



Pengaruh Ekstrak Biji Kapulaga Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Usus Ikan Gurame yang Diinfeksi Bakteri

Effect of Cardamom Seed Extract (Amomum Compactum) on Hematological Profile and Histopathology of Gouramy Intestine Infected with Bacteria (Edwardsiella Tarda)

^{1)*} Faridatun Amalia Hasanah, ²⁾ Arief Prajitno, ³⁾ Mohamad Fadjar

^{1,2,3} Studi Budidaya Perairan, Indonesia

Email: ^{1)} faridatunamalia25@gmail.com, ²⁾ Author@gmail.com, ³⁾ Author@gmail.com

*Correspondence: ¹⁾ Faridatun Amalia Hasanah

DOI:

10.36418/comserva.v2i4.298

Histori Artikel

Diajukan : 01-08-2022

Diterima : 10-08-2022

Diterbitkan : 29-08-2022

ABSTRAK

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan ikan tawar dengan kebutuhan tinggi mencapai 40 ton/hari. Serangan bakteri (*Edwardsiella tarda*) sering menjadi masalah budidaya yang mengganggu kesehatan ikan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis konsentrasi ekstrak etanol 70% biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang efektif dalam mengobati ikan gurame yang terinfeksi bakteri *E.tarda* kaitannya dengan hematologi dan histopatologi usus. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Juni 2022 di Laboratorium Penyakit Ikan, Universitas Brawijaya. Metode yang digunakan yaitu metode eksperimental Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah perendaman ikan yang terinfeksi bakteri *E.tarda* dalam larutan ekstrak etanol 70% biji kapulaga dengan konsentrasi 250 mg/L, 275 mg/L, 300 mg/L, 325 mg/L dan 350 mg/L. Parameter yang diamati meliputi perubahan hematologi, histopatologi usus, kelangsungan hidup dan kualitas air. Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan yang signifikan pada pengamatan hematologi setelah diberikan ekstrak pada konsentrasi 300 mg/L dengan nilai rata-rata eritrosit ($3,16 \times 10^6$ sel/mm³), leukosit ($20,55 \times 10^4$ sel/mm³), limfosit (63%), neutrofil (14%) dan monosit (14%). Hasil pengamatan pada perubahan histologi usus juga menunjukkan adanya kerusakan berupa nekrosis, hemoragi dan edema sebelum perlakuan dan mengalami penurunan terbaik setelah pemberian ekstrak pada dosis 300 mg/L yaitu 1,87 (nekrosis), 1,33 (hemoragi) dan 1,27 (edema). Kelangsungan hidup ikan gurame yang terinfeksi bakteri *E.tarda* setelah diberikan ekstrak selama 24 jam dan dipelihara selama 14 hari mengalami kematian 67% (250 mg/L), 71% (275 mg/L), 78% (300 mg/L), 62% (325 mg/L) dan 56% (350 mg/L). Sementara pengamatan kualitas air menunjukkan hasil yang sesuai dengan nilai optimumnya, sehingga tidak memberikan pengaruh buruk pada ikan uji. Berdasarkan uraian hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan ekstrak pada konsentrasi 300 mg/L merupakan dosis yang paling efektif untuk mengobati ikan gurami yang terinfeksi bakteri *E.tarda*.

Kata kunci: Gurame; Ekstrak; Kapulaga; *E.tarda*; Usus

ABSTRACT

Gouramy (Osphronemus gouramy) is a freshwater fish with a high demand up to 40 tons/day. Bacterial attack (Edwardsiella tarda) is often a problem for aquaculture that interferes with fish health. The purpose of this study is to analyze the concentration of 70% ethanol extract of cardamom seeds (Amomum compactum) which is effective in treating carp infected with E. tarda bacteria

in relation to hematology and intestinal histopathology. The research was conducted in February – June 2022 at the Fish Disease Laboratory, Universitas Brawijaya. The method used is the experimental method of Completely Randomized Design (CRD) with five treatments and three replications. The treatment used was soaking fish infected with E. tarda bacteria in a solution of 70% ethanol extract of cardamom seeds with concentrations of 250 mg/L, 275 mg/L, 300 mg/L, 325 mg/L and 350 mg/L. Parameters observed included changes in hematology, intestinal histopathology, survival rate and water quality. The results showed a significant change in hematological observations after being given the extract at a concentration of 300 mg/L with an average value of erythrocytes (3.16×10^6 cells/mm³), leukocytes (20.55×10^4 cells/mm³), lymphocytes (63%), neutrophils (14%) and monocytes (14%). The results of observations on changes in intestinal histology also showed damage in the form of necrosis, hemorrhage and edema before treatment and experienced the best decrease after administration of extract at a dose of 300 mg/L, namely 1.87 (necrosis), 1.33 (haemorrhage) and 1.27 (edema). The survival of carp infected with E. tarda bacteria after being given the extract for 24 hours and reared for 14 days experienced mortality of 67% (250 mg/L), 71% (275 mg/L), 78% (300 mg/L), 62% (325 mg/L) and 56% (350 mg/L). Meanwhile, observations of water quality showed results that were in accordance with the optimum value, so that it did not have a bad effect on the test fish. Based on the description of the results of this study, it can be concluded that the use of extracts at a concentration of 300 mg/L is the most effective dose to treat gourami infected with E. tarda bacteria.

Keywords: *Gouramy; extract; cardamom; E. tarda; intestine*

PENDAHULUAN

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan ikan tawar yang bernilai gizi dan ekonomis tinggi dengan harga relatif tinggi yaitu sekitar Rp. 35.000 – 50.000 per kg (Ma'arif, 2017). Masalah utama yang sering dihadapi para petani yaitu serangan penyakit oleh bakteri. Beberapa bakteri yang menginfeksi ikan tawar yaitu *Aeromonas hydrophila* dan *Edwardsiella tarda* (LAPANG & TIMUR, 2019).

E. tarda dikenal sebagai penyakit utama pada budidaya ikan air tawar terutama *catfish* di negara United States. Penyakit ini tidak memproduksi endotoksin seperti bakteri gam negatif lainnya, tetapi menghasilkan 2 eksotoksin (hemolisin dan dermatosin) (Amrullah et al., 2015). (Mangunwardoyo et al., 2016) menyatakan bahwa hemolisin mampu melisis sel darah merah sehingga darah akan keluar melewati luka pada tubuh ikan yang terinfeksi bakteri. Dermatoksin yaitu rusaknya kulit dan juga membran selulosa. Bakteri ini dapat masuk kedalam tubuh ikan melalui sistem pencernaan, dimana akan dialirkan oleh darah hingga mencapai tubuh/jaringan ikan (Tauhid et al., 2015). Infeksi yang diakibatkan oleh bakteri (*E. tarda*) juga mengakibatkan adanya gangguan kesehatan maupun perubahan fisiologis pada ikan. Hal ini dapat diketahui melalui perubahan yang terjadi pada komponen darah dan perubahan fisiologisnya terutama usus.

Usus merupakan organ pencernaan terpanjang pada ikan yaitu dimulai dari pilorik sampai ke anus (Aanyu et al., 2014). Terjadinya kerusakan pada usus dapat disebabkan oleh mikroba, zat toksik maupun patogen yang masuk ke dalamnya. Biasanya patogen dapat masuk secara lokal ke dalam usus melalui perendaman dan pakan yang dimakan oleh ikan (Diba & Rahman, 2018). Beberapa penelitian telah menyatakan bahwa usus dan celah kulit adalah situs yang paling memungkinkan masuknya bakteri *E. tarda* (Buller, 2014). (Juanda & Edo, 2018) menyatakan bahwa hematologi pada usus biasanya

banyak terjadi pada bagian sub mukosa usus dengan adanya eritrosit yang keluar dari pembuluh darah pada jaringan usus.

Berdasarkan uraian tersebut, perlu adanya upaya penanggulangan yang tepat melalui tindakan pencegahan atau pengobatan tanpa penggunaan antibiotik. Antibiotik telah dilarang dalam dosis yang tinggi, karena mengakibatkan adanya galur resistensi dari bakteri dan mencemari lingkungan perairan. Salah satu cara untuk meminimalisir hal tersebut yaitu dengan menggunakan tumbuhan alam sebagai obat yang juga dapat bersifat antibakteri salah satunya kapulaga.

Kapulaga adalah salah satu rempah yang dihasilkan oleh Indonesia yang juga merupakan komoditas ekspor. Biji kapulaga (*A. cardamomum*) diketahui memiliki kandunga minyak atsiri sebesar 3 – 7% yang terdiri atas sineol, borneol, dan terpineol (Anto, 2020). Disamping mengandung minyak atsiri, juga mengandung saponin, flavonoida dan polifenol, (Anto, 2020). Komponen-komponen dalam kapulaga termasuk dalam golongan fenol dan terpena. Senyawa fenol aktif sebagai antibakteri dengan mekanisme membentuk kompleks dengan protein sel sehingga menghambat kerja enzim pada sel bakteri. (Iskandar et al., 2014) menyatakan bahwa mekanisme kerja kapulaga sebagai antibakteri ini dapat dilakukan melalui metode perendaman. Metode ini diawali dengan masuknya cairan ekstrak ke mulut ikan melalui proses difusi atau osmosis, kemudian mengalir melalui peredaran darah dan selanjutnya dialirkan ke seluruh tubuh ikan.

METODE

1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari 2021 – Juni 2022 di Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Materia Medica Batu.

2. Materi Penelitian

1) Bahan Penelitian

Materi penelitian ini diawali dengan menggunakan ikan gurame soang berumur sekitar 5 bulan (4 – 7 cm) dari pembudidaya gurame di Tulungagung. Selanjutnya, kapulaga (*A. compactum*) diperoleh dari pasar tradisional daerah Malang, Jawa Timur. Pelarut untuk maserasi yaitu etanol 70% dan bahan untuk kultur bakteri serta uji daya hambat antibakteri yaitu bakteri *E. tarda* yang diperoleh dari Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, Dan Keamanan Hasil Perikanan, Jakarta.

