

**PENGARUH EKSTRAK KASAR KAYU PULAI BATU (*Alstonia acuminata*)
SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG PADA
IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*) YANG TERINFEKSI
BAKTERI *Vibrio harveyi***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :
WARTINI
NIM. 0810853004



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

**PENGARUH EKSTRAK KASAR KAYU PULAI BATU (*Alstonia acuminata*)
SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG PADA
IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*) YANG TERINFEKSI
BAKTERI *Vibrio harveyi***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

**Oleh :
WARTINI
NIM. 0810853004**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK KASAR KAYU PULAI BATU (*Alstonia acuminata*)
SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG PADA
IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*) YANG TERINFEKSI
BAKTERI *Vibrio harveyi***

Oleh :

WARTINI

NIM. 0810853004

telah dipertahankan di depan penguji pada
tanggal 28 Desember 2012 dan dinyatakan
telah memenuhi syarat

Menyetujui,

DosenPenguji I

DosenPembimbing I

(Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D)
NIP. 19460320 197303 1 001

(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)
NIP. 1961106 198602 2 001

Tanggal:

Tanggal:

DosenPenguji II

DosenPembimbing II

(Dr. Ir. Maftuch, MS)
NIP. 19660825 199203 1 001

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)
NIP. 19630924 19803 2 002

Tanggal:

Tanggal:

Mengetahui,
KetuaJurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001

RINGKASAN

Wartini. Pengaruh Ekstrak Kasar Kayu Pulai Batu (*Alstonia acuminata*) Sebagai Imunostimulan terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang terinfeksi Bakteri *Vibrio harveyi*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Ir. EllanaSanoesi, MP**

Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) merupakan salah satu jenis ikan laut yang mempunyai nilai ekonomi tinggi, karena sangat disukai di dalam maupun di luar negeri seperti negara-negara Asean, Hongkong, Cina, dan Jepang. Budidaya ikan ini sangat potensial akan tetapi masih terkendala dengan rentannya penyakit terutama oleh bakteri dan pertumbuhannya relatif agak lambat. Tingkat penyerangan bakteri *Vibrio harveyi* pada pembenihan ikan kerapu macan dapat dihitung dalam beberapa jam. Penyerangan bakteri jenis *Vibrio* ini dapat mengakibatkan hancurnya organ dalam benih ikan, dan adanya luka pada bagian kulit. Kulit kayu pulai batu *Alstonia acuminata* banyak mengandung alkaloid dan biasa digunakan untuk berbagai keperluan pengobatan sebagai imunostimulan. Sel yang berperan dalam respon imun alamiah terdiri dari sel fagosit (makrofag dan neutrofil) dan sel NK (*natural killer*).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar kayu pulai batu (*A. acuminata*) sebagai imunostimulan terhadap jumlah makrofag pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Dilaksanakan di Unit Pengelola Budidaya Laut (UPBL) Probolinggo JawaTimur, pada tanggal 1 Desember 2011– 7 Maret 2012.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan metode eksperimen dan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah pemanfaatan ekstrak kasar kayu pulai batu *A.acuminata* dengan dosis 0 ppm sebagai kontrol (K), 50 ppm (A), 100 ppm (B), 150 ppm (C) dan 200 (D) ppm. Parameter utama yang diamati adalah jumlah sel makrofag serta parameter penunjang yaitu kualitas air meliputi; suhu, salinitas, oksigen terlarut (DO) dan derajat keasaman (pH).

Hasil penelitian memberikan pengaruh berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar kayu pulai batu pada perlakuan B (100 ppm) merupakan dosis terbaik dan efisien sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan jumlah makrofag ikan kerapu macan. Dibandingkan dengan pada perlakuan D (200 ppm) yang merupakan nilai tertinggi, akan tetapi pada dosis 200 ppm kurang optimal sebagai imunostimulan. Ditunjang dengan nilai kualitas air sebagai media pemeliharaan selama penelitian yang masih berada pada kisaran toleransi ikan kerapu macan *E.fuscoguttatus*, yaitu: suhu 27 – 30 °C, salinitas 30 ppt, pH 7,21 – 8,4 dan DO 5-6 ppm.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT karena atas rahmad, taufiq dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul : Pengaruh Ekstrak Kasar Kayu Pulai Batu (*Alstonia acuminata*) sebagai Immunostimulan terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio harveyi*. Skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana S1 Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Atas terselesaikannya laporan ini, maka penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing 2 yang dengan setia membimbing serta mengarahkan jalannya penelitian hingga terselesaikannya laporan ini.
- Bapak Prof. Dr. Marsoedi, Ph.D dan Bapak Dr. Ir. Maftuch, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan pengalaman dan bimbingan dalam ujian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan ini. Namun demikian, berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang berminat dan memerlukannya.

Malang, Desember 2012

Penulis

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Desember 2012

Mahasiswa

Wartini



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Puji syukur yang sebesar-besarnya kepada Allah SWT.
- Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing.
- Bapak Prof. Dr. Marsoedi, Ph.D dan Bapak Dr. Ir. Maftuch, MS selaku dosen penguji
- Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan kepada Ibunda dan Ayahanda tercinta, atas dorongan yang kuat, kebijaksanaan dan do'a.
- Suamiku tercinta (Oky Suprpto) yang selalu memberikan semangat dan motivasi.
- Bu Jen yang telah banyak memberikan bantuan, bimbingan dan semangat.
- Teman-teman BJT (Bajak Tambak) tercinta terimakasih atas persaudaraannya selama ini, akan selalu kurindu selamanya.
- Teman-teman Kertosentono No. 129 yang selalu menemani dan memberi dukungan.

Malang, 28 Desember 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	5
1.6 Tempat dan Waktu	5
 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kayu Pulai Batu (<i>Alstonia acuminata</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Biologi <i>Alstonia acuminata</i>	6
2.1.2 Pemanfaatan Pule Batu (<i>Alstonia acuminata</i>) dan Khasiat Sebagai Bahan Obat.....	7
2.1.3 Senyawa Aktif dan Genus <i>Alstonia</i>	8
2.2 Ikan Kerapu Macan (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>).....	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	10
2.2.2 Habitat.....	11
2.2.3 Penyakit	12
2.3 <i>Vibrio harveyi</i>	13
2.3.1 Klasifikasi	13
2.3.2 Morfologi	13
2.4 Imunostimulan.....	17
2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik	20
2.6 Makrofag	22
2.7 Peran Makrofag.....	23
 3. MATERI DAN METODOLOGI	
3.1 Materi Penelitian.....	25
3.1.1 Alat-alat Penelitian	25
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian	25
3.2 Metode Penelitian.....	26
3.3 Rancangan Percobaan.....	26
3.4 Prosedur Penelitian	28
3.4.1 Persiapan Penelitian	28
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian	30
3.5 Parameter Uji	33

3.5.1 Parameter Utama	33
3.5.3 Parameter Penunjang	33
3.6 Analisa Data.....	33
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Jumlah Sel Makrofag.....	34
4.2 Kelulushidupan / <i>Survival Rate</i> (SR).....	39
4.3 Kualitas Air.....	41
 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
 DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	51



DAFTAR TABEL

Halaman

1. Fungsi Struktur Permukaan Sel Bakteri.....	16
2. Metode Pemberian Imunostimulan pada Beberapa Organisme.....	19
3. Komponen Sistem Imun Nonspesifik.....	21
4. Jumlah Rata-rata Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Penelitian.....	34
5. Jumlah Rata-rata Sel Makrofag (10^6 sel/ml) dari Dua Kali Ulangan selama Penelitian.....	35
6. Analisa Sidik Ragam Jumlah Sel Makrofag Selama Penelitian.....	35
7. Uji BNJ Jumlah Makrofag Selama Penelitian.....	36
8. Analisa Regresi Jumlah Makrofag (10^7 sel/ml) Ikan Kerapu Macan dengan Pemberian Ekstrak Kayu Pulai Batu Dengan Dosis Yang Berbeda pada Hari ke-1 dan ke-8.....	37
9. Data Kelulushidupan Ikan Kerapu Macan Selama Penelitian.....	40
10. Sidik Ragam Tingkat Kelulushidupan Ikan Kerapu Macan.....	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Kayu Pulau Batu (<i>Alstonia acuminata</i>)	6
2. Ikan Kerapu Macan (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>)	10
3. Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	13
4. Sel Makrofag.....	22
5. Rancangan Denah Penelitian	27
6. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kayu Pulau Batu terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Kerapu Macan pada Hari ke-1.....	37
7. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kayu Pulau Batu terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Kerapu Macan pada Hari ke-8.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Alat dan Bahan.....	51
2. Perhitungan Jumlah Makrofag pada Ikan Kerapu Macan (<i>E.fuscoguttatus</i>) selama Penelitian.....	54
3. Data <i>Survival Rate</i> (SR) Selama Penelitian.....	63

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan kerapu merupakan andalan Indonesia sebagai komoditas ekspor dari sektor perikanan. Karena itu tidak heran kalau budidaya ikan kerapu berkembang dengan pesatnya di berbagai wilayah perairan laut Indonesia. Perkembangan budidaya ikan kerapu ternyata tidak selalu berjalan mulus sesuai yang diinginkan. Salah satu permasalahan yang dihadapi adalah seringnya terjadi kematian yang disebabkan oleh berbagai faktor, antara lain serangan penyakit. Dari pengalaman selama ini penyakit pada kerapu ternyata bukan disebabkan oleh satu jenis patogen tetapi oleh lebih dari satu patogen. Berdasarkan kenyataan tersebut maka perlu upaya peningkatan kekebalan non-spesifik dari ikan yang dibudidayakan dalam mengatasi permasalahan penyakit (Zafran, 2008).

Ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) merupakan salah satu jenis ikan laut yang mempunyai nilai ekonomi tinggi, karena sangat disukai di dalam maupun di luar negeri seperti negara-negara Asean, Hongkong, Cina, dan Jepang. Budidaya ikan ini sangat potensial akan tetapi masih terkendala dengan rentannya penyakit terutama oleh bakteri dan pertumbuhannya relatif agak lambat (Suryadi *et al.*, 2004)

Gangguan utama pada komoditi budidaya ikan kerapu ini adalah serangan bakteri oleh kelompok vibriosis dan juga virus. Salah satu bakteri patogen yang ditemukan pada infeksi ikan kerapu adalah *V. harveyi* seperti dikatakan oleh Jun *et al.*, (2003), bahwa *Vibrio* merupakan patogen oportunistik yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat yang saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan. Bakteri *Vibrio* ini juga dapat hidup di bagian

tubuh organisme lain baik di luar tubuh dengan jalan menempel, maupun pada organ tubuh bagian dalam seperti hati, usus dan sebagainya (Feliatra, 1999).

Buller (2004) juga menyebutkan bahwa *V. harveyi* menyebabkan kematian pada ikan hiu dan abalone dan menyebabkan *necrotizing enteritis* pada ikan flounder, *gastroenteritis* pada ikan kerapu, *systemic disease*, *ulcerative disease*, *necrosis* serta *vibriosis*. Tanda terjangkitnya bakteri ini pada inang adalah terjadinya *white spot* pada kaki abalon dan menyebabkan hilangnya kemampuan lekat kaki. Juga menyebabkan necrotic, red anus, penyakit pada ginjal ikan, luka pada mata, black spot pada exoskeleton, dan hepatopancreas.

Berbagai usaha telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit oleh bakteri ini yaitu menggunakan obat-obatan antibiotik. Akan tetapi pemakaian antibiotik ini tidak efektif lagi karena dapat membawa dampak negatif terhadap daya tahan dan pertumbuhan ikan (Kordi, 2004).

Kayu pulai batu (*A. acuminata*) atau (*A. spectabilis*) adalah jenis tanaman herbal yang dikenal sebagai tanaman darat yang telah lama digunakan masyarakat sebagai obat tradisional. Secara tradisional, kulitnya dimanfaatkan untuk penyakit liver, malaria, asma dan sakit perut.

Senyawa alkaloid ditemukan pada seluruh bagian tumbuhan pule batu, baik pada daun, akar, maupun kulit. Alkaloid banyak disimpan tumbuhan pada jaringan-jaringan yang penting untuk pertahanan diri dan reproduksi, termasuk jaringan muda yang aktif melakukan pertumbuhan, akar, kulit batang, bunga, semai dan jaringan yang aktif dalam proses fotosintesis (Van Wyk and Wink, 2004). Salah satu karakteristik kandungan alkaloid pada suatu jenis tumbuhan adalah adanya rasa pahit (Levetin dan McMahon, 2003), juga dikemukakan Praptiwi (2004) bahwa rasa pahit pada tumbuhan sebenarnya juga merupakan

indikasi adanya kandungan alkaloid. Selain itu salah satu sifat kimia alkaloid yang penting adalah kebiasaannya (Robinson, 1995).

Makrofag sendiri merupakan sel efektor utama terhadap organisme ini (Pudjonarko *et al.*, 2004). Karakteristik bakteri intraseluler fakultatif adalah kemampuannya untuk bertahan dan melakukan replikasi dalam sel fagosit. Respon imun yang utama adalah imunitas yang diperantarai sel (*cell mediated immunity*) dan eliminasinya memerlukan mekanisme imunitas seluler. Dua efektor imunitas yang diperantarai sel adalah makrofag teraktivasi dan CTLs. *Listeria monocytogenes* menghasilkan protein hemolisin yang menyebabkan bakteri dapat keluar dari fagolisosom menuju sitoplasma. Dalam sitoplasma bakteri terhindar dari mekanisme mikrobisidal makrofag sehingga CTLs CD8 akan teraktivasi. CTLs memproduksi IFN- γ yang dapat membunuh makrofag yang mengandung bakteri dalam sitoplasmanya (Abbas *et al.*, 2000).

