

**PENGARUH PEMBERIAN BAHAN AKTIF ALKALOID UBUR-UBUR  
(*Bougainvillia sp.*) MELALUI METODE PERENDAMAN TERHADAP  
PERUBAHAN JUMLAH PLASMA PROTEIN IKAN KERAPU MACAN  
(*Epinephelus fuscoguttatus*) YANG TERINFEKSI *Vibrio harveyi*.**

**LAPORAN SKRIPSI  
BUDIDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**AFIFAH**

**NIM. 0310850006**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**FAKULTAS PERIKANAN**

**MALANG**

**2007**

**PENGARUH PEMBERIAN BAHAN AKTIF ALKALOID UBUR-UBUR  
(*Bougainvillia sp.*) MELALUI METODE PERENDAMAN TERHADAP  
PERUBAHAN JUMLAH PLASMA PROTEIN IKAN KERAPU MACAN  
(*Epinephelus fuscoguttatus*) YANG TERINFEKSI *Vibrio harveyi***

*Skripsi Sebagai Salah Satu Prasyarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana pada  
Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang*

Oleh :

**AFIFAH**

**NIM. 0310850006**

**DOSEN PENGUJI I**

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)**  
TANGGAL :

**DOSEN PENGUJI II**

**(ATING TUNIARTI, S.Pi M.Aqua)**  
TANGGAL :

**MENYETUJUI,  
DOSEN PEMBIMBING I**

**(Ir. SRI ANDAYANI, MS)**  
TANGGAL :

**DOSEN PEMBIMBING II**

**(Ir. M. FADJAR, MSc)**  
TANGGAL :

**MENGETAHUI,  
KETUA JURUSAN**

**(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)**  
TANGGAL :

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*) Melalui Metode Perendaman Terhadap Jumlah Plasma Protein Ikan Kerapu Macan (*E. fuscoguttatus*) Yang Terinfeksi *Vibrio harveyi*.” ini dapat diselesaikan.

Dengan selesainya laporan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak dan Ibu serta Kakak-kakak tercinta yang telah memberikan doa dan dukungan, sehingga ananda dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Ir. Sri Andayani, MS., selaku dosen pembimbing I.
3. Ir. M. Fadjar, MSc., selaku dosen pembimbing II.
4. Dr. Ir. Maftuch, MSi., selaku dosen penguji I
5. Ibu Ating Yuniarti, S.Pi M.Aqua., selaku dosen penguji II.
6. Ir. Yani Nuraini, selaku dosen pembimbing lapang.
7. Seluruh anggota team penelitian, atas segala motivasi dan semangatnya.
8. Semua teman, sahabat serta BP angkatan 2003, atas supportnya selama ini.

Penulis menyadari bahwa laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi perbaikan laporan ini. Harapan penulis semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 25 Juni 2007

Penulis

## RINGKASAN

**AFIFAH.** Sripsi tentang Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia sp.*) Melalui Metode Perendaman Terhadap Perubahan Jumlah Plasma Protein Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Yang Terinfeksi *Vibrio harveyi*. (dibawah bimbingan **Ir. SRI ANDAYANI, MS** dan **Ir. M. Fadjar, M.Sc**).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama Penyakit dan lingkungan Balai Budidaya Pengembangan Air Payau Situbondo pada bulan Desember 2006 sampai dengan Februari 2007.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi mengenai potensi bahan aktif alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia sp*) terhadap respon kekebalan tubuh benih ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* melalui metode perendaman dengan mengetahui perubahan gambaran dan jumlah plasma protein pada ikan kerapu macan yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*.

Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam menggunakan dosis bahan aktif alkaloid dari Ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*) sebagai imunostimulan terhadap jumlah plasma protein ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, data diperoleh berdasarkan hasil suatu percobaan secara langsung untuk melihat hasil yang dapat menegaskan hubungan antar variabel atau parameter yang diamati. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat jenis perlakuan dan dua kali ulangan. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah perbedaan dosis senyawa aktif ubur-ubur sebagai imunostimulan, yakni A (6,4 ppm), B (8,4 ppm), C (10,4 ppm) dan D (12,4 ppm).

Hasil penelitian yang diperoleh menjelaskan bahwa bahan imunostimulan dari alkaloid Ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*) yang diberikan melalui perendaman dapat merangsang kekebalan nonspesifik dan spesifik ikan. Ini ditandai dengan meningkatnya jumlah protein yang terdapat pada plasma darah ikan setelah pemberian alkaloid. Disamping itu dapat diketahui pula bahwa dengan pemberian alkaloid ini mampu menghambat daya infeksi oleh *Vibrio harveyi*. Hal ini terbukti bahwa pada ikan yang diberi imunostimulan alkaloid, jumlah protein yang muncul dapat lebih banyak dan kadar proteinnya juga tinggi. Dengan protein yang lebih besar, maka akan mampu untuk lebih menstimulasi kekebalan non spesifik sehingga nantinya berbagai antibodi sebagai kekebalan spesifik ikan juga terbentuk.

Penelitian ini pada akhirnya memberikan kesimpulan, bahwa alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*) dapat digunakan sebagai imunostimulan untuk menghambat serangan bakteri *Vibrio harveyi* pada benih kerapu macan dengan dosis optimal melalui metode perendaman yang dapat diaplikasikan adalah 10,22 ppm. Sebagai tindak lanjut dari hasil penelitian ini, disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan tentang aplikasi imunostimulan dengan menggunakan alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*) tersebut pada ikan kerapu macan stadia larva dan juvenil dengan menggunakan bakteri jenis lainnya serta pengaplikasian imunostimulan dengan menggunakan alkaloid ubur-ubur pada spesies ikan lainnya dengan menggunakan bakteri *Vibrio harveyi*.

**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>RINGKASAN</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Kegunaan Penelitian .....	5
1.5 Hipotesis .....	6
1.6 Waktu dan Tempat .....	7
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Biologi Ikan Kerapu Macan .....	8
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Kerapu Macan .....	8
2.1.1 Penyebaran dan Habitat .....	9
2.1.3 Benih Kerapu .....	10
2.2 <i>Vibio spp.</i> .....	11
2.2.1 Klasifikasi .....	11
2.2.2 Biologi .....	11
a. Morfologi .....	11
b. Metabolisme dan Pertumbuhan .....	11
c. Habitat dan Daerah Penyebarannya .....	12
d. Ciri-Ciri Serangan .....	13
2.3 <i>Bougainvillia sp.</i> .....	14
2.3.1 Klasifikasi .....	14
2.3.2 Biologi .....	14
a. Morfologi .....	14
b. Habitat dan Daerah Penyebarannya .....	15
d. Reproduksi .....	15
2.3.3 Kandungan Ekstrak <i>Bougainvillia sp.</i> .....	16

2.3.4 Alkaloid dari Ekstrak Ubur-ubur ( <i>Bougainvillia sp.</i> ) Sebagai Immunostimulant .....	17
2.4 Imunitas Pada Ikan .....	21
2.4.1 Sistem Imun Spesifik .....	21
2.4.2 Sistem Imun Non Spesifik .....	22
2.5 Plasma Protein Darah .....	23
2.6 Analisis Plasma Protein Darah .....	24
2.6.1 Elektroforesis SDS PAGE .....	24
2.6.2 Spektrofotometri .....	28
2.7 Kualitas Air Media Pemeliharaan Kerapu .....	29

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian .....	32
3.1.1 Ikan Kerapu .....	32
3.1.2 Pakan .....	32
3.1.3 Media Uji .....	32
3.1.4 Wadah Uji .....	32
3.1.5 Bahan Immunostimulan Alkaloid .....	32
3.1.6 Bahan Penelitian .....	33
3.1.7 Peraatan Penelitian .....	33
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian .....	34
3.2.1 Metode Penelitian .....	34
3.2.2 Rancangan Penelitian .....	34
3.3 Prosedur Penelitian .....	36
3.3.1 Persiapan Tempat .....	36
3.3.2 Persiapan Ikan Uji .....	36
3.3.3 Perlakuan Pemeliharaan .....	38
3.3.4 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	38
3.3.5 Pembuatan Media .....	39
3.3.6 Pembuatan Biakan bakteri <i>V. harveyi</i> Untuk Penginfeksi .....	42
3.3.7 Sanitasi Air dan Alat-alat Pelaksana Penelitian .....	42
3.3.8 Proses Perendaman .....	43
3.3.9 Proses Penginfeksi .....	44
3.3.10 Pengambilan Plasma Darah .....	44
3.3.11 Pengamatan Plasma Protein Pada Kerapu .....	45
3.3.11.1 Elektroforesis .....	45
3.3.11.2 Spektrofotometer .....	47
3.4 Parameter Uji .....	48
3.4.1 Parameter Utama .....	48
3.4.2 Parameter Penunjang .....	48

### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Perubahan Profil Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa dan Setelah Penginfeksi .....	49
4.2 Perubahan Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa dan Setelah Penginfeksi .....	55
4.2.1 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa Infeksi .....	55

4.2.2 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Setelah Penginfeksi..58

4.2.3 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Sehat dan Ikan Sakit..... 61

4.3 Analisa Kualitas Air ..... 63

4.3.1 Suhu ..... 63

4.3.2 Derajat Keasaman ..... 64

4.3.3 Oksigen Terlarut ..... 64

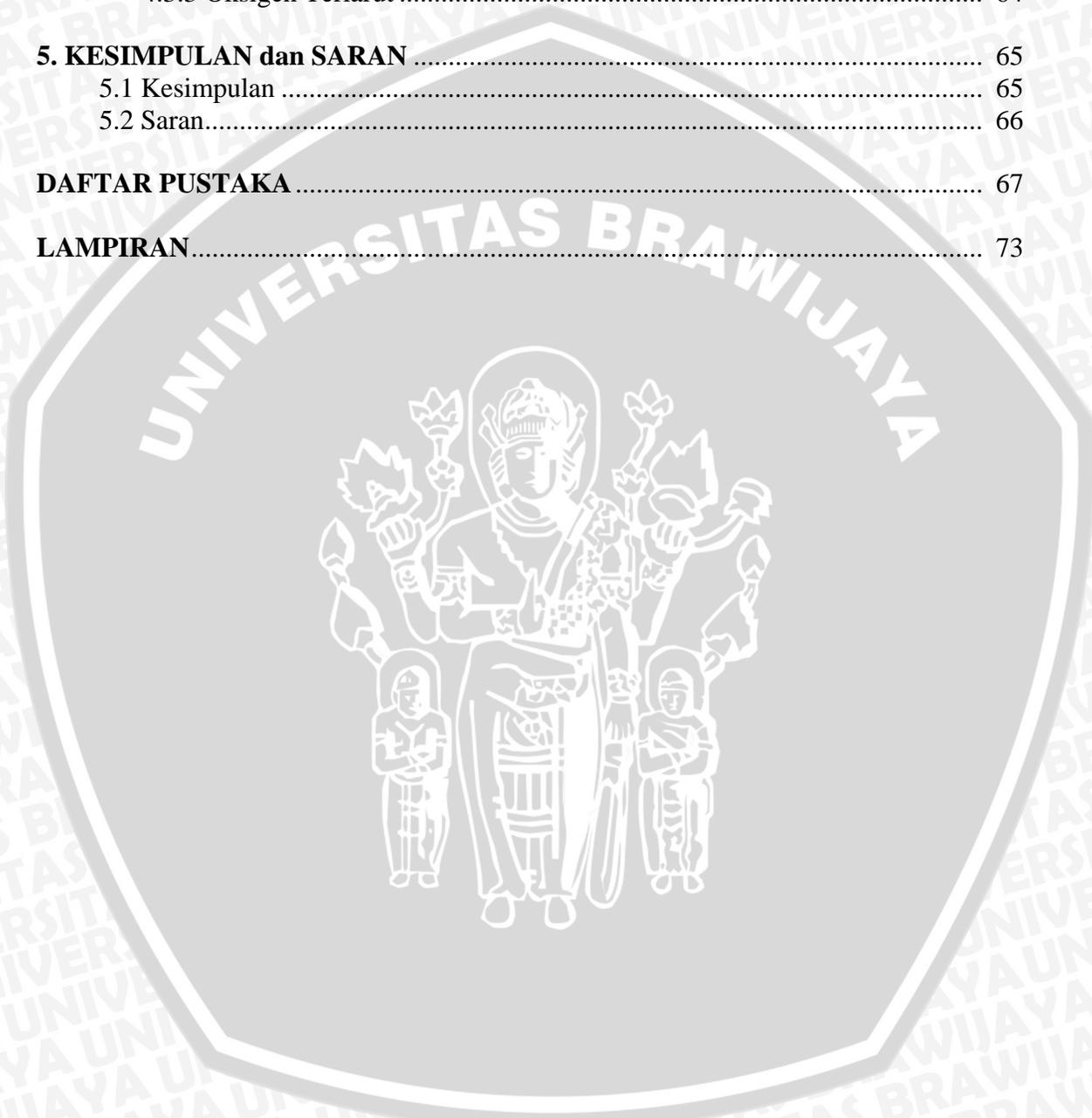
**5. KESIMPULAN dan SARAN ..... 65**

5.1 Kesimpulan ..... 65

5.2 Saran..... 66

**DAFTAR PUSTAKA ..... 67**

**LAMPIRAN..... 73**

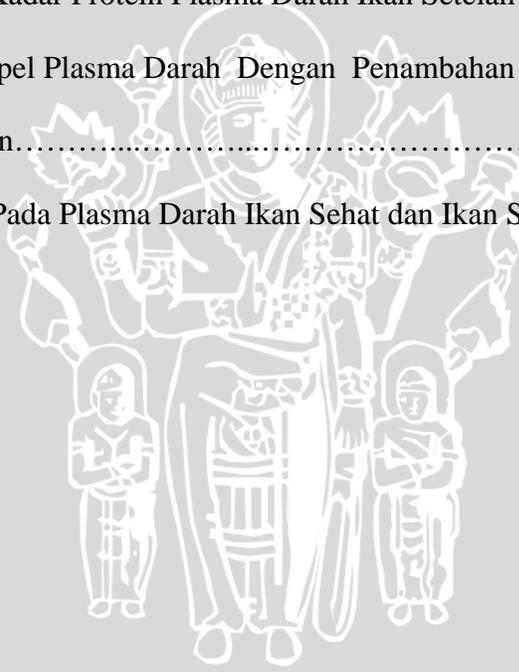


## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Gambar Ubur-ubur ( <i>Bougainvillia sp.</i> ).....	14
2. Struktur Dasar Alkaloid Pada Ubur-ubur ( <i>Bougainvillia sp.</i> ).....	18
3. Struktur Alkaloid Pada Ubur-ubur ( <i>Bougainvillia sp.</i> ).....	19
4. Gambar Sel Plasma Dalam Darah.....	24
5. Peranan Plasma Sel Dalam Sistem Kekebalan.....	24
6. Denah Penelitian.....	36
7. Elektroforegram Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan dan Tanpa Infeksi.....	49
8. Elektroforegram Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan dan Penginfeksian.....	51
9. Mekanisme Perusakan Dinding Sel Bakteri Oleh Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur ( <i>Bougainvillia sp.</i> ).....	53
10. Grafik Pengaruh Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur Terhadap Berat Molekul protein plasma Tanpa Infeksi.....	57
11. Grafik Pengaruh Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur Terhadap Berat Molekul Protein Plasma Setelah Infeksi.....	60

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Tanpa Infeksi.....	55
2. Tabel Sidik Ragam Kadar Protein Pada Plasma Darah Tanpa Infeksi .....	55
3. Uji BNT Untuk Sampel Dengan Penambahan Imunostimulan dan Tanpa Infeksi..	56
4. Analisa Sidik Ragam Regresi untuk Sampel Plasma Tanpa Infeksi.....	56
5. Data Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Setelah Penginfeksian.....	58
6. Tabel Sidik Ragam Kadar Protein Plasma Darah Ikan Setelah Penginfeksian.....	59
7. Uji BNT Untuk Sampel Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan dan Setelah Penginfeksian.....	59
8. Nilai Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Sehat dan Ikan Sakit. ....	61



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Benih Ikan Kerapu Macan ( <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> ).....	73
2. Bentuk dan Cara Pembuatan Alkaloid .....	74
3. Gambar Bak Pemeliharaan Ikan Kerapu Macan .....	76
4. Bahan-Bahan Elektroforesis.....	77
5. Perhitungan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang .....	78
6. Perhitungan Konsentrasi Alkaloid Ubur - Ubur ( <i>Bougainvillia</i> sp) Untuk Perendaman.....	79
7. Sentrifuge dengan Kemampuan Maksimal 10.000 rpm.....	81
8. Elektroforesis Plate.....	82
9. Pembuatan Bahan.....	83
10. Proses Elektroforesis.....	86
11. Shaker Staining dan Desstaining Sampel Plasma.....	87
12. Gambar Spektrofotometer.....	88
13. Data Hasil Uji Elektroforesis .....	89
14. Data Perbandingan Protein Sampel Tanpa dan Setelah Infeksi.....	92
15. Data Hasil Uji Spektrofotometer.....	93
16. Perhitungan Hasil Uji Spektrofotometer .....	94

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Indonesia sebagai negara maritim mempunyai potensi hasil perikanan laut yang besar. Perhatian Pemerintah dalam sektor perikanan laut semakin besar dengan dibentuknya Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal ini dilakukan dalam rangka pemanfaatan dan pemeliharaan potensi perikanan laut semaksimal mungkin sehingga dapat memenuhi kebutuhan gizi masyarakat Indonesia dan dapat menambah devisa negara dari komoditas non-migas. Salah satu strategi pemanfaatan dan pelestarian potensi sumber daya laut adalah pembenihan dan budidaya ikan kerapu.

Ikan kerapu merupakan komoditi laut yang mempunyai nilai ekonomis penting. Permintaan pengadaan ikan kerapu sebagai bahan konsumsi akhir-akhir ini semakin meningkat. Komoditi tersebut dipasarkan dalam bentuk segar maupun dalam bentuk kemasan dengan penjualan hingga mencapai skala internasional. Seiring pula dengan semakin meningkatnya kebutuhan akan protein hewani asal laut, minat petani nelayan untuk membudidayakan ikan kerapu pun semakin meningkat (Nuchsin dan Hatmanti, 2004).

Dari data yang dikeluarkan Dinas Perikanan dan Kelautan (2003) dapat diketahui bahwa pada tahun 1999 produksi benih kerapu macan mencapai 63.100 ekor, tahun 2000 produksi benih kerapu macan jumlah totalnya adalah 89.700 ekor. Tahun 2001 terjadi peningkatan produksi benih kerapu macan mencapai 1.614.400 ekor dan tahun 2002 produksi benih kerapu macan mencapai 2.583.700 ekor (Anonymous, 2004).

Kendala utama dalam usaha budidaya ikan kerapu adalah tingginya tingkat mortalitas benih yang dibudidayakan bisa mencapai 99% diakibatkan antara lain oleh Vibriosis, dimana infeksi bakteri patogen pada ikan budidaya dapat menyebabkan kematian ikan lebih dari 80%. *Vibrio* merupakan mikroorganisme atau bakteri Gram negatif yang menyebabkan infeksi sistemik pada ikan yang disebut vibriosis (Wang dan Leung, 2000).

Penyakit yang timbul adalah karena adanya interaksi antara inang, jasad penyebab penyakit dan lingkungan. Tindakan pencegahan merupakan langkah penanggulangan penyakit yang lebih efektif dibandingkan dengan pengobatan. Pengendalian penyakit ikan dengan menggunakan antibiotik dan bahan khemoterapi lain dapat menimbulkan masalah, yaitu menurunkan daya tahan tubuh ikan, mempengaruhi pertumbuhan ikan, serta dapat menimbulkan resistensi bakteri. Selain itu, penggunaan antibiotik dapat pula mengakibatkan pencemaran lingkungan dan terjadinya akumulasi residu antibiotik pada daging ikan. Salah satu cara pencegahan penyakit yang paling efektif adalah dengan menerapkan prinsip imunoprofilaksis yaitu suatu pencegahan penyakit dengan meningkatkan kekebalan tubuh terhadap berbagai penyakit (Ellis, 1988).

Penemuan immunostimulan sebagai suatu bahan yang dapat meningkatkan kekebalan non spesifik dapat dijadikan alternatif pencegahan penyakit pada ikan. Keberhasilan penggunaan immunostimulan dalam meningkatkan respon kekebalan ikan dipengaruhi oleh jenis, dosis, waktu, cara pemberian dan jenis ikannya (Sakai, 1998).

Aplikasi immunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan, perendaman maupun melalui suntikan (Roza dan Johny, 2004).

Menurut Dalimunthe (2006) untuk metode perendaman, biasa dipilih terutama untuk mengobati ikan-ikan yang terinfeksi dibagian luar tubuh.

Penemuan terbaru di bidang farmakologi kelautan saat ini, untuk penggunaan immunostimulan pada ikan dapat juga memanfaatkan senyawa aktif biota laut tertentu seperti binatang laut dari golongan coelenterata, yakni ubur-ubur, (*Bougainvillia* sp.). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Afriandini (2004), dalam ekstrak kloroform ubur-ubur mengandung senyawa alkaloid dan fenolik. Karena kandungan-kandungan kimia yang dimiliki ubur-ubur secara alami ini maka ubur-ubur dari jenis *Bougainvillia* sp. memiliki kemampuan sebagai bakterisida.

Hasil penelitian Fadjar, Andayani, Arfiati dan Prajitno (2003) bahan ekstrak cair ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) menghasilkan zona hambatan rata-rata pada bakteri *V. harveyi* 7 - 8,8 mm. Sedangkan hasil penelitian Awiningsih (2004), dengan perlakuan terbaik dengan ekstrak ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) mampu memberikan daerah hambatan dengan rata-rata 10,13 mm.

Sistem kekebalan tubuh pada ikan umumnya dideteksi melalui pemeriksaan darah. Beberapa komponen darah dapat diamati untuk mendeteksi adanya infeksi tertentu diantaranya plasma darah. Plasma sel ( yang sering disebut dengan sel plasma B atau plasmocyte) adalah sel yang termasuk dalam sistem kekebalan yang mampu mensekresi sejumlah besar antibodi (Anonymous, 2006).

Oleh karena itu penelitian ini berupaya untuk melihat pengaruh penggunaan immunostimulan ubur ubur melalui metode perendaman terhadap sistem kekebalan tubuh ikan kerapu macan melalui pengamatan gambaran dan jumlah plasma proteinnya.

## 1.2 Perumusan Masalah

Menurut Mahardika (2004) mengatakan bahwa ikan kerapu macan, *E. fuscoguttatus* merupakan salah satu jenis ikan kerapu yang semakin diminati oleh masyarakat. Pembenuhan dan budidaya ikan ini semakin berkembang di pembudidayaan ikan, kerana memiliki harga dan pangsa pasar yang lebih menjanjikan. Namun budidaya ikan ini masih menghadapi kendala yang salah satunya adalah masalah penyakit. Salah satu penyakit yang sering muncul tersebut adalah serangan dari bakteri *Vibrio spp.* atau yang lebih dikenal dengan *Vibriosis*. Tiga spesies bakteri *Vibrio* yang ditemukan menyerang ikan kerapu adalah *V. alginoliticus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. harveyi*.