3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada studi ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan model sebagai berikut menurut (Sastrosupadi & Krismawati, n.d.):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : Respon nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

M : Nilai tengah umum

T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Studi ini dilakukan berdasarkan 5 perlakuan percobaan dengan 3 kali ulangan dan 2 kontrol (kontrol normal dan kontrol infeksi). Perlakuan yang diberikan yaitu ekstrak kapulaga dilanjut dengan pengamatan terhadap profil darah dan jaringan usus setelah diuji tantang oleh bakteri *E. tarda*. Penempatan media dilakukan secara acak yang ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 1. Denah penempatan media penelitian

Keterangan:

A, B, C, D, E = 250 mg/L, 275 mg/L, 300 mg/L, 325 mg/L, 350 mg/L

1, 2, 3 = Ulangan

K+ = Kontrol normal

K- = Pemberian antibakteri sintesis

4. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari penelitian tahap pertama dan kedua, sebagaimana dijelaskan dibawah ini.

1) Tahap 1 (Pertama)

a. Pembuatan Serbuk dan Ekstrak Biji Kapulaga

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode remaserasi, dimana serbuk kapulaga sebanyak 200 g dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 2000 ml selama 3 x 24 jam. Setelah itu, maserat dievaporasi dengan rotary evaporator vacuum pada suhu 50°C dan dihitung rendemennya dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat}}{\text{Berat simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

b. Uji Identifikasi Senyawa

Uji identifikasi senyawa bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif dan senyawa dominan yang ada di dalam ekstrak biji kapulaga.

a) Uji Fitokimia

(a) Uji Alkaloid

Pereaksi Mayer akan mengandung alkaloid apabila membentuk endapan putih atau kuning. Pereaksi Wagner akan membentuk endapan coklat bila positif mengandung alkaloid, sedangkan Pereaksi Dragendrof akan membentuk endapan jingga jika mengandung alkaloid.

(b) Uji Flavonoid

Hasil akan menunjukkan positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna oranye, merah atau kuning.

(c) Uji Saponin

Apabila terbentuk busa setinggi 1 – 10 cm dengan waktu kurang dari 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang, maka positif mengandung saponin.

(d) Uji Steroid dan Terpenoid

Sampel mengandung terpenoid apabila terbentuk warna merah keunguan, positif mengandung steroid jika terbentuk warna hijau.

c. Uji Spektrofotometri UV-Vis (Ultraviolet-Visible)

Metode ini dilakukan dengan cara mengukur spektra panjang gelombang absorbansi dari radiasi ultra violet dari ekstrak biji kapulaga (panjang gelombang 190 nm – 1100 nm).

d. Uji Spektrofotometer FTIR (Fourier Transform-Infrared)

Analisis senyawa dengan uji FTIR dilakukan dengan mengukur spektrum FTIR (Panjang gelombang 700 – 200 cm⁻¹ dan analisa).

e. Kultur Bakteri

Kultur bakteri ini diawali dengan memasukkan media agar pada tabung reaksi kemudian disterilisasi dengan autoklaf (suhu 1210C, tekanan 1 atm).

f. Uji Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Uji MIC didasarkan pada indikator kekeruhan TSB yang telah ditanam bakteri dan ekstrak dengan dosis yang berbeda dan kemudian dibandingkan dengan tabung kontrol.

g. Uji Cakram

Uji ini memiliki tujuan untuk mengetahui daya hambat dari pemberian ekstrak dilihat dari zona bening pada sekeliling cakram. Prosedur uji cakram pada studi ini mengacu pada studi (Maftuch et al., 2018). Pengamatan media dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk didaerah kertas cakram (menggunakan jangka sorong).

h. Uji SEM (Scanning Electron Microscope)

Uji SEM dilakukan dengan tujuan mengetahui struktur morfologi yang rusak akibat adanya pemberian ekstrak berbahan aktif. Pengujian ini diawali pembuatan preparat *E. tarda* dengan dua kali perlakuan yaitu perlakuan normal dan perlakuan bakteri *E. tarda* yang diberi ekstrak biji kapulaga dengan dosis yang ditentukan. Setelah itu kedua preparate diamati menggunakan SEM. Kerusakan struktur sel bakteri dianalisis dengan cara membandingkan hasil.

2) Penelitian tahap 2 (Kedua)

a. Patogenitas *E. tarda* dengan Lethal Dossage 50 (LD50)

Pengujian ini digunakan untuk menentukan seberapa padat dan berapa lama bakteri *E. tarda* membunuh ikan yang diuji (Hussen Ali, 2012). Pengujian ini diawali dengan menyiapkan ikan sebanyak 50 ekor dan dibagi ke dalam 5 wadah percobaan. Setiap perlakuan direndam dalam 10 lt air dengan kepadatan bakteri 104 sel/ml, 105 sel/ml, 106 sel/ml, 107 sel/ml dan 108 sel/ml, lalu diamati selama 96 jam. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan EPA Prohibit Analysis dan mencatat waktu serta jumlah ikan yang mati (hingga 50%).

b. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Kapulaga dengan Lethal Concentration 50 (LC50)

Uji LC50 adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% organisme uji mengalami kematian. Penentuan nilai LC ini dilakukan dengan menggunakan pengembangan dosis ekstrak dari hasil uji MIC. Hasil data kemudian dianalisa dengan EPA Prohibit Analysis.

c. Infeksi *E. tarda* dan Perendaman Ekstrak Biji Kapulaga

Tahapan pada uji ini diawali dengan melakukan penginfeksian bakteri sesuai dengan kepadatan yang dibutuhkan sampai menunjukkan adanya tanda infeksius. Pada proses pengobatan, ikan gurame yang telah diinfeksi, kemudian direndam dengan ekstrak biji kapulaga sesuai dosis perlakuan. Pada masa pemeliharaan ikan diamati hematologi, histopatologi, gejala klinis dan tingkat kelulushidupan pasca infeksi dan pasca pengobatan.

5. Pengamatan Hematologi

Pengamatan hematologi ini dilakukan pada ikan normal yang telah diberi infeksi bakteri uji setelah 7 hari pasca pemberian ekstrak biji kapulaga. Selanjutnya pengambilan darah dengan spuit 1 ml yang sudah dicampur antikoagulan EDTA. Kemudian, dilakukan perhitungan jumlah eritrosit, leukosit serta diferensial leukosit, dengan rumus masing-masing sebagai berikut:

a. Eritrosit

Pengambilan darah ikan dilakukan pada bagian vena caudalis dekat ekor menggunakan syringe ukuran 1 ml steril yang telah dicampur koagulan. Setelah itu melakukan pengamatan jumlah eritrosit menggunakan mikroskop pada semua kotak eritrosit dengan rumus sebagai berikut:

$$(A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan:

$$\text{Eritrosit} = \text{Jumlah sel darah merah}$$

- A = Jumlah sel darah merah yang dihitung
- N = Jumlah kotak hemositometer yang diamati
- V = Volume haemositometer
- Fp = Faktor pengenceran

b. Leukosit

Perhitungan jumlah leukosit menurut (Blaxhall & Daisley, 1973) diawali dengan pengambilan darah ikan sebanyak 5 ml/ikan pada daerah arteri kaudal dengan spuit 1 ml sampai skala 0,5 µL. Jumlah total leukosit dapat dihitung dalam 4 kotak kecil dengan rumus di berikut:

$$(A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan:

- Leukosit = Jumlah sel darah putih
- A = Jumlah sel darah putih yang dihitung
- N = Jumlah kotak hemositometer yang diamati
- V = Volume haemositometer
- Fp = Faktor pengenceran

c. Diferensial Leukosit

Diferensial leukosit yang dihitung antara lain yaitu limfosit, neutrophil dan monosit. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Limfosit} = \frac{L}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ Monosit} = \frac{M}{100} \times 100\%$$

$$\% \text{ Neutrofil} = \frac{N}{100} \times 100\%$$

6. Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan beberapa tahapan uji, yaitu tahap fiksasi, dehidrasi, clearing, impregnasi, pengeblokkan, pewarnaan jaringan dengan Haematoxylin Eosin (HE), mounting, skoring, dan kelulushidupan (Roening et al., 1998). Pada tahap pengmatan dan skoring dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan pada ikan pasca diberi perlakuan. Skoring dilakukan dengan menghitung area yang terwarnai secara manual dan menghitung persentasenya. Persentase skoring terhadap tingkat kerusakan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai skoring dan persentase kerusakan jaringan

Nilai Skoring	Persentase Kerusakan (%)	Keterangan
0	0	Tidak rusak
1	1-25	Sedikit
2	26-50	Sedang
3	51-75	Banyak
4	76-100	Sangat banyak

Sumber: (Maftuch et al., 2018)

7. Kelulushidupan Ikan

Kelulushidupan pada ikan gurame dilihat setelah 7 hari masa pemeliharaan pasca pengobatan (Pratama et al., 2018) dan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : Kelulushidupan %
 Nt : Jumlah ikan akhir penelitian (ekor)
 No : Jumlah ikan pada awal penelitian (ekor)

8. Parameter Penunjang Penelitian

Adapun parameter penunjang lainnya pada studi ini yaitu pengukuran suhu air, pH dan oksigen terlarut.

9. Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan data yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data diolah dan dianalisis menggunakan aplikasi software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 for Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penelitian Tahap 1

1) Rendemen Ekstrak Etanol 70% Biji Kapulaga

Sebanyak 200 g serbuk kapulaga yang telah diremaserasi dengan pelarut etanol 70% dan dievaporasi menghasilkan ekstrak kental sebanyak 19 g yang berwarna kuning kemerah-merahan dengan rendemen sebesar 9,7%. Berikut adalah tabel rendemen dari hasil ekstraksi.

