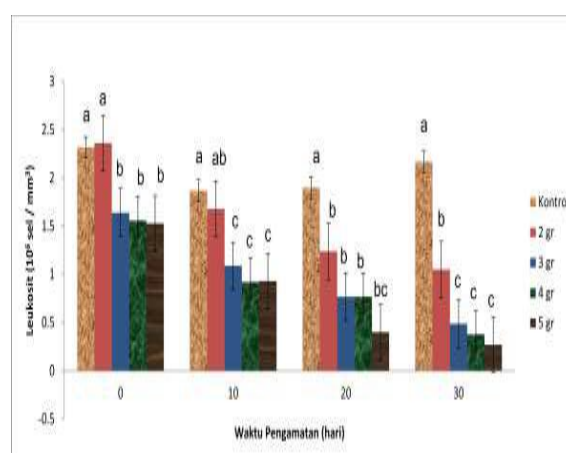
Semakin tinggi perlakuan dosis ekstrak

daun *Macaranga tanarius*, maka jumlah eritrosit ikan kerapu tikus semakin tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Jumlah eritrosit paling tinggi ditemukan pada perlakuan ke-4, selanjutnya pada perlakuan ke-3, ke-2 dan ke-1 dengan jumlah secara berturut-turut $3,73 \times 10^6$ sel/ml; $3,14 \times 10^6$ sel/ml; $2,91 \times 10^6$ sel/ml; $2,04 \times 10^6$ sel/ml; dan $1,11 \times 10^6$ sel/ml. Jumlah eritrosit tertinggi pada perlakuan ke-4 tersebut menunjukkan jumlah eritrosit normal ikan laut. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Andayani *et al* (2008) bahwa jumlah eritrosit normal ikan laut antara $3,45 - 4,45 \times 10^6$ sel/ml. Pemberian ekstrak daun *M. tanarius* yang didalamnya terkandung senyawa flavonoid memberikan kenaikan jumlah eritrosit setelah terinfeksi VNN. Karena, flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai antivirus. Senyawa flavonoid dapat menghambat proses replikasi virus pada tahap adsorpsi dan tahap penetrasi dengan cara mengikat partikel virus secara irreversibel dan menghambat glikoprotein virus untuk proses infeksi (Calvalho *et al.*, 2013). Penghambatan senyawa flavonoid terhadap replikasi VNN pada sel darah ikan kerapu tikus dapat mengurangi jumlah sel yang terinfeksi dan jumlah VNN. Seiring dengan berkurangnya jumlah sel yang terinfeksi dan jumlah VNN pada sel darah, maka organ hematopoietik pada ginjal dan limpa dapat memproduksi eritrosit untuk menggantikan sel-sel eritrosit yang terinfeksi VNN hingga

meningkat kearah jumlah eritrosit normal.

Jumlah Leukosit

Leukosit pada ikan teleostei merupakan salah satu bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bersifat non-spesifik (Uribe *et al.*, 2011). Menurunnya jumlah leukosit disebut leukopenia sedangkan meningkatnya jumlah leukosit disebut leukositosis. Leukosit yang diproduksi akan tinggi jika terdapat infeksi virus pada tubuh ikan dan terdapat upaya dari tubuh ikan tersebut untuk melawan (Azar, 2013). Hasil pengamatan jumlah leukosit ikan kerapu tikus pada hari ke-0 yang terinfeksi VNN sangat tinggi dari normal sebesar $2,12 \times 10^6$ sel/ml. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Azhar (2013) bahwa jumlah leukosit ikan kerapu tikus setelah di uji tantang dengan *V. Alginolyticus* meningkat sebesar $9,23 \times 10^6$ sel/ml. Peningkatan jumlah leukosit ini terkait dengan kinerja sistem imun ikan dalam mereduksi infeksi VNN.