Alternatif solusi yang dapat ditawarkan untuk menjawab permasalahan tersebut di atas adalah mengupayakan pencegahan penyakit dengan cara meningkatkan kekebalan tubuh ikan melalui rangsangan aktivitas pertahanan tubuhnya, diantaranya adalah dengan pemberian immunostimulan.

Menurut Muliani, *et.al.*, (1998) dalam Fadjar, Andayani, Arfiati dan Prajitno (2003), bahwa senyawa bioaktif yang diperoleh dari *hydrozoa* antara lain dari golongan fenolat, steroid dan terpenoid menunjukkan aktivitas kuat terhadap bakteri pada ikan dan udang.

Sehubungan dengan kemampuan senyawa aktif ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) sebagai bakterisida untuk menekan pertumbuhan dan menghambat infeksi bakteri *Vibrio harveyi*, maka perlu dilakukan kajian lanjutan tentang kemampuan senyawa aktif ubur-ubur, *Bougainvillia* sp. sebagai immunostimulan yang mampu meningkatkan tanggap kebal ikan kerapu macan (*E.fuscoguttatus*) terhadap serangan bakteri *Vibrio harveyi*.

Pemberian imunostimulan pada ikan dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya adalah dengan perendaman. Nabib dan Pasaribu (1990) menyatakan bahwa

metode perendaman menyebabkan proses immunitas yang lebih efektif, karena antigen lebih lama kontak dengan ikan.

Immunitas dari organisme dapat diketahui diantaranya dengan pemeriksaan darah. Diantara beberapa komponen penyusun darah terdapat plasma sel yang juga mampu untuk mendeteksi adanya infeksi dari bahan asing yang masuk kedalam tubuh. Plasma sel merupakan sel yang terdiri atas protein-protein yang mampu mensekresi sejumlah besar antibodi dan merupakan salah satu dari sistem kekebalan dari tubuh organisme (Anonymous, 2006).

Pemeriksaan darah ikan kerapu pada penelitian ini dititik beratkan pada pemeriksaan gambaran dan jumlah protein pada plasma darah. Sehingga dari penelitian ini diharapkan, penelitian ini akan dapat menjawab tantangan dan hambatan dalam usaha budidaya kerapu macan di tambak dan jaring apung.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan diadakannya penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi mengenai potensi bahan aktif alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia* sp) terhadap respon kekebalan tubuh benih ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* melalui metode perendaman dengan mengetahui perubahan gambaran dan jumlah plasma protein pada ikan kerapu macan yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*.

### **1.4 Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi untuk beberapa pihak, diantaranya :

- Lingkungan akademik, dapat dijadikan sebagai tambahan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) melalui perendaman dengan mengetahui perubahan gambaran dan jumlah protein plasma ikan kerapu macan yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*.
- Pemerintah dan instansi yang terkait, sebagai masukan dalam mengambil kebijaksanaan-kebijaksanaan tentang penanggulangan hama dan penyakit ikan dengan mempertimbangkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) melalui perendaman terhadap perubahan gambaran dan jumlah protein plasma ikan kerapu macan yang terinfeksi *V. harveyi*.
- Masyarakat, khususnya pembudidaya ikan. Sebagai informasi penggunaan bahan aktif alkaloid dari ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) sebagai immunostimulan melalui perendaman terhadap gambaran dan jumlah protein plasma kerapu macan yang diberi bahan aktif alkaloid tersebut dan telah terinfeksi bakteri *V. harveyi*.

### 1.5 Hipotesis

H<sub>0</sub> : Diduga bahwa pemberian bahan aktif alkaloid dari ubur-ubur (*Bougainvillia* sp) dengan dosis yang berbeda melalui perendaman tidak memberikan pengaruh terhadap perubahan gambaran dan jumlah plasma protein darah ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri *V. harveyi*.

H<sub>1</sub> : Diduga bahwa pemberian bahan aktif alkaloid dari ubur-ubur (*Bougainvillia* sp) dengan dosis yang berbeda melalui perendaman memberikan pengaruh terhadap perubahan gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan kerapu macan yang diinfeksi bakteri *V. harveyi*.

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Balai Budidaya Air Payau Situbondo (BBAP) Kabupaten Situbondo pada bulan Desember 2006 sampai dengan Februari 2007.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Ikan Kerapu Macan

Dari sekian banyak jenis kerapu, famili *Serranidae* merupakan jenis yang paling populer dan mempunyai nilai ekonomis paling tinggi untuk dibudidayakan. Secara umum kerapu mempunyai bentuk tubuh yang gemuk pipih tertutup oleh sisik-sisik kecil. Kebanyakan hidup di perairan terumbu karang dan sekitarnya, ada pula yang hidup di sekitar muara sungai. Kerapu merupakan salah satu ikan bentik penting di perairan tropis dan sub tropis, jenis ikan ini sangat disukai konsumen (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Kerapu Macan

Sistematika kerapu macan atau kerapu *tiger* menurut Randall (1987) dalam Subyakto dan Cahyaningsih (2003), sebagai berikut :

Fillum	: Chordata.
Sub Fillum	: Vertebrata.
Klas	: Osteichtyes.
Sub Klas	: Actinopterigi
Ordo	: Percomphi
Sub Ordo	: Perciodea
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Epinephelus</i>
Species	: <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>

Identifikasi kerapu macan pertama kali dilakukan oleh Weber dan Beaufort (1931), keduanya mendeskripsikan ikan tersebut mempunyai bentuk yang memanjang gepeng (*compressed*) atau agak membulat, mulut lebar serong ke atas dengan bibir bawah menonjol ke atas. Rahang bawah dan atas dilengkapi dengan gigi-gigi geratan berderet 2 baris, Lancip dan kuat serta ujung luar bagian depan adalah gigi-gigi yang terbesar. Sirip ekor umumnya membulat (*rounded*), sirip punggung memanjang dimana bagian jari-jarinya yang keras berjumlah 6-8 buah, sedangkan sirip dubur berjumlah 3 buah, jari-jari sirip ekor berjumlah 15-17 dan bercabang dengan 13-15. Warna dasar sawo matang, perut bagian bawah agak keputihan dan pada badannya terdapat titik berwarna merah kecoklatan serta tampak pula 4-6 baris warna gelap yang melintang hingga ke ekornya. Badan ditutupi oleh sisik kecil, mengkilat dan memiliki ciri loreng-loreng (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

### 2.1.2 Penyebaran dan Habitat

Daerah penyebaran kerapu macan dimulai dari Afrika Timur, Kepulauan Ryukyu (Jepang Selatan), Australia, Taiwan, Mikronesia dan Polinesia. Menurut Weber dan Beaufort (1931), di Indonesia ikan kerapu banyak ditemukan di perairan Pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Pulau Buru dan Ambon.

Dalam siklus hidupnya kerapu macan muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 m, selanjutnya menginjak masa dewasa berupaya ke perairan yang lebih dalam antara 8-40 m, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan senja hari. Telur dan larva bersifat pelagis sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal atau berdiam didasar kolam (Tampubolon dan Mulyadi, 1989).

Ditambahkan pula oleh Subyakto dan Cahyaningsih (2003) bahwa habitat favorit larva dan kerapu macan muda adalah perairan dekat muara sungai dengan dasar pasir berkarang yang banyak ditumbuhi padang lamun (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

### 2.1.3 Benih kerapu

Benih merupakan larva yang telah menyerupai bentuk ikan dewasa. Pada benih kerapu kanibalisme merupakan sifat biologi yang secara alamiah tidak dapat dihilangkan. Dilihat dari proses terjadinya, sifat ini mulai menonjol setelah larva menyerupai bentuk ikan dewasa (benih) dan mulai berkurang setelah benih mencapai ukuran panjang 7-10 cm pada umur lebih dari 35 hari. Benih yang ukurannya lebih besar akan memangsa yang lebih kecil dan ini merupakan fase kritis yang ke-4 pada budidaya kerapu. Upaya yang dapat ditempuh untuk mengatasi hal tersebut adalah melakukan pendederan terhadap benih sebelum benih digunakan untuk pembesaran. Dengan demikian pada masa-masa kritis, penanganan harus lebih intensif. Faktor penting lainnya yaitu kebiasaan hidup, jenis pakan dan kebiasaan pakan, penyebaran dan lain sebagainya (Anonymous, 2004).

Pakan merupakan faktor yang memegang peranan penting untuk menunjang keberhasilan kegiatan pendederan. Pakan hendaknya mempunyai kandungan nutrisi sesuai untuk benih serta dalam kondisi baik. Kebutuhan nutrisi untuk benih kerapu harus memiliki kadar protein yang tinggi karena tergolong hewan karnivora. Jenis pakan yang umum digunakan adalah pakan buatan dan ikan segar. Pemberian pakan sebaiknya diberikan secara *ad libitum* sebanyak 5-6 kali dalam sehari. Selama pemberian pakan, diusahakan tidak ada pakan yang tersisa agar tidak menimbulkan efek yang merugikan. Kelebihan pakan yang tersisa, akan menimbulkan pembusukan sehingga mempercepat proses penurunan kualitas air yang mengakibatkan stress pada ikan (Anonymous, 2004).

## 2.2 *Vibrio harveyi*.

### 2.2.1 Klasifikasi

Menurut Bergey (1962) edisi ke-7 dalam Dwidjoseputro (1998), klasifikasi dari *Vibrio harveyi* adalah sebagai berikut:

Phyllum : Protophyta

Class : Schizomycetes

Ordo : Pseudomonadales

Sub ordo : Pseudomonadineae

Famili : Spirillaceae

Genus : *Vibrio*

Species : *Vibrio harveyi*

### 2.2.2 Biologi

#### a. Morfologi

*Vibrio* dalam mikrofauna yang umumnya berada pada lingkungan laut estuaria. Secara bakteriologi berbentuk batang bengkok dengan ukuran lebar 0,5-0,8  $\mu$  dan dengan panjang 1,4-2,6  $\mu$ . Sebagian besar bakteri *Vibrio* berenang aktif dan gerakannya disebabkan oleh gerakan rotasi flagel. Bakteri *V. harveyi* pada umumnya hidup pada air laut yang mempunyai suhu yang tinggi. Bakteri ini dalam keadaan gelap dapat menghasilkan cahaya sehingga dapat digolongkan menjadi bakteri gram negatif (Anonymous, 2005).

#### b. Metabolisme dan pertumbuhan

*Vibrio sp.* bersifat anaerobik fakultatif, dimana metabolisme dapat dilakukan dengan oksigen ataupun tanpa oksigen (fermentasi), selain itu bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media mineral yang mengandung ammonium, karbon sederhana dan

glutamat (Holt, 1979). Bakteri ini memiliki enzim katalase, motilitas positif dan mampu menghasilkan enzim oksidase yang bersifat fermentatif (Rukyani *et al.*, 1992).

Faktor yang sangat mempengaruhi aktifitas dan pertumbuhan bakteri tersebut adalah faktor abiotik. Faktor ini meliputi faktor fisik seperti: temperatur, osmose, cahaya dan radiasi, juga faktor kimia yang mencakup pH, salinitas, bahan organik dan zat-zat kimia (Holt, 1979). Pada umumnya bakteri *Vibrio sp.* tumbuh secara optimal pada suhu 30 °C, salinitas optimum antara 20-30 ppt dan pH optimum berkisar antara 7,5-8,5 (Bauman *et al.*, 1984).

Bakteri *Vibrio sp.* termasuk bakteri kemoorganotropis dapat tumbuh dalam medium mineral yang mengandung D-glukosa dan NH<sub>4</sub>Cl (Bauman *et al.*, 1984). Dikatakan Dwidjoseputro (1998), bahwa *Vibrio spp.* termasuk kemoorganotropik, yaitu mikroba yang dapat menggunakan komponen organik sebagai sumber karbon dan energi. Medium yang paling cocok bagi kehidupan bakteri adalah medium yang isotonis terhadap isi sel bakteri. Bakteri *Vibrio spp.* adalah jenis bakteri halofil yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi (Holt, 1979).

### c. Habitat dan daerah penyebarannya

Penyakit kunang-kunang ternyata hanya dikenal di daerah tropis seperti Filipina, Thailand, Indonesia dan Equador. Belum pernah ada laporan kasus penyakit di daerah sub tropis seperti Taiwan, China, Jepang dan Amerika Serikat. Penyakit ini telah menyebar hampir di seluruh Indonesia dan kasus serangan dilaporkan terutama terjadi di daerah dimana banyak terdapat *hatchery* seperti di daerah Jawa Timur (Situbondo, Besuki dan Banyuwangi), Jawa Barat (Serang, Pandeglang, Pelabuhan Ratu dan Indramayu), Jawa Tengah (Jejara), Sulawesi Selatan (Bone), Bali dan Lampung (Rukyani *et al.*, 1992).

*Vibrio sp.* ditemukan di habitat-habitat aquatik dengan kisaran salinitas yang luas. Sangat umum pada lingkungan estuarin dan laut serta terdapat pada permukaan intestinal hewan laut. Beberapa spesies ditemukan di habitat air tawar (Bauman *et al.*, 1984).

#### d. Ciri-ciri serangan

*Vibrio spp.* diantaranya menginfeksi sel inang dimulai dengan melalui saluran pencernaan. Salah satu kemampuan terpenting bakteri patogen adalah kepastiannya untuk meregulasi faktor-faktor virulensi sebagai respon terhadap perubahan kondisi lingkungan saat masuk ke sel inang. Bakteri patogen ini diketahui melekat pada kollagen, mucus ikan dan sel epitel. Jalan masuk (*portal of entry*) species *Vibrio* menuju ikan adalah melalui saluran gastrointestinal, insang dan kulit. Khusus mengenai route *Vibriosis* untuk masuk ke ikan terutama untuk pelekatan dan untuk penetrasi adalah melalui sel epitel yang secara sistematis menyebar (Yanuar *et al.*, 2004).

Menurut Zafran (1998) tanda-tanda umum adanya serangan *Vibriosis* pada kerapu adalah adanya gejala eksternal dan gejala internal. Gejala eksternal seperti pada Gram negatif septicaemia. Warna punggung kehitam-hitaman, nafsu makan turun atau hilang, eritema pangkal sirip dan dalam mulut, petikiae pada otot daging, hemorhagik pada alat kelamin dan dubur. Apabila penyakit berkembang hemorhagik dan nekrotik akan meluas terutama pada otot daging dan terjadi erosi kulit. Sedangkan gejala internal adalah hemorhagik dan nekrotik pada usus dan otot daging, empedu dan hati lengket, ginjal membengkak, kematian ikan terutama karena tidak berfungsinya organ tubuh dan kekurangan O<sub>2</sub> (Kamiso, 2004). Ditambahkan oleh Kabata (1985), bahwa penyakit ini dapat mengakibatkan pendarahan dan luka nanah yang parah.

## 2.3 *Bougainvillia* sp

### 2.3.1 Klasifikasi

Menurut Haeckel (1879) dalam Arifin (2003), klasifikasi dari *Bougainvillia* sp.

Phyllum : Coelenterata

Sub phyllum : Cnidaria

Class : Hydrozoa

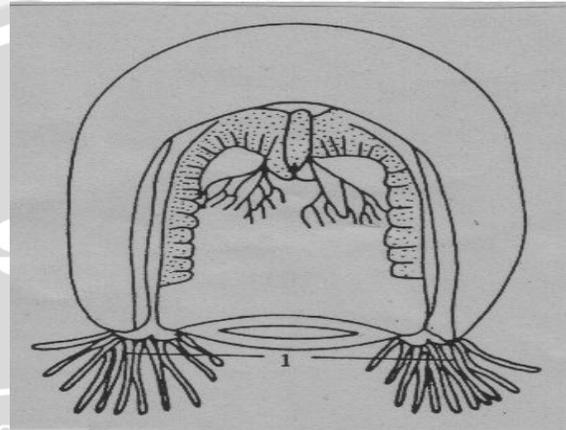
Ordo : Filifera

Sub ordo : Hydrida

Family : Bougainvilliidae

Genus : *Bougainvillia*

Species : *Bougainvillia* sp.



Gambar 1. *Bougainvillia* (Wickstead, 1965)

### 2.3.2 Biologi

#### a. Morfologi

Bentuk ubur-ubur hampir seperti lonceng atau payung dimana bagian atas disebut *ex-umbrella* dan bagian bawah disebut *sub-umbrella*, tentakel menggantung ditepi velum dan berjumlah 4-16, tentakel ini kaya akan *nematocyst* yang merupakan racun pada ubur-ubur (Wijarni dan Diana, 1984).

Menurut Hickman (1970), tubuh Hydrozoa dapat mencapai panjang 0,5-6 cm atau berupa jelly yang tipis, memiliki *tube silinder*, pada tubuhnya juga terdapat *pedal disk* yang berfungsi sebagai senjata, pedal ini dilengkapi dengan jaringan sel yang memungkinkan untuk menempel pada substrat dan gelembung untuk mengapung.

Menurut Radiopoetro (1991), jaringan epidermis pada polip hydrozoa tersusun atas sel-sel, antara lain:

- Sel-sel epitheliomuscular
- Sel-sel sensoris
- Sel-sel saraf
- Sel-sel interstisiil
- Sel-sel kelenjar (*cnidoblast*)

*Cnidoblast* terbentuk dari sel interstisiil pada ujung permukaan tubuh, *cnidoblast* mempunyai lanjutan dari protoplasma yaitu *cnidocil*. Dalam *cnidoblast* terdapat *nematocyst* yang berbentuk gelembung dengan dinding membran yang kuat dan mengandung cairan beracun yang dapat menyebabkan iritasi.

#### **b. Habitat dan penyebaran**

Menurut Barnes (1974), ubur-ubur merupakan coelenterata yang hidup di laut. Hidup soliter atau berkelompok, berenang bebas dengan bantuan kontraksi payungnya yang bekerja seperti pompa, beraturan dan berirama. Beberapa jenis juga tergantung pada ombak, bila keadaan ombak cukup besar mereka cenderung bergerak ke pantai. Ubur-ubur ada yang senang hidup di perairan hangat dan sedang, ada yang senang berenang dekat permukaan atau dalam, serta hidup pada perairan yang dangkal di daerah tropis dan sub tropis. Sehingga secara garis besar ubur-ubur tersebar luas di semua perairan laut. Di Jawa Timur ubur-ubur tersebar di perairan pantai Probolinggo, Nambangan, Surabaya, Sidorukun Gresik dan daerah-daerah berpantai lainnya.

#### **c. Reproduksi**

Menurut Barnes (1974), reproduksi ubur-ubur secara seksual adalah bentuk dewasa (medusa) dan aseksual adalah bentuk polip. Pada reproduksi seksual, spermatozoa hewan jantan keluar melalui mulut dan berenang menuju hewan betina, selanjutnya melalui mulut hewan betina akan menuju telur yang dihasilkan oleh

ovarium. Pembuahan terjadi di dalam tubuh hewan betina. Zygot yang dihasilkan akan keluar melalui mulut dengan bantuan lengan mulut.

Selanjutnya terjadi pembelahan sampai terbentuk larva planula yang bersilia dan dapat berenang. Planula akan berenang beberapa saat, kemudian akan melekat pada dasar perairan yang agak keras. Kemudian silia akan hilang dan dimulai reproduksi aseksual, yaitu akan membentuk mulut, tentakel dan mulai menangkap makanan dan tumbuh. Kemudian terbentuk polip yang bersusun dan antara yang satu dan yang lainnya mulai memisahkan diri mulai dari polip yang paling atas. Peristiwa ini disebut strobilasi dan medusa yang terbentuk disebut strobila. Tentakel strobila akan memendek dan bentuk ini disebut ephyra. Ephyra akan berenang bebas dan selanjutnya tumbuh menjadi ubur-ubur dewasa.

### 2. 3. 3 Kandungan Ekstrak *Bougainvillia* sp.

Menurut Wijarni dan Diana (1984), ubur-ubur dikenal sebagai binatang pengganggu di perairan dekat pantai karena dapat menyebabkan rasa gatal pada kulit bila tersentuh. Hal ini disebabkan adanya sel penyengat atau *nematocyst* yang terdapat di dalam jaringan epidermisnya, baik pada tentakel maupun dibagian tubuh lainnya. Sel-sel penyengat letaknya tersebar pada tentakel, lengan mulut dan pada permukaan mulut dalam jumlah besar. Fungsi *nematocyst* adalah untuk melumpuhkan musuh atau mangsa sebelum dimasukkan ke dalam mulut.

Sebagian besar bahan aktif yang di ekstraksi dari lautan adalah toksin. Sebenarnya toksin adalah molekul yang mempunyai aktifitas fisiologi yang kuat dengan fungsi khusus. Toksin mempunyai potensi untuk digunakan sebagai obat walaupun kadang-kadang tidak dapat digunakan secara langsung sebagai obat. Ekstraksi bahan

aktif dari laut sudah banyak dilakukan, sebagai contoh bahan antibiotik, anti cendawan pada jenis monera; anti virus dari protista; antibiotik, faktor perusak dan faktor pertumbuhan dari jenis spons; serta bahan anti koagulan dan neurohormonal dari beberapa jenis coelenterata. Ekstrak alkohol dan etanol dari 2000 spesies organisme laut telah diuji di berbagai negara maju dan golongan tersebut ternyata mengandung senyawa sitotoksik, antibakteri, antibiotik, antitumor, maupun antikanker diantaranya golongan coelenterata (Angka dan Suhartono, 2000).

Menurut Scheuer (1978), coelenterata dari kelas hydrozoa mempunyai zat bioaktif dari golongan terpenoid, sesterpen, variabelin, ketosteroid, metilsteroid glikosida peptide dan asam fenolat. Menurut Fadjjar *et al.*, (2003), menyatakan bahwa senyawa bioaktif ubur – ubur dari klas hydrozoa menunjukkan aktivitas kuat terhadap bakteri pada ikan dan udang.

#### **2.3.4 Alkaloid dari Ekstrak Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) sebagai Immunostimulan**

Bahan bioaktif yang dikandung golongan coelentrata salah satunya adalah alkaloid. Menurut Guralnik (1972), alkaloid biasanya tanpa warna, berbentuk kristal, dan merupakan zat organik yang pahit. Alkaloid dapat memiliki efek toksin pada sistem manusia dan hewan.

Sumber-sumber alkaloid adalah pada tanaman berbunga, angiosperma. Pada tahun-tahun berikutnya penemuan sejumlah besar alkaloid terdapat pada hewan, serangga, organisme laut, mikroorganisme dan tanaman rendah. Kebanyakan alkaloid yang telah diisolasi berupa padatan kristal dengan titik lebur tertentu atau mempunyai kisaran dekomposisi. Sedikit alkaloid yang berbentuk amorf, dan beberapa seperti nikotin dan koniin berupa cairan. Kebanyakan alkaloid tidak berwarna, tetapi beberapa

senyawa yang kompleks spesies aromatik berwarna. Garam alkaloid dan alkaloid quartener sangat larut dalam air. Kebanyakan alkaloid bersifat basa. Sifat tersebut tergantung pada adanya pasangan elektron pada nitrogen (Sastrohamidjojo, 1996).