Tabel 2. Rendemen ekstrak etanol 70% biji kapulaga

Jenis Pelarut	Jumlah Pelarut (ml)	Berat Sampel (gr)	Berat Ekstrak (gr)	Rendemen (%)	Rasio	keterangan
Etanol 70%	4000	200	19,47	9,7	1:10	Hasil Uji

Berdasarkan pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa pelarut etanol yang digunakan pada ekstrak 70% menghasilkan rendemen paling tinggi yaitu sebesar 9,7%. Pelarut etanol 70% dipilih karena merupakan pelarut yang lebih polar dari etanol 90% dan juga lebih non polar dari etanol 50%. Hal ini dikarenakan konsentrasi etanol dapat mempengaruhi kelarutan senyawa fenolik di dalam pelarut. Proses ini terjadi dengan mengalirnya pelarut ke dalam sel, sehingga kandungan bahan aktif didalamnya akan terlarut sesuai dengan kelarutannya.

2) Uji Aktivitas Antibakteri

a. Uji MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

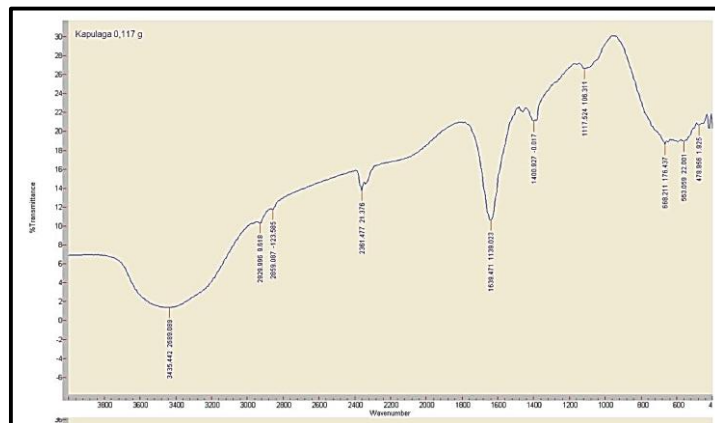
Data hasil uji MIC menunjukkan bahwa biji kapulaga yang diekstrak dengan pelarut etanol menghasilkan nilai absorbansi terendah pada konsentrasi 50 mg/L yaitu 0,273 dengan kepadatan bakteri 141×10^{19} seperti yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji MIC

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi Ekstrak Etanol 70% Biji Kapulaga	Σ Koloni bakteri (cfu/mL)
K-	0.989	231×10^{20}
K+	0.074	0
25	0.890	153×10^{19}
50	0.246	141×10^{19}
75	0.273	137×10^{18}
100	0.197	123×10^{11}
125	0.190	115×10^{10}

Keterangan: Kontrol positif (K+) dengan kloramfenikol 5 mg/L, kontrol negatif (K-) hanya bakteri

Berdasarkan data tersebut, rendahnya nilai absorbansi menunjukkan bahwa kepadatan bakteri



akan semakin berkurang seiring dengan penambahan dosis ekstrak. Sehingga, konsentrasi 50 mg/L ekstrak etanol dijadikan sebagai acuan untuk menentukan dosis uji cakram dan mengetahui secara mendalam pengaruhnya dalam menghambat bakteri.

b. Uji Cakram

Konsentrasi yang digunakan pada uji iniyaitu 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l dan 250 mg/l yang diamati pada jam ke-24 dan 48 setelah inkubasi. Hasil pengukuran zona bening sebagaimana disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji cakram

Konsentrasi (mg/l)	Rata-rata Diameter Zona Hambat		Aktivitas Antibakteri
	24 Jam	48 Jam	
K-	0 ± 0,0 ^a	0 ± 0,0 ^a	Lemah
50	9,25 ± 0,54 ^b	9,09 ± 0,49 ^b	Sedang
100	9,47 ± 0,12 ^b	9,71 ± 0,41 ^{bc}	Sedang
150	10,35 ± 0,39 ^c	9,77 ± 0,41 ^{bc}	Kuat
200	11,04 ± 0,06 ^d	9,94 ± 0,24 ^c	Kuat
250	12,02 ± 0,08 ^e	10,72 ± 0,63 ^d	Kuat
K+	10,92 ± 0,24 ^d	10,10 ± 0,19 ^{cd}	Kuat

Keterangan: Klasifikasi diameter zona hambat, lemah < 5 mm, sedang 5 – 10 mm, kuat 10 – 20 mm, sangat kuat > 20 mm (Jannata et al., 2014)

Berdasarkan hasil pengukuran di atas, diketahui bahwa zona hambat tertinggi dimulai dari konsentrasi ekstrak 200 mg/l dan 250 mg/l (jam ke 24 dan 48) dengan kategori kuat. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri *E. tarda*. Sesuai dengan pendapat (Chen et al., 2005), bahwa semakin besar daya antibakteri dan zona hambat dipengaruhi oleh semakin besarnya konsentrasi antimikroba yang digunakan. Namun, terdapat perbedaan zona hambat pada jam ke 24 dan 48. Dimana pada jam ke 24 mengalami peningkatan zona hambat, tetapi terjadi penurunan pada jam ke 48. Adanya penurunan tersebut dikarenakan isolat bakteri yang memasuki fase stasioner, dimana selama waktu pertumbuhannya, aktivitas bakteri akan meningkat dan jumlah sel akan semakin banyak.

3) Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Biji Kapulaga

Hasil uji fitokimia ekstrak etanol pada kapulaga disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol 70% kapulaga

Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
Flavonoid	Jingga, Merah Bata Merah Muda, Merah tua	(+)
Alkaloid	Endapan Putih, Jingga, Cokelat	(-)
Tanin/Fenol	Coklat Kehitaman, Biru Kehitaman	(+)
Terpenoid		
Steroid	Hijau Kebiruan	(-)
Triterpenoid	Orange, Jingga Kecoklatan	(+)
Saponin	Busa Permanen	(-)

Berdasarkan tabel hasil uji fitokimia tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% kapulaga memiliki kandungan senyawa golongan flavonoid, tannin/fenol dan triterpenoid yang bersifat polar. Penggunaan etanol sebagai pelarut yang bersifat polar dapat mengekstraksi dengan baik senyawa golongan fenolik seperti flavonoid dan juga tannin yang mampu berfungsi sebagai antioksidan maupun antiabakteri. Hal ini dikarenakan golongan senyawa tersebut memiliki gugus hidroksil yang mengakibatkan senyawa tersebut bersifat polar. Sementara triterpenoid yang dikatakan sebagai senyawa bersifat non polar dapat terekstraksi juga di dalam etanol. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Ergina et al., 2014), bahwa senyawa triterpenoid ini dapat larut dalam air/pelarut yang bersifat polar karena mampu untuk membentuk suatu ikatan hidrogen melalui atom O (oksigen) gugus hidroksil dan atom H pada air.

4) Analisis Spektrofotometri Fourier Transform Infrared (FTIR)

Berdasarkan data hasil spektrum FTIR, memperlihatkan adanya pita serapan yang kuat pada daerah 3435 dan 1639 cm^{-1} dengan masing-masing memiliki gugus fungsi berupa O-H unsur dan C=C alkena. Pita serapan pada bilangan 2929 dan 2361 cm^{-1} merupakan serapan sedang yang memiliki gugus fungsi C-H alifatik dan O-H. Sedangkan pada panjang gelombang 2859, 1400, 1117 dan 563 cm^{-1} merupakan serapan dari -CH₂-, ulur C-O dari karboksilat, C-O dari eter, dan PO₄³⁻ (Sedyono dan Tontowi, 2008). Hasil identifikasi senyawa aktif dengan spektrofotometer FTIR pada ekstrak kapulaga dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 6.

Gambar 2. Hasil analisis FTIR ekstrak biji kapulaga

Tabel 6. Analisis spektrofotometri FT-IR ekstrak biji kapulaga

No	Panjang Gelombang (cm^{-1})	Intensitas Serapan	Gugus Fungsi	Kelompok
1	3435	Kuat	O-H	Fenol
2	2929	Sedang	C-H (Alifatik)	Alkana
3	2859	Lemah	-CH ₂ -	Etil
4	2361	Lemah	O-H	Fenol
5	1639	Kuat	C=C (Alifatik)	Alkena
6	1400	Lemah	C=O	Karbonil
7	1117	Lemah	C-O	Karboksilat
8	668	Sedang	-	
9	563	Lemah	PO ₄ ³⁻	Posfat
10	478	Lemah	-	

Senyawa flavonoid memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon. Pita serapan pada gelombang 2929 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H alifatik. Pada interpretasi spektrum IR juga terdapat regangan ikatan rangkap seperti C=O pada daerah 1400 cm⁻¹ yaitu senyawa karbonil yang mungkin juga ditandai dengan adanya kandungan flavonoid dalam campuran kompleks O. seperti yang dijelaskan oleh Harbone (1987), menjelaskan bahwa adanya gugus hidroksil (O-H), C=C, C=O dan C-H alifatik pada pengamatan FTIR mengindikasikan senyawa flavonoid di dalamnya. Tidak hanya itu, berdasarkan hasil kajian (Aprilisna et al., 2015), gugus posfat yang terlihat pada pengamatan FTIR ini juga diduga menyebabkan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat. Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa pada ekstrak biji kapulaga bekerja secara sinergis. Sebagaimana yang dijelaskan oleh (Jangnga et al., 2018), bahwa aktivitas antibakteri dapat menjadi lebih kuat karena adanya kandungan senyawa pada ekstrak yang bekerja secara sinergis. Proses tersebut yakni dilakukan oleh senyawa fenolik termasuk flavonoid dan terpenoid yang mampu merusak membran luar bakteri gram negatif.

