

**PENGARUH IMMUNOSTIMULAN BAKTERIN *Vibrio alginolyticus*
TERHADAP RESPON IMMUN SELULER UDANG WINDU
(*Penaeus monodon*) YANG DIPAPAR
BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

**Skripsi
BUDIDAYA PERAIRAN**

**Oleh
SUMISDIYANTO
NIM. 0210858001**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2009**

**PENGARUH IMMUNOSTIMULAN BAKTERIN *Vibrio alginolyticus*
TERHADAP RESPON IMMUN SELULER UDANG WINDU
(*Penaeus monodon*) YANG DIPAPAR
BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

Oleh :
SUMISDIYANTO
NIM. 0210858001

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS.

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. MAFTUCH, MSi.

Tanggal :

Dosen penguji II

Dosen Pembimbing II

Ir. M. RASYID FADHOLI, MSi.

Tanggal :

Ir. ELLANA SANOESI, MP.

Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua jurusan MSP**

Ir. MAHENNO SRI WIDODO, MS

Tanggal :

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr.wb

Alhamdulillah penulis panjatkan atas rahmat, karunia dan ridho-Nya, pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul PENGARUH IMMUNOSTIMULAN BAKTERIN *Vibrio alginolyticus* TERHADAP RESPON IMMUN SELULER UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) YANG DIPAPAR BAKTERI *Vibrio alginolyticus*.

Laporan ini diharapkan dapat memberikan pemahaman dan pengetahuan tentang potensi bakterin *V. alginolyticus* sebagai immunostimulan dalam usaha preventif mengatasi infeksi sekunder yang didominasi vibriosis pada usaha budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) yang terserang penyakit *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) ditengah kondisi lingkungan yang mengalami kerusakan.

Penulis menyadari dalam penyusunan laporan ini masih banyak kekurangan dan kekeliruan. Saran dan kritik yang konstruktif sangat penulis harapkan. Akhirnya semoga laporan Sekripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkannya.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Malang, 27 Juli 2009

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih atas bantuan dan dukungannya selama ini dalam rangka menyelesaikan skripsi sebagai tugas akhir tingkat sarjana kepada :

1. Ibu dan Ayah tercinta, yang tak pernah putus doa'nya dan memberikan segalanya pada penulis. Semoga Allah SWT mengasihi dan menyayangi mereka dan menjadikan penulis sebagai anak yang sholeh dan bertaqwah.
2. Dr. Ir. Maftuch, MSi, selaku dosen pembimbing I dan Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku pembimbing II, yang telah berkenan meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, petunjuk, saran, dan koreksinya.
3. Mbak Mi, Mbak Win, Mbak Amix dan Dik Umi yang telah membantu finansial selama penulis melaksanakan kuliah hingga Penelitian skripsi, semoga pengorbanan anda sekalian menjadi amal ibadah yang diterima Allah SWT dan bisa saya balas dimasa yang akan datang .
4. Dik Windy dan dik Agus yang selalu memberi dukungan dan motivasi untuk berpikir positif dan mengambil hikmah dari semua kejadian yang penulis alami selama kuliah di Malang.
5. Dik Ricky yang selalu memberi motivasi dan semangat untuk cepat lulus kuliah dengan berbagai pengalaman pahit dan manis terutama kerjasama berwirausaha katering. Pengalaman tersebut membuat penulis untuk kembali bangkit dari keterpurukan dan membangun kepribadian yang lebih positif .
6. Takhir kepada teman-teman di Lab PPI dan berbagai pihak serta Laboran lab PPI (Mbak Titin) dan Laboran lab IIP (Pak Soel) yang selalu mendukung penulis.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR GRAFIK	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
1.5 Hipotesis	6
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biologi Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i>)	7
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	7
2.1.2 Distribusi dan Siklus Hidupnya	9
2.1.3. Sistem Pertahanan Udang	10
2.1.3.1 Sistem Immunitas Udang.....	10
2.1.3.2 Himogram	11