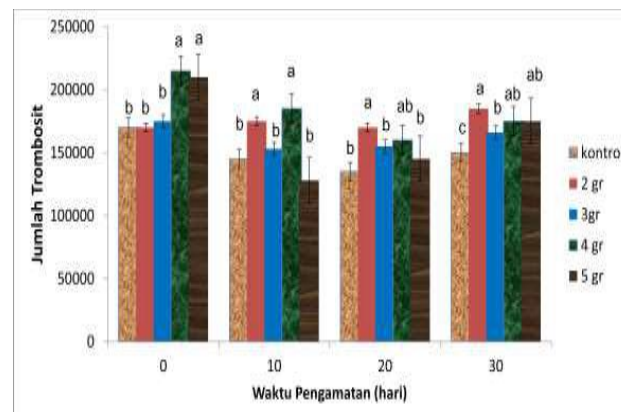
Gambar 2 : Rata-rata jumlah leukosit ikan kerapu tikus selama 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, ab, b, bc, dan c) pada kolom sama sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$)

Data hasil penelitian menunjukkan penurunan kadar leukosit ikan kerapu tikus pada semua kelompok perlakuan ekstrak etanol daun *Macaranga tanarius* kecuali perlakuan kontrol. Jumlah leukosit terendah terdapat pada perlakuan ke-4 selanjutnya perlakuan ke-2; ke-3 dan ke-1 dengan jumlah secara berturut-turut $0,78 \times 10^6$ sel/mL; $0,99 \times 10^6$ sel/mL; $0,91 \times 10^6$ sel/mL; dan $1,58 \times 10^6$ sel/mL (Gambar 2). Jumlah leukosit terendah pada perlakuan ke-4 tersebut menunjukkan jumlah leukosit ikan laut mendekati normal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Andayani *et al*, (2008) bahwa jumlah leukosit normal ikan laut antara $0,65 - 0,76 \times 10^6$ sel/mL. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun *Macaranga tanarius* yang mampu memberikan penurunan jumlah leukosit setelah terinfeksi VNN. Karena, senyawa flavonoid terutama quercetin dan hesperidin aktif menghambat replikasi virus dan mengganggu sintesis asam nukleat virus (Formica dan Regelson, 1995). Aktivitas senyawa flavonoid yang menghambat replikasi virus pada sel darah ikan kerapu tikus berdampak pengurangan jumlah sel yang terinfeksi dan jumlah VNN, sehingga jumlah leukosit akan menurun seiring dengan berkurangnya jumlah sel yang terinfeksi dan jumlah VNN pada sel darah ikan kerapu tikus.

Jumlah Trombosit

Trombosit atau keping-keping darah berperan penting dalam proses

pembekuan darah. Roberts dan Richards (1978) menyatakan bahwa trombosit mengeluarkan tromboplastin yaitu enzim yang membuat polimeri dan fibrinogen yang berperan penting dalam pembekuan darah.



Gambar 3 : Rata-rata jumlah trombosit ikan kerapu tikus selama 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, ab, b, dan c) pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$)

Hasil yang ditunjukkan memperlihatkan bahwa jumlah trombosit pada ikan kerapu tikus tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan setelah diberikan ekstrak etanol daun *Macaranga tanarius*. Kenyataan ini menunjukkan bahwa jumlah trombosit ikan kerapu tikus tidak terpengaruh oleh adanya pemberian ekstrak etanol daun *Macaranga tanarius*. Hal ini diduga karena infeksi VNN tidak menyebabkan pendarahan pada organ ikan kerapu tikus, tetapi VNN lebih cepat menyerang organ otak dan langsung menyerang reseptor sel-sel saraf ikan sehingga dapat mempengaruhi perilaku ikan kerapu tikus.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol daun

Macaranga tanarius melalui pemberian pakan mampu menginaktivasi VNN pada ikan kerapu tikus, ditandai dengan meningkatnya jumlah eritrosit, dan menurunnya jumlah leukosit mendekati jumlah normal leukosit ikan.