5) Analisis Spektrofotometri UV-vis (Ultraviolet-Visible)

Hasil data analisis uji UV-Vis dapat dilihat pada tabel berikut.

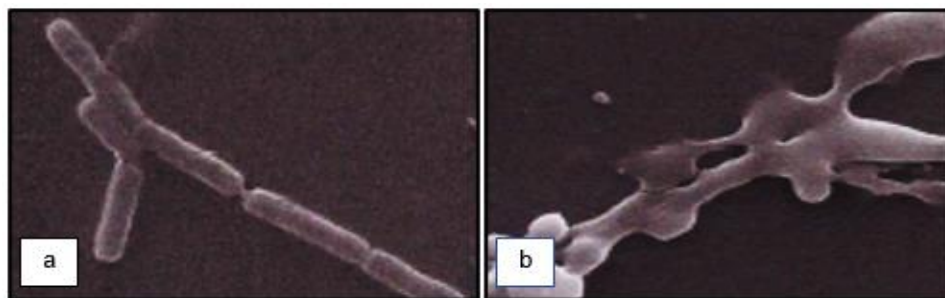
Tabel 7. Data titik puncak UV-Vis

Panjang Gelombang	Senyawa
204.00	Fenol
206.00	Fenol
214.00	Flavonoid
220.00	Flavonoid
257.00	Flavonoid
401.00	Karoten dan turunannya
600.00	Flavonoid
639.00	Klorofil

Tabel 7 menjelaskan bahwa hasil analisis UV-vis menunjukkan adanya serapan maksimum panjang gelombang <700 nm. Data tersebut juga disimpulkan bahwa hasil uji UV-Vis dominan berasal dari golongan fenol yaitu flavonoid dan juga terpenoid serta turunannya. Dimana data tersebut menunjukkan adanya serapan fenol dengan panjang gelombang dari 204 sampai dengan 257. Selain itu, tabel di atas juga menjelaskan bahwa distribusi partikel fenol semakin banyak akan berbanding lurus dengan serapan Panjang gelombang yang dihasilkan sesuai dengan Hukum Lambert Beer.

6) Uji SEM (Scanning Electron Microscope)

Pengamatan kerusakan sel bakteri *E. tarda* bertujuan untuk melihat pengaruh dari senyawa yang ada pada ekstrak biji kapulaga. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kerusakan sel bakteri *E. tarda* dilihat menggunakan SEM (50.000x). (a) Tanpa perlakuan, (b) Sel terpapar ekstrak

Gambar 3 menunjukkan bahwa bakteri terlihat memiliki bentuk yang utuh (batang) pada perlakuan kontrol. Sementara bakteri terlihat mengalami kerusakan dengan perubahan bentuk yang tidak beraturan pada perlakuan pemberian ekstrak dan terjadi perpanjangan ukuran sel. Hal ini diakibatkan karena adanya akumulasi senyawa antibakteri dalam sel, sehingga sel membesar dan diikuti dengan terjadinya kebocoran dan kematian sel. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa ekstrak biji kapulaga dalam hal ini mampu bertindak sebagai antibakteri dengan merusak sel bakteri.

7) Uji Patogenitas Bakteri *E. tarda* (LD₅₀)

Uji patogenitas *E. tarda* LD₅₀ dilakukan dengan menginfeksi ikan uji pada kepadatan bakteri 10⁴ - 10⁸. Hasil uji LD₅₀ menunjukkan peningkatan mortalitas ikan pada kepadatan bakteri yang tinggi (10⁸) seperti disajikan pada tabel.

Tabel 8. Hasil Uji Patogenitas *E. tarda*

Persentase Kematian (%)	Kepadatan Bakteri (cfu/mL)	Log Kepadatan Bakteri LD ₅₀
0	10 ⁴	0
1	10 ⁵	0,17 x 10 ⁵
15	10 ⁶	1,66 x 10 ⁶
50	10 ⁷	5,35 x 10 ⁷
95	10 ⁸	8,43 x 10 ⁸

Data pada tabel hasil uji LD₅₀ memperlihatkan bahwa pada ikan gurami dengan infeksi bakteri 10⁷ cfu/mL mengalami kematian sebesar 50% selama 96 jam. Tingkat patogenitas bakteri *E. tarda* bertambah pada kepadatan yang lebih tinggi yaitu 10⁸ sebesar 95% dalam waktu 24 jam.

Hasil yang berbeda ditunjukkan pada kepadatan bakteri yang lebih rendah, dimana persentase kematian ikan juga rendah yaitu sebesar 10% pada kepadatan 10⁶ cfu/mL dan tidak mengalami kematian pada kepadatan 10⁴ cfu/mL serta 10⁵ cfu/mL. Terjadinya hal tersebut diakibatkan oleh faktor ketahanan ikan yang berbeda. Ikan akan melindungi tubuhnya dari infeksi bakteri dengan memproduksi banyak lendir sehingga metabolisme meningkat serta energi yang dipakai akan lebih banyak.

2. Penelitian Tahap 2.

1) Uji Toksisitas Ekstrak biji Kapulaga (LC₅₀)

Uji toksisitas ekstrak kasar biji kapulaga dilakukan pada uji in vivo untuk mengetahui dosis yang dapat membunuh organisme sebanyak 50%. Penentuan nilai LC₅₀ dilakukan dengan menggunakan pengembangan dosis ekstrak dari hasil uji MIC (Fajri et al., 2016). Hasil uji Letal 50% yang didapatkan diketahui, bahwa dosis ekstrak yang paling tinggi mengakibatkan kematian sebesar 60% yaitu 350 mg/l dalam kurun waktu 48 jam. Dosis 250 mg/l dan 275 mg/l tidak menyebabkan kematian pada ikan uji selama 48 jam. Adapun data hasil mortalitas pada uji letal disajikan pada Tabel 9 dan Gambar 4 berikut ini.

Tabel 9. Hasil uji LC₅₀ ekstrak biji kapulaga

Konsentrasi (mg/L)	Log 10 (Konsentrasi)	Probit	Kematian (%)
250	2.39	0	0
275	2.44	3.72	10
300	2.47	4.75	40
325	2.51	4.75	40
350	2.54	5.25	60

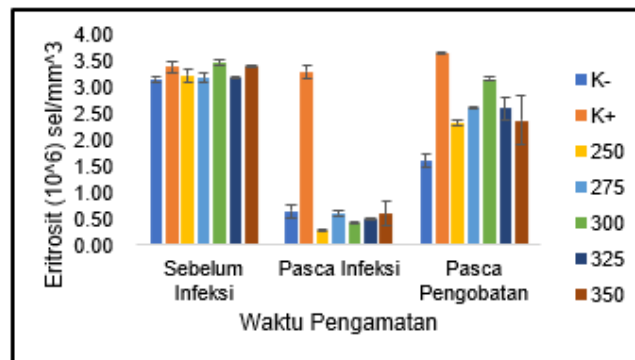
Berdasarkan data tersebut, dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, maka semakin rendah kelulusan hidup ikan. Penurunan kelulusan hidup tersebut diakibatkan

karena ketidakmampuan ikan menetralkan pengaruh yang ditimbulkan oleh ekstrak biji kapulaga yang diberikan. Kematian ikan ini diduga disebabkan oleh adanya potensi golongan senyawa yang terdapat pada biji kapulaga diantaranya flavonoid, fenol dan triterpenoid. Senyawa tersebut akan bersifat toksik pada konsentrasi tertentu (Cahyadi, 2009).

2) Hematologi

a. Eritrosit

Pengamatan nilai eritrosit ikan gurami dilakukan dengan perlakuan yang berbeda, yaitu K- (Kontrol infeksi), K+ (Kontrol normal), 250, 275, 300, 325 dan 350 mg/L ekstrak biji kapulaga. Sebagaimana disajikan pada gambar berikut.

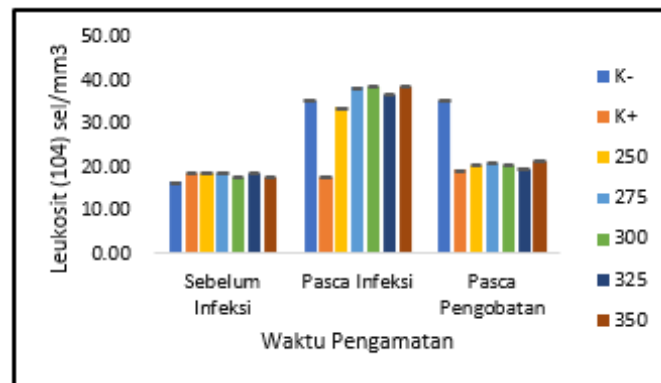


Gambar 5. Nilai Eritrosit Ikan Gurami Selama Penelitian Nilai Eritrosit Terlihat Mengalami Perubahan yang Signifikan Setelah Dilakukan

Pengobatan dengan ekstrak, dimana menunjukkan aktifitas peningkatan sel darah merah dengan nilai rata-rata sebesar $2,70 \times 10^6$ sel/mm³. Jumlah nilai eritrosit yang paling tinggi ditunjukkan pada konsentrasi 300 mg/L sebesar $3,16 \times 10^6$ sel/mm³ dibandingkan dengan dosis lainnya yang mengalami penurunan eritrosit. Jumlah total eritrosit pada perlakuan setelah pengobatan dengan ekstrak berada pada kisaran normal yaitu 1 – 3 juta sel/mm³. Hal ini diketahui bahwa pemberian ekstrak biji kapulaga tidak mengganggu pada kesehatan ikan, melainkan dapat meningkatkan kesehatan ikan setelah diinfeksi oleh bakteri. Adanya peningkatan kadar eritrosit merupakan faktor dari aktifitas senyawa flavonoid dan fenol pada ekstrak biji kapulaga yang memiliki fungsi sebagai antibakteri.

b. Leukosit

Hasil pengamatan jumlah leukosit ikan gurami setelah pemberian ekstrak biji kapulaga menunjukkan bahwa nilai rata-rata leukosit pada perlakuan sebelum infeksi atau ikan sehat lebih rendah yaitu sebesar $17,93 \times 10^4$ sel/mm³ dibanding dengan pasca infeksi dengan rata-rata nilai $34,66 \times 10^4$ sel/mm³. Jumlah leukosit kembali mengalami menurun pada perlakuan pasca pengobatan sebesar $12,45 \times 10^4$ sel/mm³ dari jumlah leukosit pada ikan sakit. Data hasil disajikan pada gambar berikut ini.