2.1.3.3 Fungsi Pertahanan <i>Krustasea</i>	17
2.2 Biologi <i>Vibrio alginolyticus</i>	22
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	22
2.2.2 Aktivitas dan Pertumbuhan	23
2.2.3 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangannya	24
2.3 Immunostimulan	24

BAB III MATERI DAN METODELOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian	27
3.1.1 Bahan-Bahan Penelitian	27
3.1.2 Alat-Alat Penelitian	28
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian.....	29
3.3 Prosedur Penelitian	30
3.3.1 Persiapan Hewan Uji	30
3.3.2 Perbanyakan <i>Vibrio alginolyticus</i>	30
3.3.3 Pemanenan Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	31
3.3.4 Pembuatan Bakterin	31
3.3.5 Pemaparan <i>Penaeus monodon</i> dengan <i>V. alginolyticus</i>	32
3.3.6 Sampling Hemosit	32
3.3.7 Pengamatan Total Protein pada Plasma Hemosit (<i>Total Plasma Protein/TPP</i>)	31
3.3.8 Pengamatan Hemosit	33
3.3.8.1 Jumlah Total Hemosit (<i>Total Haemocyte Count/THC</i>).....	33
3.3.8.2 Jumlah Diferensial hemosit (<i>Differential Haemocyte Count/ DHC</i>)	33
3.3.9 Pengamatan Gejala klinis <i>P. monodon</i> Setelah Terinfeksi <i>V. alginolyticus</i> ...	34
3.3.10 Pengukuran Kualitas Air	34
3.4 Parameter Uji	35
3.4.1Parameter Utama	35
3.4.2 Paremeter penunjang	35
3.5 Analisa Data	35

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil	36
4.1.1 Jumlah Total Haemosit (<i>Total Haemocyte Count/THC</i>)	36
4.1.2 Jumlah Hemosit Differensial (<i>Differential Haemocyte Count/ DHC</i>)	41
4.1.2.1 Sel Hyalin	42
4.1.2.2 Sel Semigranular	44
4.1.2.3 Sel Granular	45
4.1.3 Total Protein pada Plasma Hemosit (<i>Total Plasma Protein/TPP</i>)	47
4.1.4 Perubahan Gejala klinis	49
4.1.5 Kualitas air	50
4.2 Pembahasan	51

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	58
5.2 Saran.....	58

DAFTAR PUSTAKA	59
-----------------------------	----

LAMPIRAN	67
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan klasifikasi hemosit oleh beberapa penulis yang berbeda	12
2. Perbedaan jenis hemosit krustasea	14
3. Karakteristik hemosit dari <i>Penaeus monodon</i>	15
4. Rata-rata jumlah total hemosit (THC)	17
5. Protein yang diisolasi dari <i>Penaeus monodon</i>	19
6. Perbandingan reagen dengan protein	33
7. Pengaruh bakterin terhadap THC (10^8 sel/ml)	36
8. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel hyalin (%).....	42
9. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel semigranular (%)	44
10. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel granular (%)	46
11. Pengaruh bakterin terhadap total protein pada plasma hemosit	48
12. Nilai parameter kualitas air selama penelitian	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi ekternal <i>Penaeus monodon</i>	8
2. Anatomi internal <i>Penaeus monodon</i>	9
3. Siklus hidup <i>Penaeus monodon</i>	10
4. Tipe hemosit <i>Penaeus monodon</i> yang diamati dengan mikroskop cahaya	15
5. Tipe hemosit <i>Penaeus monodon</i> yang diamati dengan mikroskop elektron	16
6. Ilustrasi dari faktor-faktor yang berperan dalam pertahanan krustasea	19
7. Peranan immunostimulan dalam mekanisme sistem pertahanan tubuh udang	26
8. Tiga sel hemosit <i>Penaeus monodon</i>	41
9. Model produksi dan maturasi hemosit	55