Penelitian mengenai penggunaan tanaman darat dari genus *Alstonia* untuk jenis *A. scholaris* telah banyak dilakukan, namun untuk jenis *A. acuminata* masih jarang diteliti, lebih khusus lagi aplikasi ke ikan sebagai immunostimulan belum dilakukan, untuk itu perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai manfaat *A. acuminata* sebagai immunostimulan terhadap benih ikan kerapu macan.

1.2 Rumusan Masalah

Usaha pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan kerapu selama ini masih tertumpu pada penggunaan bahan kimia dan obat-obatan antibiotik. Penggunaan obat-obatan atau antibiotik mempunyai beberapa keuntungan bila tepat diagnosis dan dosisnya mudah didapat dan efeknya lebih cepat teramati, namun demikian penggunaan obat-obatan atau antibiotik secara terus-menerus akan menimbulkan masalah, yaitu timbulnya resistensi, adanya residu pada tubuh ikan, dan mencemari lingkungan yang akhirnya mematikan

organisme bukan sasaran. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah ini dilakukan dengan memanfaatkan senyawa bioaktif dari tanaman darat sebagai imunostimulan.

Imunostimulan merupakan zat kimia, obat-obatan, stressor atau aksi yang meningkatkan respon imun non spesifik dengan berinteraksi secara langsung dengan sel dari sistem yang mengaktifkan respon imun bawaan tersebut. Hal penting dalam penggunaan imunostimulan adalah bahwa zat-zat imunostimulator meningkatkan resistensi terhadap infeksi penyakit, bukan dengan respon imun didapat (*acquired immune respon*), tetapi dengan meningkatkan respon imun non spesifik lebih baik melalui mekanisme pertahanan humoral dibanding selular (Galindo dan Hosokawa, 2004).

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan sebagai berikut:

Bagaimana pengaruh imunstimulan ekstrak kayu pulai batu *A. acuminata* terhadap jumlah makrofag pada ikan kerapu macan yang terinfeksi bakteri *V.harveyi*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar kayu pulai batu (*A. acuminata*) sebagai imunostimulan terhadap jumlah makrofag pada ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang terinfeksi bakteri *V.harveyi*

1.4 Kegunaan Penelitian

Memberikan informasi mengenai kemampuan ekstrak kayu pulai batu (*A.acuminata*) sebagai salah satu alternatif pencegahan penyakit infeksi oleh bakteri *V.harveyi* pada benih ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*), sehingga bisa digunakan sebagai imunostimulan dari bahan yang murah dan ramah lingkungan.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak kasar kayu pulai batu (*A.acuminata*) sebagai immunostimulan tidak dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah makrofag ikan kerapu macan (*E.fuscoguttatus*) yang terinfeksi bakteri *V.harveyi*

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar kayu pulai batu (*A. acuminata*) sebagai immunostimulan dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah makrofag ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang terinfeksi bakteri *V.harveyi*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pengelola Budidaya Laut (UPBL) Probolinggo Jawa Timur, pada tanggal 1 Desember 2011 – 7 Maret 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kayu Pulai Batu (*A. acuminata*)

2.1.1 Klasifikasi dan Biologi (*A. acuminata*)

Menurut Anonymous (2012^a) sistematika (taksonomi) kayu pulai batu

(Gambar 1) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Gentianales
Suku	: Apocynaceae
Marga	: Alstonia
Spesies	: <i>Alstonia acuminata</i>



Gambar 1. Kayu Pulai Batu (*A. acuminata*) (Anonymous, 2012^b)

Menurut Sidiyasa (1998), kayu susu atau pulai (*A. acuminata* atau *A. spectabilis*) masing-masing daerah dan suku di Indonesia memiliki nama lokal untuk menyebut jenis *A. acuminata*, tetapi pada umumnya jenis ini dikenal dengan nama pulai batu. Tanaman ini merupakan pohon sedang dengan ketinggian 40 m dan berbatang lurus. dibandingkan dengan jenis lainnya yang sesuku, pulai merupakan pohon yang paling besar diantara *Apocynaceae* lainnya dengan diameter 40 - 60 cm.

Menurut Yadi *et al.*, (2008), kayu pulai tergolong ringan, tidak keras dan tidak ada galihnya. Pohon pulai bisa tumbuh sangat tinggi dan besar, bisa mencapai 15 meter dengan diameter batang mencapai 60 meter. Pulai termasuk jenis yang toleran terhadap berbagai macam tanah dan habitat meskipun tidak begitu tahan di daerah yang dingin.

Pulai (*Alstonia scholaris*) yang termasuk suku kamboja-kambojaan, tersebar di seluruh Nusantara. Di Pulau Jawa tumbuh di hutan jati, hutan campuran dan hutan kecil di pedesaan, ditemukan dari dataran rendah sampai 900 m dari permukaan laut. Kadang-kadang ditanam di pekarangan dekat pagar atau sebagai pohon hias. Tinggi pohon berkisar antara 20 - 25 m. Batang lurus, diameternya mencapai 60 cm, berkayu, dan percabangan menggarpu. Kulit batang rapuh, rasanya sangat pahit, dan bergetah putih. Daun tunggal, tersusun melingkar 4 - 9 helai, bertangkai yang panjangnya 7,5 - 15 mm, bentuknya lonjong sampai lanset atau lonjong sampai bulat telur sungsang, permukaan atas licin, permukaan bawah buram, tepi rata, pertulangan menyirip, panjang 10 - 23 cm, lebar 3 - 7,5 cm, warna hijau. Perbungaan majemuk tersusun dalam malai yang bergagang panjang, keluar dari ujung tangkai. Bunga wangi berwarna hijau terang sampai putih kekuningan, berambut halus yang rapat. Buah berupa buah bumbung berbentuk pita yang panjangnya 20 - 50 cm, menggantung. Biji kecil, panjang 1,5-2 cm, berambut pada bagian tepinya dan berjambul pada ujungnya (Indartik, 2009)

2.1.2 Pemanfaatan Pule Batu (*A. acuminata*) dan Khasiat sebagai Bahan Obat

Pulai merupakan salah satu jenis pohon yang tersebar di seluruh Indonesia. Bagian-bagian dari pohon ini dapat digunakan mulai getah hingga kayunya. Kulit batang, daun dan bunga dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Kayunya dapat dimanfaatkan untuk bahan baku barang kerajinan, pensil,

papan tulis, lemari, dan lain-lain. Kulitnya telah lama dikenal sebagai obat tradisional untuk anti hipertensi. Kulit kayu pulai berfungsi sebagai bahan baku obat-obatan, antara lain sebagai peluruh dahak, peluruh haid, stomakik, antipiretik, pereda kejang, menurunkan gula darah (hipoglikemik), tonik dan antiseptik (Indartik, 2009).

Pulai berkhasiat untuk mengatasi beberapa jenis penyakit dan gangguan kesehatan seperti memperkuat lambung dan isi perut, mengempiskan perut kembung dan limpa yang membengkak, demam, memperlancar pembersihan darah wanita nifas, obat cacing, penolak demam, kencing manis, malaria, maag, wasir, penyakit kulit, obat penguat, obat sepilis, obat beri-beri, mematikan kumann pada luka hewan, obat pematang bengkak, obat kencing batu, batuk berdahak, diare, disentri, kurang nafsu makan, hipertensi, anemia, rematik, mengobati gigitan ular, sakit telinga, gangguan haid, payudara bengkak karena bendungan ASI (Heyne (1987)

Menurut Yadi *et. al.*, (2008), kayu pulai dimanfaatkan sebatang korek api dan juga untuk membuat topeng. Selain itu kulit kayunya berkhasiat untuk mengatasi malaria karena adanya kandungan saponin, flavonoida dan polifenol. Beberapa sumber menyebutkan bahwa jenis ini sudah mulai jarang ditemui belakangan ini. Keberadaanya terbatas pada kalangan yang bergerak di bidang bisnis korek api.

2.1.3 Senyawa Aktif dari Genus *Alstonia*

Kandungan kimia yang terdapat pada berbagai bagian tumbuhan pulai beragam. Bagian akar, kulit batang, getah dan daun pulai memiliki rasa pahit karena adanya kandungan echeretine dan echicheine. Pada beberapa bagian pohon ini terdapat bahan yang sudah diketahui antara lain alkaloida berupa ditamine, ditaine dan echi-kaoetchine. Pada kulit batang terdapat kandungan saponin, flavonoida dan polifenol (Republika, 2005)

Kulit kayu *A. scholaris* banyak mengandung alkaloid dan biasa digunakan untuk berbagai keperluan pengobatan. Senyawa alkaloid merupakan senyawa yang terdapat pada tumbuhan yang mempunyai efek fisiologi yang kuat sehingga bermanfaat dalam proses pengobatan dan kebanyakan jenis dan marga *Alstonia* mengandung senyawa alkaloid (Kulsum *et al.*, 2003). *A.scholaris* dilaporkan mengandung alstonine, resperine dan alkalid monoterpena lainnya pada bagian kulit (Van dan Wink, 2004).

Selain alkaloid, seluruh bagian tumbuhan pulai juga mengandung senyawa triterpenoid. Triterpenoid merupakan komponen kimia aktif dalam tumbuhan yang digunakan untuk penyembuhan penyakit. Peranan penting triterpenoid dalam bidang farmakologi dan aplikasi komersial adalah digunakan sebagai obat kanker (Apriyanti, 2002). Selain itu, triterpenoid merupakan komponen yang esensial dari metabolisme manusia termasuk hormon adrenal seperti kortison, hormone seks dan lemak yang didapat dari vitamin A, E, dan K (Robinson, 2005). Secara tradisional tumbuhan yang mengandung triterpenoid dimanfaatkan sebagai obat dalam penyakit diabetes, gangguan menstruasi, gangguan kulit, kerusakan hati, dan malaria. Proses fitokimia saponin memiliki pengaruh besar pada aktifitas anti bakterial dimana berguna untuk menurunkan kolesterol dalam darah. Selain itu juga berfungsi untuk mengatasi gangguan fungsi hati (Apriyanti, 2002).

Saponin merupakan jenis senyawa fitokimia yang terdapat pada kulit dan daun pulai. Menurut Harborne (1984), saponin bersama-sama steroida dan triterpenoida merupakan senyawa terpenoid. Jenis senyawa ini merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dalam air.

2.2 Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Sudrajat (2008), ikan kerapu macan digolongkan pada :

Kelas	: Chondrichthyes
Subkelas	: Ellasmobranchii
Ordo	: Percomorphi divisi : perciformes
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Epinephelus</i>
Spesies	: <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>
Sinonim	: <i>Brown-marbled grouper</i> , <i>tiger grouper</i> ; nama lokal Indonesia: kerapu macan, balong macan.



Gambar 2. Ikan Kerapu Macan (*E. Fuscoguttatus*) (Anonymous, 2012^o)

Morfologi ikan kerapu macan (*E.fuscoguttatus*) seperti yang terlihat pada Gambar 2. Tinggi ikan kerapu macan (*E.fuscoguttatus*) lebih panjang dari panjang kepalanya. Area *interorbital*nya datar atau sedikit cekung, bagian *Preoperculum*nya membulat dan bergerigi halus, ujung bagian atas *operculum*nya cembung, ujung bagian depan tulang *preorbital* menekuk cukup dalam ke arah lubang hidung dan rahang bagian atas memanjang dari posterior sampai mata.

Kerapu macan (*E.fuscoguttatus*) mempunyai bentuk badan 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 dua baris, lancip dan kuat serta ujung luar bagian depan adalah gigi-gigi terbesar. Sirip ekor umumnya membulat (*rounded*), sirip punggung memanjang dimana bagian jari-jarinya yang keras berjumlah

kurang lebih sama dengan jari-jari lunaknya, jari-jari sirip yang keras berjumlah 6-8 buah, sedangkan sirip dubur berjumlah 3 buah, jari-jari sirip ekor berjumlah 15-17 dan bercabang dengan jumlah 13-15. 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. (Antoro *et al.*, 2004).

Bentuk ujung sirip ekor, sirip dada dan sirip dubur ikan berupa busur. Kepala dan badannya berwarna keabu-abuan pucat kehijauan atau keccoklatan. Badan penuh dipenuhi dengan bintik-bintik gelap berwarna jingga kemerahan atau coklat gelap. Bintik-bintik di bagian tengah lebih gelap dibanding pinggir, ukuran bintik semakin mengecil ke arah mulut. Adapun punggung dan pangkal sirip punggung ikan terdapat bercak besar kehitaman (Sudrajat, 2008).

2.2.2 Habitat

Menurut Sutrisna (2011), distribusi ikan ini di berbagai kepulauan dunia tersebut tidak terlepas dari habitatnya di perairan yang berasosiasi dengan karang. Ikan kerapu macan banyak ditemukan pada daerah yang kaya terumbu karangnya serta air yang jernih, sampai kedalaman 60 m. Habitat ini termasuk perairan dangkal terumbu karang, dasar laut berbatu, puncak laguna, kanal karang serta tubir (bagian terjal terluar terumbu karang). Namun pada umumnya ikan ini hidup pada kedalaman 5-20 meter di semua tipe terumbu karang dengan kondisi yang baik. Kebanyakan ikan kerapu macan memanfaatkan liang/lubang/rongga di terumbu karang sebagai tempat berlindung dan biasanya menetap (*sedentary*). Parameter ekologis yang cocok bagi pertumbuhan ikan kerapu macan yaitu temperatur 24-31 °C, salinitas 30-33 ppt, kandungan oksigen terlarut > 3,5 ppm dan pH 7,8 – 8, perairan seperti ini, pada umumnya terdapat di perairan terumbu karang.