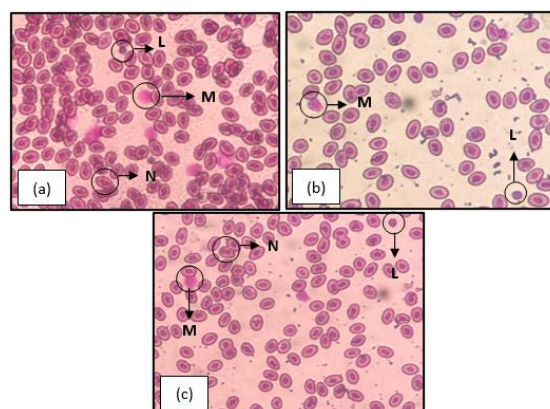


Gambar 6. Nilai Leukosit Ikan Gurame Selama Penelitian Dilihat pada Setiap Perlakuan Pemberian Ekstrak

Konsentrasi 300 dan 325 mg/L, tetapi konsentrasi lainnya menunjukkan nilai optimum pada ikan sehat. Hal ini diketahui bahwa peningkatan jumlah leukosit mengindikasikan respon ikan terhadap adanya benda asing di dalam tubuh ikan. Sementara penurunan yang terjadi disebabkan oleh sebagian leukosit yang bergerak menuju jaringan tubuh terinfeksi. Penurunan nilai leukosit juga disebabkan adanya aktivitas dari ekstrak dari biji kapulaga yang berperan dalam proses pengobatan ikan gurami pasca infeksi bakteri *E. tarda*. Selain itu juga, Wahjuningrum et al., (2008), menyatakan bahwa menurunnya jumlah leukosit pada ikan disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid pada ekstrak yang mampu memicu sistem imun sehingga dapat memproteksi mikroorganisme asing penyebab infeksi.

c. Differensial Leukosit

Pengamatan nilai differensial leukosit bertujuan untuk mengetahui rentang nilai pada jenis leukosit sebelum dan pasca infeksi serta setelah pengobatan. Perbedaan hasil pada pengamatan ini sebagaimana disajikan pada gambar berikut ini.

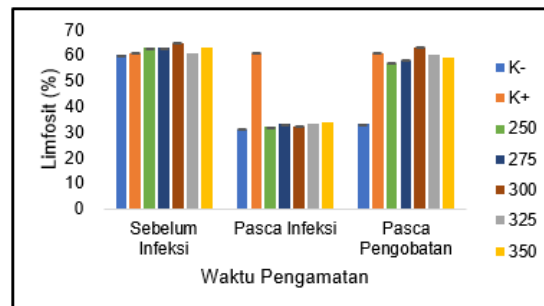


Gambar 7. Hasil pengamatan differensial leukosit pada ikan gurame selama penelitian dengan pembesaran mikroskop 1000x. (a) sebelum infeksi bakteri, (b) pasca infeksi bakteri, (c) sesudah pengobatan dengan ekstrak biji kapulaga. Ket: Limfosit (L), Neutrofil (N), Monosit (M).

a) Limfosit

Limfosit dalam keadaan normal, nilai limfosit berkisar antara 60 – 82% (Utami et al., 2013). Hasil persentase limfosit, menunjukkan bahwa pada perlakuan sebelum infeksi memiliki pola nilai yang

sama antar konsentrasi satu dengan yang lainnya yaitu sebesar 62%. Persentase nilai pada perlakuan pasca infeksi menunjukkan penurunan yang tidak berbeda signifikan antara konsentrasi dengan rata-rata nilai sebesar 36%. Peningkatan nilai persentase limfosit mulai terjadi lagi pada perlakuan pasca pengobatan dengan rata-rata sebesar 54%, dimana nilai limfosit terbaik yaitu pada konsentrasi 300 mg/L yang memiliki nilai hampir sama dengan perlakuan kontrol normal yaitu 63%, sebagaimana yang disajikan pada Gambar 8.

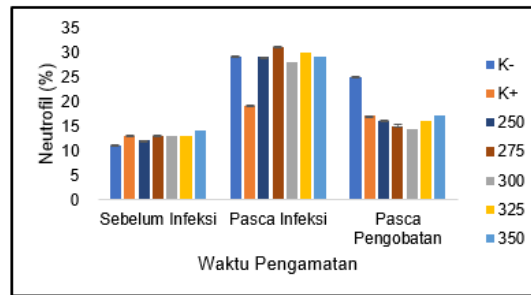


Gambar 8. Nilai Limfosit Ikan Gurami Selama Pemeliharaan

Penurunan nilai limfosit mengakibatkan ikan stress karena gangguan infeksi bakteri. Penurunan limfosit pada ikan dipengaruhi oleh adanya infeksi bakteri yang menimbulkan ikan mampu beradaptasi dengan mengeluarkan sitokin untuk mengenali mikroba pada tubuh. Sementara itu, Limfosit mengalami peningkatan pada perlakuan pasca pengobatan. Hal ini disebabkan karena ekstrak biji kapulaga diduga mampu berperan sebagai antibakteri, sehingga dapat merangsang pembentukan kekebalan tubuh ikan yang terinfeksi. Berbeda dengan hasil pada konsentrasi 250 mg/L pasca pengobatan yang mengalami penurunan jumlah sel limfosit yakni dengan kisaran nilai 57%. Penurunan ini terjadi diduga karena antibodi yang telah terbentuk oleh ekstrak tersebut digunakan sebagai perlawanan terhadap bakteri *E. tarda*. Dengan kata lain, perlawanan tersebut menyebabkan menurunnya jumlah sel limfosit sebagai sel penyedia zat kekebalan tubuh. Sebagaimana yang dijelaskan oleh (Rukyani et al., 2017), bahwa peningkatan kebutuhan sel darah putih (limfosit) dikarenakan oleh adanya intensitas dari patogen tertentu yang menimbulkan kurangnya jumlah sel limfosit.

b) Neutrofil

Neutrofil merupakan sel darah putih yang memiliki peran dalam mekanisme kekebalan tubuh. Menurut (Salasia, 2001), nilai sel neutrofil ikan sehat berkisar antara 8 – 22%. Hasil menunjukkan bahwa nilai neutrofil pada perlakuan sebelum infeksi rendah yaitu dengan kisaran 13%. Sementara rata-rata persentase pada perlakuan pasca infeksi menunjukkan kenaikan yakni sebesar 28% dan mengalami penurunan pada perlakuan pasca pengobatan sebesar 4% dari saat terjadinya infeksi. Data hasil persentase neutrofil dapat dilihat pada gambar berikut ini.



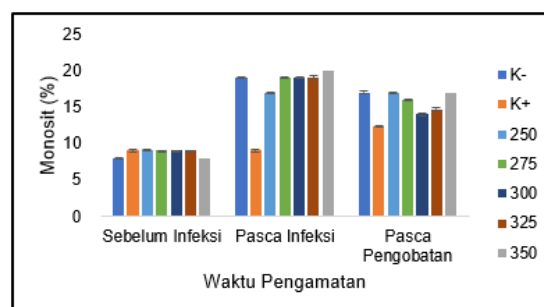
Gambar 9. Nilai neutrofil ikan gurami selama pemeliharaan

Terjadinya penurunan nilai neutrofil pada perlakuan pasca pengobatan sesuai dengan penjelasan dari (Nabib & Pasaribu, 1989), bahwa pada saat ikan terinfeksi bakteri, sel neutrofil akan meningkat sekitar 4 – 8% seperti halnya pada sel monosit yang merupakan sel dengan umur pendek, sehingga jumlah sel dalam darah berfluktuatif. Penurunan persentase neutrofil tersebut juga menunjukkan bahwa senyawa dalam ekstrak biji kapulaga memiliki peran sebagai antibakteri yang dapat menekan kembali kekebalan tubuh pada ikan. Flavonoid dapat mempengaruhi produksi sitokin, inflamasi dengan memproteksi radikal bebas. Selain itu, flavonoid juga mampu menangkal radikal bebas dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya.