Menurut Robinson (1995), fungsi dari alkaloid yaitu sebagai berikut :

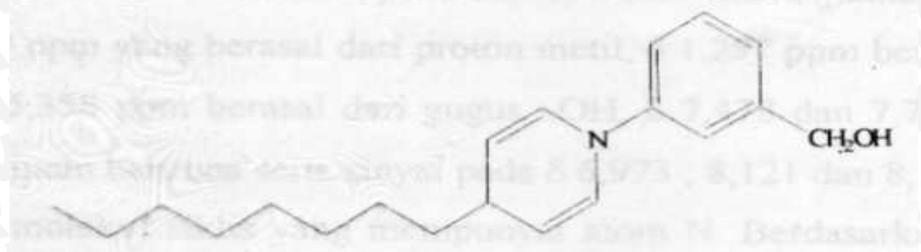
- Alkaloid diperkirakan berfungsi sebagai hasil buangan nitrogen seperti urea dan asam urat pada binatang (pendapat ini tidak berlaku lagi)
- Alkaloid dapat melindungi tumbuhan dari serangan penyakit atau pemangsa tumbuhan.
- Beberapa jenis alkaloid mungkin bertindak sebagai tandon penyimpanan nitrogen meskipun banyak alkaloid ditimbun dan tidak mengalami metabolisme lebih lanjut dan sangat kekerangan oksigen.
- Alkaloid dapat berlaku sebagai pengatur tubuh, karena dari segi struktur beberapa alkaloid menyerupai pengatur tumbuh.
- Alkaloid sebagian besar bersifat basa, dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan.

Adapun struktur dasar dari alkaloid berdasarkan Fessenden dan Fessenden (1984) adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Struktur Dasar Alkaloid

Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian Farid, Fadjar dan Andayani (2004), diperoleh data dari spektra UV-vis, NMR dan IR, bahwa kemungkinan struktur senyawa alkaloid ubur-ubur, *Bougainvillia* sp. Dalam ekstrak kloroform dapat ditunjukkan pada Gambar 3. berikut ini:



### ***1-benzilalkohol, 4-oktil piperidin***

Gambar 3. Struktur alkaloid pada ubur-ubur (*Bougainvillia sp.*)

Menurut hasil penelitian Herawati (2004), bahwa bahan alkaloid dengan dosis sebesar 8,4 efektif membunuh bakteri sebesar 99,9%. Menurut Sakai (1999), ekstrak hewan yang membunuh bakteri dapat dianggap sebagai immunostimulan. Immunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintetis yang dapat meningkatkan tanggap kebal non-spesifik, sehingga dapat dijadikan alternatif untuk penggunaan vaksin atau antibiotik dalam perlindungan terhadap serangan penyakit (Johny dan Roza, 2001 dalam Ridwan 2005)

Menurut Anderson (1974), mekanisme masuknya antigen dari immunostimulan pada tubuh ikan dengan metode perendaman dapat melalui insang, dan kulit. Dimana antigen terlebih akan ditangkap oleh spesifik reseptor dan diproses oleh makrofag, selanjutnya pesan tersebut akan dikirim ke organ limposit. Dalam limposit ini, antigen akan dimultiplikasi (digandakan) dan antibodi spesifik diproduksi. Selanjutnya antibodi tersebut dibawa masuk melewati sel menuju peredaran darah dalam kapiler insang untuk diedarkan ke seluruh jaringan tubuh ikan.

Berdasarkan pendapat para peneliti, maka metode pemberian immunostimulan pada ikan dapat dilakukan dengan 4 metode/cara, yakni :

- **Injeksi**

Cara ini sangat efektif untuk menghasilkan respon kekebalan, namun banyak membutuhkan waktu dan tenaga serta seringkali menimbulkan stress pada ikan yang akan diberi immunostimulan.

- **Perendaman**

Cara perendaman ini memiliki keunggulan karena dapat digunakan untuk pengaplikasian immunoistimulan pada ikan dalam jumlah besar (Hernayanti, Irianto dan Herlina, 2004), pelaksanaannya mudah, tidak menguras tenaga, tidak menimbulkan efek stress yang besar dan bisa digunakan untuk ikan ukuran benih atau ukuran juvenil sampai larva (Ellis, 1988).

Sedangkan Nabib dan Pasaribu (1990), menyatakan bahwa, metode perendaman menyebabkan proses immunitas yang lebih efektif, karena antigen lebih lama kontak dengan ikan.

- **Penyemprotan**

Immunostimulan disemprotkan dengan menggunakan alat penyemprot bertekanan tinggi pada tubuh ikan. Namun cara ini banyak mengakibatkan kerugian antara lain ikan menjadi stress akibat penyemprotan, terjadi pemborosan immunostimulan, dan membutuhkan biaya yang sangat besare untuk membeli alat.

- **Oral**

Cara ini dapat dipakai untuk ikan dalam jumlah besar, tidak memerlukan banyak tenaga, tidak menimbulkan stress tetapi terjadi pemborosan immunostimulan apabila pakan yang dioplos dengan immunostimulan tidak dimakan oleh ikan.

Menurut Tizard (1988), syarat utama yang harus diperhatikan ketika pengaplikasian vaksin atau immunostimulan adalah, ikan tidak dalam kondisi diserang

parasit, tidak mengalami malnutrisi, suhu tidak terlalu dingin atau terlalu panas, tidak dalam keadaan stress dan tidak dalam keadaan karantina akibat penyakit, karena kondisi-kondisi ini akan menghambat tanggap kebal non-spesifik dari ikan tersebut.

## **2.4 Immunitas Pada Ikan**

Imunitas adalah resistensi terhadap penyakit terutama penyakit infeksi. Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi disebut sistem imun dan reaksi yang dikoordinasi sel-sel dan molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya disebut respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (Baratawijaya, 2004).

Sistem imun membentuk suatu pertahanan tubuh terhadap benda-benda asing seperti mikroorganisme (bakteri, protozoa, virus dan parasit), molekul-molekul yang berpotensi sebagai toksik, atau sel-sel tidak normal. Sel-sel sistem imun tersebar di seluruh tubuh dan ditemukan di dalam sumsum tulang, timus, darah, kelenjar getah bening, limpa, saluran nafas, saluran cerna, saluran urin dan jaringan. Pertahanan imun terdiri atas sistem imun spesifik dan sistem non-imun spesifik (Baratawijaya, 2004).

### **2.4.1 Sistem Imun Spesifik**

Sistem imun spesifik adalah sistem kekebalan khusus yang membentuk antigen dan membuat limfosit peka untuk segera menyerang dan menghancurkan organisme spesifik atau toksin (Fujaya, 2004). Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh segera dikenal oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitifitas sel-sel sistem imun tersebut. Benda asing yang sama, bila muncul kembali

akan dikenal lebih cepat, kemudian dihancurkan olehnya. Oleh karena sistem tersebut hanya dapat menyingkirkan benda asing yang dikenal sebelumnya, maka sistem ini disebut sistem imun spesifik (Baratawidjaja, 2004).

Ada dua jenis sistem imun spesifik, yakni sistem imun spesifik imun humoral dan sistem imun spesifik selular. Sistem imun spesifik humoral sistem imun yang didapat karena tubuh membentuk antibodi yang mampu menyerang penguinasi (Fujaya, 2004) dan menurut Baratawidjaja (2004), pemeran utama dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B. Sedangkan sistem imun spesifik selular sesuai yang dikemukakan oleh Fujaya (2004) adalah sistem imun yang dicapai melalui pembentukan limfosit dalam jumlah besar yang secara khusus menyerang penguinasi. Jadi pemeran utama sistem imun spesifik selular ini adalah limfosit T (Baratawidjaja, 2004).

#### **2.4.2 Sistem Imun Non-Spesifik**

Sistem imun non-spesifik adalah mekanisme fisiologik imunitas non-spesifik berupa komponen normal tubuh yang selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba masuk tubuh dan dengan cepat menyingkirkan mikroba tersebut, non-spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu. Mekanismenya tidak menunjukkan spesifitas terhadap bahan asing dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial.

Bila benda-benda patogen berhasil menyerbu masuk ke dalam tubuh organisme, sistem pertahanan non akan bereaksi. Sistem imun yang tidak spesifik terhadap substansi-substansi asing (bakteri, virus, partikel anorganik dan lain-lain) dilakukan oleh substansi yang larut tertentu seperti protein (lizosim, serum dan lain-lain) (Sibernagl,

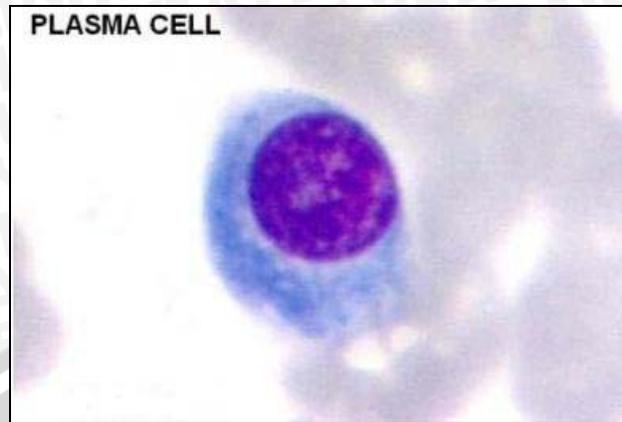
1990). Pertahanan ikan pertama kali melawan patogen dihambat dengan respon non-spesifik (mucus, epidermis, dermis) dan inflamasi (Anderson, 1974).

Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh, sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun non-spesifik (Baratawijaya, 2004). Kedua sistem terjalin erat, dan keduanya melibatkan partisipasi sel-sel dan faktor-faktor yang dapat larut yang dapat berpindah-pindah (Sibernagl, 1990).

## **2.5 Plasma Protein Darah**

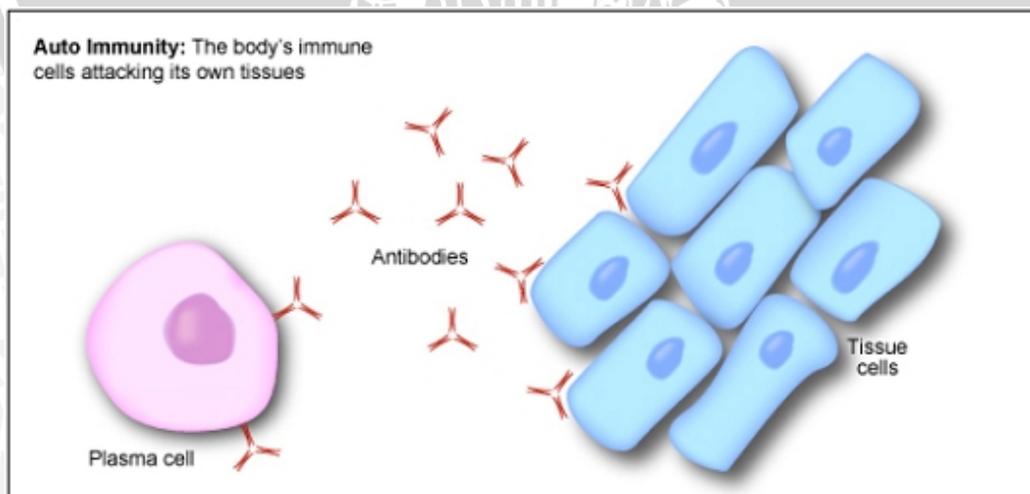
Darah terdiri dari beberapa jenis korpuskula yang membentuk 45% bagian dari darah. Bagian 55% yang lain berupa cairan kekuningan yang membentuk medium cairan-cairan darah yang disebut dengan plasma. Plasma darah pada dasarnya adalah larutan air yang mengandung 80-90% protein diantaranya albumin, immunoglobulin (antibodi) dan berbagai enzim serta komponen lain seperti bahan pembeku darah, hormon, dan berbagai jenis garam. (Anonymous, 2006).

Sel plasma mempunyai nukleus yang bulat, yang terletak aksentrik yang kromatinnya tersebar tidak merata. Sel plasma mempunyai sitoplasma yang bersifat basofilik dan pironinofili, sesuai dengan sel yang kaya ribosom yang menghasilkan antibodi. Sel plasma mampu membuat sebanyak 300 molekul antibodi setiap detik dan kadang antibodi tersebut berkumpul (Tizard, 1988). Adapun gambaran dari sel plasma darah dapat dilihat sebagaimana Gambar 4 berikut:



Gambar 4. Gambar Sel Plasma Dalam Darah (Khajeh, 2007)

Plasma sel ( yang juga sering disebut dengan sel plasma B atau plasmocyte) merupakan salah satu sel yang termasuk dalam sistem kekebalan yang mampu mensekresi sejumlah besar antibodi. Antibodi yang terdapat dalam plasma darah adalah protein yang berbentuk Y (lihat Gambar 5) yang sering disebut dengan immunoglobulin. Immunoglobulin ini digunakan dalam system kekebalan untuk mengidentifikasi dan menetralkan bahan asing seperti bakteri dan virus. Beberapa antibodi mampu untuk mengenali antigen tertentu sebagai targetnya. Hal ini dikarenakan pada kedua ujung “Y” nya mempunyai struktur yang berhubungan untuk mengunci.



Gambar 5. Peranan Plasma Sel Dalam Sistem Kekebalan (Anonymous, 2007a)

Setiap gembok hanya mempunyai satu kunci, dalam hal ini adalah antigen. Jika kuncinya dipasangkan dengan gembok, maka antibodi akan menyerang, dan mengenali mikroba atau sel penginfeksi untuk menyerang dengan beberapa system kekebalan lainnya atau secara langsung menetralkan target (mengeblok bagian mikroba yang berperan penting dalam invasi dan pertahanan). Produksi dari antibodi adalah fungsi utama dari sistem kekebalan humoral (Anonymous, 2006).

## **2.6 Analisis Plasma Protein darah**

### **2.6.1 Elektroforesis SDS PAGE**

Menurut Titrawani (1996) elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan didalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. Ditambahkan oleh Richadson *et al.* (1986) bahwa pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan berat ukuran molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi (Pratiwi, 2001).

Elektroforesis biasanya memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul-molekul biologi. Media penyangganya bermacam-macam tergantung pada tujuan dan bahan yang akan dianalisa. Media penyangga yang sering dipakai dalam elektroforesis antara lain yaitu kertas, selulose, asetat dan gel. Gel yang dipakai dapat berupa pati, agarose ataupun poliakrilamid (Zubay, 1989).

Gel poliakrilamid tersusun dari akrilamid dan bis akrilamid yang akan membentuk polimer bila terdapat radikal bebas. Polimer yang terbentuk mempunyai

pori-pori didalamnya. Besarnya pori-pori dapat diatur dengan mengubah konsentrasi akrilamid dan bisakrilamid (Zubay, 1989).

SDS PAGE (Sodium Dodecil Sulfate Polyacrylamide Electrophoresis Gel) merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya dengan menggunakan media penyangga berupa gel polyakrilamid (Anonymous, 2003).

Prinsip kerja SDS PAGE adalah molekul bergerak ke arah elektroda dengan muatan yang berlawanan. Molekul yang lebih kecil bergerak cepat dan mudah dibandingkan yang besar. Pemisahan ini berdasarkan ukuran muatan. SDS ini merupakan detergen yang mempunyai muatan negatif yang sangat besar sehingga SDS akan mengikat muatan positif dari protein dan dengan demikian mengakibatkan pergerakan protein ke arah elektroda positif. SDS juga akan menyebabkan protein terdenaturasi (dalam hal ini SDS mampu memutuskan ikatan-ikatan sub unit protein) dan meningkatkan daya membuka molekul protein ( Dharmawati (1995) dalam Susanto (2004)).

Pada saat elektroforesis berlangsung, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu pada gel poliakrilamid tergantung berat molekulnya. Semakin rendah berat molekulnya maka semakin jauh pula protein bergerak dengan kata lain metabolismenya tinggi. Sebaliknya, protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek dengan kata lain mobilitasnya rendah. Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terseparasi (terpisah-pisah) pada gel poliakrilamida tergantung pada mobilitasnya. Protein dengan mobilitas tinggi akan berhenti bergerak pada bagian yang lebih bawah gel, sedangkan

protein dengan mobilitas rendah cenderung berhenti bergerak pada bagian atas gel (Zubay, 1989).

Aliran molekul-molekul protein dalam gel ini akan membentuk pita. Protein homogen akan menghasilkan satu pita sedang sub unit yang ukurannya berbeda akan menghasilkan banyak pita. Dengan demikian, pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein (disebut sebagai band atau pita protein) yang sudah terseparasi berdasarkan berat molekulnya. Dalam satu sampel protein, bisa lebih dari satu bahkan puluhan band dalam gel poliakrilamida.

Pada kondisi tidak diwarnai, protein tersebut tidak terlihat karena memang protein dalam sampel tidak berwarna. Setelah diwarnai dengan staining solution yang mengandung coomassie brilliant blue R-250, protein yang tidak berwarna tersebut menjadi biru karena mengikat coomassie blue. Pada kondisi ini kita bisa mengetahui keberadaan dan mengukur mobilitas protein untuk kemudian ditentukan berat molekulnya.

Elektroforesis dengan kondisi protein yang sudah terdisosiasi dapat dipakai untuk memperkirakan berat molekul suatu protein. Berat molekul tersebut dapat ditentukan dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid (yang mengandung SDS) berdasarkan kurva standar berat molekul dari protein standar. Protein standar yang diketahui berat molekulnya dapat dielektroforesis dan mobilitasnya pada gel poliakrilamid dapat diukur. Mobilitas (atau  $R_f$ ) diukur dengan memakai rumus sebagaimana Zubay (1989):

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Protein dengan berat molekul tertentu mempunyai Rf tertentu pula. Bila dipakai lima jenis protein standar dengan berat molekul yang berbeda, maka akan didapatkan lima nilai Rf yang berbeda pula. Untuk membuat kurva kalibrasi berat molekul, kelima nilai Rf ini akan ditempatkan sebagai sumbu Y dan berat molekul (biasanya dinyatakan sebagai fungsi dari log berat molekul) ditempatkan sebagai sumbu X. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis yaitu  $y = a + bx$ . Mobilitas dari suatu protein (yang belum diketahui berat molekulnya) dapat dicari dengan mengplotkan langsung pada kurva standar berat molekul atau dapat dihitung dengan menggunakan persamaan garis dari kurva standar berat molekul (Zubay, 1989).

### 2.6.2 Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan suatu teknik analisa menggunakan alat spektrofotometer yang mekanisme kerjanya berdasarkan pada banyaknya cahaya yang diserap oleh suatu substansi dalam larutan. Cahaya disini bisa berupa cahaya tampak ( $\lambda$  400-700 nm) ataupun cahaya tidak tampak ( $\lambda$  200-100 nm). Setiap jenis substansi dalam larutan menyerap dan memantulkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu. Kemampuan penyerapan cahaya ini merupakan salah satu sifat khas substansi seperti halnya titik leleh, berat jenis dan kelarutan. Banyaknya cahaya yang diserap (absorbansi) oleh larutan menggambarkan banyaknya atau jumlah substansi yang terlarut (Widyarti, 2000).

Suatu substansi berwarna bisa dianalisa dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang cahaya tampak, tetapi bila suatu substansi tidak berwarna maka dapat dianalisa dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang cahaya UV. Beberapa substansi organik tidak berwarna sehingga tidak menyerap cahaya pada panjang

gelombang cahaya tampak tetapi menyerap cahaya pada gelombang UV. Protein misalnya mempunyai absorbansi maksimum sekitar 280 nm karena gugus asam amino tirosin dan triptofan. Substansi protein yang tidak berwarna tersebut jika direaksikan dengan suatu *dye reagen* dapat menghasilkan suatu substansi berwarna (Widyarti, 2000).

Langkah utama dalam analisis spektrofotometri meliputi kondisi kerja dan pembuatan kurva kalibrasi yang menghubungkan konsentrasi dan absorbansi. Pengukuran absorbansi biasanya dilakukan pada suatu panjang gelombang yang sesuai dengan absorbansi maksimum (Brown, 1987).

Faktor-faktor yang mempengaruhi absorbansi meliputi jenis pelarut, suhu dan konsentrasi elektrolit yang tinggi. Keberhasilan dinding kuvet juga akan mempengaruhi absorbansi. Oleh karena itu bekas jari pada dinding kuvet harus dibersihkan dengan tissue dan hanya memegang bagian ujung atas tabung sebelum pengukuran. Larutan standar yang dipakai sebaiknya mempunyai komposisi cuplikan berada diantara konsentrasi larutan standar (Hendayana, 1994).

### **2.7 Kualitas Air Media Pemeliharaan Kerapu**

Beberapa parameter yang perlu diperhatikan untuk usaha budidaya laut diantaranya meliputi suhu, salinitas, pH, kecerahan, oksigen terlarut, ammonia, nitrit dan sumber polutan lainnya. Menurut Randall (1987), optimalisasi media pemeliharaan merupakan harmonisasi sebagai parameter kualitas air utama yang meliputi : suhu, oksigen terlarut, pH, salinitas dan ammonia.

### **a. Suhu**

Pada dasarnya semua contoh budidaya adalah poikilotherm, walaupun metabolismenya dideterminasikan oleh temperatur air. Sebagai alasan bahwa kisaran suhu yang luas, membutuhkan sistem enzim yang berbeda antara berbagai macam spesies. Metabolisme akan berjalan lambat apabila temperatur harus ditingkatkan mencapai level optimum (Stickney, 1979)

Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme organisme, karena itu penyebaran organisme baik di lautan maupun di perairan tawar dibatasi oleh suhu perairan tersebut. Suhu sangat berpengaruh terhadap kehidupan dan pertumbuhan ikan. Secara umum laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu dan dapat menekan kehidupan ikan bahkan menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai ekstrim (Kordi, 2004).

Di atas suhu optimum, metabolisme meningkat dan energi tidak digunakan untuk pertumbuhan sampai dengan pemeliharaan sebagai metabolisme tertinggi. Apabila suhu mendekati titik thermal kematian, metabolisme akan berjalan lambat aktivitas makan turun dan akhirnya mati (Stickney, 1979).

### **b. Oksigen Terlarut**

Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas, sehingga bila ketersediaannya di dalam air tidak mencukupi kebutuhan ikan budidaya, maka segala aktivitas ikan akan terhambat. Kebutuhan ikan mempunyai dua aspek, yaitu kebutuhan lingkungan bagi spesies tertentu dan kebutuhan konsumtif yang tergantung pada keadaan metabolisme ikan. Perbedaan kebutuhan oksigen dalam suatu lingkungan bagi ikan dari spesies tertentu disebabkan oleh adanya perbedaan struktur molekul sel darah ikan, yang

mempengaruhi hubungan antara tekanan parsial oksigen dalam darah dan derajat kejenuhan oksigen dalam sel darah (Kordi, 2004).

Menurut Kordi (2004), bahwa ikan memerlukan oksigen untuk pembakaran bahan makanan guna menghasilkan energi untuk aktivitas seperti berenang, pertumbuhan, reproduksi dan lain-lain. Oleh karena itu, ketersediaan oksigen bagi ikan menentukan lingkaran aktivitas ikan, konservasi pakan, demikian juga laju pertumbuhan bergantung pada oksigen dengan ketentuan faktor kondisi lainnya adalah optimum.

### c. Derajat Keasaman (pH)

Asam atau basa biasa disebut pH, selebihnya dapat digunakan sebagai indeks kualitas lingkungan perairan. Kondisi perairan dengan pH netral atau sedikit basa sangat ideal untuk kehidupan ikan air laut. Perairan dengan pH rendah dapat mengakibatkan aktivitas tubuh menurun atau ikan menjadi lemah, lebih mudah terkena infeksi dan biasanya diikuti dengan tingkat mortalitas tinggi (Sudjiharno dan Tjahjo Winanto, 1999).