Benih kerapu macan dapat hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 meter, selanjutnya menginjak masa dewasa beruaya ke

perairan yang lebih dalam antara 7-40 meter, biasanya ruaya ini berlangsung pada siang dan senja hari. Telur dan larva bersifat pelagis sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal. Habitat favorit larva dan kerapu lumpur muda adalah perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar pasir berkarang yang banyak ditumbuhi padang lamun (Antoro *et al.*, 2004).

2.2.3 Penyakit

Jenis penyakit bakterial yang ditemukan pada ikan kerapu, diantaranya adalah penyakit borok pangkal strip ekor, dan penyakit mulut merah. Hasil isolasi dan identifikasi bakteri ditemukan beberapa jenis bakteri yang diduga berkaitan erat dengan kasus penyakit bakterial, yaitu *Vibrio alginolyticus*, *V.algosus*, *V.anguillarum* dan *V.fuscus*. Diantara jenis bakteri tersebut bakteri *V alginolyticus* dan *V.fuscus* merupakan jenis yang sangat patogen pada ikan kerapu tikus (Akmalia, 2011).

Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang menunjang kehidupan ikan. Berbagai jenis penyakit atau penyebab penyakit ikan seperti bakteri, virus, lerne, cacing dan lain sebagainya telah tersebar luas dan diduga selalu dan pasti ada di semua perairan.

Menurut Perlak (2009), serangan penyakit dan gangguan hama tidak hanya menyebabkan menurunnya hasil panen (produksi), tetapi pada tahap yang lebih jauh dapat menyebabkan kegagalan panen. Penyakit ikan dapat didefinisikan sebagai segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan suatu fungsi atau struktur dari alat tubuh atau sebagian alat tubuh, baik secara langsung maupun tidak langsung. Pada prinsipnya penyakit yang menyerang ikan tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor,

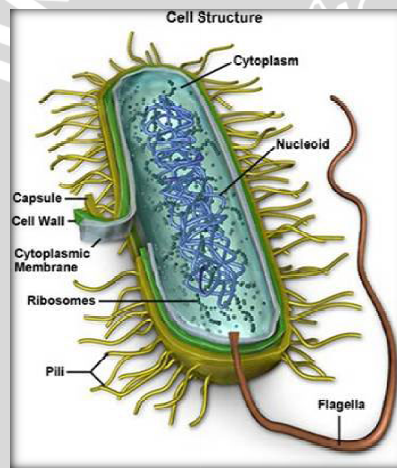
yaitu kondisi lingkungan (kondisi di dalam air), kondisi inang (ikan), dan adanya jasad pathogen (jasad penyakit).

2.3 Bakteri *Vibrio harveyi*

2.3.1. Klasifikasi

Klasifikasi bakteri (Gambar 3) menurut Agung (2007) *Vibrio harveyi* diklasifikasikan sebagai berikut :

Phylum : Protophyta
Class : Schizomycetes
Ordo : Pseudomonadales
Sub ordo : Pseudomonadineae
Family : Spirillaceae
Genus : *Vibrio*
Spesies : *Vibrio harveyi*



Gambar 3. Bakteri *Vibrio harveyi* (Anonymous, 2012^d)

2.3.2. Morfologi

Ukuran bakteri bervariasi baik penampang maupun panjangnya, tetapi pada umumnya penampang bakteri adalah sekitar 0,7 – 1,5 μm dan panjangnya sekitar 1-6 μm (Tim Mikrobiologi, 2003).

Secara umum ciri-ciri *Vibrio* yaitu berbentuk koma atau batang pendek, bengkok atau lurus, bersel tunggal, mempunyai alat gerak berupa *flagella* kutub tunggal (*monotric flagel*), termasuk gram negatif, ukuran sel 1-4 μm , tidak

membentuk spora, oksidase positif, katalase positif, serta proses fermentasi karbohidratnya tidak membentuk gas (Agung 2011).

a. Bentuk Bakteri

Berdasarkan bentuk morfologinya, maka bakteri dapat dibagi atas tiga golongan, yaitu golongan basil, golongan kokus dan golongan spiril.

- *Basil*

Basil (dari bacillus) berbentuk serupa tongkat pendek, silindris. Sebagian besar bakteri berupa basil. Basil dapat bergandeng-gandengan panjang, bergandengan dua-dua, atau terlepas satu sama lain.

- *Kokus*

Kokus (dari coccus) adalah bakteri yang bentuknya serupa bola-bola kecil. Golongan ini tidak sebanyak golongan basil.

- *Spiril*

Spiril (dari spirillum) ialah bakteri yang bengkok atau berbengkok-bengkok serupa spiral (Dwijoseputro, 1998).

b. Ciri-ciri Bakteri

Menurut Arisma (2008), bakteri memiliki ciri-ciri yang membedakannya dengan makhluk hidup lain yaitu:

- Organisme multiseluler
- Prokariot (tidak memiliki membran inti sel)
- Umumnya tidak memiliki klorofil
- Memiliki ukuran tubuh yang bervariasi antara 0,12 s/d ratusan mikron dan umumnya memiliki ukuran rata-rata 1 s/d 5 mikron
- Memiliki bentuk tubuh yang beraneka ragam
- Hidup bebas atau parasit

- Hidup di lingkungan ekstrim seperti pada mata air panas, kawah atau gambut dinding selnya tidak mengandung peptidoglikan
- Mempunyai kosmopolit diberbagai lingkungan dinding dan selnya mengandung peptidoglikan

c. Struktur Tubuh Bakteri

Menurut Pelczar (2008), struktur tubuh bakteri terdiri dari flagela, pili dan kapsul.

- Flagela

Flagelum, embel-embel seperti rambut yang teramat tipis mencuat menembus dinding sel dan bermula dari tubuh dasar, suatu struktur granular tepat di bawah membran sel di dalam sitoplasma, disebut flagelum (jamak, flagela). Flagelum menyebabkan motilitas (pergerakan) pada sel bakteri.

- Pili (fimbriae)

Pili hanya dapat dilihat dengan mikroskop elektron, tidak berfungsi untuk pergerakan, dijumpai baik pada spesies yang nonmotil maupun yang motil. Salah satu jenis yang dikenal sebagai *pilus F* (atau *pilus seks*), berfungsi sebagai pintu gerbang bagi masuknya bahan genetik selama berlangsungnya perkawinan antara bakteri. Beberapa pili berfungsi sebagai alat untuk melekat pada permukaan.

- Kapsul

Beberapa sel bakteri, seperti misalnya pneumokokus yang menyebabkan pneumonia, dikelilingi oleh suatu lapisan bahan kental yang disebut kapsul atau lapisan lendir. Ukuran kapsul dipengaruhi oleh medium tempat ditumbuhkannya bakteri itu. Bagi bakteri, kapsul merupakan penutup lindung dan juga berfungsi sebagai gudang

makanan cadangan. Kapsul bakteri-bakteri penyebab penyakit tertentu menambah kemampuan bakteri tersebut untuk menginfeksi.

- Dinding sel

Di bawah substansi ekstraselluler seperti kapsul atau lendir di luar membran stoplasma, terletak dinding sel, yaitu suatu struktur amat kaku yang memberikan bentuk pada sel.

- Membran sitoplasma

Membran sitoplasma perkiraan ketebalannya, yang didasarkan pada mikograf elektron irisan-irisan tipis, ialah sekitar 7,5 nm. Membran sitoplasma amatlah penting karena mengendalikan lalu-lalangnya substansi kimiawi dalam larutan, masuk ke dalam dan keluar dari sel.

- Mesosom

Membran sitoplasma, dengan cara melipat ke arah dalam atau invaginasi ke dalam sitoplasma, menghasilkan suatu struktur yang disebut mesosom. Mesosom diduga berfungsi dalam sintesis dinding sel dan pembelahan nukleus.

Tabel 1. Fungsi Struktur Permukaan Sel Bakteri

Struktur	Fungsi	Komposisi kimiawi
Flagela Pili	Lokomosi Tabung konjugasi Pelekatan sel.	Protein Protein
Kapsul dan bahan ekstra seluler	Penutup lindung Pelekatan sel Makanan cadangan	Polisakarida, polipeptidae
Dinding sel	Penutup lindung Permeabilitas	Peptidoglikan, asam tekoat, polisakarida, lipid dan protein
Membran sitoplasma dan mesosom	Penutup semipermeabel Mekanisme transpor Pembelahan sel Sintesis makromolekul	Lipid, protein

2.4. Immunostimulan

Menurut Hanifah (2011), imunostimulan adalah senyawa tertentu yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun sistem non spesifik, dan terjadi induksi non spesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral. Pertahanan non spesifik terhadap antigen ini disebut paramunitas, dan zat berhubungan dengan penginduksi disebut paraimunitas. Induktor semacam ini biasanya tidak atau sedikit sekali kerja antigenya, akan tetapi sebagian besar bekerja sebagai mitogen yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel tujuan adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B, karena induktor paramunitas ini bekerja menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Mitogen ini dapat bekerja langsung maupun tak langsung (misalnya melalui sistem komplemen atau limfosit, melalui produksi interferon atau enzim lisosomal) untuk meningkatkan fagositosis mikro dan makro. Mekanisme pertahanan spesifik maupun non spesifik umumnya saling berpengaruh.

Imunitas adalah kemampuan tubuh menahan hampir semua jenis organisme atau toksin yang merusak jaringan tubuh. Sebagian organisme memiliki imunitas bawaan, yang terdiri dari kemampuan umum misalnya fagositosis bakteri, destruksi patogen oleh sekresi asam, enzim pencernaan di saluran cerna, resistensi kulit terhadap invasi, dan bahan kimia tertentu dalam darah yang melekat ke organisme asing atau toksin dan menghancurkannya. Imunitas didapat adalah kemampuan tubuh membentuk mekanisme protektif yang sangat kuat terhadap agen penginvasi spesifik misalnya bakteri, virus, toksin, dan bahkan jaringan asing dari organisme lain (Hall dan Guyton, 2010). Renggaris dan Karnen (2009) juga mengemukakan bahwa sel sistem imun juga ditemukan di kulit dan membran mukosa. Ikan memiliki sel sejenis sel T dan B.

Monosit, makrofag, granulosit yang berperan dalam respons inflamasi ditemukan pada ikan.

Raa (2000) menjelaskan bahwa penggunaan immunostimulan dapat memperbaiki kesehatan dan performa dari peternakan hewan termasuk ikan dan udang pada akuakultur, bila digunakan ketika:

- a. Kondisi yang diketahui akan menimbulkan stress (seperti penanganan ikan, perubahan temperatur dan kondisi lingkungan, ketika larva akan menerima makanan buatan)
 - b. Ada dugaan akan terpapar mikroorganisme patogen dan parasit (misalnya ketika musim-musim tertentu dimana penyakit biasanya timbul atau ketika kondisi pemeliharaan dalam kepadatan yang tinggi).
 - c. Fase-fase perkembangan ketika hewan biasanya sangat rentan terserang penyakit (misalnya fase larva pada udang dan ikan, pematangan gonad).
- ❖ Keuntungan penggunaan immunostimulan adalah:
- Mengurangi kematian berkaitan dengan patogen oportunistik
Patogen oportunistik dapat menyebabkan penyakit dan kematian ketika inangnya sedang dalam kondisi lemah atau stress, mikroorganisme seperti itu dapat mengganggu kondisi ikan, walaupun keadaan lingkungan dan pakan baik, dan tidak menunjukkan gejala klinik.
 - Mengurangi kematian ikan pada tahap larva/benih

Ellis (1988) menyatakan bahwa respons imun pada ikan terdiri atas respons seluler dan respons humoral. Respons humoral merupakan respons spesifik sedangkan respon seluler bersifat non spesifik. Respons pertahanan seluler ikan meliputi pertahanan mekanik dan kimiawi (mukus, kulit, sisik, dan insang) dan pertahanan seluler yang meliputi sel makrofag dan leukosit yaitu monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil.

Menurut Anderson dan Douglas (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 limfosit. Dalam limfosit ini, antigen akan dimultipikasi (digandakan) dan antibodi spesifik diproduksi. Selanjutnya antibodi tersebut dibawa masuk melewati peredaran darah dalam kapiler insang untuk diedarkan ke seluruh jaringan tubuh ikan.

Berikut ini akan dijelaskan pemberian dosis dengan metode perendaman, penyuntikan dan oral dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Metode Pemberian Immunostimulan pada beberapa Organisme

Metode	Immunostimulan	Organisme	Dosis	Sumber
Perendaman	<i>Boungainvillia sp</i>	Kerapu Macan	10,4 ppm perendaman	Andayani, 2007.
Oral	<i>Boungainvillia sp</i>	Kerapu Macan	1 alkaloid/kg pakan	Andayani, 2009.
Perendaman	Levamisol	Ikan Mas	1 mg/l2,15 mg/l	Traves K.M.and Brown, 2000.
Perendaman	Levamisol	Udang	0,2 g/kg pakan	Cahyono, 2004
Oral	Levamisol	Larva Kerapu Bebek	200 mg peptidoglican /kg pakan	Johny dan Des Rosa, 2004
Oral	Peptidoglican	Kerapu Bebek	50-100 µg peptidoglican /0,1 ml	Johnny et al., 2001
Penyuntikan	Peptidoglican	Ikan Kerapu Macan	100 µg peptidoglican /0,1 ml	Johnny dan Roza, 2002.
Penyuntikan	Peptidoglican	Ikan Kerapu Bebek		Johnny et al., 2003

2.5 Sistem Imun Non Spesifik

Imunitas non spesifik fisiologik berupa komponen normal tubuh, selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba masuk tubuh dan dengan cepat menyingkirkannya. Jumlahnya dapat ditingkatkan oleh infeksi, misalnya jumlah sel darah putih meningkat selama fase akut pada banyak penyakit. Disebut non spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Mekanisme tidak menunjukkan spesifisitas terhadap bahan asing dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respons langsung (Rengganis dan Karnen, 2009).