DAFTAR GRAFIK

Grafik	Halaman
1. Pengaruh bakterin terhadap THC	36
2. Pengaruh bakterin terhadap THC pada 0 jam	38
3. Pengaruh bakterin terhadap THC pada 48 jam pasca uji tantang	39
4. Pengaruh bakterin terhadap THC pada 96 jam pasca uji tantang	41
5. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel hyalin	43
6. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel semigranular	45
7. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel granular	47
8. Pengaruh bakterin terhadap total protein pada plasma hemosit	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perubahan gejala klinis	67
2. Data terkait analisis statistik THC	71
3. Data terkait analisis statistik sel hyalin	79
4. Data terkait analisis statistik sel semigranular	81
5. Data terkait analisis statistik sel granular	83
6. Data terkait analisis statistik TPP	85

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan salah satu komoditas budidaya perairan yang utama di Indonesia. Namun, dengan memperhatikan pencapaian produksi udang hasil budidaya terjadi penurunan produksi (Harris, 2000). Hal ini terlihat dari tahun 1999 - 2004, dimana produksi ditambak mengalami peningkatan dari 83.223 ton menjadi 95.403 ton tetapi produksi udang turun dari 21.279 ton menjadi 19.555 ton pada tahun yang sama (Anonymous, 2006). Penurunan produksi signifikan dengan kegagalan panen yang dialami petambak sejak akhir tahun 1980an, yang antara lain disebabkan oleh terjadinya degradasi lingkungan dan munculnya berbagai penyakit (Van de Braak, 2002).

Penyakit pada udang diklasifikasikan dalam 2 kelompok yaitu penyakit infeksi dan penyakit non infeksi. Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen seperti parasit, jamur, bakteri dan virus yang dapat menular dari satu inang ke inang yang lain melalui air atau sentuhan langsung antar inang, inang perantara, peralatan dan aktifitas manusia (Rodriguez dan Moullac, 2000). Adapun penyakit non infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan non patogen seperti nutrisi, kualitas air dan racun (Murdjani *et al*, 2003).

Bakteri penyebab utama terjadinya kematian massal pada pembenihan dan pembesaran udang di kawasan Asia. Bakteri yang paling dominan ditemukan pada pembenihan udang di Indonesia adalah *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela* dan *Vibrio*

harveyi (Sargeloos *et al.*, 2000), pada pembesaran udang di Indonesia yang paling banyak ditemukan adalah *Vibrio harveyi*. Jayaree (2000) menemukan *Vibrio alginolyticus*, *V. Parahaemolyticus* dan *V. Anguillarrum* bersifat menyerang bila keadaan memungkinkan serta penyebab utama infeksi sekunder pada udang yang terserang *White Spot Syndrome Virus* (WSSV).

Pada saat terjadinya serangan patogen yang pertama kali berperan dalam sistem pertahanan tubuh udang adalah kutikula yang memiliki kemampuan antimikroba melalui lendir yang dihasilkan. Pertahanan selanjutnya adalah hemosit yang memiliki peranan yang sangat penting dalam pertahanan internal udang (Van de Braak, 2002).

Penyelesaian atau penanggulangan penyakit menggunakan antibiotik sangat tidak dianjurkan karena penggunaan antibiotik dapat menimbulkan resistensi, penumpukan residu pada daging udang dan pencemaran lingkungan (Wu dan Chang, 1981). Selain itu menurut Kurmaly (1992) penggunaan antibiotik hanya efektif terhadap infeksi bakteri dan tidak mempunyai aktifitas terhadap virus. Lebih lanjut Kamiso (2004) menjelaskan udang tidak mempunyai sistem pertahanan adaptif sehingga vaksinasi kurang efektif.