Penurunan neutrophil juga terkait dengan fungsi utamanya sebagai penghancur benda asing melalui fagositosis atau disebut dengan kematosis. Oleh karena itu, persentase nilai neutrofil tidak akan meningkat tanpa rangsangan oleh benda asing termasuk bakteri. Sementara meningkatnya jumlah neutrofil berhubungan dengan respon ikan untuk melawan benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Hal ini juga menunjukkan peningkatan jumlah makrofag di tempat infeksi dan memungkinkan untuk menghancurkan benda asing dengan mudah.

c) Monosit

Monosit memiliki peran penting dalam tubuh sebagai pemberi informasi mengenai serangan penyakit pada leukosit. Hasil pengamatan nilai rata-rata monosit dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 10. Nilai monosit ikan gurami selama pemeliharaan

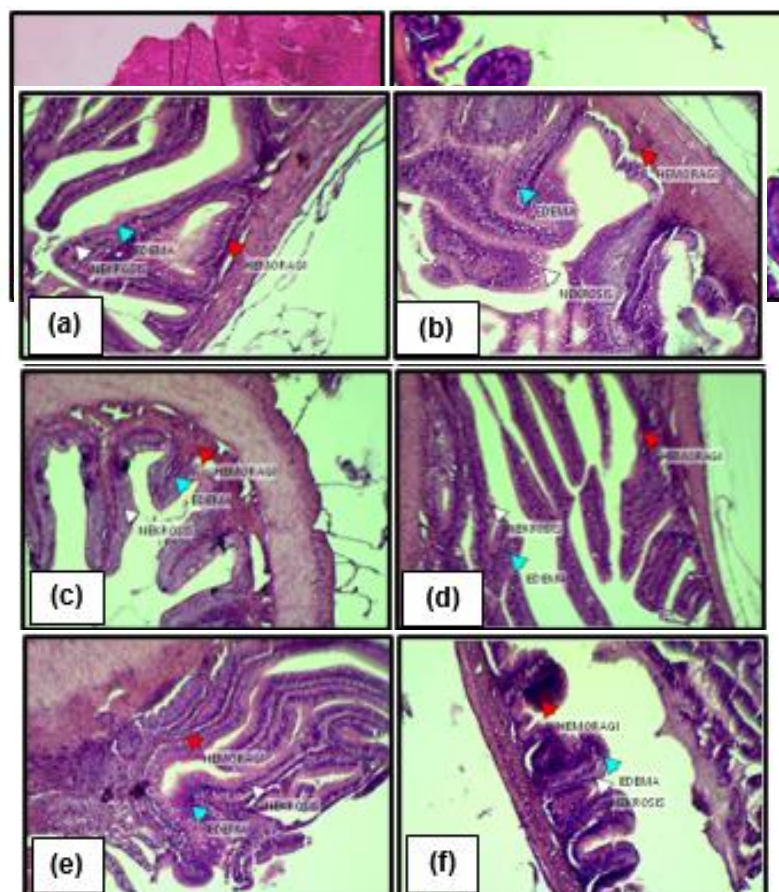
Berdasarkan gambar nilai rata-rata persentase (%) monosit menunjukkan bahwa pada perlakuan sebelum infeksi memiliki nilai yang hampir sama yaitu 9%. Nilai ini sesuai dengan pendapat dari (Sugiani et al., 2018), yang menyatakan bahwa persentase monosit pada ikan normal yaitu sekitar 4 – 13%. Sama halnya dengan perlakuan pasca infeksi yang menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan dengan nilai rata-rata sebesar 18%. Berbeda dengan perlakuan setelah pengobatan yang

terlihat adanya beberapa pengaruh yang signifikan antar perlakuan dosis, dimana konsentrasi 300 dan 325 mg/L merupakan konsentrasi terbaik dan memiliki nilai yang hampir sama dengan perlakuan K+ (Kontrol normal).

Peningkatan jumlah monosit pada pasca infeksi disebabkan karena ikan mengalami infeksi bakteri yang masuk ke dalam tubuh dan merangsang sel darah putih untuk lebih banyak memproduksi monosit. Monosit sebagai agen makrofag akan meningkat cepat dan bergerak meninggalkan pembuluh darah ke daerah yang terkena infeksi untuk melakukan fagositosis jika terjadi infeksi oleh mikroorganisme penyakit. Kemudian, persentase monosit setelah pengobatan mengalami penurunan yang diduga karena kemampuan ekstrak biji kapulaga yang mampu menghambat bakteri *E. tarda*. Monosit ini mampu melaksanakan fungsinya sebagai makrofag dengan menghancurkan sel, mikroorganisme penyakit.

d. Gambaran Histopatologi Usus Ikan Gurame (*O. gouramy*)

Usus merupakan organ penting yang sering terpapar oleh penyakit. Pengamatan ini dilakukan pada ikan sehat (Kontrol normal), ikan yang terinfeksi bakteri (Kontrol infeksi) dan ikan dengan pemberian perlakuan dosis ekstrak kapulaga. Berikut merupakan gambar dari hasil pengamatan organ usus pada ikan normal.



Gambar 11. (a) Gambaran Histopatologi Usus Ikan Gurame Normal dengan Perbesaran 100x (Manan dan Pratiwi, 2015). (b) Histopatologi Usus Ikan Gurame Normal dengan Perbesaran 400x

Gambar 12. Gambaran Histologi Usus Ikan Gurame dengan Perbesaran 400x (a) Kontrol Infeksi (b) Dosis 250 mg/L (c) Dosis 275 mg/L (d) Dosis 300, (e) Dosis 325 mg/L (f) 350 mg/L.

Berdasarkan gambar hasil pengamatan tersebut, diketahui bahwa jaringan penyusun komponen pada usus terlihat sehat dan tidak terdapat kerusakan. Penampang jaringan tersebut yaitu pada bagian sub mukosa usus yang juga terlihat normal. Usus yang mengalami kerusakan pada perlakuan pasca infeksi bakteri dan setelah pengobatan dengan ekstrak dapat dilihat pada Gambar 12.

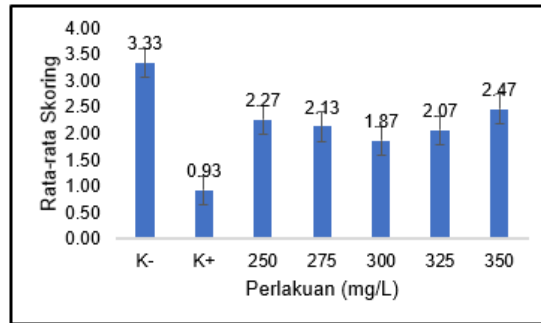
Data hasil pengamatan tersebut menunjukkan adanya variasi perubahan pada bagian usus. Hal itu ditimbulkan akibat pemberian bakteri dan ekstrak biji kapulaga dengan nilai skoring yang berbeda. Perubahan tersebut meliputi nekrosis, hemoragi dan edema pada usus ikan gurame di setiap perlakuan. Kerusakan pada saluran pencernaan terutama usus dapat mempengaruhi aktivitas dan fungsi enzim yang ada di dalamnya. Hal tersebut juga dikarenakan adanya penurunan pada aktivitas enzim yang berperan sebagai detoksifikasi sehingga kerusakan sulit untuk dipulihkan.

Nekrosis pada usus ikan gurame biasanya ditandai dengan adanya pembengkakan. Terjadinya nekrosis ini diakibatkan karena pengaruh dari infeksi bakteri yang masuk pada tubuh ikan yang juga menyebabkan kematian pada ikan.

Hemoragi juga ditemukan pada semua perlakuan yang diakibatkan oleh adanya toksin yang dikeluarkan bakteri dan menyebabkan sistem vaskularisasi pada sistem peredaran darah terganggu (Diba & Rahman, 2018). Munculnya hemoragi ini ditandai dengan keluarnya darah dari pembuluh darah yang rusak. Hal ini sesuai dengan pendapat (Jamin & Erlangga, 2016), yang menyatakan bahwa terjadinya hemoragi ditandai dengan pecahnya pembuluh darah hingga mengakibatkan darah mengalir ke jaringan tubuh. Hemoragi yang ditunjukkan pada hasil pengamatan ini ditandai dengan adanya bagian yang berwarna ungu pekat atau hitam. Munculnya tanda ini sesuai dengan penjelasan dari (Pardamean et al., 2020), dimana tanda terjadinya hemoragi dapat dilihat dengan adanya bintik darah pekat pada pembuluh darah akibat dari kongesti pada usus yang parah. Selain itu, pengamatan histopatologi ini juga mengakibatkan timbulnya edema pada usus yang merupakan tanda adanya cairan berlebih pada jaringan tubuh yang menyebabkan pembengkakan (Sulastri et al., 2018).

a) Nekrosis

Pengamatan histopatologi dengan perlakuan pengobatan ekstrak biji kapulaga yang diinfeksi bakteri *E. tarda* memberikan hasil kerusakan usus yang bervariasi. Dilihat pada hasil grafik skoring, dosis ekstrak 250 mg/L tidak berbeda nyata dengan dosis 350 mg/L. Keduanya memiliki nilai nekrosis terbesar sebesar 22,7 dan 44,7. Sementara nekrosis terendah terdapat pada perlakuan dosis 300 mg/L dengan rata-rata nilai 1,87. Nilai tersebut merupakan nilai paling mendekati dengan ikan normal atau berbeda sangat nyata dengan perlakuan lainnya ($p < 0,05$). Kerusakan (nekrosis) ini bersifat irreversibel atau sulit untuk diperbaiki. Sebagaimana disajikan pada Gambar 13.



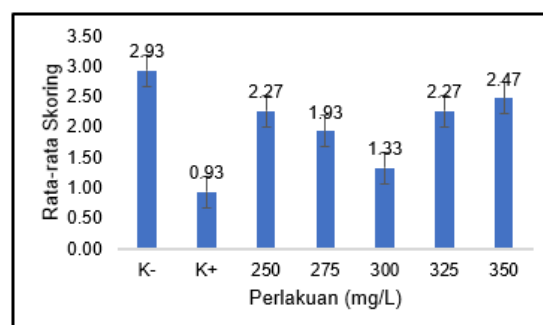
Gambar 13. Hasil Skoring Nekrosis pada Usus Ikan Gurame

Rendahnya nilai nekrosis pada dosis 300 mg/L diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak biji kapulaga. (Febrinda et al., 2013), menjelaskan bahwa flavonoid mampu menangkal radikal bebas dengan menjadi inhibitor enzim pembentuknya sehingga kerusakannya lebih sedikit. Kandungan flavonoid, fenol dan terpenoid aktif sebagai antioksidan dan antibakteri yang tinggi, sehingga kerusakan dapat dihindari. Selain itu, senyawa tersebut juga dapat bersifat toksik apabila sudah melebihi pada titik optimumnya.