Ikan memiliki sistem pertahanan tubuh untuk melawan berbagai macam penyakit. Dalam tubuhnya, terdapat dua sistem pertahanan yaitu sistem pertahanan non spesifik dan spesifik. Sistem pertahanan non spesifik berfungsi untuk segala patogen yang menyerang dan bersifat permanen (selalu ada). Sistem pertahanan spesifik berfungsi untuk melawan penyakit yang memerlukan rangsangan terlebih dahulu (Ellis, 1988).

Sistem imun yang telah terpapar oleh antigen akan menimbulkan dua jenis respon imun yaitu respon imun nonspesifik dan respon imun spesifik. Respon imun nonspesifik merupakan respon tubuh terhadap antigen yang belum pernah terpapar antigen, sedangkan respon imun spesifik merupakan respon tubuh terhadap antigen yang sebelumnya sudah pernah dikenalnya. Kedua respon ini saling berinteraksi satu sama lainnya. Interaksi tersebut berlangsung bersama-sama sehingga menghasilkan suatu aktivitas biologik yang seirama dan serasi. Dalam berbagai mekanisme tidak dapat dipisahkan antara satu dengan yang lain (Besung, 2009).

Komponen-komponen utama sistem imun non spesifik adalah pertahanan fisik dan kimiawi seperti ephitel dan respon non spesifik adalah: substansi yang diproduksi pada permukaan ephitel (Widayani 2007). Determinan yang berperan pada mekanisme respon imun non-spesifik, adalah: (1) host/inang: ras, spesies, genetis, individual, umur, jenis kelamin, hormonal, dan status gizi; (2) fisik: kulit, membran mukus, permukaan yang basah, perangkap anatomis, misalnya rongga massal, pembersih mekanis misalnya silia; (3) antimikroba aktif: sekresi keringat, sekresi kulit yang bersifat antibakteri dan antifungus, sekresi membran mukus yang bersifat antibakteri dan antivirus, substansi-substansi antimikroba, jaringan misalnya lisozim dan sel-sel yang melakukan fagositosis (mikrofag dan makrofag); (4) determinan lain yang dapat berpengaruh: pemberian kortison, antibiotik, dan keadaan suhu.

Tabel 3. Komponen Sistem Imun Non Spesifik (Rengganis dan Karnen, 2009).

Komponen Sawar	Fungsi Utama
Lapisan epitel	Mencegah mikroba masuk
Defensin/katolisidin	Membunuh mikroba
Limfosit intraepitelial	Membunuh mikroba
Sel efektor dalam sirkulasi	
Neutrofil	Fagositosis dini dan membunuh mikroba
Makrofag	Fagositosis efisien dan membunuh mikroba, sekresi sitokin yang merangsang inflamasi
Sel NK	
Protein efektor dalam sirkulasi	
Komplemen	Lisis sel terinfeksi, aktivasi makrofag
Ikatan manosa	Membunuh mikroba, opsonisasi mikroba
CRP (pentaksin)	Opsonisasi mikroba, aktivasi komplemen (jalur lektin)
Sitokin	
TNF, IL-1, kemokin	Opsonisasi mikroba, aktivasi komplemen
IFN- α , - β	Inflamasi
IFN- γ	Resistensi terhadap virus
IL - 12	Aktivasi makrofag

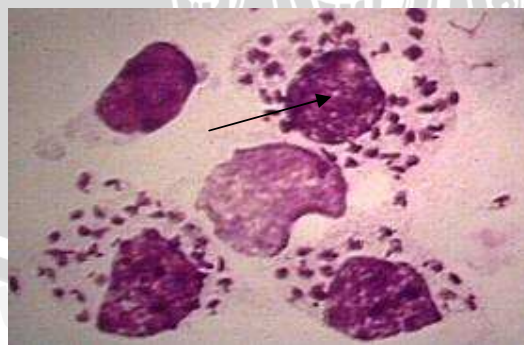
Sisik dan kulit merupakan pelindung fisik yang melindungi ikan dari kemungkinan luka dan sangat penting peranannya dalam mengendalikan

osmolaritas tubuh. Kerusakan sisik atau kulit akan mempermudah patogen menginfeksi inang. Mukus selain pelindung juga pelindung kimiawi karena mengandung lisozim, komplemen, protein-protein komplemen dan protease mirip tripsin yang dapat merusak sel-sel bakteri gram negatif. (Anderson, 1974).

2.6 Makrofag

Menurut Corwin (2009), makrofag adalah sel besar yang mampu mencerna bakteri dan sisa sel dalam jumlah yang sangat besar. Makrofag dapat memfagositosis sel darah merah dan sel darah putih lain yang telah lisis. Sebagian sel makrofag mengkoloni jaringan, misalnya kulit, kelenjar limfe, dan paru, selama berbulan-bulan atau bertahun-tahun. Sel-sel ini berfungsi menyapu berbagai mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh melalui rute-rute tersebut. Sistem sel monosit makrofag disebut sistem retikuloendotel.

Makrofag memiliki sifat seperti halnya sel fagosit yang lain, yaitu mempunyai sifat melindungi yang dilakukan oleh sel fagosit terhadap adanya infeksi bahan asing (Stoskopf, 1993). Makrofag merespon pertama kali terhadap antigen adalah makrofag jaringan. Bakteri *V. harveyi* yang merupakan bakteri gram negative, Pada bagian luarnya memiliki LPS, dan ini salah satunya dikenali oleh makrofag. Untuk jelasnya tentang sel makrofag yaitu dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Sel Makrofag (➤) (Anonymous, 2012^e)

Makrofag merupakan sel terpenting yang memproduksi sitokin untuk mengontrol dan menyingkirkan parasit. NO yang diproduksi makrofag

nampaknya sangat berperan untuk membunuh parasit. NO adalah sitotoksik atau sitostatik untuk malaria, leishmania, *T.cruzi*, toxoplasma, skistosoma, dan fungus patogen Kriptokok neoformans. IFN- γ merupakan sitokin penting oleh karena dapat mengaktifkan *respiratory burst* yang menghasilkan NO. IFN- α dapat bekerja sinergistik dengan IFN- γ dalam meningkatkan produksi NO dengan menginduksi sintase oksida nitrit (NOS). Sitokin TGF- β dan IL-10 menghambat produksi NO oleh makrofag (Rengganis I dan Karnen G.B, 2009).

Menurut Triana *et.al.*, (2007), makrofag merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik berperan fungsional dalam fagositosis maupun perannya sebagai antigen presenting cells (APC). Dalam melakukan kedua peran tersebut, bantuan mediator endogen seperti sitokin, sudah pasti dibutuhkan.

Makrofag yang teraktivasi akan tampak lebih besar dengan pseudopodi yang bertambah panjang dan produksi enzim-enzim yang ada di dalam makrofag seperti katepsin G, asam fosfatase, lisozim, beta glukoronidase, esteroprotease, hidrolase, myeloperoksidase, dan arilsulfatase akan meningkat. Adanya aktivasi makrofag menyebabkan meningkatnya kemampuan fagositosis dan sekresi interleukin. Sekresi interleukin ini akan memacu sel B untuk menghasilkan antibody (Besung, 2009).

2.7 Peran Makrofag

Makrofag berperan memfagosit sel sasaran/antigen setelah diaktifkan oleh limfokin, atau dengan perantaraan apsonisasi oleh imunoglobulin. Makrofag juga mempunyai peran sebagai penyaji antigen kepada sel limfosit T, sama halnya dengan sel langerhans dan sel dendritik. Makrofag akan memproses antigen yang kompleks sifatnya untuk kemudian dijalankan kepada limfosit T sehingga lebih mudah dikenal. Makrofag juga membentuk sitokin yang dapat

memacu respon imun, serta enzim proteolitik yang dapat mencerna sel antigen (Seto A, 2002).

Menurut Robbins *et al.*, (2007), makrofag mengeluarkan MHC kelas II sehingga berperan penting dalam pemrosesan dan penyajian antigen ke sel T helper CD4+. Karena sel T (kecuali sel B) tidak dapat dipicu oleh antigen bebas, penyajian oleh makrofag atau APC lainnya merupakan suatu keharusan untuk induksi imunitas yang diperantarai sel. Makrofag memfagosit (dan akhirnya membunuh) mikroba yang diikat oleh antibodi dan atau komplemen, oleh karena itu makrofag merupakan unsur efektor yang penting pada imunitas humoral.



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

- Benang
- Autoclave
- Apendof
- Hotplate
- Ember
- Mortar
- Spatula
- Timbangan analitik
- Micropipet
- Bak volume 30 liter
- Haemocytometer
- Cover glass
- Petridish
- Bak volume 25 liter
- DO meter
- Handtally counter
- Thermometer
- Aerator
- pH meter
- Kamera digital
- Mikroskop cahaya
- Refraktometer
- Objek glass
- Bunsen
- Erlemeyer
- Tabung reaksi

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

Benih ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) ukuran 13 cm berjumlah 150 ekor.

- Ekstrak kayu pulai batu
- Air laut
- (*A. acuminata*)
- Kertas label
- Bakteri *Vibrio harveyi*
- Kertas koran
- RPMI
- TCBSA (Thiosulfate citrate bilesait sukrose agar)
- Metaline blue
- MgSO₄ 6,94 gram
- Aquadest

- NaCl 13,4 gram
- KCl 0,75 gram
- NB

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Menurut Nazir (2005), penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk penelitian.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen. Menurut Surachmad (1985), model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} ; i = 1, 2, \dots, t ; j = 1, 2, \dots, j$$

Keterangan :

Y_{ij} = respon atau hasil pengamatan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke- i

ϵ_{ij} = pengaruh galat dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

i = 1, 2, 3, 4, 5 (perlakuan)

j = 1, 2, 3 (ulangan)

❖ Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian dalam penelitian ini yaitu variable bebas (independent) dan variable terikat (dependent). Variabel

bebas adalah variable yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variable terikat adalah variable yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Surachmad, 1994). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi perbandingan dosis ekstrak kasar kayu pulai batu (*A. acuminata*) serta variabel terikat yaitu jumlah makrofag.

❖ Perlakuan

Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan dan satu kontrol dengan masing-masing diulang tiga kali, yaitu:

K: Kontrol (tanpa perlakuan atau tanpa pemberian ekstrak (*A. acuminata*) 0 ppm.

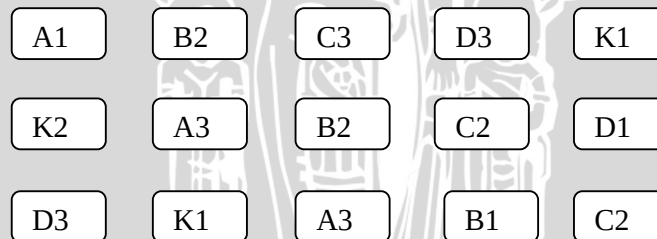
A : Pemberian ekstrak (*A. acuminata*) dengan konsentrasi 50 ppm

B : Pemberian ekstrak (*A. acuminata*) dengan konsentrasi 100 ppm

C : Pemberian ekstrak (*A. acuminata*) dengan konsentrasi 150 ppm

D : Pemberian ekstrak (*A. Acuminata*) dengan konsentrasi 200 ppm

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dengan denah percobaan hasil dari pengacakan dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini :



Gambar 5. Rancangan Denah Penelitian

Keterangan :

K : Kontrol

A,B,C,D : Perlakuan dengan lama perendaman yang berbeda

1,2,3 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang.
- Dituangkan air secukupnya ke dalam autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan dalam autoclave ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.
- Saklar dinyalakan, kemudian tombol sirine yang berwarna merah diputar sampai batas lampu yang berwarna merah.
- Ditunggu 15 menit, setelah mencapai 121°C sirine akan berbunyi lalu dimatikan.
- Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0.
- Dimatikan saklar listrik dan dibuka tutup autoclave.
- Alat dan bahan yang sudah disterilisasi diambil dan alat yang telah steril disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah steril disimpan dalam lemari pendingin (kulkas).

b. Pembuatan Media TCBSA (Thiosulfate Citrate Billesait Sukrose Agar) dan NB (Nutrient Broth)

➤ Pembuatan Media TCBSA

- TCBSA sejumlah 88 gram, KCL 0,075 gram, MgSO_4 0,694 gram, NaCl 1,34 gram dilarutkan dalam 1000 ml air aquadest steril dalam erlemeyer steril.
- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen
- Larutan tidak dsterilkan dalam autoklaf
- Setelah itu, dalam keadaan panas dituang dalam cawan petri steril

- Media dibiarkan memadat
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin. Cawan petri diletakkan terbalik yaitu bagian tutup berada di bawah untuk menghindari tetesan air kondensasi dalam tutup.

➤ **Pembuatan NB**

- NB sejumlah 13 gram, KCL 0,075 gram, $MgSO_4$ 0,694 gram, NaCl 1,34 gram dilarutkan dalam 100 ml air aquadest steril dalam erlemeyer steril.
- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit
- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu kurang lebih $30^\circ C$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.

c. Pembuatan Ekstrak *Alstonia acuminata*

- Kulit kayu *A. acuminata* sebanyak 273,86 gr dipotong kecil-kecil dan diangin-anginkan.
- Dihaluskan dengan blender
- Dimaserasi 3 x 24 jam dengan 2,5 L methanol
- Disaring dan dipekatkan dengan evaporator $\pm 40^\circ C$
- Dipartisi dengan 4x100 mL *n*-heksan- H_2O
- Diperoleh hasil sebanyak 4,0248 gr

d. Pembuatan Biakan Bakteri *V. Harveyi* Untuk Penginfeksi

- Disiapkan biakan bakteri *V. harveyi*.