Daftar Pustaka

- Andayani, S., Marsoedi., Sanoesi, E., Wilujeng. A. E., dan H. Suprastiani. 2008. *Profil Hematologi Beberapa Ikan Air Tawar Budidaya*. Jurusan MSP, Fakultas Perikanan dan Kelautan, UB Malang.
- Angka S. L, GT Wongkar, Karwani. 1985. *Blood Picture and Bacteria Isolated From Ulcered and Crooked-Black Clarias Batrachus*. Symposium On Pract. Measure for Preventing and Controlling Fish Disease. BIOTROP. 17 P.
- Azhar. F., *Pengaruh Pemberian Probiotik dan Prebiotik Terhadap Performan Juvenile Ikan Kerapu Bebek (Cromileptes altivelis)*. Laboratorium Kesehatan Ikan. Institut Pertanian Bogor . Bogor 16680.
- Bastiawan, D., A. Wahid., M. Alifudin, dan I. Agustawan. 2001. Gambaran Darah Lele dumbo (*Clarias spp.*) yang Diinfeksi Cendawan *Aphanomyces* spp pada pH yang Berbeda. *Jurnal penelitian Indonesia* 7 (3) : 44-47.
- Bijanti, R. 2005. *Hematologi Ikan : Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan*. Bagian ilmu kedokteran hewan veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Carvalho, C., Botelho, C., Ferreira, H., Ferreira, M. R., Santosa, M., Diaz, T., Oliveira, J. A., Soares-Martins, M., Almeida, A., Silva Júnior. 2013. *In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design*. Laboratório de Virologia Animal (LVA), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- Chi, S. C. 2006. *Piscine Nodavirus Infections in Asia. First International Symposium on Viral Nervous Necrosis of Fish International Conference Center, Hiroshima, November 28 to December 1, 2006*.
- Dugencie, S. K., Arda, N and A. Canda. 2003. Some Medicinal Plants as Immunostimulant for fish. *Journal of ethnopharmacology*. 88 : 99-106.
- Esteban, M. A., Cuesta, A., Betuna, J and J. Meseguer. 2001. *Immunomodulatory effects oddietary intake of chitin on Gilthead Seabream (Sparus aurata L) Innate Immunesystem*. J. Fish and Shellfish Immunology. 11 : 303-313.
- Fänge, R. 1994. Blood Cell, Haemopoiesis and Lymphomyeloid tissues in fish. *Journal of fish and shellfish Immunology*. 10 : 234-244.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. *Review of biology of quercetin and related bioflavonoids*. Food and Chemical Toxicology. 33. 1061–1080
- Hesser EF. 1960. *Methods for Routine Fish Hematology*. Progressive Fish Culturist.
- Irianto Agus. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics*. Taylor and Frandhis Ltd. London. 318p.
- Lagler KF, Bardach JE, RR Miller, Passino DRM. 1977. *Ichthyology*. John Willey and Sons. Inc. new York-London. Hlm 506.
- Lee, M. H., Jwo-Farn Chiou., Kun-Ying Yen., Yang, L.L., 2000. *EBV DNA polymerase inhibition of tannins from Eugenia uniflora*. Graduate Institute of Pharmacognosy Science, Taipei Medical College, 250 Wu-Hsing Street, Taipei 110, Taiwan
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y., C.M. Yule, C.M., 2008. *Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species*. School of Science, Monash University Sunway Campus, Jalan Lagoon Selatan, Bandar Sunway,

- 46150 Petaling Jaya, Selangor, Malaysia.
- Rizka R P, Yanuhar U, Suryanto A M. 2013. *Perubahan Struktur Jaringan Mata dan Otak pada Larva Ikan Kerapu Tikus (C. altivelis) Yang Terinfeksi Viral Nervous (VNN) Dengan Pemeriksaan Scanning Electro Microscope (SEM)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Siakpere, O.K. 1985. *Haematological Characteristics of Clarias Fisheriensis*. *S.J Fish Biology*. **27** (3). 259-264.
- Uribe C, Folch H Enriquez R, dan Moran G. 2001. *Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review*. *Veterinari Medicina* **56** (10) : 484-503.
- Yanuhar, U. 2011. *The Function of Receptor Protein Humpback Grouper *Cromileptes altivelis* in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of Viral Nervous Necrotic Infection*. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **1** (2).