Pada pemberian dosis yang berlebihan pada ikan, kandungan senyawa pada biji kapulaga akan menimbulkan efek samping pada tubuh. Senyawa aktif pada tumbuhan dengan dosis tinggi akan menjadi toksik yang dapat merusak dinding sel serta mengakibatkan nekrosis. Seperti yang disajikan pada grafik di atas, dimana dosis 350 mg/L mengalami nekrosis terparah dibanding dengan dosis lainnya. Disamping itu, senyawa fenolik yang terdapat pada biji kapulaga pada dosis yang optimum mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Seperti penjelasan dari (Souza et al., 2015) yang menyatakan bahwa kemampuan OH dalam ikatannya dengan fosfolipid dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel bahkan dapat menyebabkan kematian sel atau nekrosis.

b) Hemoragi

Hasil pengamatan melalui nilai rata-rata skoring dengan kerusakan paling rendah (mendekati kontrol normal) yaitu pada perlakuan 300 mg/L yaitu 1,33. Perlakuan tersebut berbeda nyata ($p < 0,05$) antara satu dengan yang lainnya, sehingga dapat dikatakan bahwa pengobatan dengan ekstrak biji kapulaga memberikan pengaruh terhadap tingkat kerusakan jaringan usus ikan gurame. Sementara itu, nilai kerusakan mulai meningkat pada perlakuan 350 mg/L dan merupakan nilai kerusakan tertinggi yaitu sebesar 2,47. Pengamatan nilai skoring hemoragi dapat dilihat pada Gambar 14.

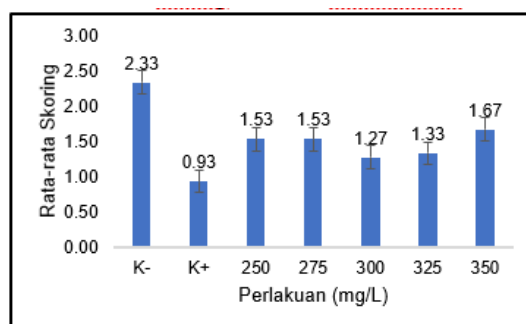


Gambar 14. Hasil Skoring Hemoragi pada Usus Ikan Gurame

Peningkatan nilai kerusakan yang terjadi diduga karena dosis ekstrak yang digunakan telah mencapai titik optimumnya atau telah melebihi jumlah yang dibutuhkan oleh ikan. Hal ini mengakibatkan adanya pengaruh negatif terhadap struktur jaringan pada usus ikan. Pengaruh tersebut berasal dari enzim hemolisin pada bakteri yang dapat melisis sel darah merah. Ditambahkan oleh pendapat Juanda dan Edo (2018), bahwa adanya hemoragi pada usus menandakan bahwa eritrosit dalam darah keluar dari pembuluh darah pada bagian jaringan usus. Selain itu, hemoragi yang terjadi pada jaringan usus menyebabkan rusaknya jaringan sistem vaskular sehingga pembuluh darah mudah bocor (Crowell et al., 1969).

c) Edema

Edema ditemukan pada semua perlakuan, dimana kerusakan ini ditandai dengan adanya jaringan yang membengkak karena banyaknya cairan di dalamnya. Hasil dari pengamatan nilai skoring edema menunjukkan rata-rata kerusakan terendah atau yang mendekati nilai kontrol normal yaitu pada perlakuan dosis 300 mg/L sebesar 1,27. Sedangkan rerata edema yang paling tinggi diperoleh pada perlakuan dosis 350 mg/L yaitu 1,67. Sementara pada perlakuan dosis lainnya diketahui tidak begitu berbeda signifikan, sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar berikut.



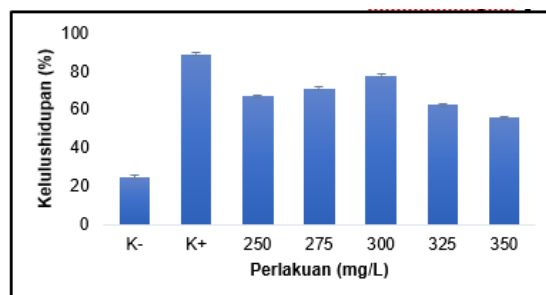
Gambar 15. Hasil Skoring Edema pada Usus Ikan Gurame

Rendahnya hasil kerusakan tersebut diduga karena ekstrak kasar biji kapulaga mampu menghambat infeksi dari bakteri *E. tarda* pada dosis 300 mg/L. (Yuhana et al., 2011) juga menambahkan bahwa hal tersebut diakibatkan karena tingginya senyawa bioaktif flavonoid yang berperan sebagai antibakteri sehingga dapat menghambat infeksi bakteri dan mengurangi kerusakan pada jaringan usus. Hal tersebut juga karena kemampuan senyawa flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat dan membran sitoplasma. Berbeda halnya pada kerusakan dengan perlakuan dosis 350 mg/L yang terlihat meningkat dan merupakan kerusakan tertinggi setelah kontrol infeksi. Meningkatnya nilai kerusakan tersebut karena adanya gangguan permeabilitas pada jaringan usus ikan. Selain itu, ekstrak biji kapulaga yang masuk ke dalam tubuh ikan juga dapat mengganggu permeabilitas sel, dimana beberapa senyawa di dalamnya seperti flavonoid akan menyebabkan denaturasi protein pada dosis yang berlebih sehingga menyebabkan kematian sel.

e. Tingkat Kelulushidupan Ikan Gurame (*O. gouramy*)

Kelulushidupan ikan merupakan total ikan hidup pada akhir penelitian. Kelangsungan hidup ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu internal yang berkaitan dengan resistensi penyakit dan eksternal yang terkait dengan padat tebar atau kondisi lingkungan. Pengamatan kelulushidupan ikan gurame dilakukan selama 7 hari setelah pengobatan dengan ekstrak. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak biji kapulaga berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kelulushidupan ikan

gurame. Diketahui bahwa nilai rata-rata paling tinggi terdapat pada perlakuan dosis 300 mg/L yakni 78%. Dosis tersebut merupakan perlakuan terbaik yang mendekati nilai pada kontrol normal. Sementara persentase kelulushidupan yang paling rendah ditunjukkan pada perlakuan dengan dosis 350 mg/L setelah kontrol infeksi. Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Kelulushidupan Ikan Gurame Setelah Pengobatan dengan Ekstrak Biji Kapulaga

Berdasarkan data kelulushidupan yang didapatkan meningkat seiring dengan pemberian ekstrak sampai dosis 300 mg/L, namun terjadi penurunan pada pemberian dosis yang semakin tinggi. Tingginya kematian ikan pasca infeksi lebih tinggi dan cepat dibanding dengan ikan uji setelah pengobatan. Hal tersebut diduga berkaitan dengan perbedaan patogenitas bakteri *E. tarda* dan kekebalan alami pada ikan, sehingga ikan mampu bertahan hidup. Menurunnya nilai kelulushidupan pada dosis 325 dan 350 mg/L, menunjukkan bahwa dosis tersebut mulai mencapai dosis maksimum untuk pengobatan. Sebagaimana hasil yang telah didapat pada LC50, dimana telah menyebabkan kematian ikan 50% pada dosis 332,86 mg/L sehingga pada kedua dosis tersebut menghasilkan tingkat kematian yang cukup besar.

Data hasil analisis menunjukkan bahwa pada dosis 300 mg/L memberikan pengaruh yang berbeda nyata dan merupakan dosis terbaik sebagai pengobatan ikan. Hal ini diduga adanya pengaruh yang diberikan oleh senyawa bioaktif di dalam ekstrak biji kapulaga selama masa pengobatan. Senyawa tersebut berupa flavonoid, fenol dan terpenoid. Senyawa flavonoid pada ekstrak etanol biji kapulaga memiliki peran sebagai antibakteri dimana mampu mengdisintegrasi koloni bakteri dengan mengganggu dinding selnya.

Rusaknya dinding sel bakteri karena adanya ion H⁺ dari senyawa fenolik (flavonoid) yang dapat menguraikan fosfolipida menjadi gliserol, asam fosfat dan juga asam karboksilat. Hal ini mengakibatkan membran sitoplasma tidak dapat dipertahankan oleh fosfolipid, sehingga mengalami kebocoran dan kematian pada sel bakteri. Ditambahkan dari penjelasan (Yuhana et al., 2011), bahwa proses terganggunya sel bakteri yaitu berawal dari gugus karbonil (C=O) yang bereaksi dengan gugus amino (NH₂). Proses tersebut kemudian mengakibatkan denaturasi protein dan menyebabkan penggumpalan protein. Keadaan ini membuat protein tidak dapat berfungsi, sehingga mengakibatkan kematian bakteri dan menyebabkan kematian bakteri.

f. Pengamatan Kualitas Air

Berdasarkan hasil pengamatan nilai kualitas air pada ikan gurame selama 7 hari pemeliharaan menunjukkan hasil yang sesuai dengan nilai optimumnya sehingga tidak memberikan pengaruh buruk pada ikan uji. Hasil pengamatan kualitas air tersebut yaitu 22,0 – 24,2 (suhu), 7,0 – 7,6 (pH), 4,2 – 5,4 (oksigen terlarut).