- NB dibuat dan diletakkan dalam tabung erlemeyer sesuai dengan keperluan.
- Dimasukkan biakan *V. harveyi* ke dalam tabung erlemeyer yang telah berisi 1.600 ml NB dan diambil biakan bakteri sebanyak 42 ose.
- Bakteri dimasukkan dalam inkubator selama 18 – 24 jam dan diatur pada suhu 37 °C.
- Setelah diinkubator tabung erlenmeyer dibandingkan dengan tabung larutan standart Mc. Farland.
- Cara pembuatan larutan Mc. Farland yaitu dengan cara mencampurkan BaCl 1% dan NaSO₄ 1%, maka diperoleh hasil kepadatan bakteri 30 x 10⁸.

e. Sterilisasi Bak-bak Percobaan

- Bak plastik yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu
- Bak plastik di cuci dengan deterjen sampai debu dan kotoran-kotoran yang melekat hilang, kemudian dibilas dengan air sampai bersih dan bau deterjen hilang
- Bak plastik dikeringkan sampai kering
- Bak plastik disusun berdasarkan denah percobaan
- Masing-masing bak plastik diisi dengan air sebanyak 20 liter
- Bak plastik yang telah diisi air kemudian diberi aerasi

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Pemberian Ekstrak Kasar Kayu Pulau Batu (*A. acuminata*) sebagai Immunostimulan

- Ikan diaklimatisasi selama kurang lebih 7 hari.
- Pemberian imunostimulan dengan menggunakan ekstrak kasar kayu pulau batu (*A. acuminata*) sesuai dengan perlakuan yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm.

- Pada hari ke-1 dilakukan perendaman ekstrak selama 3 hari sesuai dengan waktu yang dianggap aman bagi ikan kerapu macan berdasarkan hasil ujian pendahuluan, dan benih diamati perkembangannya setiap hari.
- Setelah dilakukan perendaman ekstrak selama 3 hari, ikan dikembalikan ke wadah pemeliharaan dan dibiarkan selama 3 hari.
- Kemudian setelah 3 hari ikan dikembalikan pada wadah perendaman ekstrak (boster ke-2) sesuai dengan jam aman untuk dilakukan perendaman yaitu 1 jam perendaman.

b. Penginfeksian Bakteri Pada Ikan

Penginfeksian ikan kerapu dengan metode perendaman dilakukan dalam wadah dengan volume 30 liter, setiap wadah diisi dengan air steril yang telah didesinfeksi dengan kaporit 150 ppm dan dinetralsir dengan Natrium tiosulfat 75 ppm. Kepadatan *V. harveyi* sebagai pathogen adalah 10^7 sel/ml. Adapun tahap kegiatan untuk penginfeksian adalah:

- Pada hari ke-7 ikan dikembalikan lagi pada wadah penyegaran, setelah ikan dirasa cukup normal ikan diinfeksi dengan bakteri *V.harveyi* pada kepadatan 10^7 . Sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan penghitungan pengenceran dengan menggunakan rumus (Sastrosupadi, 2000) :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$10^9 \times V1 = 10^7 \times 10.000 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{10^7 \times 10.000 \text{ ml}}{10^9}$$

$$V1 = 100 \text{ ml}$$

Dimana :

N1 : kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N2 :kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V1 : volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan (ml)

V2 : volume media air dalam wadah penelitian (ml)

- Ikan yang sudah disegarkan pada bak ditambahkan bakteri *V. harveyi* dengan kepadatan 10^7 pada masing-masing bak perlakuan. Pada setiap bak terdapat 6 ekor ikan kerapu macan (*E.fuscoguttatus*).
- Kemudian ikan dibiarkan dalam bak perendaman bakteri sambil diamati gejala klinis pada ikan.
- Hari ke-8 dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah makrofag karena dianggap hari maksimal untuk melakukan ujiantang.
- Diambil data hari ke-1 dan ke-8 karena hari yang ke-1 adalah sebagai pembandingan, sedangkan hari ke-8 adalah hari maksimal untuk diambil nilai tertinggi dalam ujiantang *V.harveyi*.

c. Penghitungan Jumlah Makrofag

Adapun cara mengisolasi makrofag menurut Irianto (2005), adalah (1) Ikan dibedah dan ginjalnya diambil dengan spatula secara aseptis (2) Ginjal diletakkan dalam cawan petri steril (3) Larutan RPMI diambil dengan spuit atau micropipet kemudian disuntikkan berkali-kali ke dalam ginjal sampai terlihat mengembang (4) Ginjal dicacah untuk mengeluarkan suspensi makrofag. Suspensi ini diambil dengan spuit lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi.

Makrofag yang sudah diisolasi kemudian dihitung jumlahnya dengan cara sebagai berikut (1) Suspensi makrofag diberi tripan biru atau metylene blue, kemudian dimasukkan dalam haemocytometer (2) Makrofag akan terlihat biru dan dilakukan penghitungan.

Jumlah sel makrofag dihitung dengan rumus :

$$(\text{sel/ml}) = \frac{N \times fp}{V}$$

Keterangan :

- N = jumlah sel makrofag;
 fp = faktor pengenceran;
 V = volume cairan haemocytometer.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Sebagai parameter utama dalam penelitian ini yaitu penghitungan jumlah makrofag yang diamati tanpa perlakuan ekstrak, pemberian ekstrak dan setelah diinfeksi *V.harveyi*.

3.5.2 Parameter Penunjang

Sebagai parameter penunjang yang diamati dalam penelitian ini adalah pengamatan terhadap kualitas air media yang meliputi salinitas, suhu, oksigen terlarut (DO) dan pH. Pengukuran kualitas air dilakukan setiap hari pada pagi hari.

3.6 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, maka digunakan analisis dengan sidik ragam. Jika hasil yang diperoleh menunjukkan pengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows dan Beda Nyata Jujur (BNJ).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Jumlah Sel Makrofag

Hasil pengamatan yang dilakukan selama penelitian ujiantang dengan bakteri *V.harveyi* jumlah makrofag memberikan hasil rata-rata yang berbeda dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm. Hasil penghitungan rata-rata jumlah makrofag dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Jumlah Rata-Rata Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Penelitian

Perlakuan	Pra Infeksi	Infeksi Bakteri <i>V.harveyi</i>	
		Hari ke-1	Hari ke-8
K	3,5	2,8	2,4
A	4,2	5,4	7,6
B	4,3	8,5	10,3
C	4,7	11,9	13,1
D	6,2	13,75	14,2

Berdasarkan Tabel di atas hasil penelitian menunjukkan bahwa pengamatan makrofag pada ikan kerapu macan setelah proses penginfeksian menunjukkan peningkatan jumlah sel makrofag dan pemberian ekstrak *A.acuminata* yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan kontrol.

Penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Sanoesi, 2008) menunjukkan bahwa konsentrasi penyuntikan yang paling baik adalah dengan menggunakan konsentrasi 33,5% - 67% berfungsi sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan jumlah sel makrofag ikan mas. Sementara itu pemberian ekstrak dengan dosis 100%, memberikan fungsi kebalikannya yaitu sebagai imunosupresif karena dapat menekan jumlah makrofag ikan mas. Hasil penghitungan rata-rata jumlah makrofag dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Jumlah Rata-rata Sel Makrofag (10^6 sel/ml) dari Dua Kali Ulangan selama Penelitian.

Perlakuan	Waktu Pengamatan (jam ke)			
	0	48	72	96
K	8,2	$8,85 \pm 0,07$	$11,9 \pm 0,14$	$12,65 \pm 0,21$
A	8,1	$10,85 \pm 0,07$	$13,85 \pm 0,07$	$14,25 \pm 0,49$
B	8,1	$15,05 \pm 0,49$	$18,65 \pm 0,35$	$19,35 \pm 0,35$
C	8,2	$12,65 \pm 0,35$	$14,6 \pm 0,28$	$15,5 \pm 0,57$

Gaspersz (1991), menyebutkan bahwa transformasi dalam bentuk logaritma (log) diharapkan memberikan kestabilan ragam sehingga proses pengujian dapat mendekati kestabilan. Untuk nilai data yang sangat besar perlu ditransformasikan dalam bentuk log agar data dapat menjadi homogen. Setelah ditransformasikan dalam bentuk log, data hasil perhitungan jumlah makrofag tersebut dimasukkan dalam uji sidik ragam. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* pada derajat kepercayaan 95 %. Hasil uji sidik ragam jumlah makrofag ikan kerapu macan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisa Sidik Ragam Jumlah Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Penelitian Hari ke-1 dan ke-8.

Hari ke-1

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	0.955	4	0.239	607.271	0.000
Acak	0.004	10	0.000		
Total	0.959	14			

Hari ke-8

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	0.961	1	0.961	53.251	0.000
Acak	0.235	13	0.018		
Total	1.196	14			

Ket: Sig. <0,05 Berbeda nyata

Tabel 6 menunjukkan bahwa nilai signifikansi (sig.) adalah kurang dari 0,05. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian perlakuan ekstrak kayu pulai batu berpengaruh secara nyata terhadap jumlah makrofag ikan kerapu macan.

Selain penghitungan sidik ragam juga dilakukan penghitungan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95 %) untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan. Hasil penghitungan uji BNJ jumlah makrofag ikan kerapu macan pada pengamatan hari k-1 dan ke-8 dapat dilihat pada (Tabel 7).

Tabel 7. Uji BNJ Jumlah Sel Makrofag (10^7 sel/ml) Selama Pengamatan Hari ke-1 dan ke-8.

Hari ke-1						
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05				
		Notasi				
		A	b	c	D	e
K	3	7.4467				
A	3		7.7333			
B	3			7.9233		
C	3				8.0733	
D	3					8.1467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Hari ke-8						
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05				
		Notasi				
		a	b	c	dd	
K	3	7.3767				
A	3		7.8800			
B	3			8.0100		
C	3				8.1167	
D	3				8.1533	
Sig.		1.000	1.000	1.000	.258	

Ket: Sig $\alpha < 0,05$ berbeda nyata.

Tabel 7 pada hari ke-1 menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan berbeda nyata terhadap perlakuan yang lain. Sedangkan pada hari ke-8 menunjukkan bahwa pada perlakuan C dan D tidak berbeda nyata.

Ditunjukkan analisa pengaruh berbeda nyata dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows. Tujuannya yaitu untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak kayu pulai batu dengan dosis yang berbeda terhadap

peningkatan jumlah makrofag ikan kerapu macan dalam menghadapi tantangan bakteri *V.harveyi*. Hasil penghitungan model regresi disajikan pada Tabel 7.

Tabel 8. Analisa Regresi Jumlah Makrofag (10^7 sel/ml) Ikan Kerapu Macan dengan Pemberian Ekstrak Kayu Pulai Batu pada Dosis yang Berbeda pada Hari ke-1 dan ke-8.

Hari ke-1

Regresi	Ringkasan Model					Estimasi Parameter	
	R Kuadrat	F	db1	db2	Sig.	Konstan	b1
Linear	0.947	231.099	1	13	.000	7.517	0.003

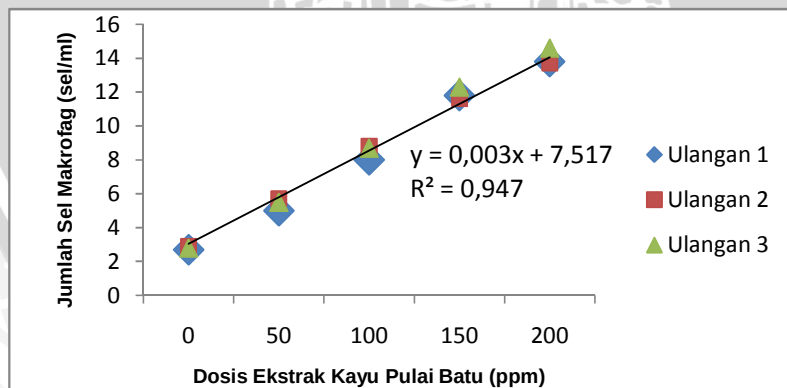
Persamaan hubungan antara dua variabel berbentuk linier yaitu $y = 0,003x + 7,517$

Hari ke-8

Regresi	Ringkasan Model					Estimasi Parameter	
	R Kuadrat	F	db1	db2	Sig.	Konstan	b1
Linear	0.804	53.251	1	13	.000	7.549	0.004

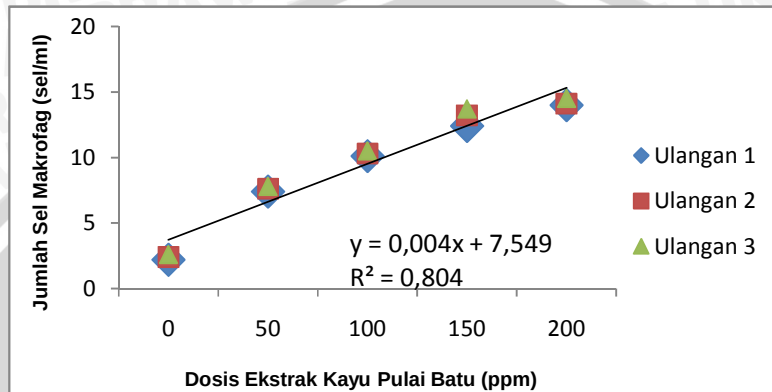
Persamaan hubungan antara dua variabel berbentuk linier yaitu $y = 0,004x + 7,549$

Tabel 8 menunjukkan bahwa model regresi yang sesuai sebagai penduga hubungan pemberian ekstrak kayu pulai batu adalah model regresi linier. Hal tersebut sesuai tingkat dosis yang semakin banyak jumlah dosis maka jumlah makrofag juga meningkat, dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kayu Pulai Batu terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Kerapu Macan pada Hari ke-1.