Untuk mengatasi hal tersebut maka penanggulangan penyakit secara preventif dapat dilakukan melalui peningkatan mekanisme kekebalan tubuh udang yang non spesifik yaitu melalui pemberian immunostimulan. Menurut Ellis (1988), immunostimulan merupakan suatu zat yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan terhadap penyakit infeksi dengan meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh yang bersifat non spesifik. Studi yang telah ada menyatakan bahwa sejumlah substansi seperti β -1,3 glucan, Lipopolysakarida (LPS), peptidoglikan, dan

endotoxin atau bakteri yang dimatikan (bakterin) dapat meningkatkan respon immun krustasea (Boonyaratpalin *et al.*, 1999). Salah satu tanda meningkatnya daya tahan tubuh oleh pemberian imunostimulan adalah meningkatnya kemampuan fagositosis karena adanya peningkatan jumlah dan kemampuan sel fagosit pada udang yang diperankan oleh hemosit.

Bakteri *vibrio alginolyticus* yang hidup diperairan laut dan payau ternyata selain menjadi patogen bagi pembenihan ikan kerapu juga memberi keuntungan. Banyak data yang mendukung akan hal itu, antara lain: di Ecuador bakteri *Vibrio alginolyticus* digunakan sebagai probiotik di industri udang (Austin, 2004), penelitian Garriques dan Arevalo (1995) menyimpulkan bahwa bakteri ini mempunyai suatu karakter yang bisa melindungi dari serangan penyakit. Gatesoupe (1990) mendeteksi *Vibrio alginolyticus* pada rotifer yang sehat dan menemukan hubungan yang positif antara kelulushidupan (*survival rate*) dari larva turbot dan porposi *Vibrio alginolyticus* di lingkungan pemeliharaan. Outer Membrane protein (Omp) dari *Vibrio alginolyticus* dengan berat molekul 42,95 KDa dapat dibuat sebagai kandidat vaksin (Maftuch, 2006).

Oleh karena pertimbangan keuntungan diatas dan kemudahan pembuatan, kepraktisan, efisiensi waktu dan tenaga dari petani udang, maka *Vibrio alginolyticus* dibuat bakterin untuk digunakan sebagai immunostimulan. Penelitian ini dilakukan guna memberi gambaran tentang efektifitas bakterin *Vibrio alginolyticus* dalam peningkatan kekebalan tubuh udang ketika terserang penyakit.

1.2 Rumusan Masalah

Oleh karena tidak efektifnya penggunaan antibiotik maupun vaksin dalam penanggulangan penyakit pada budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) maka penanggulangan penyakit secara preventif dapat dilakukan melalui peningkatan kekebalan tubuh udang yang non spesifik dengan pemberian immunostimulan. Berbagai substansi yang bisa digunakan untuk pembuatan immunostimulan yaitu β -1,3 glucan, Lipopolysakarida (LPS), Peptidoglikan (PG) dan endotoxin atau bakteri yang dimatikan (bakterin). Dalam penggunaan immunostimulan, bahan yang potensial jadi immunostimulan adalah bakteri. Jenis bakteri yang digunakan sebagai bakterin adalah *Vibrio alginolyticus*, mengingat bakteri ini dijadikan probiotik dan Outer Membrane Proteinnya (Omp) bisa dibuat vaksin

Salah satu tanda meningkatanya daya tahan tubuh udang oleh pemberian immunostimulan adalah meningkatnya kemampuan fagositosis yang pada udang diperankan oleh hemosit. Untuk itu rumusan masalahnya adalah :

Apakah pemberian bakterin *Vibrio alginolyticus* akan meningkatkan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah diferensial hemosit (*Differential Haemocyte Count/DHC*) dan Total Protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Protein TPP*) udang windu (*Penaeus monodon*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh bakterin *vibrio alginolyticus* terhadap respon immun seluler udang windu (*Penaeus monodon*) melalui penghitungan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah diferensial hemosit