Sedangkan menurut Kordi (2004), pada pH rendah kandungan oksigen terlarut akan berkurang, sebagai akibatnya konsumsi oksigen menurun, aktivitas pernafasan naik dan selera makan akan berkurang dan sebaiknya ini terjadi pada suasana basa. Atas dasar ini maka usaha budidaya akan berhasil baik dalam air dengan pH 6,5 – 9. Sedangkan selera makan tertinggi didapat pada pH 7,5 – 8,5. Menurut Subyakto dan Cahyaningsih (2003), salah satu parameter kualitas air untuk ikan kerapu adalah pH sebesar 7,8 – 8,3.

### III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Ikan Kerapu

Dalam penelitian yang akan dilakukan ini menggunakan benih ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang berukuran 7 – 8 cm dengan umur D 90 yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Adapun benih ikan kerapu yang digunakan dapat dilihat sebagaimana Gambar pada Lampiran 1.

##### 3.1.2 Pakan

Pakan yang akan diberikan berupa ikan rucah, diantaranya ikan tongkol dan lemuru. Pemberian pakan ini diberikan 2 kali setiap harinya yaitu pada pukul 07.00 WIB dan 16.00 WIB. Sedangkan dosis pakan yang diberikan adalah *ad libitum*.

##### 3.1.3 Media Uji

Media uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut dengan salinitas 33 ppt yang diperoleh diperairan sekitar BBAP Situbondo.

##### 3.1.4 Wadah Uji

Wadah uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak berisi air dengan volume 10 liter sebanyak 10 buah (4 perlakuan dan 2 kontrol dengan 2 kali ulangan), dengan kepadatan 12 ekor setiap bak, sesuai dengan unit percobaan yang terlebih dahulu disucihamakan. Lihat Lampiran 3.

##### 3.1.5 Bahan Immunostimulan Alkaloid

Bahan immunostimulan alkaloid Ubur-ubur sudah didapat dalam bentuk ekstrak dimana ekstrak tersebut berbentuk cair. Bentuk dan cara pembuatan bahan immunostimulan ini dapat dilihat sebagaimana pada Lampiran 2.

### 3.1.6 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Biakan murni bakteri *Vibrio harveyi*
- TCBSA (*Thiosulfate Citrate Billesait Sukrose Agar*)
- NaCl Fisiologis
- NB
- Pewarna gram
- Aquades steril
- Tissue
- Spirtus
- Bahan untuk elektroforesis yang terdiri dari UGB, LGB, *T-acryl*, dd H<sub>2</sub>O, APS (*Ammonium Per Sulfate*) dan Temed (Lihat Lampiran 4).
- Reagen Nessler
- Chlorine
- Alkohol 70%
- Kertas Perkamen
- Kertas

### 3.1.7 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Bak plastik 10 buah
- Aerator
- Petridish
- Erlenmeyer
- Jarum Ose
- Pipet Ukur
- Karet Penghisap
- Micropipet
- Microtip
- Tabung Reaksi
- Autoclave
- pH Meter
- Thermometer
- Oxymeter
- Gelas Ukur
- Timbangan Analitik
- Sentrifuge
- Shaker
- Spektrofotometer
- Electroforesis kit

## **3.2 Metode dan Rancangan Penelitian**

### **3.2.1 Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah suatu bentuk observasi di bawah kondisi buatan, dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur oleh si peneliti. Artinya, pada dasarnya adalah mengadakan percobaan untuk melihat hasil, dan hasil percobaan akan menegaskan bagaimana kedudukan kausal antara variabel – variabel yang diselidiki. Dengan demikian, penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan – perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 1988).

Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu teknik pengambilan data dimana peneliti mengadakan pengamatan secara langsung terhadap gejala – gejala subyek yang diteliti, baik pengamatan yang dilakukan dalam kondisi yang sebenarnya maupun yang dilakukan di dalam kondisi buatan yang khusus diadakan (Surachmad, 1989).

### **3.2.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Menurut Gasperz (1991), beberapa keuntungan dari penggunaan RAL adalah:

1. Denah perancangan percobaan lebih mudah.
2. Analisis statistika terhadap subyek percobaan sangat sederhana.

3. Fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan.
4. Kemungkinan kehilangan informasi data hilang lebih kecil.

Rumus dari model RAL adalah sebagai berikut :

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Dimana:

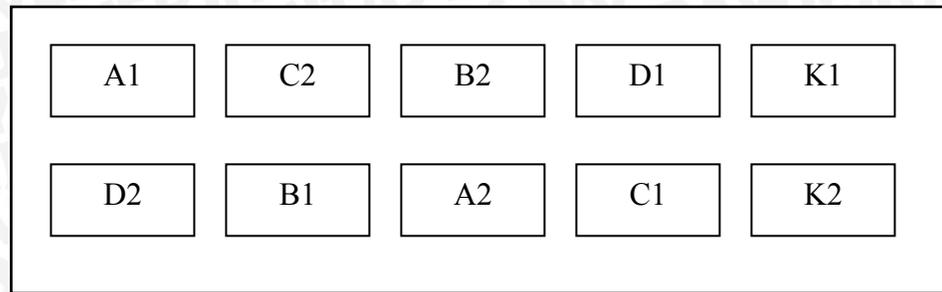
- Y = Nilai pengamatan  
 $\mu$  = Nilai rata-rata harapan  
T = Pengaruh perlakuan  
 $\varepsilon$  = Galat

Perlakuan yang diberikan adalah pemberian dosis immunostimulan yang terdiri dari 5 dosis pemberian yaitu :

- A : 6,4 ppm  
B : 8,4 ppm  
C : 10,4 ppm  
D : 12,4 ppm  
K : 0 ppm

Standard penentuan dosis alkaloid yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada dosis alkaloid yang digunakan dalam penelitian Yanuarius (2005), yakni 6,4 ppm-12,4 ppm, pada dosis 8,4 ppm - 10,4 ppm, pengaruh senyawa aktif ubur-ubur, *Bougainvillia* sp. tersebut belum memberikan nilai yang berbeda sangat nyata atau berbeda nyata terhadap kelulushidupan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*).

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali, sehingga jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 8 dan 2 kontrol diletakkan berdasarkan ulangan. Denah percobaan dapat dilihat pada Gambar 6 berikut :



Gambar 6. Denah penelitian

Keterangan :

- 1 dan 2 : Ulangan  
A, B, C, D : Perlakuan dosis yang berbeda  
K : Kontrol

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Tempat

- Bak plastik volume 10 Liter dicuci hingga bersih, dan setelah itu dilakukan pengeringan bak.
- Bak diisi dengan air laut yang bersih dengan salinitas 33 ppt dengan kepadatan 12 ekor/ 10 liter air laut.
- Bak diberi aerasi dan aliran air di flow trow.

#### 3.3.2 Persiapan Ikan Uji

##### Aklimatisasi benih ikan kerapu macan dalam bak aklimatisasi

- Bak aklimatisasi berkapasitas 50 liter diisi dengan air laut sebanyak 30 liter dengan salinitas 33 ppt (sesuai dengan salinitas asal benih ikan).
- Suhu air dalam bak aklimatisasi kemudian dinaikkan sampai 31°C (sesuai dengan suhu air pengangkutan benih ikan).

- Benih ikan dalam kemasan kantong plastik diapungkan pada bak aklimatisasi selama beberapa menit sampai suhu di dalam kantong plastik dan di bak aklimatisasi sama.
- Benih dilepaskan perlahan-lahan ke dalam bak aklimatisasi.
- Selanjutnya suhu dipertahankan pada kondisi optimum antara 28-32° C.
- Salinitas dipertahankan pada kondisi optimum, antara 28-33 ppt.
- Aklimatisasi dilakukan selama  $\pm$  3 hari setelah itu dilakukan seleksi benih.

### **Seleksi dan sanitasi benih ikan kerapu macan**

Seleksi benih ini bertujuan untuk mendapatkan benih yang sehat dan memiliki ukuran yang homogen, sedangkan sanitasi bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme patogen, terutama bakteri *Vibrio sp.* yang berasal dari panti pembenihan asal benih. Seleksi dan sanitasi benih dilakukan dengan cara-cara sebagai berikut :

- Benih diambil dari bak aklimatisasi dengan menggunakan *scoop net* tetapi masih tetap diletakan di dalam air.
- Benih diukur panjangnya menggunakan penggaris. Benih yang dipakai sebagai sampel adalah benih yang memiliki ukuran panjang berkisar antara 7-8 cm.
- Benih yang telah diukur dipindah ke bak yang telah disediakan untuk diamati kondisinya, mulai dari gerakannya (lincah/aktif, berenang normal dan bergerombol), kondisi kesehatannya (organ tubuh lengkap, tidak cacat, tidak tampak kelainan bentuk) serta respon terhadap pakan yang diberikan sangat responsif.
- Selanjutnya, benih siap dipindahkan ke bak-bak percobaan.
- Semua prosedur dilakukan dengan sangat hati-hati untuk mencegah terjadinya stress yang bisa mengakibatkan kematian.

### **Aklimatisasi benih ikan kerapu macan dalam bak-bak percobaan**

- Benih ikan kerapu macan setelah diseleksi dipindahkan dari bak penampungan ke bak-bak percobaan yang telah disiapkan. Tiap bak berisi 10 liter air laut dan dilengkapi dengan peralatan aerasi.
- Kepadatan benih dalam bak percobaan adalah 12 ekor/bak.
- Benih diberi pakan berupa ikan rucah secara *ad libitum* dengan frekuensi 2 kali sehari.
- Kualitas air pada bak percobaan diupayakan tetap berada pada kondisi optimum (salinitas 28-35 ppt, suhu antara 28-32° C, oksigen terlarut tidak  $\leq 5$  ppm).
- Benih diaklimatisasi di bak-bak percobaan selama satu hari.

#### **3.3.3 Perlakuan Pemeliharaan.**

- Ikan kerapu macan selama pemeliharaan dilakukan penimbangan berat badan dan panjang total dari tubuh ikan kerapu macan setiap minggu, dan setiap pagi dilakukan penyiponan.
- Pengukuran kualitas air (pH, Suhu dan DO) dilakukan untuk setiap harinya.

#### **3.3.4 Sterilisasi Alat dan Bahan**

- Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang.
- Air secukupnya dituang kedalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus kertas pekarmen dimasukkan kedalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.

- Autoclave dinyalakan, setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga monometer menunjukkan angka 1 atm kembali.
- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121 °C dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit.
- Autoclave dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoclave.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.3.5 Pembuatan Media

#### Pembuatan Larutan Nutrient Broth

- Untuk membuat 100 ml larutan *nutrient broth* dibutuhkan 1,3 gram *nutrient broth* kering.
- *Nutrient broth* kering dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan selanjutnya dicampur dengan aquadest.
- Larutan *nutrient broth* dipanaskan di atas hot plate dan diberi stirer sehingga dapat larut homogen. Pemanasan dihentikan jika larutan *nutrient broth* sudah larut sempurna dan berwarna bening.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen kemudian disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121° C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.

- *Nutrient broth* yang akan dipakai didinginkan terlebih dahulu hingga mencapai suhu 30° C. Bakteri akan mati jika diinokulasikan pada *nutrient broth* yang masih panas.
- *Nutrient broth* yang tidak langsung dipakai disimpan dalam lemari es.

### **Pembuatan Media TCBSA**

- Untuk pembuatan media TCBSA pada penelitian ini, maka TCBSA ditimbang sebanyak 8,9 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer volume 250 lalu dicampur dengan aquadest steril sebanyak 100 ml.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen kemudian disterilkan di dalam autoclave pada suhu 121° C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
- Larutan TCBSA dipanaskan di atas hot plate dan diberi stirer agar TCBSA dapat larut homogen. Pemanasan dihentikan jika TCBSA sudah larut sempurna dan berwarna bening. Selanjutnya didiamkan sampai suhunya turun  $\pm 50^{\circ}$  C.
- TCBSA yang masih panas dituang ke dalam Petri disk steril  $\pm 15$  ml per cawan. Penuangan dilakukan di dekat api bunsen, tepi Petri disk dipanaskan lagi setelah penuangan selesai dilakukan.
- Media dapat digunakan setelah 24 jam.
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari es pada suhu 37° C sehingga dapat bertahan lebih lama. Petridish diletakkan terbalik yaitu bagian tutup berada di bawah, dengan maksud untuk menguapkan kadar air yang terkandung dalam media tumbuh sekaligus mencegah tetesan air kondensasi dari tutup jatuh ke media tumbuh.
- Media dari lemari es apabila akan digunakan, terlebih dahulu dimasukkan ke dalam inkubator sehingga suhu media sama dengan suhu lingkungan

### Penanaman bakteri pada media dengan teknik penggoresan agar

- Isolat murni bakteri *Vibrio harveyi* yang berbentuk kering beku diencerkan terlebih dahulu dengan *nutrient broth* untuk mengaktifkan kembali bakteri *Vibrio harveyi*.
- Bakteri *Vibrio harveyii* dalam *nutrient broth* diinkubasi pada suhu 30° C selama minimal 3 jam.
- Jarum ose dipanaskan dengan api bunsen sampai memijar.
- Jarum ose yang sudah dingin disentuhkan pada suspensi isolat murni bakteri *Vibrio harveyi* kemudian digoreskan pada media TCBSA. Jarum ose yang masih panas mematikan bakteri sehingga tidak terjadi pertumbuhan pada bekas goresan.
- Penggoresan hanya dilakukan pada permukaan media TCBSA, karena penggoresan yang terlalu dalam pada media agar dapat mengganggu pertumbuhan bakteri.
- Jarum ose dipijarkan kembali untuk mencegah kontaminasi pada penggoresan di daerah lain. Prosedur penggoresan berikutnya sama dengan prosedur sebelumnya.
- Selama penggoresan, tutup petridish dibuka sedikit mungkin untuk melindungi permukaan agar dari kontaminasi.
- Media yang sudah diinokulasi dengan bakteri diinkubasikan pada suhu 30° C dalam inkubator agar tetap steril. Petridish diletakkan terbalik untuk mencegah air kondensasi jatuh ke atas permukaan agar.

### 3.3.6 Pembuatan Biakan bakteri *V. harveyi* Untuk Penginfeksi

- Biakan bakteri murni *V. harveyi* disiapkan, dan perbanyak dengan cara remajakan kembali pada tabung-tabung reaksi yang berisi NA.
- NB dibuat dan diletakkan dalam tabung erlenmeyer sesuai dengan keperluan.
- Biakan bakteri *V. harveyi* dimasukkan kedalam tabung erlemeyer kurang lebih untuk 4 ml NB diambil biakan bakteri sebanyak 5 ose.
- Bakteri dimasukkan ke inkubator selama 18-24 jam dan ataur pada suhu 37 °C.
- Larutan standart *MC Farland* I; II; dan III dibuat untuk mengetahui kepadatan bakteri *V. harveyi* yang dihasilkan nantinya. Dimana larutan tersebut campuran dari H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 % dengan BaCl<sub>2</sub> 1 %.
- Kepadatan larutan standart Mc Farland tersebut nantinya akan menghasilkan kepadatan bakteri *V. harveyi* untuk I; II; dan III adalah 3 x 10<sup>8</sup>; 6 x 10<sup>8</sup>; dan 9 x 10<sup>8</sup> sel/ ml.
- Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan kerapu macan nantinya menggunakan kepadatan 10<sup>5</sup> sel/ ml. Sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus  $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$ . Perhitungan dosis bakteri yang digunakan untuk penginfeksian dapat dilihat pada Lampiran 5.

### 3.3.7 Sanitasi Air dan Alat-alat Pelaksana Penelitian

- Semua alat-alat pelaksana penelitian direndam dan dicuci dengan menggunakan chlorin 5 ppm dan dibilas dengan menggunakan air tawar sampai bersih dan dikeringkan.

- Air laut ditampung dalam bak berkapasitas 0,5 ton dan kemudian diberi larutan chlorin sebanyak 5 ppm. Setelah itu beri aerasi secara keras dan diamkan selama 3 hari untuk menghilangkan chlorin.

### 3.3.8 Proses Perendaman

Menurut Dalimunthe (2006) penanggulangan penyakit bakterial dapat dilakukan dengan upaya pengobatan baik menggunakan antibiotik maupun kemotrapik melalui beberapa metode diantaranya perendaman, penyuntikan dan penambahan melalui pakan. Untuk metode perendaman, biasa dipilih terutama untuk mengobati ikan-ikan yang terinfeksi dibagian luar tubuh.

Metode perendaman yang dilakukan pada penelitian ini, dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu :

- Perendaman pertama dilakukan pada hari ke-0
- Disiapkan bak sebanyak 10 buah dan diisi dengan air laut sebanyak 15 liter dengan kondisi suhu dan salinitas yang telah disesuaikan.
- Disiapkan alkaloid sesuai dengan dosis pemberian untuk masing-masing bak. Untuk perhitungan dosis dapat dilihat sebagaimana pada Lampiran 6.
- Alkaloid dicampur secara merata dengan air laut. Aerasi dihidupkan dan benih dimasukkan selama  $\pm$  1 jam dengan kepadatan 12 ekor/ bak untuk tiap-tiap bak perendaman.
- Setelah 1 jam, benih diangkat dan dipindahkan kembali ke dalam bak-bak penelitian.
- Benih diamati perkembangannya setiap hari.

- Setelah benih dipelihara selama 7 hari maka pada hari ke-7 dilakukan perendaman kembali dengan metode yang sama.
- Setelah dilakukan perendaman, benih dibiarkan selama 1 hari dan dipelihara seperti biasa.
- Pada hari ke-8 dapat dilakukan ujiantang.

### 3.3.9 Proses Penginfeksian.

- Aquarium yang bersih diisi dengan air laut yang telah dichlorin selama 3 hari sebanyak 50 liter dan beri aerasi.
- Ikan kerapu macan dimasukkan kembali dalam bak aquarium masing-masing perlakuan sebanyak 12 ekor/ bak.
- Ikan kerapu macan dipuasakan selama 1 hari.
- Bakteri yang sudah siap pada media NB dalam tabung erlenmeyer tadi bisa diinfeksi langsung kedalam media hidup ikan kerapu macan, sesuai dengan kepadatan yang diinginkan.
- Proses penginfeksian berlangsung selama 7 hari, setelah itu dilakukan reisolasi.
- Pada saat reisolasi ikan diberi makan pelet kontrol dan aliran air di *flow trow*.

### 3.3.10 Pengambilan Plasma Darah

Ikan kerapu yang telah diinfeksi *V. harveyi* selanjutnya diambil sampel darahnya dengan menggunakan spuit dan dimasukkan pada epen dorf. Kemudian dimasukkan kedalam sentrifuge (Lihat Lampiran 7). Hal ini untuk memisahkan antara sel darah dengan plasmanya.

Thorpe (1984) menyatakan bahwa sentrifugasi adalah salah satu teknik fisika yang mudah dan digunakan untuk memecah partikel-partikel sel dan memisahkannya menjadi bagian-bagian murninya. Dan untuk pemecahan sel darah, sentrifuge biasa digunakan maksimal pada 3000 rpm.

### 3.3.11 Pengamatan Plasma Protein Pada Kerapu

Setelah plasma darah terpisah dari sel darahnya maka plasma darah ini bisa diambil dari sentrifuge menggunakan micropipet, dan dapat langsung dilakukan proses pengamatan. Pengamatan gambaran dan jumlah plasma pada sampel plasma kerapu macan dilakukan dengan 2 cara yaitu elektroforesis dan spektrofotometer.

#### 3.3.11.1 Elektroforesis

Pengamatan plasma darah melalui metode elektroforesis Laemmli (SDS-PAGE) sebagaimana dalam Sumitro *et al.* (1996) dapat dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

##### Persiapan Gel

- *Plate* gel dibuat dengan merangkai 2 *plate* kaca dengan jarak  $\pm 1$  mm (Lihat Lampiran 8).
- Disiapkan bahan-bahan yang diperlukan (Lihat Lampiran 9).
- Gel dibuat 2 lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpul sampel (stacking gel) dan gel sebagai media untuk memisahkan protein (separating gel).
- Campuran separating gel 45  $\mu$ l dimasukkan ke dalam *plate* (tempat lapisan gel).
- Ditunggu 10 menit sampai separating gel terbentuk.
- Setelah membentuk gel, stacking gel dituang di atas separating gel sambil dipasang sisir untuk membuat sumurannya.

- Didiamkan selama 30 menit.
- Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati.
- *Plate* dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan buffer elektroforesis ke dalam *chamber elektroforesis*.

### **Injeksi Sampel**

- *Plate* yang berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber elektroforesis*.
- Ditambahkan *running buffer* hingga *plate* terbenam seutuhnya
- Sebanyak 20  $\mu$ l plasma darah ditambah 20  $\mu$ l Reduksi Sampel Buffer (RSB).
- Di vortex untuk menghomogenkan
- Dipanaskan dengan penangas air suhu 100° C selama 3 menit.
- Setelah dingin, dimasukkan sampel kedalam sumuran elektroforesis.
- Sampel dapat dimasukkan kedalam sumur-sumur gel dengan volume  $\pm$  40  $\mu$ l untuk setiap sumur dengan menggunakan *syringe*.
- *Syringe* dibilas sampai 3 kali dengan aquadest atau dengan *running buffer* sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda sampel yang berbeda pada kolom gel berikutnya.

### **Running sampel**

- Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply*.
- *Running* dilakukan pada *constan current* 20 mA dengan voltase 100 selama selama 2 jam atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0.5 cm dari dasar gel (Lihat Lampiran 10).
- Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*.

### Pewarnaan dan Pencucian

- Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit.
- Selanjutnya penghilangan warna dilakukan dengan merendamkan gel dalam larutan *destaining*.
- Digoyang-goyangkan pada shaker sampai gel jernih (Lihat Lampiran 11).

### Pembuatan kurva standar berat molekul

- Pergerakan masing-masing protein standar diukur dan dihitung nilai  $R_f$  nya.

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tepi awal (a)}}{\text{jarak pergerakan akhir tracking dye (b)}}$$

- Menggambarkan kurva standar berat molekul yang diperoleh dengan mengplotkan nilai  $R_f$  pada sumbu X dan log berat molekul pada sumbu Y
- Menghitung persamaan garis linier  $y = a + bx$

### Pengukuran berat molekul protein sampel

- Jumlah pita protein dihitung dan diamati dengan cermat.
- Masing-masing pita protein dihitung nilai  $R_f$  nya.
- Dari setiap nilai  $R$  yang diperoleh hitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standar molekul.
- Catat hasil yang diperoleh dan masukkan dalam tabel

#### 3.3.11.2 Spektrofotometer

Penentuan kadar protein menggunakan spektrofotometer (Lihat Lampiran 12) dapat dilakukan dengan menggunakan metode buret melalui beberapa tahap diantaranya:

### Pengukuran sampel

- Diambil sampel plasma darah masing-masing 200  $\mu$ l dari setiap sampel.
- Ditambahkan 800  $\mu$ l pereaksi biuret.
- Dikocok dan didiamkan 30 menit pada suhu kamar.
- Diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum 540 nm untuk masing-masing larutan.
- Di dapatkan data absorbansi tiap-tiap sampel.