Berdasarkan Gambar 6 menunjukkan peningkatan jumlah makrofag dari perlakuan K ($2,8 \cdot 10^7$ sel/ml), A ($5,4 \cdot 10^7$ sel/ml), B ($8,5 \cdot 10^7$ sel/ml), C ($11,910^7$ sel/ml) dan D ($13,7510^7$ sel/ml). Persamaan regresi berbentuk linier yaitu, $y = 0,003x + 7,517$.



Gambar 7. Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kayu Pulai Batu terhadap Jumlah Sel Makrofag Ikan Kerapu Macan pada Hari ke-8.

Gambar 7 menunjukkan peningkatan jumlah makrofag dari perlakuan K ($2,4 \cdot 10^7$ sel/ml), A ($7,6 \cdot 10^7$ sel/ml), B ($10,3 \cdot 10^7$ sel/ml), C ($13,1 \cdot 10^7$ sel/ml) dan D ($14,2 \cdot 10^7$ sel/ml). Persamaan regresi berbentuk linier yaitu, $y = 0,004x + 7,549$.

Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar kayu pulai batu pada perlakuan B (100 ppm) merupakan dosis terbaik dan efisien sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan jumlah makrofag ikan kerapu macan. Dibandingkan dengan pada perlakuan D (200 ppm) yang merupakan nilai tertinggi, akan tetapi pada dosis 200 ppm kurang optimal sebagai imunostimulan.

Meningkatnya jumlah makrofag disebabkan adanya jaringan yang rusak akibat aktivitas bakteri, akan mengeluarkan zat-zat kimia yang dapat mendatangkan lebih banyak makrofag. Dan bakteri itu sendiri seperti endotoksin

(lipoposakarida) juga dapat mengaktifkan makrofag. Selain itu makrofag memiliki sifat seperti halnya sel fagosit yang lain, yaitu mempunyai sifat melindungi yang dilakukan oleh sel fagosit terhadap adanya infeksi bahan asing atau mikroorganisme (Norum, Bogwald dan Dalmo 2005 dalam Sanoesi 2008).

Peningkatan kekebalan tubuh ikan non spesifik pada ikan kerapu macan ditunjukkan dengan peningkatan jumlah makrofag (Sanoesi, 2008). Pada penelitian ini, makrofag yang diamati adalah makrofag pada ginjal bagian anterior (*ahead kidney*). Ginjal sangat penting dalam pembentukan darah dan imunitas pada ikan, pada tahap pertumbuhan awal ginjal secara keseluruhan berkembang memproduksi sel-sel imun dan merupakan awal proses tanggap kebal tubuh ikan. Semakin dewasa, ginjal bagian anterior berkembang menjadi bagian terpenting dalam pembentukan sel darah dan sistem imun. Sementara itu ginjal bagian posterior hanya berfungsi sebagai penyaring darah dan menjalankan fungsi urinari. Darah mengalir ke ginjal untuk mengenalkan antigen, hal ini menyebabkan bertambahnya konsentrasi sel-sel imun meningkat pada ginjal bagian anterior. Sel-sel imun yang dimaksud adalah makrofag, limfosit dan plasma sel. Sel-sel tersebut berperan dalam penangkapan antigen dan menjalankan fungsi imun non spesifik yang mempunyai memori (Secombes *et al*, 1982).

4.2 Kelulushidupan / *Survival Rate* (SR)

Kelulushidupan adalah perbandingan antara jumlah individu yang hidup pada akhir penelitian dengan jumlah individu yang hidup pada awal penelitian. Dari hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak kayu batu (*Alstonia acuminata*) sebagai immunostimulan ditinjau dari histologi ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) menghasilkan tingkat kelulushidupan yang berbeda-beda, lebih lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9 dan Lampiran 3.

Tabel 9. Data kelulushidupan ikan kerapu macan selama penelitian

Perlakuan	Ulangan (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	1	2	3		
50 ppm	100	66,67	0	166,67	55,56
100 ppm	100	100	16,67	216,67	72,22
150 ppm	100	100	66,67	266,67	88,89
200 ppm	83,33	100	100	283,33	94,44
Bakteri	16,67	0	16,67	33,34	11,11

Berdasarkan data kelulushidupan pada Tabel 9 diketahui bahwa persentase kelulushidupan tertinggi yaitu pada pemberian *A. acuminata* dengan dosis 200 ppm sebesar 94,44%. Hal ini diduga karena peran senyawa aktif yang terkandung dalam *A. acuminata* mampu meningkatkan sistem imun ikan kerapu macan. Berdasarkan penelitian Kulkarni (2008), menyatakan bahwa pule disebut juga sebagai kayu batu yang berasal dari tanaman hutan, tanaman ini banyak mengandung ditamine dan ekitamina yang bermanfaat sebagai imunstimulan dan antimikroba.

Nilai kelulushidupan ikan kerapu macan di akhir penelitian berkisar antara 11,11% - 94,44%. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kelulushidupan maka dilakukan perhitungan statistik menggunakan SPSS 16 pada Lampiran 3 dan didapatkan hasil sidik ragam yang dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Sidik ragam tingkat kelulushidupan ikan kerapu macan

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	Signifikansi
Perlakuan	4	13443,689	3360,922	3,076	0,068
Acak	10	10925,630	1092,563		
Total	14	24369,319			

Keterangan: Nilai Sig > α = 0,05 berarti data tidak berbeda nyata

Hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Alstonia acuminata* sebagai imunstimulan ikan kerapu macan tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kelulushidupan ikan kerapu macan, dimana ($p>0,05$).

Persentase kelulushidupan ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dipengaruhi oleh faktor abiotik seperti kemampuan menyesuaikan diri dengan lingkungan, penanganan manusia, padat tebar, kompetitor, umur serta predator. Pada penelitian ini saat pemeliharaan menggunakan bak plastik volume 30 liter yang menyebabkan ikan sulit beradaptasi karena di alam bebas habitat ikan kerapu macan di daerah karang. Hal ini sesuai dengan pendapat Tampubolon dalam Mulyadi (2009), ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) habitatnya di daerah karang, maka sering disebut ikan karang dan termasuk salah satu jenis ikan buas (*carnivore*).

4.3 Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor penting yang sangat mempengaruhi keberhasilan suatu usaha budidaya. Penurunan kualitas air akan menyebabkan nafsu makan berkurang, pertumbuhan terhambat, timbulnya penyakit dan kematian ikan (Amali, 2005). Selama penelitian berlangsung, pengukuran kualitas air dilakukan yang meliputi suhu, oksigen terlarut (DO) dan pH pada setiap wadah media pemeliharaan. Faktor-faktor tersebut turut diperhatikan selama penelitian berlangsung karena air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan itu sendiri.

a. Suhu

Suhu air sangat berpengaruh terhadap laju metabolisme dan pertumbuhan organisme perairan. Suhu air juga mempengaruhi jumlah makanan yang dikonsumsi oleh ikan. Pada penelitian ini didapatkan suhu sebesar 27-

30°C. Pada suhu rendah, akibat yang ditimbulkan antara lain ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi fungi dan bakteri patogen akibat melemahnya sistem imun (Irianto, 2005). Suhu di ruang relatif lebih tinggi dibandingkan suhu di ruang tertutup, dimana suhu outdoor 29 – 32 °C dan indoor 26 – 29 °C (Amali 2005). Menurut Sudrajat (2008), suhu yang ideal untuk pertumbuhan kerapu macan yaitu, 26 – 31 °C.

b. Salinitas

Salinitas selama penelitian berkisar 30 ppt, nilai tersebut masih layak bagi kelangsungan hidup ikan kerapu macan. Menurut Boyd (1982) salinitas merupakan kadar seluruh ion-ion yang terlarut dalam air. Salinitas air laut pada umumnya mempunyai kisaran 30 – 35 ppt. Salinitas pada penelitian sedikit diatas salinitas optimun untuk kerapu, tetapi benih kerapu masih bisa beradaptasi terhadap salinitas tersebut. Nilai salinitas yang ideal untuk kerapu macan yaitu berkisar antara 22 – 32 ppt (Sudrajat, 2008).

c. pH

Derajat keasaman (pH) air dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan. Perairan asam akan kurang produktif, malah dapat membunuh ikan. Pada penelitian ini diperoleh pengukuran pH berkisar 7,21 – 8,4. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putry (2011) bahwa usaha budidaya ikan akan berhasil baik dalam air dengan pH 6,5 – 9,0 dan pertumbuhan maksimal ikan terjadi pada pH 7 - 8. Menurut Boyd (1982) menyatakan bahwa kisaran pH yang cocok untuk kehidupan ikan adalah antara 6,5 sampai 9,0. Ikan kerapu akan sangat baik pertumbuhannya bila dipelihara pada air laut dengan pH berkisar antara 8,0 sampai 8,2 (Mulyadi, 1989).

d. Oksigen Terlarut atau Dissolved Oxygeni (DO)

Oksigen terlarut dalam air merupakan parameter kualitas air yang paling menentukan pada budidaya ikan. Penelitian ini diperoleh pengukuran oksigen terlarut berkisar 5 – 6 mg/liter. Pengukuran kualitas air pada bak pemeliharaan rata-rata masih menunjukkan keadaan yang normal untuk pertumbuhan kerapu macan, sehingga faktor lingkungan bukan merupakan faktor yang mempengaruhi prosentase kanibalisme ataupun pertumbuhan kerapu macan.

Kandungan DO secara umum tidak mengalami fluktuasi sehingga masih berada dalam kisaran yang baik untuk benih ikan. Boyd (1982) mengemukakan apabila kandungan oksigen terlarut dalam perairan $<1,0$ mg/liter akan menyebabkan kematian pada ikan, ikan akan bertahan hidup pada kisaran 1,0 – 5,0 mg/liter.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak kasar kayu pulai batu (*Alstonia acuminata*) sebagai immunostimulan terhadap jumlah sel makrofag pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

Hasil penelitian memberikan pengaruh berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar kayu pulai batu pada perlakuan B (100 ppm) merupakan dosis terbaik dan efisien sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan jumlah makrofag ikan kerapu macan. Dibandingkan dengan pada perlakuan D (200 ppm) yang merupakan nilai tertinggi, akan tetapi pada dosis 200 ppm kurang optimal sebagai imunostimulan. Ditunjang dengan nilai kualitas air sebagai media pemeliharaan selama penelitian yang masih berada pada kisaran toleransi ikan kerapu macan *E.fuscoguttatus*, yaitu : suhu 27 – 30 °C, salinitas 30 ppt, pH 7,21 – 8,4 dan DO 5-6 ppm.

5.2 Saran

1. Berdasarkan hasil penelitian untuk meningkatkan jumlah makrofag pada ikan kerapu macan *E.fuscoguttatus* yang terinfeksi bakteri *V.harveyi* disarankan menggunakan dosis ekstrak kayu pulai batu *A.acuminata* dengan dosis 200 ppm.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak kayu pulai batu *A.acuminata* untuk memperoleh dosis yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2012^a. Klasifikasi Kayu pulai Batu *A.acuminata*. <http://www.A.acuminata.org>. Diakses tanggal 01Mei 2012.
- _____. 2012^b. Gambar Kayu Pulai. <http://A.acuminata.org> Diakses tanggal .Diakses tanggal 01Mei 2012.
- _____. 2012^c.Gambar Kerapu Macan. <http://www.fishbase.org>. Diakses tanggal 01Mei 2012.
- _____. 2012^d. Gambar *V. harveyi*. <http://V.harveyi.org> Diakses tanggal 01Mei 2012.
- _____. 2012^e. Gambar Makrofag. <http://makrofag.org> Diakses tanggal 13Mei 2012.
- Andayani, S.2007. Pengaruh Bioaktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia sp*) sebagai Immunostimulan terhadap Aktifitas Bakterisida, Respon Imun Non Spesifik serta Kelulushidupan (RPS) Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*).Universitas Brawijaya. Malang.Hlm 23-24.
- _____. 2009. Respon Non Spesifik Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Terhadap Immunostimulan Senyawa Aktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia sp*) Melalui Pakan.Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya Malang. Kota Malang. Penelitian Hayati Edisi Khusus: 3b:hlm 67-73.
- _____. 2011. Aktivitas fagositosis Makrofag Dan Histopatologi Ginjal Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Setelah Diberi Immunostimulan Alkaloid Ubur-Ubur (*Bugainivilla Sp*) Dan Diinfeksi Vibrio Harveyi. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas brawijaya. Malang 6B. Hlm 13-17.
- Anderson, and P.Douglas. 1974. Fish Immunology. T.F.H. Dieses Of Fishes. T.F.H Publication, Lnc, Ltd. 564 hlm.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pober, J.S., 2000, Cellular and Molecular Immunology, 4th ed, WB Saunders Co, Philadelphia
- Agung, 2007. Penelurusan Efektifitas beberapa Bahan Alam sebagai Kandidat Antibakteri dalam mengatasi Penyakit *Vibriosis* pada Udang Windu. Makalah. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Pandjajaran. Jatinagor.
- Apriyanti, T. 2002. Analisa Ekstraktif dan Fitokimia Kulit Kayu, Akar serta Daun dari Jenis Pohon Pulai (*Alstonia Scholoris R.Br*) Sebagai Bahan Obat-obatan. Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda. Skripsi.Hlm 25-28.

Akmalia, M. 2011. Jenis Penyakit pada Kerapu dan Obatnya. <http://blogs.com>. diakses tanggal 12 juli 2012.

Amali, T. F. I. 2005. Pengaruh Pemberian *nannochloropsis sp*, Natan dan *Coccolith spp* pada Rotifera terhadap Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Larva Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Skripsi. Hlm 12

Antoro, S. dan Widiastuti, E. 2004. Pembenihan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Balai Budidaya Laut Lampung. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Perikanan. Lampung. 84 hlm.

Brenner, D.J, Noel, R. Krieg, James, T. Staley. 1982. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Second Edition Volume Two The Proteobacteria. Springer. USA.