(*Differential Haemocyte Count/ DHC*) dan Total Protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Protein/TPP*).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Informasi dan pengetahuan tentang pengaruh penggunaan bakterin *Vibrio alginolyticus* terhadap peningkatan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah diferensial hemosit (*Differential Haemocyte Count/ DHC*) dan Total Protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Protein/TPP*) pada udang windu (*Penaeus monodon*) memberikan sumbangan baru bagi ilmu pengetahuan bidang imunologi perikanan di Indonesia. Pengetahuan ini dapat digunakan untuk menentukan strategi peningkatan kekebalan tubuh udang windu (*Penaeus monodon*).
2. Pemberian bakterin *Vibrio alginolyticus* memberikan pengetahuan tentang respon immun seluler non spesifik yang menambah pemahaman tentang teori immunologi invertebrata.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Terbukti bakterin *Vibrio alginolyticus* sebagai pemicu peningkatan kekebalan tubuh udang non spesifik ini berguna sebagai bahan immunostimulan untuk mengatasi penyakit vibriosis pada udang windu (*Penaeus monodon*).
2. Uji tantang udang windu dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* secara in vivo memberikan informasi dan pengetahuan penting tentang indikator kemampuan

lamanya bertahan hidup udang windu (*Penaeus monodon*) yang selanjutnya dapat digunakan sebagai pengambilan keputusan tindakan yang harus segera diambil.

1.5 Hipotesis

1. H_0 : Pemberian bakterin *Vibrio alginolyticus* tidak akan meningkatkan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah diferensial hemosit (*Differential Haemocyte Count/DHC*) dan total protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Protein TPP*) udang windu (*Penaeus monodon*)

H_1 : *Pemberian* bakterin *Vibrio alginolyticus* akan meningkatkan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah deferensial hemosit (*Differential Haemocyte Count/DHC*) dan total protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Protein TPP*) udang windu (*Penaeus monodon*).

1.6 Waktu Dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan bulan April sampai Mei 2009 di Workshop, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Udang Windu (*Penaeus monodon*)

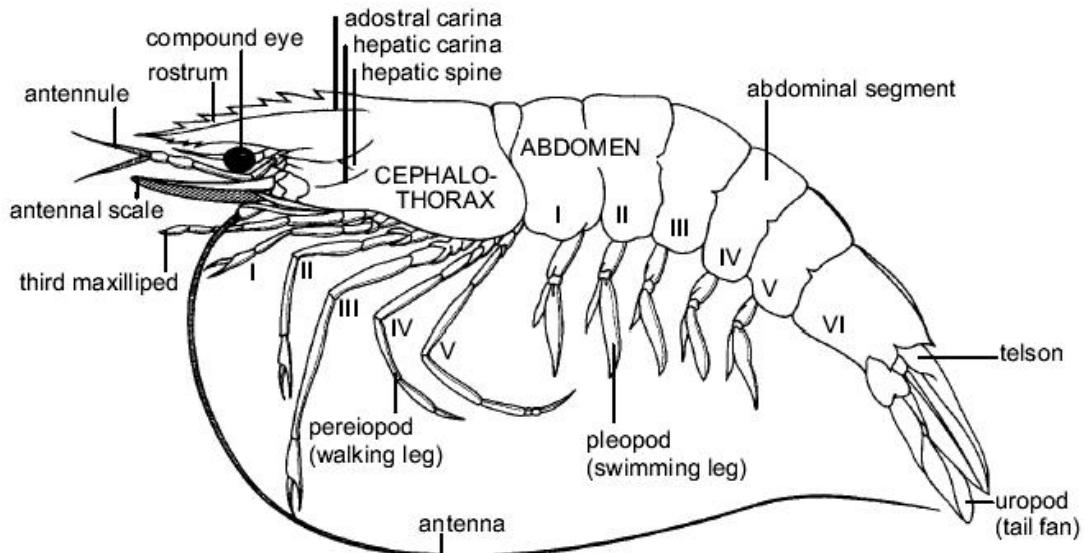
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Udang penaeid tergabung pada phylum terbesar di kingdom yaitu Arthropoda. Kelompok ini dicirikan dengan terdapatnya sepasang apendik dan lapisan kutikula atau eksoskeleton yang menutupi seluruh permukaan tubuhnya. Udang penaeid berada pada subphylum krustasea yang memiliki 10 kelas dan dari 42.000 spesies paling dominan hidup di air. Tergabung dalam kelas *Malacostraca*, udang bersama *crayfish*, lobster dan kepiting termasuk dalam ordo decapoda (Van de Braak, 2002). Berikut ini klasifikasi lengkap dari udang windu (*Penaeus monodon*) menurut Van de Braak (2002)