### Penghitungan kadar protein

- Pembuatan kurva baku bovin plasma protein dengan menggunakan larutan BSA standar.
- Dibuat persamaan regresi dan koefisien korelasi dari hasil pengukuran yang telah dilakukan sehingga kadar proteinnya dapat lebih mudah dianalisa.

## 3.4 Parameter Uji

### 3.4.1 Parameter utama

Parameter utama penelitian ini adalah menghitung besarnya jumlah plasma protein pada darah benih ikan kerapu macan umur D-90 yang terinfeksi *V. Harveyi*. Perhitungan dilakukan berdasarkan hasil dari pengamatan melalui metode elektroforesis dan spektrofotometer.

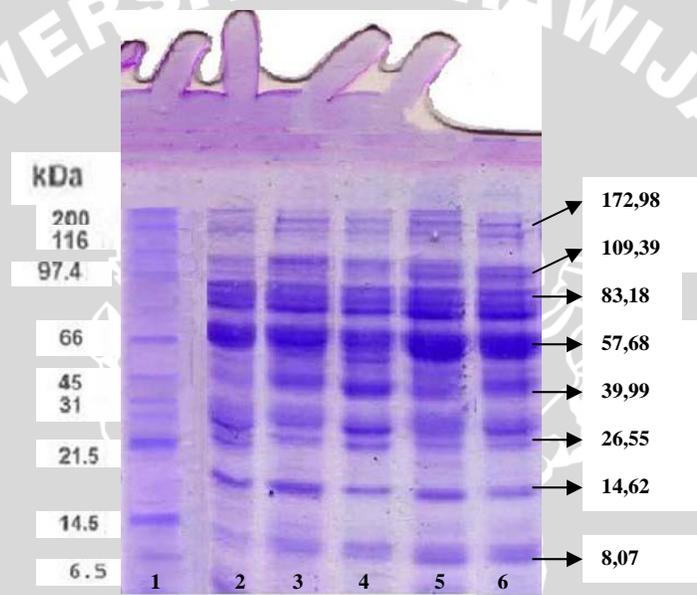
### 3.4.2 Parameter penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah kualitas air dari media pemeliharaan selama masa pemeliharaan, perendaman dan setelah uji tangkap dilakukan. Pengamatan parameter kualitas air selama penelitian ini meliputi : suhu, oksigen terlarut, dan pH.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Perubahan Profil Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa dan Setelah Penginfeksi

Hasil pengujian profil protein dengan menggunakan elektroforesis SDS PAGE, menunjukkan gambaran profil dan jumlah berat molekul dari protein pada tiap-tiap sampel plasma darah ikan kerapu. Profil protein dari sampel plasma darah ikan kerapu tanpa penginfeksi dapat dilihat pada Gambar 7 berikut :



Gambar 7. Elektroforegram Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan Dan Tanpa infeksi

Keterangan :

- Kolom 1 : Marker
- Kolom 2 : Plasma ikan + dosis K
- Kolom 3 : Plasma ikan + dosis A
- Kolom 4 : Plasma ikan + dosis B
- Kolom 5 : Plasma ikan + dosis C
- Kolom 6 : Plasma ikan + dosis D

Keberadaan protein pada tiap kolom dapat dilihat dengan munculnya pita atau band berwarna biru pada gambar di atas. Menurut Sudarmadji (1996), protein akan berwarna biru karena mengikat *coomasie blue*, dan warna biru ini dapat digunakan

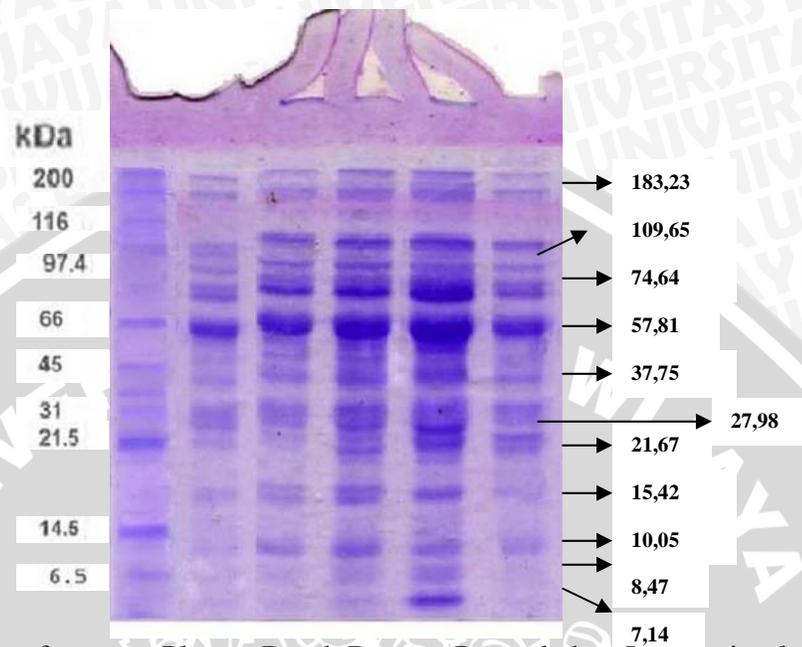
sebagai petunjuk gerakan sampel. Teknik pewarnaan ini biasa disebut juga dengan *staining*. Tebal tipisnya pita-pita protein ini menunjukkan kandungan atau banyaknya protein, tetapi mempunyai berat molekul yang sama pada tiap-tiap kolom secara horizontal.

Pada sampel plasma darah tanpa infeksi, terdapat sejumlah pita protein yang sama yaitu sebanyak 8 pita meskipun dengan dosis yang berbeda, diantaranya yaitu protein 172,98 kDa, protein 109,39 kDa, protein 83,18 kDa, protein 57,68 kDa, protein 39,99 kDa, protein 26,55 kDa, protein 14,62 kDa dan protein 8,07 kDa. Ke-8 protein ini muncul pada semua sampel tanpa infeksi walaupun dengan pemberian dosis imunostimulan yang berbeda begitu pula pada kontrol.

Walaupun sama jumlah proteinnya, tetapi karakteristik pada tiap pita protein yang muncul ini berbeda. Dalam hal ini tebal tipis dari pita. Sebagaimana dapat dilihat pada gambar 7, terlihat bahwa protein 83,18 kDa dan protein 57,68 kDa mempunyai pita yang sangat tebal melebihi pita-pita protein lainnya. Dengan penebalan ini menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai fraksi yang cukup besar melebihi dari protein-protein lainnya dalam setiap sampel plasma darah tersebut.

Menurut Soedarmadji (1996), Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan.

Sedangkan untuk profil protein dari sampel plasma darah ikan kerapu setelah penginfeksi dapat dilihat sebagaimana pada Gambar 8 berikut :



Gambar 8. Elektrofogram Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan dan Penginfeksi

Keterangan :

- Kolom 1 : Marker
- Kolom 2 : Plasma ikan + dosis K
- Kolom 3 : Plasma ikan + dosis A
- Kolom 4 : Plasma ikan + dosis B
- Kolom 5 : Plasma ikan + dosis C
- Kolom 6 : Plasma ikan + dosis D

Setelah dilakukan infeksi, terdapat beberapa perubahan pada pita protein masing-masing sampel dimana ada beberapa protein yang hilang, beberapa protein baru muncul, juga terjadi perubahan tingkat ketebalan masing-masing pita proteinnya. Pita-pita protein ini terlihat lebih tipis dan sedikit pudar daripada sebelum infeksi.

Protein-protein yang muncul pada sampel plasma darah ikan kerapu setelah penginfeksi ini bertambah dari sebelum penginfeksi, yaitu dari 8 pita menjadi 11 pita protein, yaitu protein 183,23 kDa, protein 109,65 kDa, protein 74,64 kDa, protein

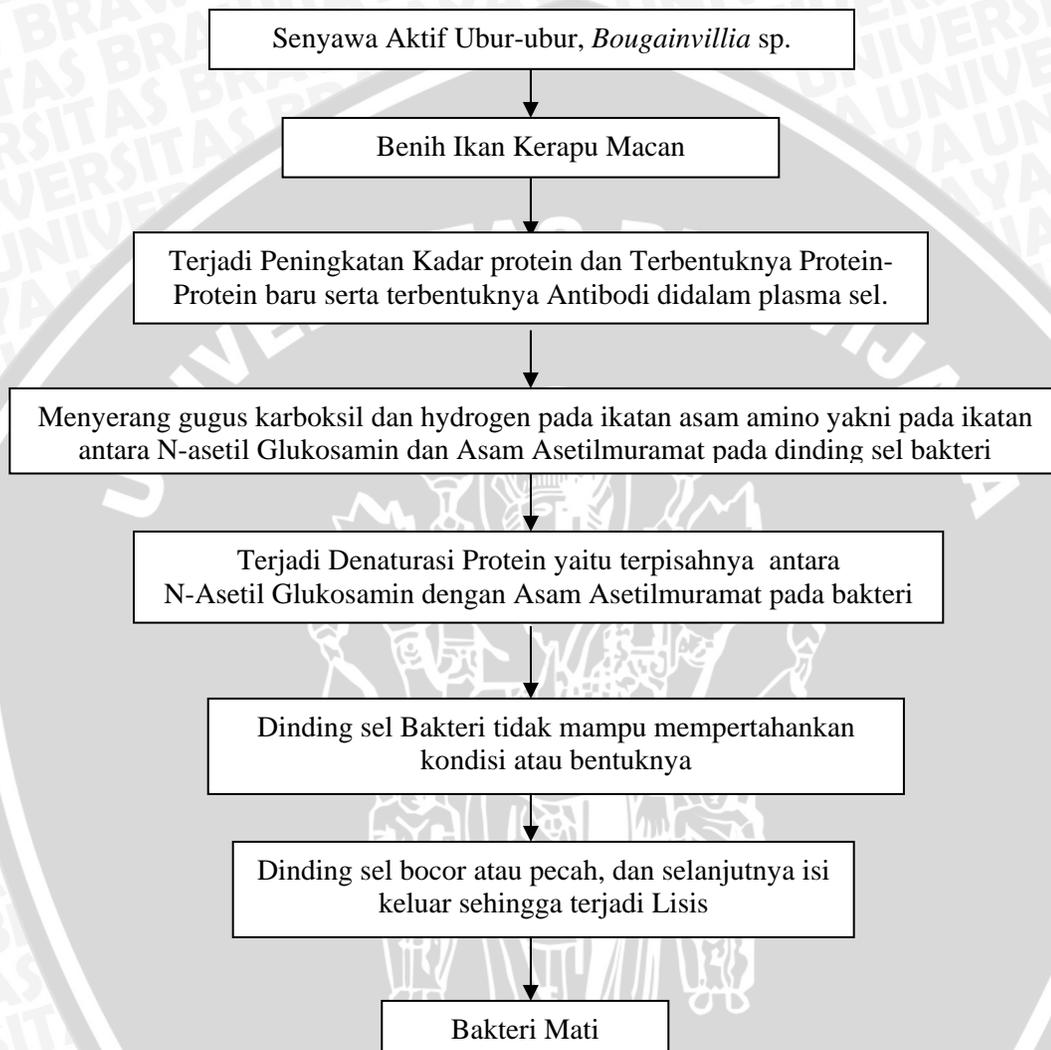
57,81 kDa, protein 37,75 kDa, protein 27,98 kDa, protein 21,67 kDa, protein 15,42 kDa, protein 10,05 kDa, protein 8,47 kDa dan protein 7,14 kDa.

Dari gambar 7 dan 8, apabila dibandingkan dapat terlihat adanya perbedaan pola protein pada masing-masing sampel yang diteliti baik sampel plasma darah ikan tanpa infeksi maupun setelah infeksi. Perbedaan yang terjadi dapat secara nyata terlihat dari tingkat ketebalan maupun jumlah pita-pita protein yang muncul. Sebagaimana pada Tabel Perbandingan Protein Sampel Tanpa dan Setelah Penginfeksi (lihat Lampiran 14), secara umum ada beberapa sampel plasma darah setelah infeksi mengalami perubahan jumlah protein atau dalam hal ini ada beberapa jenis protein yang hilang dan ada juga protein-protein baru yang muncul apabila dibandingkan dengan sebelum infeksi. Disamping itu juga terjadi perubahan gambaran dan ketebalan dari masing-masing fraksi protein.

Diduga adanya perubahan ini disebabkan oleh adanya aktifitas bakteri pasca infeksi dalam tubuh ikan, yang mempengaruhi munculnya protein-protein baru yang tersintesis yang berfungsi untuk membantu sistem kekebalan tubuh ikan dalam menghadapi serangan bakteri tersebut, juga adanya kerusakan pada protein-protein tertentu sehingga protein tersebut sampai hilang.

Menurut Winarno (1991), denaturasi protein adalah proses terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam, dan terbukanya lipatan atau wiru molekul. Dijelaskan pula bahwa, protein yang terdenaturasi akan berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik ke luar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi pada saat larutan protein telah mendekati pH isolistrik, dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap. Selanjutnya, enzim-enzim yang gugus prostetiknya terdiri dari protein akan

kehilangan aktivitasnya sehingga tidak berfungsi lagi sebagai enzim yang aktif. Adapun mekanisme denaturasi protein pada peptidoglikan dinding sel bakteri oleh senyawa aktif ubur-ubur, *Bougainvillia* sp. disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram Mekanisme Perusakan Dinding Sel Bakteri Oleh Alkaloid Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.)

Pada diagram 9 diatas, dijelaskan tentang kemampuan senyawa aktif ubur-ubur untuk melakukan proses denaturasi protein pada peptidoglikan dinding sel bakteri *Vibrio spp* yang terjadi dalam plasma darah ikan. Peristiwa lisisnya bakteri membuktikan bahwa alkaloid sebagai imunostimulan mampu memacu respon tubuh ikan untuk melakukan

interaksi tanggap kebal non spesifiknya sehingga terbentuk tanggap kebal selulernya. Di dalam plasma darah, aktifitas bahan aktif alkaloid ini akan lebih efektif dengan munculnya beberapa zat antibodi yang berjalan bersamaan untuk menghentikan aktifitas bakteri dalam sel darah pada tubuh inang.

Dalam plasma darah terdapat beberapa komponen yang berfungsi dalam sistem kekebalan tubuh. Menurut Anonymous (2006) bahwa plasma sel ( yang sering disebut dengan sel plasma B atau plasmocyte) adalah salah satu sel yang termasuk dalam sistem kekebalan yang mampu mensekresi sejumlah besar antibodi. Antibodi atau immunoglobulin yang terdapat dalam plasma darah adalah protein yang berbentuk Y dan digunakan dalam system kekebalan untuk mengidentifikasi dan menetralkan bahan asing seperti bakteri dan virus.

Sedangkan untuk fraksi protein dari ikan sehat dan ikan sakit, dapat dilihat pada sampel plasma dosis K (0 ppm) pada Gambar 7 untuk ikan sehat dan Gambar 8 untuk ikan sakit . Dari kedua sampel ini dapat dilihat adanya perubahan jumlah, jenis dan ketebalan pita-pita proteinnya. Dari jumlah protein yang muncul terdapat adanya perbedaan jumlah pita protein yaitu sebanyak 8 pita pada ikan sehat, dan kemudian bertambah 1 pita setelah penginfeksi sehingga menjadi 9 pita.

Kesembilan pita protein yang muncul pada plasma ikan sakit, yaitu protein 183,23 kDa, protein 109,65 kDa, protein 74,64 kDa, protein 57,81 kDa, protein 37,75 kDa, protein 27,98 kDa, protein 21,67 kDa, protein 15,42 kDa. Diantara kesembilan protein tersebut terdapat 2 protein baru yang secara nyata terlihat yaitu protein 57,81 kDa dan protein 37,75 kDa. Sedangkan protein yang hilang setelah penginfeksi ini adalah protein 8,07 kDa.

## 4.2 Perubahan Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa dan Setelah Penginfeksi

### 4.2.1 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa Infeksi

Kadar protein pada plasma darah ikan kerapu tanpa penginfeksi yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometer dapat dilihat sebagaimana pada Tabel 1 berikut :

**Tabel 1. Data Kadar Protein Pada Plasma Ikan Tanpa Infeksi**

Perlakuan	Ulangan		Total	Rerata
	1	2		
A (6,4 ppm)	460	445	905	452,5
B (8,4 ppm)	720	740	1460	730
C (10,4 ppm)	760	770	1530	765
D (12,4 ppm)	620	640	1260	630
Total	-	-	5155	2577,5

Untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan dosis bahan aktif alkaloid ubur-ubur maka dilakukan penghitungan analisa sidik ragam. Analisa keragaman dapat dilihat pada Tabel 2. Adapun perhitungan sidik ragamnya dapat dilihat sebagaimana pada Lampiran 16.

**Tabel 2. Sidik Ragam Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Tanpa Infeksi**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	117809,375	39269,792	279,252**	6,59	16,69
2. Acak	4	562,5	140,6			
Total	7	118371,875	-	-	-	-

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan analisis sidik ragam uji F pada Tabel 2 dapat disimpulkan bahwa pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur ternyata memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar protein dari sampel plasma darah ikan kerapu. Selanjutnya dicari dosis terbaik dari dosis tersebut dengan melakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat sebagaimana pada tabel 3 berikut :

**Tabel 3. Uji BNT Sampel Dengan Penambahan Imunostimulan Tanpa Infeksi**

Rata-rata Perlakuan	A (452,5)	D (630)	B (730)	C (765)	Notasi
A (452,5)	-	-	-	-	a
D (630)	177,5**	-	-	-	b
B (730)	277,5**	100**	-	-	c
C (765)	312,5**	135**	35*	-	d

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata, \* = berbeda nyata

Dari hasil uji BNT diatas dapat diketahui bahwa dari keempat perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Oleh karena itu untuk mengetahui hubungan antara dosis imunostimulan ini terhadap kadar protein dalam plasma darah ikan kerapu, maka dilakukan analisa polinomial orthogonal.

Berdasarkan analisa polinomial orthogonal (lihat Lampiran 16) dapat diketahui bahwa perlakuan dosis terbaik untuk ikan tanpa infeksi adalah pada perlakuan dosis C (10,4 ppm) kemudian dosis B (8,4 ppm) lalu dilanjutkan dosis D (12,4 ppm) dan yang terakhir adalah dosis A (6,4 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan C dengan dosis 10,4 ppm mampu untuk meningkatkan kadar protein pada plasma yang tertinggi apabila dibandingkan dengan dosis pemberian bahan aktif alkaloid ubur ubur (*Bougainvillia sp.*) yang lain.

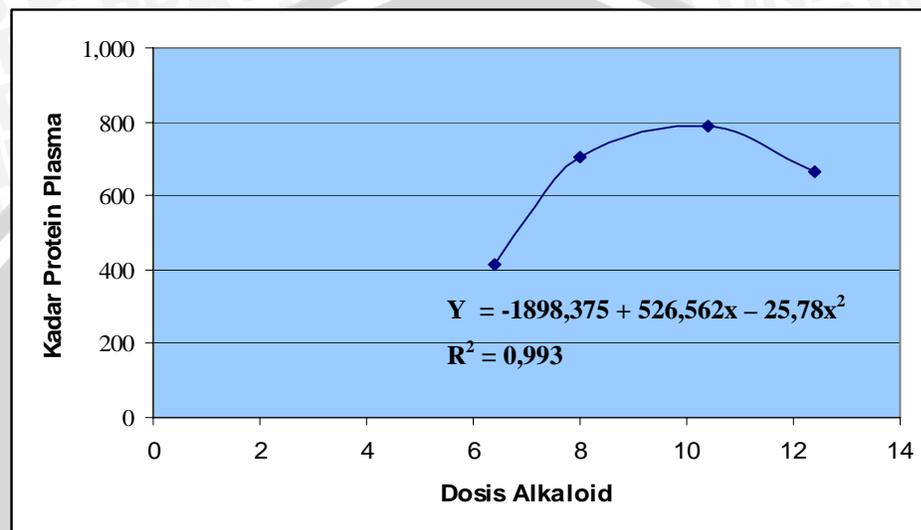
Setelah pengujian BNT diteruskan dengan analisis sidik ragam regresi (lihat Tabel 4), adapun perhitungan regresinya dapat dilihat pada Lampiran 16.

**Tabel 4. Analisa Sidik Ragam Regresi untuk Sampel Plasma Tanpa Infeksi**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	3	117809,375				
- Linear	1	32205,625	32205,625	229,018**	7.71	21.20
- Kuadratik	1	85078,125	85078,125	605**	7.71	21.20
- Kubik	1	525,625	525,625	3,738 <sup>ns</sup>	7.71	21.20
2. Acak	4	562,5	140,625			
Total	7					

Ket : <sup>ns</sup> = tidak berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan analisa sidik ragam regresi didapatkan persamaan kuadratik, yaitu  $Y = 1898,375 + 526,562x - 25,78x^2$  dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,993. Grafik hubungan dosis bahan aktif alkaloid ubur-ubur (*Bougainvillia sp*) terhadap kadar protein plasma dapat dilihat sebagaimana Gambar 10 berikut:



Gambar 10. Grafik Pengaruh Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur Terhadap Berat Molekul Protein Plasma Tanpa Infeksi.

Grafik diatas menjelaskan bahwa pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur memberikan pengaruh terhadap kadar protein plasma. Dengan pemberian bahan aktif yang semakin meningkat maka kadar protein plasmanya juga meningkat sampai pada titik maksimal kemudian kadar protein plasma akan mengalami penurunan. Titik puncak dari grafik diatas adalah pada dosis alkaloid sebesar 10,91 ppm. Sehingga dapat diketahui bahwa dosis 10,91 ppm tersebut merupakan dosis optimal yang dapat diberikan untuk meningkatkan kadar protein pada plasma darah.

Semakin tingginya kadar protein yang diperoleh setelah diberi penambahan imunostimulan alkaloid ubur-ubur, maka dapat diasumsikan bahwa protein dalam plasma darah ikan kerapu tersebut juga semakin tinggi. Sebagaimana menurut

Anonymous (2006) bahwa plasma darah pada dasarnya adalah larutan air yang mengandung 80-90% protein diantaranya albumin, immunoglobulin (antibodi) dan berbagai enzim serta komponen lain seperti bahan pembeku darah, hormon, dan berbagai jenis garam.

Dengan protein yang lebih besar, maka protein ini akan mampu untuk lebih berperan dalam menjalankan berbagai fungsinya didalam tubuh. Salah satu fungsi protein yang sangat penting bagi tubuh organisme adalah fungsinya sebagai salah satu agen kekebalan dalam tubuh. Sebagaimana menurut Leghninger (1982) bahwa diantara beberapa fungsi protein, salah satunya adalah protein pertahanan. Protein ini mempunyai peranan dalam mempertahankan organisme dalam melawan dan melindunginya dari berbagai serangan virus, bakteri ataupun protein asing dari spesies lain. Dalam sistem pertahanan ini, berbagai protein akan tersintesis dan menyusun salah satu jenis antibodi tertentu. Antibodi atau yang lebih dikenal dengan *immunoglobulin* adalah protein yang khusus dibuat oleh limfosit yang dapat mengenali dan mengendapkan atau menetralkan protein asing dari berbagai mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh organisme.