SIMPULAN

^{1*)} **Faridatun Amalia Hasanah,** ²⁾ **Arief Prajitno,** ³⁾ **Mohamad Fadjar**

Pengaruh Ekstrak Biji Kapulaga (*Amomum Compactum*) Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Usus Ikan Gurame (*Osphronemus Gouramy*) Yang Diinfeksi Bakteri (*Edwardsiella Tarda*)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakuka, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

a). Pemberian ekstrak biji kapulaga (*A. compactum*) dengan etanol 70% berpengaruh terhadap profil hematologi dan histopatologi usus ikan gurami (*O. gouramy*) yang diinfeksi oleh bakteri *E.tarda* b). Pemberian ekstrak bij ikapulaga (*A. compactum*) dengan dosis 300 mg/L merupakan dosis terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. tarda*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aanyu, M., Ondhoro, C. C., Ganda, E., Kato, D. C., & Basiita, R. K. (2014). Intestine histology, nutrient digestibility and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on diets with both cotton and sunflower seed cakes. *African Journal of Biotechnology*, *13*(37). <https://doi.org/10.5897/AJB12.1895>
- Amrullah, A., Sukenda, S., Harris, E., Alimuddin, A., & Lusiastuti, A. M. (2015). TOKSISITAS PROTEIN 89 kDa PRODUK EKSTRASELULER *Streptococcus agalactiae* PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, *10*(3), 397–403. <https://doi.org/10.15578/jra.10.3.2015.397-403>
- Anto, S. (2020). *Rempah-Rempah dan Minyak Atsiri*. Penerbit Lakeisha.
- Aprilisna, M., Ramadhany, C. A., Sunendar, B., & Widodo, H. B. (2015). Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Scaffold Membran Cangkang Telur yang Diaktivasi Karbonat Apatit. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, *1*(1), 59–67. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.8993>
- Bлахhall, P. C., & Daisley, K. W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, *5*(6), 771–781. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>
- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Cabi.
- Cahyadi, R. (2009). *Uji toksisitas akut ekstrak etanol buah pare (Momordica charantia L.) terhadap larva artemia salina leach dengan metode brine shrimp lethality test (Bst)*. Medical faculty.
- Chen, W.-M., De Faria, S. M., Stralioetto, R., Pitard, R. M., Simoes-Araujo, J. L., Chou, J.-H., Chou, Y.-J., Barrios, E., Prescott, A. R., & Elliott, G. N. (2005). Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7461–7471. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>
- Crowell, J. W., Jones, C. E., & Smith, E. E. (1969). Effect of allopurinol on hemorrhagic shock. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *216*(4), 744–748.
- Diba, D. F., & Rahman, W. E. (2018). Gambaran Histopatologi Hati, Lambung dan Usus Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) yang Terinfeksi Cacing Endoparasit. *OCTOPUS: JURNAL ILMU PERIKANAN*, *7*(2), 24–30. <https://doi.org/10.26618/octopus.v7i2.2469>
- Ergina, E., Nuryanti, S., & Pursitasari, I. D. (2014). Uji kualitatif senyawa metabolit sekunder pada daun palado (*Agave angustifolia*) yang diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. *Jurnal Akademika Kimia*, *3*(3), 165–172.
- Fajri, N., Ayuzar, E., & Ezraneti, R. (2016). Efektivitas serbuk daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap bakteri *Edwardsiella tarda*. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, *3*(1), 23–25. <https://doi.org/10.29103/aa.v3i1.334>
- Febrinda, A. E., Astawan, M., Wresdiyati, T., & Yuliana, N. D. (2013). Kapasitas Antioksidan Dan Inhibitor Alfa Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak [Antioxidant and Alpha-Glucosidase Inhibitory Properties of Bawang Dayak Bulb Extracts]. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, *24*(2), 161. <https://doi.org/10.6066/jtip.2013.24.2.161>
- Hussen Ali, T. (2012). Determination of the lethal dose 50%(LD50) of cadmium chloride and the histopathological changes in male mice liver and kidneys. *Journal of Education and Science*, *25*(3), 27–38.
- Iskandar, A., Junior, M. Z., & Arfah, H. (2014). Efektivitas Ekstrak Tepung Testis Sapi dalam Alih

- Kelamin Ikan Nila, *Oreochromis niloticus* L. Melalui Teknik Perendaman (The Effectiveness of BTME (Bull Testes Meal Extract) in Sex-Reversal of Tilapia through Immersion Technique). *Jurnal Sains Terapan*, 4(1), 27–34. <https://doi.org/10.29244/jstsv.4.1.27-34>
- Jamin, J., & Erlangga, E. (2016). Pengaruh insektisida golongan organofosfat terhadap benih ikan nila gift (*Oreochromis niloticus*, Bleeker): analisis histologi hati dan insang. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 3(2), 46–53. <https://doi.org/10.29103/aa.v3i2.324>
- Jangnga, I. D., Kambaya, P. P., & Kosala, K. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri dan Analisis Bioautografi Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona Squamosa* L) terhadap *Enterococcus faecalis* Secara in Vitro. *ODONTO: Dental Journal*, 5(2), 102–109. <https://doi.org/10.30659/odj.5.2.102-109>
- Juanda, S. J., & Edo, S. I. (2018). Histopatologi insang, hati dan usus ikan lele (*Clarias gariepinus*) di kota kupang, nusa tenggara timur (Gill, Liver and Gut's Histopathology of Catfish (*Clarias gariepinus*) in Kota Kupang, East West Nusa). *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 14(1), 23–29. <https://doi.org/10.14710/ijfst.14.1.23-29>
- LAPANG, P. K., & TIMUR, P. (2019). IDENTIFIKASI BAKTERI PADA KOMODITAS IKAN AIR TAWAR DI BALAI KARANTINA IKAN PENGENDALIAN MUTU DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN KELAS I, SURABAYA I.
- Ma'arif, A. S. (2017). *Cara sukses budidaya ikan gurami*. Penerbit Bio Genesis.
- Maftuch, M., Setyawan, F. H., & Suprastyani, H. (2018). Uji daya hambat ekstrak *Chaetoceros calcitrans* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida*. *JFMR (Journal of Fisheries and Marine Research)*, 2(1), 39–46. <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2018.002.01.6>
- Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R., & Riani, E. (2016). Uji patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2), 145–255. <https://doi.org/10.15578/jra.5.2.2010.145-255>
- Nabib, R., & Pasaribu, F. H. (1989). Patologi dan penyakit ikan. *Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor*, 158.
- Pardamean, E. S., Syawal, H., & Riauwyaty, M. (2020). *Identifikasi Bakteri Patogen Pada Ikan Mas (Cyprinus Carpio) Yang Dipelihara Dalam Keramba Jaring Apung*.
- Pratama, B. A., Susilowati, T., & Yuniarti, T. (2018). Pengaruh perbedaan suhu terhadap lama penetasan telur, daya tetas telur, kelulushidupan dan pertumbuhan benih ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) strain bastar. *Sains Akuakultur Tropis: Indonesian Journal of Tropical Aquaculture*, 2(1). <https://doi.org/10.14710/sat.v2i1.2478>
- Roenigk, H. H., Auerbach, R., Maibach, H., Weinstein, G., & Lebwohl, M. (1998). Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(3), 478–485. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(98\)70508-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70508-0)
- Rukyani, A., Silvia, E., Sunarto, A., & Tauhid, T. (2017). PENINGKATAN RESPON KEBAL NON-SPEKIFIK PADA IKAN LELE DUMBO (*Clarias* sp.) DENGAN PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN (B-GLUCAN). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 3(1), 1–10.
- Salasia, S. I. O. (2001). Resistency *Streptococcus Equi* Subsp. *Zooepidemicus* on bactericidal activities of polymorphonuclear leucocyte. *J. Saint. Vet*, 29(1), 1–6.
- Sastrosupadi, A., & Krismawati, A. (n.d.). *Buku Prinsip-Prinsip Agronomi Dengan Hasil-Hasil di Indonesia*. Universitas Negeri Malang.
- Souza, J. E. De, Casanova, L. M., & Costa, S. S. (2015). *Bioavailability of phenolic compounds: a*

^{1*)} **Faridatun Amalia Hasanah,** ²⁾ **Arief Prajitno,** ³⁾ **Mohamad Fadjar**

Pengaruh Ekstrak Biji Kapulaga (*Amomum Compactum*) Terhadap Profil Hematologi dan Histopatologi Usus Ikan Gurame (*Osphronemus Gouramy*) Yang Diinfeksi Bakteri (*Edwardsiella Tarda*)

major challenge for drug development? <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150006>

- Sugiani, D., Taukhid, T., Purwaningsih, U., & Lusiastuti, A. M. (2018). Vaksin kering beku sel utuh bakteri aeromonas hydrophila untuk pencegahan penyakit motile aeromonads septicemia pada ikan lele, nila, dan gurami. *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(2), 159–167. <https://doi.org/10.15578/jra.13.2.2018.159-167>
- Sulastrri, I. J., Zakaria, M. N., & Marusin, N. (2018). Struktur histologi usus Ikan Asang (*Osteochilus hasseltii* CV) yang Terdapat di Danau Singkarak, Sumatera Barat. *Jurnal Metamorfosa*, 2, 214–218.
- Taukhid, T., Purwaningsih, U., Sugiani, D., Sumiati, T., & Lusiastuti, A. M. (2015). Efikasi vaksin inaktif bakteri Aeromonas hydrophila-AHL0905-2 (Hydrovac) dan Streptococcus agalactiae-N14G (Streptovac) untuk pencegahan penyakit bakterial pada ikan budidaya air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(4), 541–551. <https://doi.org/10.15578/jra.10.4.2015.541-551>
- Utami, D. T., Prayitno, S. B., Hastuti, S., & Santika, A. (2013). Gambaran parameter Hematologis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA Streptococcus iniae dengan dosis yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 7–20.
- Yuhana, S. A., Kusdarwati, R., & Meles, D. K. (2011). Daya Antibakteri Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap Bakteri Streptococcus iniae Secara In Vitro. *Jurnal Skripsi. Fakultas Perikanan Dan Kelautan Universitas Airlangga*.



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).