Phylum	:	Arthropoda
Subphylum	:	Crustacean
Kelas	:	Malacostraca
Ordo	:	Decopoda
Superfamily	:	Penaeoidea
Family Penaeidae	:	Rafinesque, 1815
Genus	:	Penaeus
Subgenus	:	Penaeus
Spesies	:	<i>Penaeus monodon</i> .

Bagian terluar udang penaeid yang nampak adalah *cephalothorax* dengan ciri rostrum keras dan abdomen bersegmen (Gambar 1). Insang, saluran pencernaan dan hati

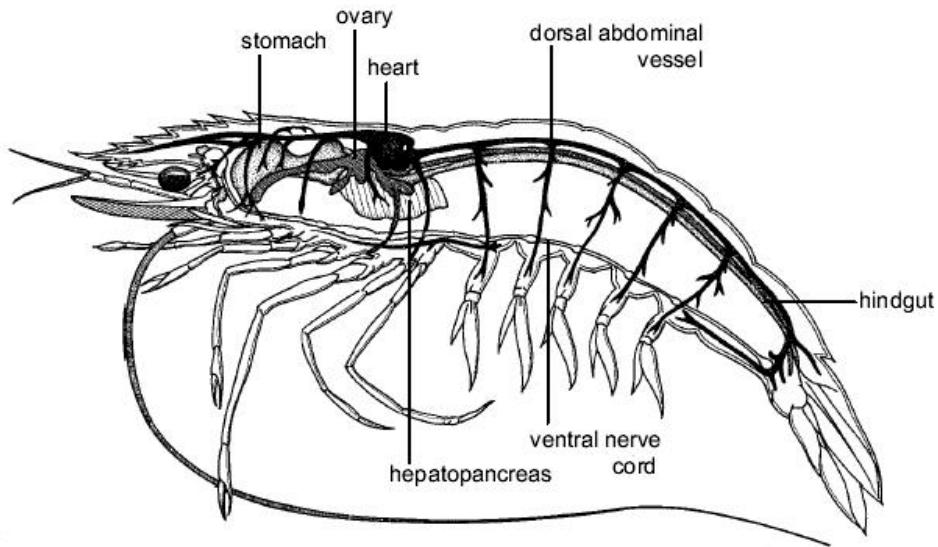
berada di *cephalothorax*, sementara kumpulan otot pada abdomen. *Appendage* pada cephalothorax terlihat berbeda demikian juga fungsinya. Dibagian kepala, antenula dan antenna berfungsi sebagai organ sensor. Mandibula dan sepasang *maxilla* (tidak terlihat pada Gambar 1) berperan dalam pengambilan makanan (Sollis, 1998). Di bagian *thorax* adalah *maxilliped*, yaitu 3 pasang *appendage* yang termodifikasi untuk mengatur letak makanan, 5 pasang kaki jalan (*Pereiopod*). Lima pasang kaki renang (*Pleopod*) ditemukan di bagian abdomen (Bell and Lightner, 1988; Bailly Brock and Moss, 1992).



Gambar 1. Morfologi eksternal *Penaeus monodon*. (Van de Braak, 2002)

Adapun anatomi internal dari udang penaeid terlihat pada Gambar 2. Udang penaeid dan Arthropoda lainnya mempunyai sistem sirkulasi darah terbuka, karenanya darah disebut hemolimp dan sel darahnya disebut hemosit. *Krustasea* memiliki jantung yang terletak di bagian dorsal pada *cephalothorax*. Bagian terbesar *cephalothorax* pada udang penaeid ditempati oleh hepatopankreas yang berfungsi menyerap nutrien, menyimpan lemak dan memproduksi enzim pencernaan. Selain itu juga terdapat organ

limfoid yang terletak diujung ventral anterior hepatopankreas yang berfungsi menyaring hemosit. Selain itu juga terdapat jaringan hematopoitik yang terletak disekitar usus dan sisi bagian dalam maxilliped yang berfungsi memproduksi hemosit. Limfoid dan jaringan hematopoitik tidak terlihat pada Gambar 2.