#### 4.2.2 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Kerapu Setelah Penginfeksi

Kadar protein plasma dari masing-masing sampel plasma darah ikan kerapu setelah penginfeksi dapat dilihat sebagaimana Tabel 5 berikut:

**Tabel 5. Data Kadar Protein Plasma Darah Setelah Penginfeksi**

Perlakuan	Ulangan		Total	Rerata
	1	2		
A (6.4 ppm)	300	300	600	300
B (8.4 ppm)	540	500	1040	520
C (10.4 ppm)	600	600	1200	600
D (12.4 ppm)	420	420	840	420
Total	-	-	3680	-

Berdasarkan data kadar protein plasma diatas maka selanjutnya dilakukan penghitungan analisa sidik ragam. Analisa keragamannya dapat dilihat pada Tabel 6. Adapun perhitungan sidik ragamnya dapat dilihat pada Lampiran 16.

**Tabel 6. Tabel Sidik Ragam Protein Pada Plasma Darah Ikan Setelah Infeksi**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	100800	33600	168**	6.59	16.69
2. Acak	4	800	200			
Total	7	101600	-	-	-	-

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

Untuk mengetahui perlakuan dosis terbaik yang dapat diberikan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yaitu BNT 5% dan BNT 1%. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 7 berikut:

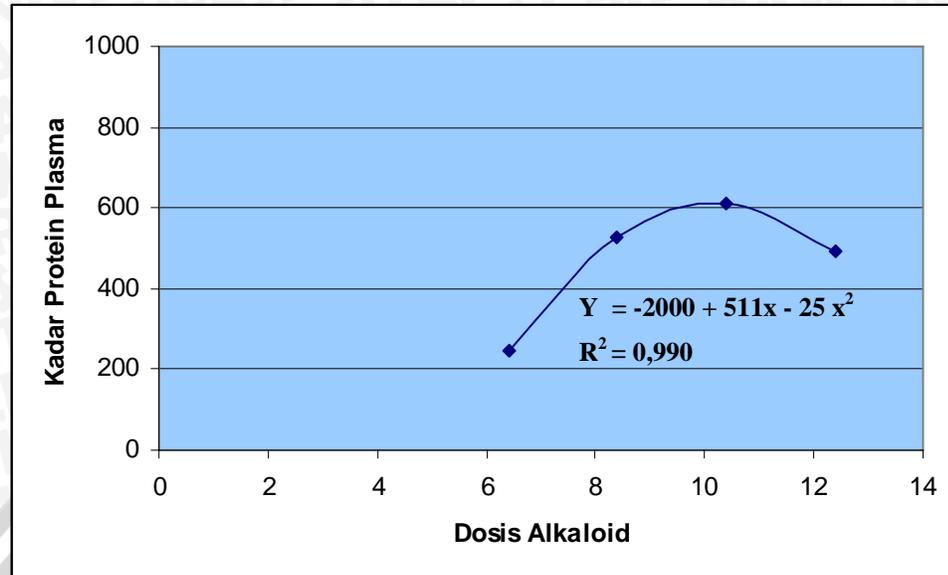
**Tabel 7. Uji BNT Untuk Sampel Plasma Darah Dengan Penambahan Imunostimulan dan Setelah Penginfeksi**

Rata-rata Perlakuan	A (300)	D (420)	B (520)	C (600)	Notasi
A (300)	-	-	-	-	a
D (420)	120**	-	-	-	b
B (520)	220**	100**	-	-	c
C (600)	300**	180**	80**	-	d

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil uji BNT diatas dapat diketahui bahwa semua perlakuan dari keempat perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Oleh karena itu untuk mengetahui hubungan antara dosis imunostimulan ini terhadap kadar protein plasma, maka dilakukan analisa polinomial orthogonal sebagaimana pada lampiran .

Selanjutnya setelah dilakukan analisa regresi, maka didapatkan hubungan kuadratik antara dosis dengan kadar protein plasma yaitu dengan persamaan  $Y = -2000 + 511x - 25x^2$  dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,990.



Gambar 11. Grafik Pengaruh Bahan Aktif Alkaloid Ubur-ubur Terhadap Kadar Protein Plasma Setelah Penginfeksi

Berdasarkan grafik diatas maka dapat diketahui pula bahwa pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur memberikan pengaruh terhadap kadar protein plasma. Dengan pemberian bahan aktif yang semakin meningkat maka kadar protein plasmanya juga meningkat sampai pada titik maksimal kemudian kadar protein plasma akan mengalami penurunan. Urutan perlakuan dosis perendaman terbaik adalah untuk dosis C (10,4 ppm); B (8.4 ppm); D (12.4 ppm) dan yang terakhir adalah perlakuan A (6.4 ppm). Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pemberian immunostimulan alkaloid ubur-ubur yang paling baik adalah pada dosis C (10.4 ppm). Namun dosis optimal yang dapat diberikan adalah sebesar 10,22 ppm.

Peningkatan kadar protein di dalam sampel plasma darah ini nantinya akan berpengaruh untuk memacu kekebalan spesifik dan non spesifik ikan. Adapun peningkatan kadar protein plasma ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Menurut Sakai (1998), menjelaskan bahwa faktor utama yang menentukan tingkat kerja atau

pengaruh suatu senyawa adalah tergantung pada dosis dan kepekatan senyawa itu sendiri. Ellis (1988), mengatakan bahwa pada dosis yang terlalu tinggi efek immunostimulan yang diberikan tidak dapat meningkatkan kekebalan, karena tubuh ikan tidak mampu memberikan respon terhadap mekanisme kerja respon seluler dan humoral, sehingga antibodi tidak terbentuk.

Adanya antigen atau imunogen yang masuk ke dalam tubuh ikan uji, akan merangsang terbentuknya suatu respons imun spesifik. Antigen yang dimaksud pada penelitian ini adalah bahan aktif alkaloid ubur-ubur dan bakteri *Vibrio harveyi*. Dalam hal ini, yang berperan dalam sistem imun adalah sel B, yang pada akhirnya akan berkembang menjadi sel plasma. Menurut Tizard (1988), sel plasma mempunyai sitoplasma yang bersifat sangat basofili dan pironinofili sesuai sebagai sel yang kaya ribosom yang menghasilkan antibodi. Sel plasma mampu membuat sebanyak 300 molekul antibodi setiap detik dan kadang-kadang antibodi tersebut berkumpul di dalam sel sebelum dikeluarkan.

#### 4.2.3 Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Sehat dan Ikan Sakit

Kadar protein dari ikan sehat dan ikan sakit, dapat dilihat pada sampel plasma dosis K (0 ppm) untuk sampel tanpa dan setelah penginfeksi. Kadar Protein yang diperoleh antara ikan sehat dan ikan sakit ini juga menunjukkan adanya penurunan sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 8 berikut :

**Tabel 8. Nilai Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Sehat dan Ikan Sakit**

Perlakuan		Hasil BM (ppm)
Faktor I	Faktor II	
A (tanpa infeksi)	K (0 ppm)	660
	K (0 ppm)	580
B (dengan infeksi)	K (0 ppm)	260
	K (0 ppm)	400

Dari hasil pengujian diatas dapat dilihat bahwa rata-rata nilai berat molekul dari protein plasma pada ikan sehat adalah sebesar 620 ppm, dan rata-rata berat molekul ikan sakit sebesar 330. Dari nilai ini diketahui adanya penurunan jumlah berat molekulnya yaitu dari 620 menjadi 330, atau hampir setengahnya. Dengan adanya penurunan kadar protein plasma ini dapat diasumsikan bahwa setelah terjadinya infeksi oleh *Vibrio* maka sel-sel dalam darah baik itu sel darah maupun plasmanya akan mengalami kerusakan sehingga berat molekul protein plasmanya juga akan semakin menurun.

Sebagaimana menurut Irianto (2005) bahwa pada tingkatan molekuler, suatu bakteri dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel darah, bahkan dapat juga menyebabkan terhentinya sintesa makromolekul sel inang sehingga mencegah sintesa protein dan asam nukleat. Sehingga dapat diduga bahwa dengan adanya kerusakan pada plasma dan terhambatnya sintesis protein didalamnya, maka dapat menurunkan jumlah berat molekul dari plasma protein sampel.

Ditambahkan juga bahwa di dalam plasma darah, terdapat sel-sel plasma yang berperan dalam sintesis antibodi. Apabila terjadi serangan bahan asing, atau dalam hal ini *Vibrio harveyi*, maka sel plasma akan mensintesis antibodi untuk menghadapi serangan tersebut. Antibodi yang terbentuk nantinya akan digunakan pula dalam proses opsonisasi terhadap *Vibrio harveyi* sebelum proses fagositosis oleh makrofag. Semakin banyak antibodi yang digunakan, maka akan berpengaruh terhadap jumlah sel plasma sehingga kadar protein pada plasmanya akan mengalami penurunan pula. Sebagaimana menurut Tizard (1981) bahwa derajat pembersihan senyawa antigen oleh makrofag akan lebih dipercepat dengan adanya antibodi yang ditujukan terhadap bakteri itu dan juga adanya opsonin yang merupakan bahan-bahan yang mampu meningkatkan pelekatan dan penelanan partikel asing.

#### 4.4 Analisa Kualitas Air

Sebagai data penunjang dalam penelitian ini maka perlu juga dilakukan pengamatan dan pengukuran kualitas air. Kualitas air dalam penelitian ini merupakan parameter penunjang. Hasil pengamatan terhadap kualitas air media selama penelitian masih memberikan nilai pada kisaran yang diinginkan oleh benih kerapu macan untuk membentuk pola pertahanan terhadap serangan penyakit, khususnya infeksi oleh bakteri pathogen seperti *Vibrio harveyi*. Dalam hubungannya dengan kelulushidupan dan daya kebal benih kerapu macan yang terinfeksi bakteri, kualitas air media memegang peranan yang sangat penting, karena timbulnya penyakit atau infeksi oleh bakteri salah satunya disebabkan karena kondisi lingkungan perairan yang tidak seimbang dan tidak menyediakan aspek higienis bagi ikan yang dibudidayakan. Parameter kualitas air yang diukur yaitu suhu, pH dan kadar oksigen terlarut.

##### 4.3.1 Suhu

Pada pengukuran suhu didapatkan kisaran antara 27,2 – 29° C. Nilai ini masih masuk ke dalam kisaran suhu optimal untuk pertumbuhan rumput laut. Sebagaimana menurut Sudjiharno dan Tjahjo Winanto (1999), bahwa selama ini pemeliharaan ikan kerapu macan yang menunjukkan perilaku makan dan pertumbuhan yang baik pada kisaran suhu antara 27°C – 29°C. Perubahan suhu yang cukup ekstrim akan berpengaruh terhadap proses metabolisme atau nafsu makan. Ditambahkan oleh Nabib dan Pasaribu (1989), bahwa kondisi suhu yang rendah cenderung memperlambat dan atau meniadakan pembentukan antibodi. Suhu di bawah suhu kritis mengakibatkan reaksi kekebalan tidak dapat berkembang. Pernyataan ini sependapat dengan Ellis (1988) yang mengatakan bahwa, reaksi pembentukan antibodi spesifik akan lebih cepat bila ikan dipelihara pada suhu 28° C dari pada suhu 15° C.

### 4.3.2 Derajat Keasaman

Nilai derajat keasaman pH berkisar antara 6,9 – 8,14. Menurut Kordi (2004), pada pH rendah kandungan oksigen terlarut akan berkurang, sebagai akibatnya konsumsi oksigen menurun, aktivitas pernafasan naik dan selera makan akan berkurang dan sebaiknya ini terjadi pada suasana basa. Atas dasar ini maka usaha budidaya akan berhasil baik dalam air dengan pH 6,5 – 9. Sedangkan selera makan tertinggi didapat pada pH 7,5 – 8,5. Menurut Subyakto dan Cahyaningsih (2003), salah satu parameter kualitas air untuk ikan kerapu adalah pH sebesar 7,8 – 8,3.

pH air media juga mempunyai peranan dalam meningkatkan proses fagositosis.. Menurut Volk and Wheeler (1993), bahwa konsentrasi ion hidrogen larutan sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Hal ini karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif. Dan enzim hanya dapat bekerja secara baik dengan aktivitas yang maksimum bila kondisi pH optimal antara 6 – 8.

### 4.3.3 Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut (DO) pada media pemeliharaan ini berkisar antara 7,5 – 16,8. Menurut Endang dan Suci (1999), bahwa kandungan oksigen terlarut yang baik untuk budidaya ikan kerapu macan adalah lebih dari 5 ppm. Demikian juga menurut Kasprijo, *et al.*, (2004), bahwa ikan yang kekurangan oksigen akan mengalami stres fisik, karena ikan memerlukan konsentrasi oksigen dalam air minimum 5 ppm.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan, diantaranya yaitu :

1. Bahan aktif alkaloid ubur-ubur yang diberikan melalui perendaman dapat digunakan sebagai immunostimulan dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan kerapu macan. Hal ini dapat terlihat pada ikan yang diberi imunostimulan alkaloid, jumlah protein yang muncul dapat lebih banyak dan kadar proteinnya juga tinggi.
2. Dosis terbaik pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur yang dapat jumlah berat molekul plasma darah tanpa infeksi tertinggi adalah pada dosis C (10,4 ppm) dilanjutkan dengan dosis B (8,4 ppm), D (12,4 ppm) dan A (6,4 ppm). Persamaan kuadratik hubungan dosis imunostimulan dengan kadar protein pada plasma benih kerapu macan adalah :  $Y = -1898,375 + 526,562x - 25,78x^2$  , dimana koefisien korelasi (r) sebesar 0,993; dengan  $X_{\text{optimal}} = 10,91$  dan  $Y_{\text{Maksimum}} = 1170,236$
3. Dosis terbaik pemberian bahan aktif alkaloid ubur-ubur yang dapat jumlah berat molekul plasma darah setelah penginfeksi tertinggi adalah pada dosis C (10,4 ppm) dilanjutkan dengan dosis B (8,4 ppm), D (12,4 ppm) dan A (6,4 ppm). Persamaan kuadratik hubungan dosis imunostimulan dengan kadar protein pada plasma benih kerapu macan adalah :  $Y = -2000 + 511x - 25x^2$ , dimana koefisien korelasi (r) sebesar 0,990; dengan  $X_{\text{optimal}} = 10,22$  dan  $Y_{\text{Maksimum}} = 611,21$
4. Nilai kisaran kualitas air media pemeliharaan masih dalam batas kisaran toleransi ikan kerapu macan yaitu: suhu 27,2 – 29° C; DO 7,5 – 16,8 ppm; salinitas 30 –37 ppt dan pH 6,9 – 8,14.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, dapat disarankan:

1. Penggunaan dosis imunostimulan alaloid ubur-ubur *Bougainvillia* sp. melalui perendaman adalah berkisar 10,22 ppm .
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh imunostimulan alkaloid ubur-ubur *Bougainvillia* sp. terhadap berbagai parasit dan penyakit lainnya yang menyerang ikan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Daftar Pustaka

- Afriandini, K., 2004. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.)**. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Afrianto, E. dan Liviawaty. 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 89 hal.
- Al Qodri, 1999. **Pemilihan Lokasi dalam Pembenihan Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Perikanan. Balai Budidaya Laut – Lampung. Lampung.
- Anderson, D., P., 1974. **Fish Immunology**. T.F.H. Publishers Inc Ltd. USA.
- Anonymous.2003. **Petunjuk Praktikum Biokimia Teknik**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- \_\_\_\_\_.2004. **Pembenihan Ikan Kerapu**. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Balai Budidaya Laut Lampung.
- \_\_\_\_\_.2006. **Plasma Darah**. [http://id.www.wikipedia.org/wiki/Plasma\\_Darah](http://id.www.wikipedia.org/wiki/Plasma_Darah). diakses pada 8 September 2006.
- \_\_\_\_\_.2007a. **Plasma Cell**. [http://id.www.mcid.co.uk/20 cell](http://id.www.mcid.co.uk/20_cell). diakses pada 15 Juni 2007
- \_\_\_\_\_.2007b. **Tyrosine**. <http://id.www.wikipedia.org/wiki/Tyrosyne>. diakses pada 25 April 2007
- \_\_\_\_\_.2007c. **Serum Albumin**. [http://id.www.wikipedia.org/wiki/Serum Albumin](http://id.www.wikipedia.org/wiki/Serum_Albumin). diakses pada 25 April 2007
- \_\_\_\_\_.2007d. **Lysozyme**. <http://id.www.wikipedia.org/wiki/Lysozyme>. diakses pada 25 April 2007
- Angka, S.L dan M.T. Suhartono. 2000. **Bioteknologi Hasil Laut**. Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan. IPB. Bogor.
- Arifin, Z. 2003. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Cair Ubur-ubur Hydrozoa dengan Jenis dan dosis yang Berbeda Terhadap Perkembangan Bakteri (*Vibrio harveyi*)**. Skripsi. Fakultas Perikanan universitas Brawijaya. Malang. Tidak dipublikasikan.

- Awiningsih, 2004. **Pengaruh Bahan Aktif Alkaloid Ekstrak Cair Ubur-ubur (*Bougainvillia* sp.) dengan Dosis yang Berbeda Terhadap *Vibrio harveyi* secara In Vitro**. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Barnes, R.D., 1974. **Invertebrata Zoology**. W.B. Saunders Company. Toppan Company, LTD. Piladelpia. London. Toronto.
- Bauman, P.A.L., Furniss and J.V. Lee. 1984. **Facultatively Anaerobic Gram Negative Rods : Genus I Vibrio**. In : Krieg N.R. and Hot J.G (Ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins Baltimore. USA. p. 518-538.
- Bellanti, J., A., 1993. **Imunologi III**. Alih bahasa ; A.S. Wahab. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. 647 hal.
- Boyd, C.E., 1982. **Water Quality Management for Pond Fish Culture in Aquaculture and Fish Science**. Elsevier Scientific Publisher. USA.
- Baratawijaya, Karnen Garna. 2004. **Imunologi Dasar. Edisi Ke 6**. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Brooks, G.F., Janet. S.B., Stephen. A. M. 2001. **Mikrobiologi Kedokteran**. Alih Bahasa Eddy. M dkk. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 527 hal.
- Brown. R. D. 1987. **Introduction to Instrumental Analysis**. Mc Graw Hill Instrumental Edition, Singapura. Page : 839-842
- Dwidjoseputro, D. 1998. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Ellies, A. E. 1988. **General Principle of Fish Vaccination** dalam Fish Vaccination, Academic Press London
- Fadjar, M., S. Andayani, D. Arfiati, dan A. Prajitno. 2003. **Pemanfaatan Ekstrak Kasar Hydrozoa Sebagai Bakterisida Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi***. Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati. Vol. 15. No. 1. 12: 69-71.
- Fessenden, R.J dan J.S. Fessenden. 1997. **Kimia Organik**. Jilid I. Edisi ketiga. Alih bahasa : A.H. Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta. 590 hal.
- Fisher, A.A. 1999. **Dermatitis Caused by Coelentrates**. Aquatic Dermatis. 64 : 84-86.
- Fox, Joe M. 2004. Immune Response of Aquatic Organism. Journals of Mariculture (2004)- 5313. 5 pp
- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknik Perikanan**. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal.

- Gasperz, V. 1991. **Metode Perencanaan Percobaan**. CV Armico. Bandung. 472 hal.
- Guralnik, D. B. 1972. **Webster New World Dictionary Second Edition**. The World Publishing Company. New York.
- Hanafiah, K. A. 1993. **Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi Edisi Revisi**. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Palembang. 12 Hal.
- Harbourne, J. B. 1987. **Metode Fitokimia**. Alih Bahasa : Kosasih, P. dan Iwang, S. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal 234-245.
- Hartono, P., Endang dan Suci. 1999. **Biologi Kerapu Tikus. Pembenihan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Departemen Pertanian. Dirjen Perikanan. Balai Budidaya Laut. Lampung. Hal 2-3.
- Hendayana. 1994. **Kimia Analitik Instrumen**. IKIP Semarang Press. Semarang
- Heramawati. 2005. **Pengaruh Bahan Aktif Dari Ubur-Ubur *Bougainvillia* sp Dengan Dosis Berbeda Untuk Menekan Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Pada Media Hidup Kepiting Bakau (*Scylla* sp)**. Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Hernayanti, A. Irianto, dan E. Herlina., 2004. **Respon Immun Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Terhadap Vaksin "Whole Cell" *Aeromonas hydrophyla* Yang Diberikan Secara Rendaman Dengan Dosis Yang Berbeda**. Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal. 67-72.
- Hickman, C.P. 1970. **Integrated Principle of Zoology**. Fourth Edition. CV Moesby Company. Saint Louis. USA. 928 pp.
- Holt, J.G. 1979. **The Sorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. The William and Wilkins Company Baltimore. USA. 35 hal
- Hopkins. 1995. **Marine Derived Pharmaceutical and Related Bioactive Agents**. Mac Connell. USA.
- Irianto, A. 2005. **Patologi Ikan Teleostei**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 116 Hal
- Johnny, F., Zafran, Des Roza dan Ketut Mahardika. 2003. **Hematologis Beberapa Species Ikan Laut Budidaya**. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol. 9, No. 4, Tahun 2003. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan dan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Kabata, Z. 1985. **Parasiter and Disease of Fish Cultured in Tropics**. Taylor and Franchis Ltd. London. *Dalam* Rochani. 2000. Pemanfaatan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestika*) Bagi Alternatif Pengendalian Penyakit *Aeromonas*

*hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.

Kasprijo, A. Hanafi dan D. Syahidah. 2004. **Pola Pemanfaatan Oksigen Untuk menunjang Kesehatan Pada Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Dan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)**. Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal. 67-70.

Kjadeh, M. 2007. **Plasma Cell**. <http://id.www.statisc.flickr.com>. diakses pada 15 juni 2007

Koesharyani, I dan Zafran. 1997. **Studi Tentang Penyakit Bakterial Pada Ikan Kerapu**. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol III No 4.

Kordi K., M.G.H. 2004. **Usaha Pembesaran Ikan Kerapu di Tambak**. Kanisius. Yogyakarta.

Krzysztof , S. Daniel, K and Tadeusz, S. 1998. The Effect Of Incomplete Colostrum Milking On Its Content And On Tripsin Inhibitor Level. Electronic Journals of Polish Agricultural Universities. Volume 1 Issue 1 Series Animal Husbandary

Makmur, S. 2003. Mengapa Terjadi Keadaan Stress Pada Ikan ? Buletin Penelitian Perikanan. Balai Riset Perikanan Umum. Palembang. Hal. 18-20.

Natzir, M. 1988. **Metodologi Penelitian**. Penerbit Ghalia Indonesia. Jakarta.

Nuchsin, R., Hatmanti, A. 2004. **Beberapa Jenis Bakteri Penghambat Bakteri Patogen *Vibrio harveyi* yang Diperoleh dari Tempat Budidaya Kerapu di Bojonegara. Banten** dalam Seminar Prosiding Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan 18 -19 Mei 2004 di Purwokerto.

Nybakken, J. W. 1988. **Biologi laut : Suatu Pendekatan Ekologis**. Gramedia. Jakarta.

Radiopoetro. 1991. **Zoology**. Erlangga. Jakarta

Randall, J.E. 1987. **A Preliminary Synopsis of The Groupers (Perciformes; Serranidae; Epinephelinae) of The Indo Pacific Region**. J.J Polovina and S. Ralston (editors), Boulder and London: Tropical Snapper ang Groupers: Biology and Fisheries Management. Westview Press Inc.

Robinson, T., 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi**. Penerbit ITB. Bandung.