Buller, N. B. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals : A Practical Identification Manual., CABI Publishing CAB International Wallingford Oxfordshire OX10 8DE . United Kingdom.

Besung, I. dan Nengah, K. 2009. (Alternative of Pegagan (*Centella asiatica*) to Diseases Prevention in Animal). Laboratorium Mikrobiologi Veteriner FKH Unud. Vol. 1 No. 2 Agustus 2009. 19 hlm.

Boyd, C.E. 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. England

Corwin E.J. 2009. Patofisiologi. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 842 hlm.

Dwidjoseputro, 1998. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta. 214 hlm.

Effendi, 2003. Biologi Perikanan. Yayasan Pustaka Nusantara. Bogor. 158 hlm.

Ellis, A.E. 1998. Immunity to bacterial in fish. Journal of Fish and Shellfish immunology. Hlm 25.

Fabiano, L. Thompson, Tetsuya, L. and Jean, S. 2004., Biodiversity of Vibrios, Microbiology And Molecular Biology Reviews, Sept. 2004 Vol. 68, No. 3.

Fariedah. F. 2010. Pengaruh Imunostimulan Outer Membrane Protein (Omp) *Vibrio alginolyticus* Dan Infeksi Bakteri *Vibrio harvey* terhadap DNA Mitokondria Udang Windu (*Paraneus monodon fab*). Tesis. Program Pascasarjana. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. Hlm 19.

Feliatra. 1999. Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio sp*) Di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau. Jurnal Natur Indonesia 11 (1): hlm 28 – 33.

Galindo, V. J. dan H. Hosokawa, 2004. Immunostimulants. Toward Temporary Prevention of Diseases in Marine Fish. Kochi University, Faculty of

Agriculture. Laboraty of Fish Nutrition 3200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502 JAPAN.

Gaspersz, 1991. Metode Perancangan Percobaan. Terjemahan CV. Armico, Bandung

Guyton, A.C. 1997. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. 9th. Jakarta.

Hadie, W, Angelia M.L, dan Uni P. 2010.Potensi Imunogenik Sel Utuh (Whole Cell) *Streptococcus agalactie* Yang Diinaktivasi Dengan Formalin Untuk Pencegahan Penyakit *Streptococois* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niliticus*).Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Bogor. Hlm 895.

Hall,I J.E dan Guyton, 2010. Fisiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta 689 hlm.

Harbone, J.B. 1984. Metode Fitokimia. Alih Bahasa: Kosasih, P. dan Iwang, S. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hlm 234-245.

Hanifah, R. 2011. Imunostimulan.medical-enter-healt.blogspot.com/imunostimu. Diakses tanggal 17 Maret 2012.

Hendriawan. 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak Sargassum Polycystum Sebagai Imunostimulan pada Ikan Kakap. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas brawijaya. Malang 6B. Hlm 15s-17

Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia (terjemahan). Badan penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Depertemen Kehutanan. Jakarta.

Indartik. 2009. Potensi Pasar Pulau (*Alstonia scholaris*) Sebagai Sumber Bahan Baku Industri Obat Herbal : Studi Kasus Jawa Barat dan jawa tengah.Peneliti pada Pusat Penelitian Sosial Ekonomi dan Kebijakan Kehutanan. Jl. Gunung Batu No. 5, Bogor. Vol. 6 No. 2 Juni 2009.Hlm. 159 – 175

Irianto, A., 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hlm.

Johnny, F. Koesharyani, I., Roza, D, Tridjoko, Giri, N.A, dan Suwiry, K.2001. Respon Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap Immunostimulan Peptidoglikan Melalui Pakan Pelet. Jur. Penel. Perikanan Indonesia. Vol. VII. No. 4, p. 52-56.

Johnny, F. Zafran, D. Roza dan I.N.A. Giri. 2002. Pengaruh vitamin C dalam pakan terhadap perubahan hemositologi ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Aquaculture Indonesia. 3(1):27-34.

Jun, L, Norman Y.S. Woo.2003. Pathogenicity of Vibrios in Fish: an Overview, Journal of Ocean University of Qingdao (Oceanic and Coastal Sea Research)October 31,2003, Vol.2, No.2

- Khusnia, 2004. Pinapisan Awal Senyawa Antibakteri dan Antioksidasi dari Kulit Batang Sentigi (*Pemphis acidula*).Depertemen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Hlm 1.
- Kordi, H. G. M. 2001. Pembesaran Kerapu Bebek di Keramba Jaring Apung di Tambak.Kanisius.Yogyakarta.132 Hlm.
- Kulkarni, Mrugaya, P. dan Archana, R, J. 2008. Effect of *Alstonia scholaris* (Linn) R.Br. on stress and cognition in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47 : 47-52.
- Kulsum, U. dan Gusmailina. 2003. Tanaman Obat asal Hutan sebagai Komoditi Hasil Hutan Bukan Kayu (HHBK) potensial (Bagian 1). Info Hasil Hutan Vol. 10 No. 2. Hlm 83 – 96. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Teknologi Hasil Hutan. Bogor
- Latama, 2011. Isolasi Bakteri Probiotik dari Usus Udang Windu dan Aplikasinya dalam upaya Pengendalian *Vibrio Harveyi* yang menginfeksi Larve Udang Windu (*Panaseus monodon fibricius*). Hlm 2.
- Mulyadi, 2009. Pengaruh Senyawa Bioaktif Total Fenol Rumput Laut *Sargassum duplicatum* Terhadap Hematologi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dan Uji Tantang dengan *Aeromonas hydrophila*. Tesis
- Natzir, 1999. Metode Penelitian. Penerbit Ghlmia Indonesia. Jakarta. 597 Hlm
- Noorhidayah dan Ibnu, H. 2008. Pemanfaatan Pulai (*Alstonia scholaris*) sebagai Bahan Obat Tradisional. Laboratorisnt Ekologi dan Dendrologi, FakuNas Keh~rranan Universitas Mtdawarman. Vol. 13, No. 1. RIMBA Kalimantan Fakultas Kehutanan Unmul, luni 2008, hlm 8 – 15
- Prajitno, A. 2005. Diktat kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. 104 hlm.
- Pelczar, M.J, 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Universitas Indonesia UI-Press. Jakarta 443 hlm.
- Perlak, I. L. 2009. Penanggulangan Hama Dan Penyakit Ikan. <http://blogs.com>. diakses tanggal 11 Juni 2012.
- Putry,I. W. 2011. Budidaya Ikan Kerapu. <http://blogs.com>. diakses tanggal 10 Juli 2012
- Raa, J. 2000. The Use of Immune-Stimulants in Fish and Shellfish Feeds. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A.y del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico. Hlm 23.
- Renggaris, I. dan Karnen, G.B. 2009. Imunologi Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 721 hlm.

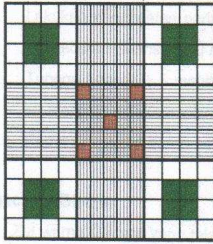
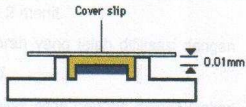
- Robbins, 2007. Patologi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 362 hlm.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Institut Teknologi Bandung.(ITB) Bandung. Hlm 71.
- Sanoesi, E. 2008^a. Penggunaan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya linn*) terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- _____. 2008^b. Penggunaan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya linn*) terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Sidiyasa. 1998. Taxonomy, Phylogeny, and Woodanatomy of Alstonia (Apocynaceae) BLUMEA supplement II. Journal of Plant Taxonomi and Plant Geography. Rijks Herbrrium. Nitherland.
- Soerianegara, I. and R.H.M.J. Lemmens. 1994. Plant Recources of South-East Asia 5 (1) Timber Trees Major : Comersials Timbers Prosea Bogor. Hlm 23-25.
- Stoskopf, M.K. 1993. Enviromental Requitments Of Marine Tropical Fishes in Fish Medicine. In Stoskopf, M.K (ed) W.B, Saunders Company. Philadelphia. 618-625 p
- Sudrajat, A. 2008. Budidaya 23 Komoditas Laut Menguntungkan. Penebar Swadaya, Jakarta. 172 hlm.
- Surakhmad, W. 1985.Dasar dan Teknik Research: Pengantar Metodologi Ilmiah. Tarsito. Bandung. 105 Hlm.
- Suriawan, A. dan Febriko, S. 2010. Budidaya Kerapu Di Jaring Apung. Kementrian Kelautan Dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Balai Budidaya Air Payau Situbondo. 32 hlm.
- Suryadi,E, Feliatra, dan Irwan. E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Laboratorium Mikrobiologi Laut, Faperika, Universitas Riau, Pekanbaru.vol 6(2): 75-80 hlm..
- Sutrisna, A. 2011. Pertumbuhan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus* forsskal, 1775) Di Perairan Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor . Bogor. Hlm 3-4.

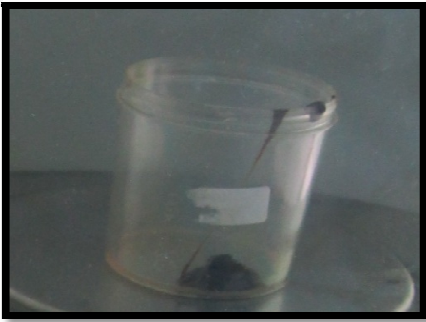
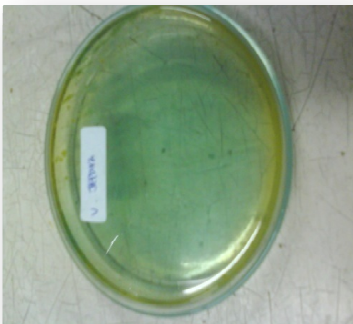
- Triana, E.E, Kusmardi dan Shirly, K. 2007. Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. Fakultas Farmasi. Universitas Pancasila. Jakarta. Vol 11. No 2. Hlm 50-53.
- Tim Mikrobiologi. 2003. Bakteriologi Medik. Bayumedia Publishing. Malang. 373 hlm.
- Van, W. B.and M. Wink. 2004. Medicinal Plants of the Word. An Illustrated Scientific guide to important medicinal plants and their uses. Briza Publication. Cape Tawn. Hlm 27-29.
- Widiyani, S.2007. Efikasi dan preferensi Biskuit yang Difortifikasi Vitamin A dan Zat Besi (Fe) dan Kaitannya Dengan Konsumsi, Status Gizi Dan Respons Imun Anak Balita. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Tesis. Hlm 26.
- www. Republika.co.id. Atasi Demam dengan Pulai. Diambil tanggal 30 September 2012.
- Yadi, P. D.D, Koerdi, N, Dian R.F, Tri W. dan R, Aan, I.A. 2008. RSSNC Newslatter. Rumpin Seed Source and Nursery Center. Rumpin-Bogor. Hlm 1.
- Yanuhar,U. 2001. Respon Immun Sel Interleukis -4 (IL-4) pada Ikan Kerapu Tikus (*E. epitelis*) yang dipapar Protein Immunogenik *Vibrio harveyi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. Jurnal Kelautan, Volume 4, no.2. hlm 26.
- Yuswanto, 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanolik Daun Sembung (*Blumeae folium*) terhadap Fagositosis Makrofag pada Monosit Jantan yang diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hlm 2.
- Zafran, 2008. Studi Pendahuluan Pemanfaatan Miselia Jamur *Lagenodium* sebagai Immunostimulan dalam Pemeliharaan Ikan Kerapu. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. Singapura. Hlm 61.
- Zuraida, 2011. Kajian Tata Niaga Kulit Pulai (*Galstonia Scholaris*) sebagai Bahan Baku Obat Hipertensi (Antihipertensi) di Propinsi Jawa Tengah. Fakultas Kehutanan. Institut Bogor. Kampus Dermaga. Bogor. Hlm 316.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Alat dan Bahan

No	Nama Alat dan Bahan	Gambar
1	Refraktometer	
2	pH Meter	
3	Termometer	

4	Mikroskop	
5	DO Meter	
6	Timbangan Digital	
7	Haemocytometer	  Dimensions of Neubauer ruling on Haemocytometer Haemocytometer in cross section - Area filled by counting solution - Area across which the grid is etched on the slide - Areas for counting red blood cells - Areas for counting white blood cells

8	Ekstrak <i>Alstonia acuminata</i>	
9	Kerapu Macan (<i>Epinephelus fuscogutattus</i>)	
10	Bakteri <i>Vibrio Harveyi</i>	

Lampiran 2. Perhitungan Jumlah Makrofag pada Ikan Kerapu Macan (*E.fuscoguttatus*) selama Penelitian

Pengamatan Jumlah Makrofag Hari Ke-1

Dalam 10^7 sel/ml

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
K	2,7	2,9	2,8
A	5	5,7	5,5
B	8	8,8	8,7
C	11,8	11,6	12,3
D	13,8	13,7	14,6

Dalam Log

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata	Std. Deviasi
K	7,43	7,46	7,45	22,34	7,45	.01528
A	7,70	7,76	7,74	23,20	7,73	.03055
B	7,90	7,94	7,93	23,78	7,93	.02082
C	8,07	8,06	8,09	24,23	8,08	.01528
D	8,14	8,14	8,16	24,44	8,15	.01155
Total				117,98	39,33	.26178

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAH
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	7.8647
	Std. Deviation	.26178
Most Extreme Differences	Absolute	.172
	Positive	.139
	Negative	-.172
Kolmogorov-Smirnov Z		.667
Asymp. Sig. (2-tailed)		.765

a. Test distribution is Normal

Nilai Z = 0.667 ($\alpha > 0,05$) jadi, data diatas normal

Lampiran 2. (Lanjutan)