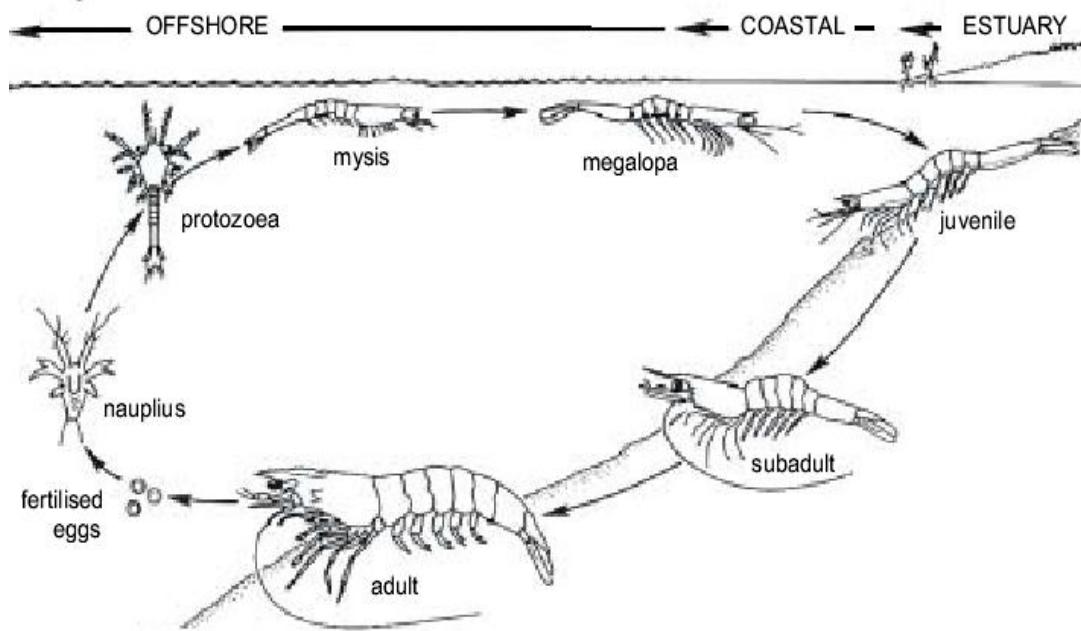
Gambar 2. Anatomi internal *Penaeus monodon*. (Van de Braak, 2002)

2.1.2 Distribusi dan siklus hidupnya

Udang windu tersebar sebagian besar dikawasan indo-pasifik dengan batas bagian utara Jepang dan Taiwan, bagian timur di Tahiti, bagian selatan Australia dan dibagian barat adalah Afrika.

Pada siklus hidupnya, udang penaeid ditemukan pada habitat yang berbeda-beda (Gambar 3). Juvenil tinggal diperairan payau dan kawasan estuari-mangrove, ketika dewasa bermigrasi ke dasar laut dalam yang bersalinitas tinggi untuk melakukan kawin dan reproduksi. Udang betina menghasilkan telur sekitar 50.000-100.000 sekali memijah (Van de Braak, 2002). Setelah telur menetas, stadia pertama disebut dengan naupli.