Roza, D dan Johny, F. 2004. **Peningkatan Kekebalan larva Ikan Kerapu Bebek *Cromileptes altivalis* Dengan menggunakan Immunostimulan Terhadap Infeksi VNN** dalam Seminar Prosiding Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan 18 -19 Mei 2004 di Purwokerto.

- Rukyani, A., Taufik, A dan Taukhid. 1992. **Penyakit Kunang-Kunang di Hatchery Udang Windu dan Cara Penanggulangannya**. Primadona. Bemdel Kedua. Edisi April. Jakarta. 61 hal.
- Sakai, M. 1998. **Current Research Status of Fish Immunostimlants**. J. Aquaculture. 172(1999): 63-92
- Scheuer, P. J. 1978. **Produk Alami Lautan**. Academic Press. Inc. New York.
- Silbernagl, S., Agaemnon Despopoulos, 2000. **Fisiologi ; Atlas Berwarna dan Teks**. Edisi 4. Alih bahasa : Y. Handojo. Penerbit Hipokrates. Jakarta.
- Sudjiharno dan Tjahjo Winanto, 1999. **Pemilihan Lokasi Pembenihan Ikan Kerapu Macan dan Pembenihan Kerapu Macan**. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Perikanan. Balai Budidaya Lampung.
- Stickney, R.R., 1979. **Principles of Warm Water Aquaculture**. Jon and Willey Sons Inc. Canada.
- Subyakto, S dan S. Cahyaningsih. 2005. **Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga**. Agromedia Pustaka. Jakarta. 62 hal.
- Sudarmadji, S.1996. **Teknik Analisa Biokimiawi Edisi Pertama**. Penerbit Liberty. Yogyakarta
- Sumitro, S. B., Fatchiyah, Rahayu, S. Widyarti, S. Arumningtyas, E.L. 1996. **Kursus Teknik-teknik Dasar Analisis Protein dan DNA**. Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Brawijaya. Malang. Hal : 35-48
- Surachmad,M. 1989. **Pengantar Penelitian Ilmiah**. Penerbit Tarsito. Bandung. Hal :167-177
- Susanto, E. 2004. **Karakteristik Fraksi Protein Bakso Babi Dengan Menggunakan SDS PAGE**. Laporan Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. Hal : 13-16
- Tampubolon, G., H., dan E. Mulyadi, 1989. **Synopsis Ikan Kerapu di Perairan Indonesia**. Balitbangkan. Semarang.
- Tizard. 1988. **Pengantar Imunologi Veteriner**. Airlangga University Press. Surabaya. 498 hal
- Volk dan Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar**. Edisi 5. Erlangga. Jakarta. 396 hal.
- Wang, X. H., Leung, K.Y. 2000. **Biochemical Characterization of Different Types of Adherence of Vibrio Species to Fish Epitel Cells**. Microbiology (2000) 146, 989-998. Society for General Microbilology.

- Weber, I.F. De Beaufort, 1931. **Te Fises of Indonesia – Australia Arcipelago**. Leiden.
- Widyarti, S. 2000. **Isolasi Protein dan Elektroforesis untuk Fakultas Kedokteran**. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas brawijaya. Malang
- Wijarni dan D. Arfiati. 1984. **Diktat Avertebrata Air**. Fakultas Perikanan Unibraw. Malang.
- Winarno, F. G. 1991. **Kimia Pangan Dan Gizi**. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Halaman 65-69.
- Yanuar, U. Maftuch. Satuman. Sukoso. Sumarno. 2004. **Karakterisasi Molekul Adhesi Protein Pili Vibrio alginolyticus dan Vibrio parahaemolyticus Pada Sel Epitel Ikan kerapu Tikus Cromileptes altivelis** dalam Seminar Prosiding Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan 18 -19 Mei 2004 di Purwokerto.
- Zubay, G. L. 1989. **Biochemistry 2<sup>nd</sup> Edition**. Mcmillan Publishing Cooperation. New York



LAMPIRAN

Lampiran 1. Gambar Benih Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

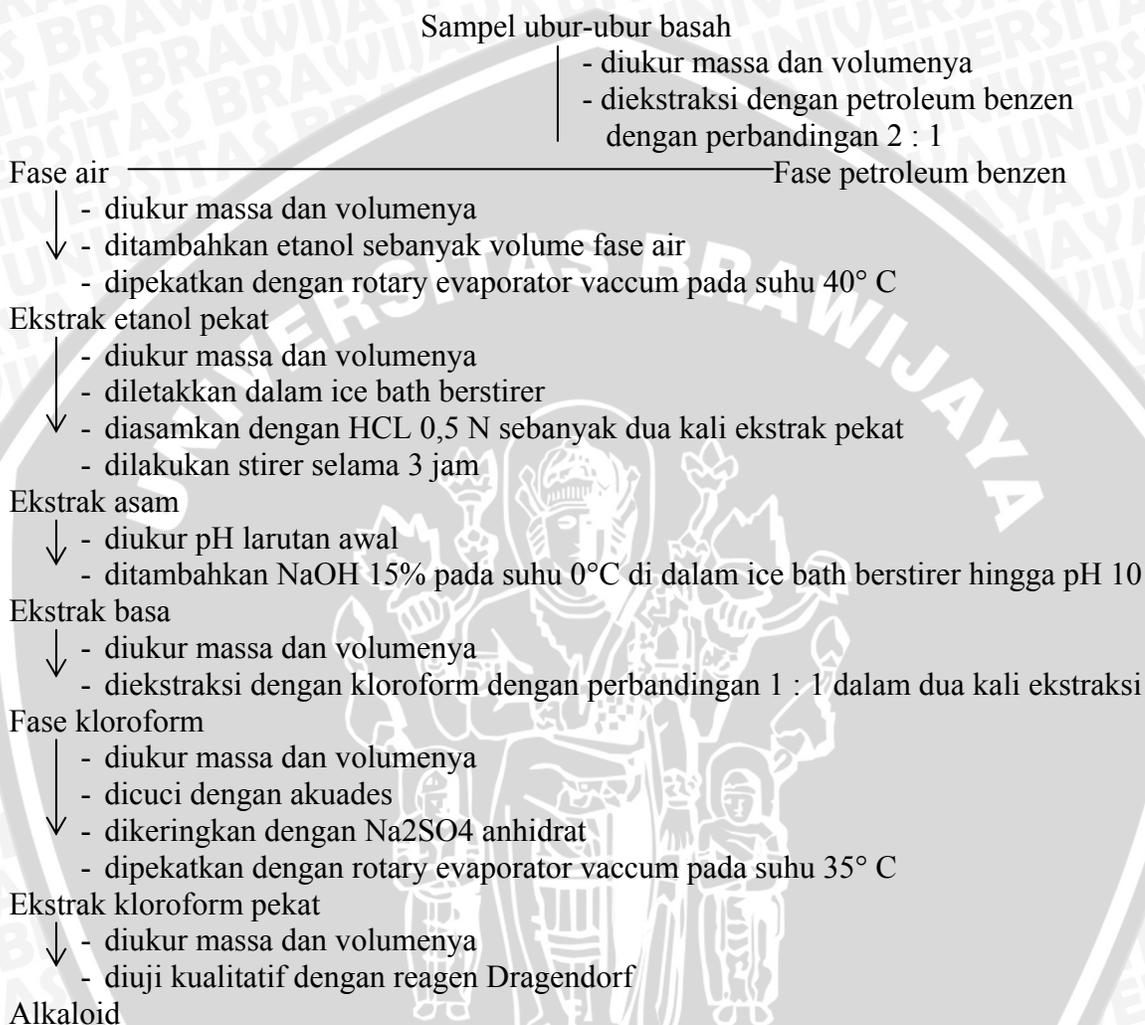


**Lampiran 2. Bentuk dan Cara Pembuatan Bahan Aktif Alkaloid Ubur-Ubur**  
(*Bougainvillia sp.*)



## Lampiran 2. (Lanjutan)

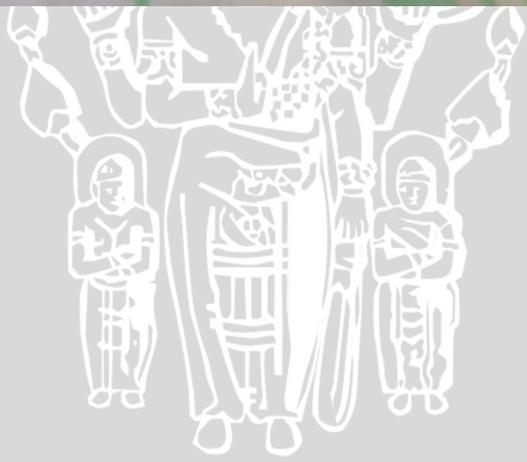
Pembuatan ekstrak bahan aktif alkaloid ubur-ubur *Bougainvillia* sp.(modifikasi Maldoni 1991) dapat dilihat pada skema berikut ini:



Lampiran 3. Gambar Bak Pemeliharaan Ikan Kerapu Macan



### Lampiran 4. Bahan-Bahan Elektroforesis



**Lampiran 5. Penghitungan Konsentrasi Bakteri Untuk Uji Tantang**

Stok Bakteri *Vibrio Harveyii* ( $N_1$ ) =  $9 \times 10^8$

Kepadatan yang diinginkan ( $N_2$ ) =  $0,5 \times 10^5$

Volume air media ( $V_2$ ) = 10 Liter

Penghitungan menggunakan Rumus :

$$N_1 * V_1 = N_2 * V_2$$

Maka volume bakteri yang diberikan pada media adalah :

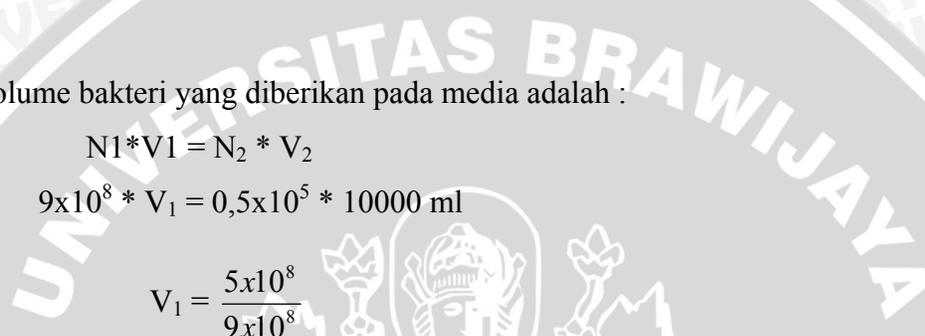
$$N_1 * V_1 = N_2 * V_2$$

$$9 \times 10^8 * V_1 = 0,5 \times 10^5 * 10000 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \times 10^8}{9 \times 10^8}$$

$$= 0,556 \text{ ml / bak}$$

$$= 556 \mu\text{l / bak}$$



## Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Alkaloid Ubur-Ubur, *Bougainvillia* sp. Untuk Perendaman

### a. Perendaman Hari Ke-Nol

Stok alkaloid = 1.250 ppm (mg/l)

Volume air Media = 10 liter

Jumlah Benih = 12 ekor/bak

Pengenceran menggunakan Rumus :

$$N_1 * V_1 = N_2 * V_2$$

1. Dosis 6,4 ppm

$$6,4 \text{ ppm} * 10 \text{ L} = 1.250 \text{ ppm} * (X)$$

$$64 \text{ mg} = 1.250 \text{ ppm} * X \text{ L}$$

$$64 \text{ mg/l} / 1.250 \text{ ppm} = 0,0512 \text{ L}$$

$$= 51,2 \text{ ml}$$

2. Dosis 8,4 ppm

$$8,4 \text{ ppm} * 10 \text{ L} = 1.250 \text{ ppm} * (X)$$

$$84 \text{ mg} = 1.250 \text{ ppm} * X \text{ L}$$

$$84 \text{ mg/l} / 1.250 \text{ ppm} = 0,0672 \text{ L}$$

$$= 67,2 \text{ ml}$$

3. Dosis 10,4 ppm

$$10,4 \text{ ppm} * 10 \text{ L} = 1.250 \text{ ppm} * (X)$$

$$104 \text{ mg} = 1.250 \text{ ppm} * X \text{ L}$$

$$104 \text{ mg/l} / 1.250 \text{ ppm} = 0,0832 \text{ L}$$

$$= 83,2 \text{ ml}$$

4. Dosis 12,4 ppm

$$12,4 \text{ ppm} * 10 \text{ L} = 1.250 \text{ ppm} * (X)$$

$$124 \text{ mg} = 1.250 \text{ ppm} * X \text{ L}$$

$$124 \text{ mg/l} / 1.250 \text{ ppm} = 0,0992 \text{ L}$$

$$= 99,2 \text{ ml}$$

**Lampiran 6. (Lanjutan)**

$$\begin{aligned}\Sigma \text{Kebutuhan Alkaloid (2 x ulangan)} &= 2 \times (51.2 + 67.2 + 83.2 + 99.2) \\ &= 2 \times 300.8 \text{ ml} \\ &= 601,6 \text{ ml}\end{aligned}$$

"Booster" Immunostimulan dilakukan dengan pemberian dosis yang sama dengan dosis perendaman yang pertama. Sehingga jumlah total kebutuhan alkaloid :

$$\begin{aligned}\Sigma \text{Total Kebutuhan Alkaloid} &= 2 \times 601,6 \text{ ml} \\ &= 1203,2 \text{ ml}\end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 7. Sentrifuge dengan Kemampuan Maksimal 10.000 rpm



Lampiran 8. Elektroforesis Plate



## Lampiran 9. Pembuatan Bahan

### Pembuatan gel

1. Separating gel 12% dibuat dengan cara :

- Siapkan tabung polipropilen 50 ml
- Masukkan bahan untuk separating gel yaitu :

Tabel Komposisi Separating Gel 12 % (untuk 1 plate)

No	Bahan	Volume ( $\mu$ l)
1	LGB	1300
2	T-Acryl	2000
3	ddH <sub>2</sub> O	1700
4	APS	70
5	Temed	7

- Aduk larutan hingga tercampur rata
2. Tuang separating gel sebanyak 45 l ke dalam plate yang telah disiapkan dengan menggunakan micropipet (dijaga jangan sampai terbentuk gelombang udara).
  3. Perlahan ditambahkan aquadest diatas larutan gel dalam plate agar permukaan tidak bergelombang.
  4. Gel dibiarkan memadat selama  $\pm$  30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu air yang menutup separating gel dibuang.
  5. Setelah separating gel memadat, stacking gel 3 % disiapkan dengan prosedur yang sama dengan separating gel, dengan komposisi sebagai berikut :

**Lampiran 9. (Lanjutan)**

Tabel Komposisi Stacking Gel 3 % (untuk 1 plate)

No	Bahan	Volume ( $\mu$ l)
1	UGB	415
2	T-Acryl	267
3	ddH <sub>2</sub> O	975
4	APS	20
5	Temed	2

6. Setelah stacking gel dingin maka gel dapat dilalukan dan sampel dapat diinjeksikan.

**Running Sampel Buffer**

1. Dicampurkan bahan Reduksi Sampel Buffer (RSB) dengan komposisi :

Tabel Komposisi Running Buffer

No	Bahan	Volume
1	Tris Hcl pH 6.8	60 ml
2	Glicerol	25%
3	SDS	2%
4	$\beta$ Mercapto Ethanol	14.4 ml
5	Bromophenol Blue	0,1%

**Running buffer pH 8.8**

1. Dicampurkan bahan running buffer dengan komposisi :

Tabel Komposisi Running Buffer

No	Bahan	Jumlah
1	Glycine	192 ml
2	Tris base	25 ml
3	SDS	0,1%

**Pewarnaan Gel**

1. Pembuatan larutan staining dengan komposisi :

Tabel Komposisi Larutan Staining

No	Bahan	Jumlah
1	Coomassie Blue	0,1 g
2	Methanol	45 ml
3	Aquadest	45 ml
4	Asam Acetate Glasial	10 ml

**Lampiran 9. (Lanjutan)**

2. Pembuatan larutan desstaining dengan komposisi :

Tabel Komposisi Larutan Desstaining

No	Bahan	Jumlah
1	Methanol	45 ml
2	Aquadest	45 ml
3	Asam Acetate Glasial	10 ml

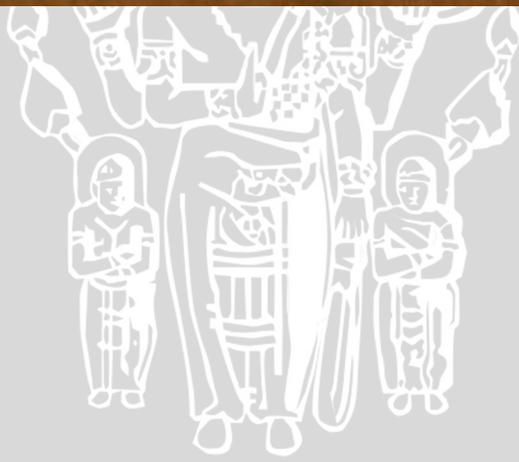
**Pewarna Biuret**

1. Pembuatan larutan biuret dengan komposisi :

Tabel Komposisi Larutan Biuret

No	Bahan	Jumlah
1	CuSO <sub>4</sub>	0,15 g
2	Na Tatrak	0,6 g
3	NaOH 10%	30 ml
4	Aquadet	100 ml
5	Reagen Biuret	-

Lampiran 10. Proses Elektroforesis SDS PAGE



### Lampiran 11. Shaker Staining dan Destaining Sampel Plasma



Lampiran 12. Gambar Spektrofotometer



**Lampiran 13. Data Hasil Uji Elektroforesis**

**A. Sampel Plasma Darah Tanpa Infeksi**

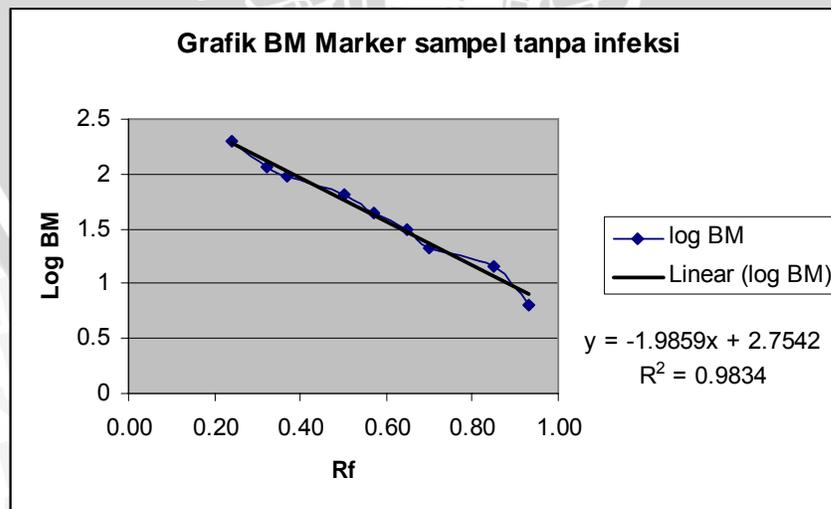
Tabel Marker Pita Protein Pada Sampel Plasma Tanpa Infeksi

Marker	a	b	Rf	BM	log BM
	2,4	10	0,24	200	2,3
	3,2	10	0,32	116	2,06
	3,7	10	0,37	97,4	1,98
	5	10	0,50	66	1,82
	5,7	10	0,57	45	1,65
	6,5	10	0,65	31	1,49
	7	10	0,70	21,5	1,33
	8,5	10	0,85	14,5	1,16
	9,3	10	0,93	6,5	0,81

Tabel Logaritmik Nilai Rf

Rf	log BM
0,24	2,3
0,32	2,06
0,37	1,98
0,50	1,82
0,57	1,65
0,65	1,49
0,70	1,33
0,85	1,16
0,93	0,81

Kurva Berat Molekul Sampel Tanpa Infeksi



**Lampiran 13 (Lanjutan)**

Tabel Protein Hasil Perhitungan Rf

Sampel A	a	b	Rf	log BM	BM
	2,6	10	0,26	2,238	172,98
	3,6	10	0,36	2,039	109,39
	4,2	10	0,42	1,920	83,18
	5	10	0,50	1,761	57,68
	5,8	10	0,58	1,602	39,99
	6,7	10	0,67	1,424	26,55
	8	10	0,80	1,165	14,62
	9,3	10	0,93	0,907	8,07

**B. Sampel plasma darah setelah infeksi**

Tabel Marker Pita Protein Pada Sampel Plasma Tanpa Infeksi

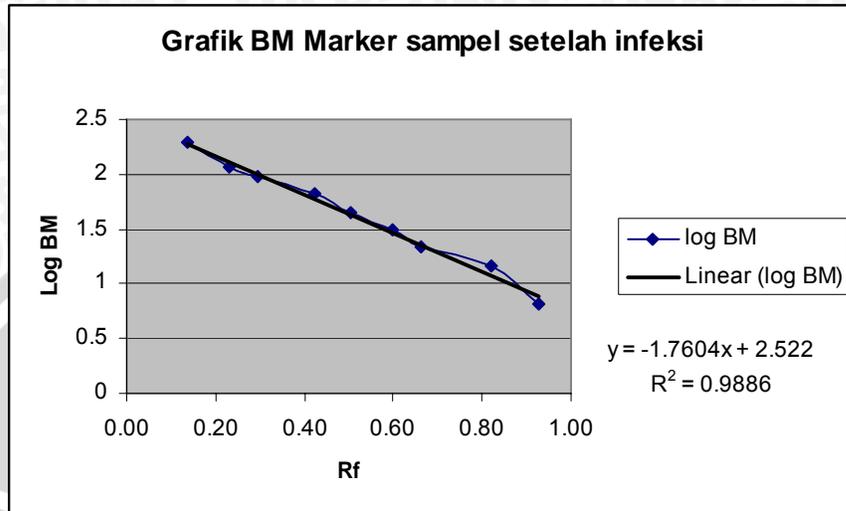
Marker B	a	b	Rf	BM	log BM
	1,3	9,5	0,14	200	2,3
	2,2	9,5	0,23	116	2,06
	2,8	9,5	0,29	97,4	1,98
	4	9,5	0,42	66	1,82
	4,8	9,5	0,51	45	1,65
	5,7	9,5	0,60	31	1,49
	6,3	9,5	0,66	21,5	1,33
	7,8	9,5	0,82	14,5	1,16
	8,8	9,5	0,93	6,5	0,81

Tabel Logaritmik Nilai Rf

Rf	log BM
0,14	2,3
0,23	2,06
0,29	1,98
0,42	1,82
0,51	1,65
0,60	1,49
0,66	1,33
0,82	1,16
0,93	0,81

**Lampiran 13 (Lanjutan)**

Kurva Berat Molekul Sampel Setelah Infeksi



Tabel Protein Hasil Perhitungan Rf

Sampel B	a	b	Rf	log BM	BM
	1,4	9,5	0,15	2,263	183,23
	2,6	9,5	0,27	2,040	109,65
	3,5	9,5	0,37	1,873	74,64
	4,1	9,5	0,43	1,762	57,81
	5,1	9,5	0,54	1,577	37,75
	5,8	9,5	0,61	1,447	27,98
	6,4	9,5	0,67	1,336	21,67
	7,2	9,5	0,76	1,188	15,42
	8,2	9,5	0,86	1,002	10,05
	8,6	9,5	0,91	0,928	8,47
	9	9,5	0,95	0,854	7,14