Deskriptif

Perlakuan	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error	Selang Kepercayaan 95%	
					Batas Atas	Batas Bawah
K	3	7.4467	.01528	.00882	7.4087	7.4846
A	3	7.7333	.03055	.01764	7.6574	7.8092
B	3	7.9233	.02082	.01202	7.8716	7.9750
C	3	8.0733	.01528	.00882	8.0354	8.1113
D	3	8.1467	.01155	.00667	8.1180	8.1754
Total	15	7.8647	.26178	.06759	7.7197	8.0096

Ket: Standart deviasi adalah nilai batas antara data dengan grafik regresi
Standart eror adalah indeks kesalahan dalam menentukan hipotesis

ANOVA

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	0.955	4	0.239	607.271	0.000
Acak	0.004	10	0.000		
Total	0.959	14			

Ket: <0,05 Berbeda nyata

Beda Nyata Jujur (BNJ)

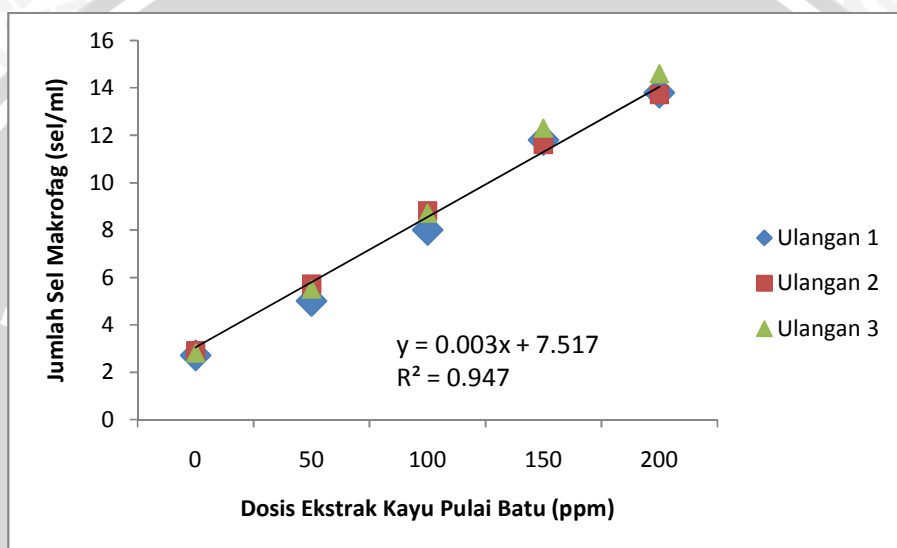
PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05				
		a	b	c	d	e
K	3	7.4467				
A	3		7.7333			
B	3			7.9233		
C	3				8.0733	
D	3					8.1467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Lampiran 2. (Lanjutan)

Ringkasan Model dan Estimasi Parameter

	Ringkasan Model					Estimasi Parameter	
	R	F	db1	db2	Sig.	Konstan	b1
Regresi							
Linear	0.947	231.099	1	13	.000	7.517	0.003

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 0.003x + 7.517$



Grafik Hubungan Pemberian Ekstrak Kayu Pulai Batu dengan Jumlah Makrofag pada Pengamatan Hari Ke-1

Lampiran 2. (Lanjutan)

Pengamatan Jumlah Makrofag Hari ke-8

Dalam 10^7 sel/ml

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
K	2,2	2,4	2,6
A	7,4	7,6	7,8
B	10,1	10,3	10,5
C	12,4	13,2	13,7
D	14	14,1	14,5

Dalam log

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata	Std. Deviasi
K	7,34	7,38	7,41	22,14	7,38	.03512
A	7,87	7,88	7,89	23,64	7,88	.01000
B	8,00	8,01	8,02	24,04	8,01	.01000
C	8,09	8,12	8,14	24,35	8,12	.02517
D	8,15	8,15	8,16	24,46	8,15	.00577
Total				118,63		

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAH
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	7.9073
	Std. Deviation	.29227
Most Extreme Differences	Absolute	.249
	Positive	.194
	Negative	-.249
Kolmogorov-Smirnov Z		.965
Asymp. Sig. (2-tailed)		.309

a. Test distribution is Normal

Nilai Z =965 ($\alpha > 0,05$) jadi, data diatas normal

Lampiran 2. (Lanjutan)

Deskriptif

Perlakuan	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error	Selang Kepercayaan 95%	
					Batas Atas	Batas Bawah
K	3	7.3767	.03512	.02028	7.2894	7.4639
A	3	7.8800	.01000	.00577	7.8552	7.9048
B	3	8.0100	.01000	.00577	7.9852	8.0348
C	3	8.1167	.02517	.01453	8.0542	8.1792
D	3	8.1533	.00577	.00333	8.1390	8.1677
Total	15	7.9073	.29227	.07546	7.7455	8.0692

Ket: Standart deviasi adalah nilai batas antara data dengan grafik regresi
Standart error adalah indeks kesalahan dalam menentukan hipotesis

ANOVA

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	0.961	1	0.961	53.251	0.000
Acak	0.235	13	0.018		
Total	1.196	14			

Ket: <0,05 Berbeda nyata

Beda Nyata Jujur (BNJ)

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	Dd
K	3	7.3767			
A	3		7.8800		
B	3			8.0100	
C	3				8.1167
D	3				8.1533
Sig.		1.000	1.000	1.000	.258

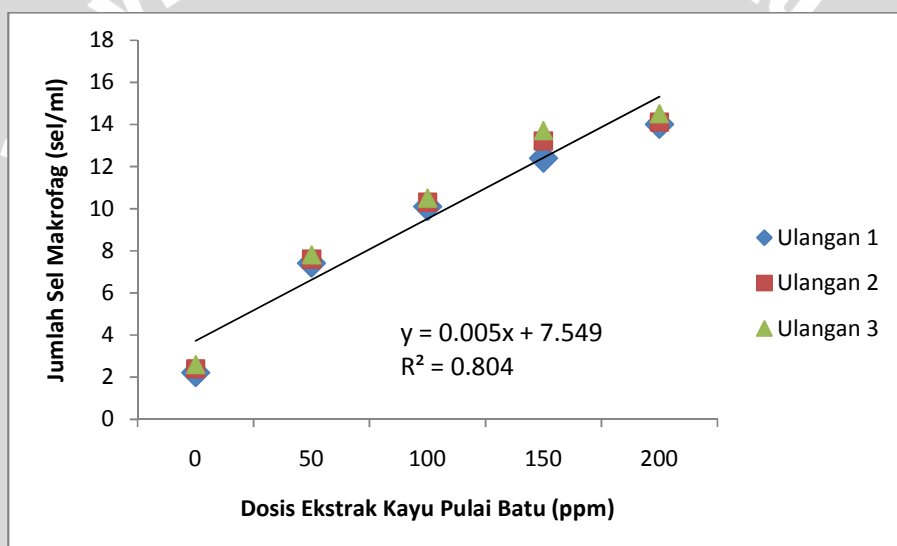
Ket: <0,05 Berbeda nyata

Lampiran 2. (Lanjutan)

Ringkasan Model dan Estimasi Parameter

Regresi	Ringkasan Model					Estimasi Parameter	
	R Kuadrat	F	db1	db2	Sig.	Konstan	b1
Linear	0.804	53.251	1	13	.000	7.549	0.004

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 0.004 + 7.549$



Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Kayu Pulai Batu dengan Jumlah Makrofag pada Pengamatan Hari Ke-8

Lampiran 2. (Lanjutan)

Pengamatan Jumlah Makrofag Pra Infeksi

Dalam 10^7 sel/ml

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
K	3,3	3,5	3,7
A	4,1	4,2	4,3
B	4,2	4,2	4,5
C	4,4	4,7	5
D	6	6,1	6,5

Dalam log

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata	Std. Deviasi
K	7,52	7,54	7,57	22,63	7,54	.02517
A	7,61	7,62	7,63	22,87	7,62	.01000
B	7,62	7,62	7,65	22,90	7,63	.01732
C	7,64	7,67	7,70	23,01	7,67	.03000
D	7,78	7,79	7,81	23,38	7,79	.01528
Total				114,79		

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAH
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	7.6507
	Std. Deviation	.08540
Most Extreme Differences	Absolute	.170
	Positive	.170
	Negative	-.135
Kolmogorov-Smirnov Z		.658
Asymp. Sig. (2-tailed)		.780

a. Test distribution is Normal

Nilai Z = 658 ($\alpha > 0,05$) jadi, data diatas normal

Lampiran 2. (Lanjutan)

Deskriptif

Perlakuan	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error	Selang Kepercayaan 95%	
					Batas Atas	Batas Bawah
K	3	7.5433	.02517	.01453	7.4808	7.6058
A	3	7.6200	.01000	.00577	7.5952	7.6448
B	3	7.6300	.01732	.01000	7.5870	7.6730
C	3	7.6700	.03000	.01732	7.5955	7.7445
D	3	7.7933	.01528	.00882	7.7554	7.8313
Total	15	7.6513	.08667	.02238	7.6033	7.6993

Ket: Standart deviasi adalah nilai batas antara data dengan grafik regresi
Standart error adalah indeks kesalahan dalam menentukan hipotesis

ANOVA

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	0.091	1	0.091	81.795	0.000
Acak	0.014	13	0.001		
Total	0.105	14			

Ket: <0,05 Berbeda nyata

Beda Nyata Jujur (BNJ)

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	Dd
K	3	7.3767			
A	3		7.8800		
B	3			8.0100	
C	3				8.1167
D	3				8.1533
Sig.		1.000	1.000	1.000	.258

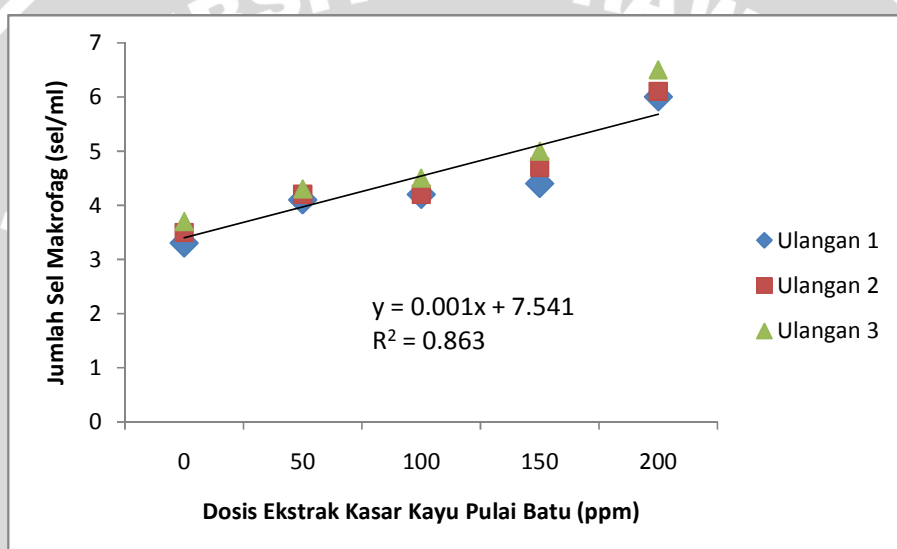
Ket: <0,05 Berbeda nyata

Lampiran 2. (Lanjutan)

Ringkasan Model dan Estimasi Parameter

Regresi	Ringkasan Model					Estimasi Parameter	
	R Kuadrat	F	db1	db2	Sig.	Konstan	b1
Linear	0.863	81.795	1	13	0.000	7.541	0.001

Sehingga persamaan hubungan antara dua variabel tersebut berbentuk linier yaitu $y = 0.001x + 7.541$



Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Kayu Pulau Batu dengan Jumlah Makrofag pada Pengamatan Pra Infeksi

Lampiran 3. Data *Survival Rate* (SR) Selama Penelitian

Perlakuan	Ulangan	Lama Pemeliharaan (Hari ke)							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
50 ppm	1	6	6	6	6	6	6	6	100
	2	6	6	6	6	6	5	4	66.67
	3	6	6	6	5	5	5	0	0.00
100 ppm	1	6	6	6	6	6	6	6	100.00
	2	6	6	6	6	6	6	6	100.00
	3	6	6	6	6	1	1	1	16.67
150 ppm	1	6	6	6	6	6	6	6	100.00
	2	6	6	6	6	6	6	6	100.00
	3	6	6	6	6	6	6	4	66.67
200 ppm	1	6	6	5	5	5	5	5	83.33
	2	6	6	6	6	6	6	6	100.00
	3	6	6	6	6	6	6	6	100.00
Bakteri	1	6	5	3	3	2	1	1	16.67
	2	6	6	4	2	2	2	0	0.00
	3	6	4	3	3	1	1	1	16.67

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SR
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	64.44
	Std. Deviation	4.17
Most Extreme Differences	Absolute	.270
	Positive	.207
	Negative	-.270
Kolmogorov-Smirnov Z		1.044
Asymp. Sig. (2-tailed)		.226

a. Test distribution is Normal.

Nilai Z = 1,044 ($\alpha > 0,05$) jadi, data diatas normal

Descriptives

SR	perlakuan	Rata - rata	Standar Deviasi	Standar Error	Nilai Kepercayaan 95%	
					Terendah	Tertinggi
0		11.1133	9.62443	5.55667	-12.7951	35.0217
50		55.5567	50.91787	29.39745	-70.9303	182.0437
100		72.2233	48.11060	27.77667	-47.2900	191.7367
150		88.8900	19.24308	11.11000	41.0875	136.6925
200		94.4433	9.62443	5.55667	70.5349	118.3517
Total		64.4453	41.72128	10.77239	41.3409	87.5498

ANOVA

SR					
	Jk	db	Kt	F hitung	Sig.
Perlakuan	13443.689	4	3360.922	3.076	.068
Acak	10925.630	10	1092.563		
Total	24369.319	14			

Nilai Sig > $\alpha = 0,05$ berarti data tidak berbeda nyata