**Lampiran 14. Tabel Perbandingan Protein Sampel Tanpa dan Setelah Penginfeksi**

Tabel Data Protein Pada Sampel Plasma Darah Ikan Kerapu Tanpa Penginfeksi

Protein	Perlakuan				
	K	A	B	C	D
172.98	✓	✓	✓	✓	✓
109.39	✓	✓	✓	✓	✓
83.18	✓	✓	✓	✓	✓
57.68	✓	✓	✓	✓	✓
39.99	-	✓	✓	✓	✓
26.55	✓	✓	✓	✓	✓
14.62	✓	✓	✓	✓	✓
8.07	✓	✓	✓	✓	✓

Tabel Data Protein Pada Sampel Plasma Darah Ikan Kerapu Setelah Penginfeksi

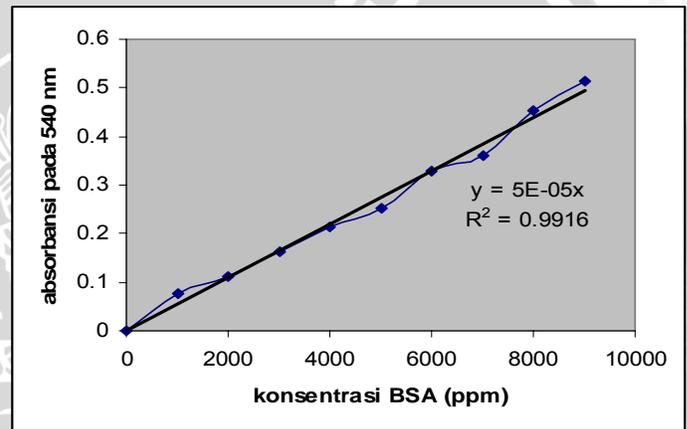
Protein	Perlakuan				
	K	A	B	C	D
183.23	✓	✓	✓	✓	✓
109.65	✓	✓	✓	✓	✓
74.64	✓	✓	✓	✓	✓
57.81	✓	✓	✓	✓	✓
37.75	✓	✓	✓	✓	✓
27.98	✓	✓	✓	✓	✓
21.67	✓	✓	✓	✓	✓
15.42	✓	✓	✓	✓	✓
10.05	-	✓	✓	✓	✓
8.47	-	-	-	✓	-
7.14	-	-	-	✓	-

**Lampiran 15. Data Hasil Uji Spektrofotometer**

Tabel Nilai Absorbansi Standar BSA

BSA (ppm)	Absorbansi (540 nm)
0	0
1000	0,078
2000	0,112
3000	0,164
4000	0,215
5000	0,253
6000	0,328
7000	0,362
8000	0,454
9000	0,513

Grafik Nilai Absorbansi Sampel



Tabel BM Sampel

sampel	abs	X (ppm)
AA1	0,023	460
AA2	0,031	445
AB1	0,025	720
AB2	0,037	740
AC1	0,038	760
AC2	0,031	770
AD1	0,036	620
AD2	0,039	640
AK1	0,033	660
AK2	0,029	580
BA1	0,045	300
BA2	0,03	300
BB1	0,027	540
BB2	0,03	500
BC1	0,036	600
BC2	0,022	600
BD1	0,026	420
BD2	0,012	420
BK1	0,013	260
BK2	0,02	400

**Lampiran 16. Perhitungan Hasil Uji Spektofotometer**

**A. Sampel Dengan Penambahan Immunostimulan Dan Tanpa Infeksi**

Perlakuan	Ulangan		Total	Rerata
	1	2		
A (6,4 ppm)	460	445	905	452,5
B (8,4 ppm)	720	740	1460	730
C (10,4 ppm)	760	770	1530	765
D (12,4 ppm)	620	640	1260	630
Total	-	-	5155	2577,5

**Perhitungan :**

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$= \frac{(5155)^2}{2 \times 4}$$

$$= 3321753,125$$

$$\text{JK Total} = A_1^2 + A_2^2 + \dots + D_2^2 - \text{FK}$$

$$= (460)^2 + (445)^2 + \dots + (640)^2 - 3321753,125$$

$$= 211600 + 198025 + \dots + 409600 - 3321753,125$$

$$= 6879125 - 3321753,125$$

$$= 118371,875$$

$$\text{JK Perlakuan} = \frac{(905)^2 + (1460)^2 + (1530)^2 + (1260)^2}{\text{ulangan}} - \text{FK}$$

$$= \frac{6879125}{2} - 3321753,125$$

$$= 3439562,5 - 3321753,125$$

$$= 117809,375$$

$$\text{JK Acak} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 118371,875 - 117809,375$$

$$= 562,5$$

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Tabel 2 Arah untuk Perhitungan JK

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan	3	117809,375	39269,792	279,252	6,59	16,69
2. Acak	4	562,5	140,6			
Total	7	118371,875	-	-	-	-

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil analisis ragam diatas ( $F \text{ Hitung} > F \text{ 1\%}$ ) maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (\*\*), sehingga dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

## Hasil uji BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT acak}}{\text{ulangan}}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 140,6}{2}} \\ &= \sqrt{140,6} \\ &= 11,859 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ 5\% (db 4) x SED} \\ &= 2,776 \times 11,859 \\ &= 32,919 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t \text{ 1\% (db 4) x SED} \\ &= 4,604 \times 11,859 \\ &= 54,597 \end{aligned}$$

Tabel BNT Untuk Sampel Dengan Penambahan Imunostimulan dan Tanpa Infeksi

Rata-rata Perlakuan	A (452,5)	D (630)	B (730)	C (765)	Notasi
A (452,5)	-	-	-	-	a
D (630)	177,5**	-	-	-	b
B (730)	277,5**	100**	-	-	c
C (765)	312,5**	135**	35*	-	d

Ket : \* = berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Hubungan fungsional antara peragam (variabel ) bebas x dan peragam tidak bebas y secara polinomial dinyatakan :

$$Y = \alpha + \beta_1 + \beta_2 + \dots + \beta_n \cdot X^n$$

Dimana :  $\alpha$  = Interaksi

$\beta = (I = 1, 2, 3, \dots, n) =$  koefisien regresi parsial yang berasosiasi dengan derajat polinomial ke-I

x = perlakuan

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan(Ci)		
		linier	kuadratik	kubik
A	905	-3	+1	-1
B	1460	-1	-1	+3
C	1530	+1	-1	-3
D	1260	+3	+1	+1
Q = $\sum (Ci.Ti)$		1135	-825	145
Kr = $(\sum Ci^2)r$		40	8	40
Jk Regresi = $Q^2 / Kr$		32205,625	85078,125	525,625

Tabel Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	3	117809,375				
- Linear	1	32205,625	32205,625	229,018**	7.71	21.20
- Kuadratik	1	85078,125	85078,125	605**	7.71	21.20
- Kubik	1	525,625	525,625	3,738 <sup>ns</sup>	7.71	21.20
2. Acak	4	562,5	140,625			
Total	7					

Ket : <sup>ns</sup> = tidak berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{85078,125}{562,5 + 85078,125} = 0,993$$

$$R \text{ Kuadratik} = \sqrt{0,993} = 0,997$$

$R^2$  Kuadratik menunjukkan sangat berbeda nyata yang lebih besar daripada linear, maka persamaan kuadrat yang akan digunakan untuk mencari hubungan antara perlakuan dengan dosis alkaloid terbaik.

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Persamaan Kuadratik

$$Y = b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot U_j^2$$

Rata-Rata Perlakuan

$$\bar{x} = \frac{6,4 + 8,4 + 10,4 + 12,4}{4} = 9,4$$

$$U_j = \frac{x - \bar{x}}{d} = \frac{x - 9,4}{2}$$

- Dimana :
- x = 6,4 maka U<sub>j</sub> = -1,5
  - x = 8,4 maka U<sub>j</sub> = -0,5
  - x = 10,4 maka U<sub>j</sub> = 0,5
  - x = 12,5 maka U<sub>j</sub> = 1,5

Perlakuan	A	B	C	D	Total
X <sub>j</sub>	6,4	8,4	10,4	12,4	-
U <sub>j</sub>	-1,5	-0,5	0,5	1,5	0
U <sub>j</sub> <sup>2</sup>	2,25	0,25	0,25	2,25	5
U <sub>j</sub> <sup>4</sup>	5,0625	0,0625	0,0625	5,0625	10,25
Y <sub>ij</sub>	905	1460	1530	1260	5155
U <sub>j</sub> ·Y <sub>ij</sub>	-1357,5	-730	2295	630	837,5
U <sub>j</sub> <sup>2</sup> ·Y <sub>ij</sub>	2036,25	365	382,5	2835	5618,75

Untuk mencari persamaan kuadratik maka :

Mencari nilai b<sub>1</sub>

$$\begin{aligned} \sum U_j \cdot Y_{ij} &= b_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\ 837,5 &= b_1 \cdot 2 \cdot 5 \\ b_1 &= 83,75 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1. \sum Y_{ij} &= b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\ 5155 &= b_0 \cdot 8 + b_2 \cdot 2 \cdot 5 \\ 5155 &= 8b_0 + 10b_2 \dots \dots \dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \sum U_j^2 \cdot Y_{ij} &= b_0 \cdot r \cdot \sum U_j^2 + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4 \\ 5618,75 &= b_0 \cdot 2 \cdot 5 + b_2 \cdot 2 \cdot 10,25 \\ 5618,75 &= 10b_0 + 20,5b_2 \dots \dots \dots (2) \end{aligned}$$

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Persamaan (1) dan (2)

$$5155 = 8b_0 + 10b_2 \quad \times 5$$

$$\underline{5618,75 = 10b_0 + 20,5b_2} \quad \times 4$$

$$25775 = 40b_0 + 50b_2$$

$$\underline{22475 = 40b_0 + 82b_2} \quad -$$

$$3300 = -32b_2$$

$$b_2 = -103,125$$

Dari persamaan (1)

$$5155 = 8b_0 + 10b_2$$

$$5155 = 8b_0 + 10(-103,125)$$

$$5155 = 8b_0 - 1031,25$$

$$8b_0 = 6186,25$$

$$B_0 = 773,28$$

Kemudian nilai  $b_0$ ,  $b_1$  dan  $b_2$  disubstitusikan kedalam persamaan kuadratik yaitu :

$$Y = b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot U_j^2$$

$$= 773,28 + 83,75 \left( \frac{x-9,4}{2} \right) - 103,125 \left( \frac{x-9,4}{2} \right)^2$$

$$= 773,28 + 41,875x - 393,625 - 103,125 \left( \frac{x^2 - 18,8x + 88,36}{4} \right)$$

$$= 41,875x + 379,655 - 25,78x^2 + 484,687x - 2278,03$$

$$= -1898,375 + 526,562x - 25,78x^2$$

Jadi persamaan kuadratiknya yaitu :

$$Y = -1898,375 + 526,562x - 25,78x^2$$

Untuk :  $x = 6,4 \dots \dots \dots 415,443$

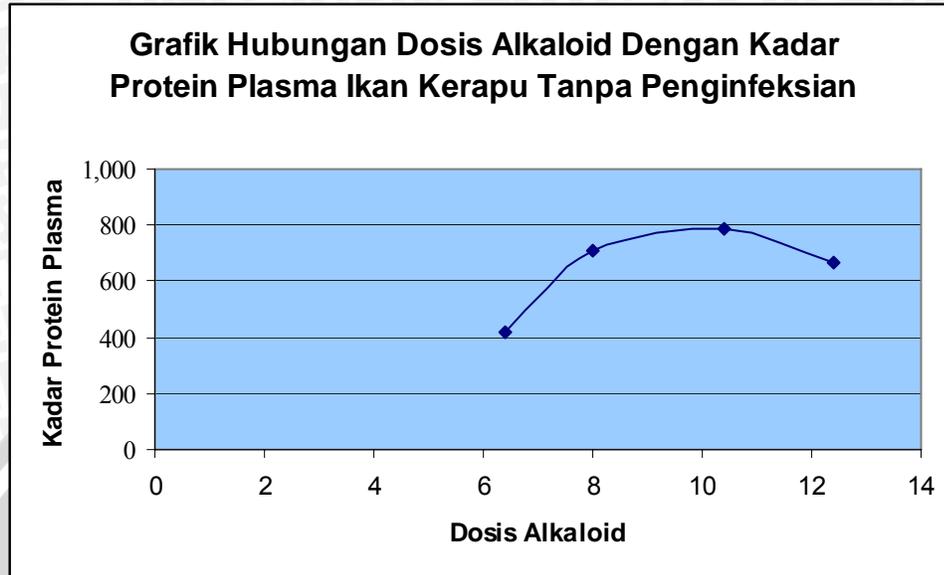
$x = 8,4 \dots \dots \dots 705,709$

$x = 10,4 \dots \dots \dots 789,505$

$x = 12,4 \dots \dots \dots 666,614$



## Lampiran 16. (Lanjutan)



Untuk mencari titik puncak ( $X_{opt}$  dan  $Y_{max}$ ) maka dicari turunan dari persamaan, yakni :

$$Y' = 526,562 - 51,56x$$

Untuk  $X = 0 \dots \dots Y = 526,526$

$$Y = 0 \dots \dots X = 10,91$$

Nilai X disubstitusikan ke persamaan :

$$Y = -1898,375 + 526,562x - 25,78x^2$$

$$Y = -1898,375 + 526,562(10,91) - 25,78(10,91)^2$$

$$Y = 1170,236$$

Maka dosis alkaloid yang paling baik untuk mencapai hasil yang maksimal untuk sampel tanpa infeksi adalah pada dosis 10,91 ppm.

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

**B. Sampel Dengan Penambahan Imunostimulan dan Setelah Penginfeksi**

Perlakuan	Ulangan		Total	Rerata
	1	2		
A (6,4 ppm)	300	300	600	300
B (8,4 ppm)	540	500	1040	520
C (10,4 ppm)	600	600	1200	600
D (12,4 ppm)	420	420	840	420
Total	-	-	3680	-

**Perhitungan :**

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= \frac{(\sum x)^2}{n} \\ &= \frac{(3680)^2}{2 \times 4} \\ &= 1692800 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= A1^2 + A2^2 + \dots + D2^2 - \text{FK} \\ &= (300)^2 + (300)^2 + \dots + (420)^2 - 1692800 \\ &= 90000 + 90000 + \dots + 176400 - 1692800 \\ &= 1793600 - 1692800 \\ &= 101600 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \frac{(600)^2 + (1040)^2 + (1200)^2 + (1260)^2}{\text{ulangan}} - \text{FK} \\ &= \frac{3587200}{2} - 1692800 \\ &= 1793600 - 1692800 \\ &= 100800 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 101600 - 100800 \\ &= 800 \end{aligned}$$

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Tabel 2 Arah untuk Perhitungan JK

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan	3	100800	33600	168**	6.59	16.69
2. Acak	4	800	200			
Total	7	101600	-	-	-	-

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil analisis ragam diatas ( $F \text{ Hitung} > F \text{ 1\%}$ ) maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (\*\*), sehingga dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

## Hasil uji BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT acak}}{\text{ulangan}}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 200}{2}} \\ &= \sqrt{200} \\ &= 14,142 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ 5\% (db 4) x SED} \\ &= 2,776 \times 14,142 \\ &= 39,529 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t \text{ 1\% (db 4) x SED} \\ &= 4,604 \times 14,142 \\ &= 65,110 \end{aligned}$$

Tabel BNT Untuk Sampel Dengan Penambahan Imunostimulan dan Setelah Penginfeksi

Rata-rata Perlakuan	A (300)	D (420)	B (520)	C (600)	Notasi
A (300)	-	-	-	-	a
D (420)	120**	-	-	-	b
B (520)	220**	100**	-	-	c
C (600)	300**	180**	80**	-	d

Ket : \*\* = berbeda sangat nyata

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Hubungan fungsional antara peragam (variabel ) bebas x dan peragam tidak bebas y secara polinomial dinyatakan :

$$Y = \alpha + \beta_1 + \beta_2 + \dots + \beta_n \cdot X^n$$

Dimana :  $\alpha$  = Interaksi

$\beta = (I = 1, 2, 3, \dots, n) =$  koefisien regresi parsial yang berasosiasi dengan derajat polinomial ke-I

x = perlakuan

Tabel Analisa Regresi

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan(Ci)		
		linier	kuadratik	kubik
A	600	-3	+1	-1
B	1040	-1	-1	+3
C	1200	+1	-1	-3
D	840	+3	+1	+1
Q = $\sum (Ci.Ti)$		880	-800	-240
Kr = $(\sum Ci^2)r$		40	8	40
Jk Regresi = $Q^2 / Kr$		19360	80000	1440

Tabel Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	3	100800				
- Linear	1	19360	19360	96.8**	7,71	21,20
- Kuadratik	1	80000	80000	400**	7,71	21,20
- Kubik	1	1440	1440	7,2 <sup>ns</sup>	7,71	21,20
2. Acak	4	800	200			
Total	7					

Ket : <sup>ns</sup> = tidak berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{80000}{800 + 80000} = 0,990$$

$$R \text{ Kuadratik} = \sqrt{0,990} = 0,995$$

$R^2$  Kuadratik menunjukkan sangat berbeda nyata, maka persamaan kuadratik yang akan digunakan untuk mencari hubungan antara perlakuan dengan dosis alkaloid terbaik.

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Persamaan Kuadratik

$$Y = b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot U_j^2$$

Rata-Rata Perlakuan

$$\bar{x} = \frac{6,4 + 8,4 + 10,4 + 12,4}{4} = 9,4$$

$$U_j = \frac{x - \bar{x}}{d} = \frac{x - 9,4}{2}$$

- Dimana :
- x = 6,4 maka U<sub>j</sub> = -1,5
  - x = 8,4 maka U<sub>j</sub> = -0,5
  - x = 10,4 maka U<sub>j</sub> = 0,5
  - x = 12,5 maka U<sub>j</sub> = 1,5

Perlakuan	A	B	C	D	Total
X <sub>j</sub>	6,4	8,4	10,4	12,4	-
U <sub>j</sub>	-1,5	-0,5	0,5	1,5	0
U <sub>j</sub> <sup>2</sup>	2,25	0,25	0,25	2,25	5
U <sub>j</sub> <sup>4</sup>	5,0625	0,0625	0,0625	5,0625	10,25
Y <sub>ij</sub>	600	1040	1200	840	3680
U <sub>j</sub> ·Y <sub>ij</sub>	-900	-520	1800	420	800
U <sub>j</sub> <sup>2</sup> ·Y <sub>ij</sub>	1350	260	300	1890	3800

Untuk mencari persamaan kuadratik maka :

Mencari nilai b<sub>1</sub>

$$\begin{aligned} \sum U_j \cdot Y_{ij} &= b_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\ 800 &= b_1 \cdot 2 \cdot 5 \\ b_1 &= 80 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1. \sum Y_{ij} &= b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\ 3680 &= b_0 \cdot 8 + b_2 \cdot 2 \cdot 5 \\ 3680 &= 8b_0 + 10b_2 \dots \dots \dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \sum U_j^2 \cdot Y_{ij} &= b_0 \cdot r \cdot \sum U_j^2 + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4 \\ 3800 &= b_0 \cdot 2 \cdot 5 + b_2 \cdot 2 \cdot 10,25 \\ 3800 &= 10b_0 + 20,5b_2 \dots \dots \dots (2) \end{aligned}$$

**Lampiran 16. (Lanjutan)**

Persamaan (1) dan (2)

$$3680 = 8b_0 + 10b_2 \quad \times 5$$

$$\underline{3800 = 10b_0 + 20.5b_2} \quad \times 4$$

$$18400 = 40b_0 + 50b_2$$

$$\underline{15200 = 40b_0 + 82b_2} \quad -$$

$$3200 = -32b_2$$

$$b_2 = -100$$

Dari persamaan (1)

$$3680 = 8b_0 + 10b_2$$

$$3680 = 8b_0 + 10(-100)$$

$$3680 = 8b_0 - 1000$$

$$8b_0 = 4680$$

$$B_0 = 585$$

Kemudian nilai b, b dan b disubstitusikan kedalam persamaan kuadratik yaitu :

$$\begin{aligned} Y &= b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot U_j^2 \\ &= 585 + 80 \left( \frac{x-9,4}{2} \right) - 100 \left( \frac{x-9,4}{2} \right)^2 \\ &= 585 + 40x - 376 - 100 \left( \frac{x^2 - 18,8x + 88,36}{4} \right) \\ &= 41x + 209 - 25x^2 + 470x - 2209 \\ &= -2000 + 511x - 25x^2 \end{aligned}$$

Jadi persamaan kuadratiknya yaitu :

$$Y = -2000 + 511x - 25x^2$$

Untuk :  $x = 6,4 \dots \dots \dots 246,4$

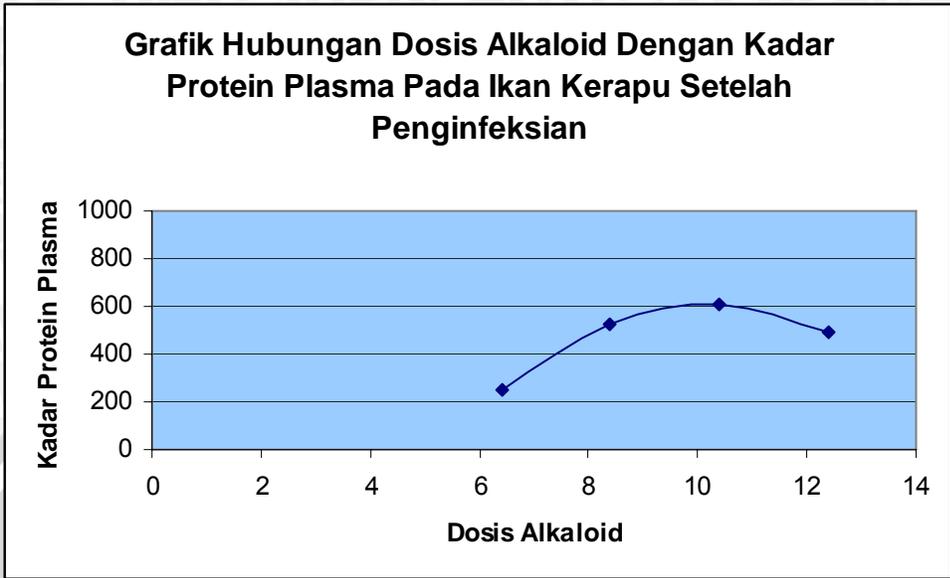
$x = 8,4 \dots \dots \dots 528,4$

$x = 10,4 \dots \dots \dots 610,4$

$x = 12,4 \dots \dots \dots 492,4$



Lampiran 16. (Lanjutan)



Untuk mencari titik puncak ( $X_{opt}$  dan  $Y_{max}$ ) maka dicari turunan dari persamaan, yakni :

$$Y' = 511 - 50x$$

Untuk  $X = 0 \dots \dots Y = 511$

$$Y = 0 \dots \dots X = 10,22$$

Nilai X disubstitusikan ke persamaan :

$$Y = -2000 + 511x - 25x^2$$

$$Y = -2000 + 511(10,22) - 25(10,22)^2$$

$$Y = 611,21$$

Maka dosis alkaloid yang paling baik untuk mencapai hasil yang maksimal untuk sampel dengan penginfeksi adalah pada dosis 10,22 ppm.