Naupli makan cadangan kuning telur yang masih tersisa untuk beberapa hari setelah itu berkembang menjadi protozoea (zoe). Zoe makan algae dan mengalami metamorfosis kedalam mysis. Mysis makan algae dan zooplankton dan mempunyai karakteristik seperti udang dewasa dan kemudian berkembang menjadi megalopa, umumnya disebut dengan postlarvae (PLs). Stadia postlarvae (PLs) menempati bagian permukaan laut dalam dan bermigrasi ke pantai



Gambar 3. Siklus hidup *Penaeus monodon*. (Van de Braak, 2002)

2.1.3 Sistem Pertahanan Udang

2.1.3.1 Sistem Imunitas Udang

Sistem pertahanan tubuh udang windu (*Penaeus monodon*) tidak memiliki memori (kemampuan mengingat) terhadap antigen dan merupakan sistem kekebalan non-spesifik. Seperti hewan invertebrata yang lain, udang tidak memiliki antibody dan karena itu mekanisme pertahanan tubuhnya sangat mengandalkan sistem imunitas bawaan

(*natural/innate immune system*) dalam membasmi patogen yang masuk ke dalam tubuhnya (Sritunyalucksana, 2001). Udang tidak memiliki mekanisme pertahanan tubuh yang berupa sistem imunitas dapatan (*adaptif/acquired immune system*).

Eksoskeleton adalah pertahanan pertama tubuh udang dalam mencegah infeksi penyakit melalui lendir (*Mucus*) yang dihasilkan oleh sel-sel epithel terluar. Apabila eksoskeleton ini gagal menangkal masuknya patogen ke dalam tubuhnya maka selanjutnya mengandalkan pertahanan internal dalam merespon infeksi tersebut melalui respon seluler dan humoral. Reaksi pertahanan seluler yang menonjol untuk melawan patogen adalah fagositosis, enkapsulasi, *cytotoxin* dan penggumpalan (*Clotting*). Reaksi pertahanan humoral berupa protein penggumpal (*Clotting*), agglutinin (seperti lektin), enzyme hidrolitik dan peptide antimikrobial yang dihasilkan oleh dan bereaksi bersama-sama dengan sel pertahanan.

2.1.3.2 Himogram

Hemosit memiliki peran yang penting pada sistem pertahanan imunitas. Pertama, hemosit menghancurkan partikel/benda asing dalam *haemacoel* melalui fagositosis, enkapsulasi, dan agregat nodulasi (Soderhall and Cerenius, 1992). Kedua, hemosit memiliki andil dalam penanganan luka lewat reaksi seluler dan yang mengawali proses koagulasi dengan membawa dan melepaskan sistem *prophenoloksidase* (proPO). Dan yang ketiga, hemosit terlibat dalam pembentukan dan perombakan molekul-molekul penting dalam hemolimfa seperti α_2 -macroglobulin(α_2 M), agglutinin dan peptide antimicrobial. Himogram terdiri dari jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*) dan jumlah hemosit terdiferensial (*Differential Haemocyte Count/ DHC*).

Untuk DHC pada hemosit krustasea belum ada keseragaman (Tabel 1). Metode yang beragam dan kriteria yang digunakan berbeda-beda sehingga muncul klasifikasi yang bervariasi, hingga untuk membandingkan satu dengan yang lain menjadi lebih sulit. Untuk krustasea secara umum, klasifikasi yang di pakai mengikuti model yang ditulis oleh Bauchau (1981) yang membagi hemosit menjadi 3, yaitu: sel hyalin, semi granular dan granular. Perbedaan ke-3 tipe sel tersebut terangkum pada Tabel 2.

Tabel 1. Perbandingan klasifikasi hemosit oleh beberapa penulis yang berbeda. (Van De Braak, 1996)

Species	English Name	Methode	Haemocyte Type	Reference
Saltwater crustacea				
<i>Homarus americanus</i>	America sea lobster		1. Prohyalocyte 2. Eosinophytic granulocyte 3. Chromophilic granulocyte	Cornic and Stewart (1973)
<i>Carcinus maenas</i>	Shore crab	Percoll centr	1. hyaline cell 2. semigranular cell 3. granular cell	Soderhall and Smith (1983)
<i>Penaeus californiensis</i>	Californian prawn	TEM and PC	1. agranulocyte 2. small granulocyte 3. large granulocyte	Martin and Graves (1985)
<i>Penaeus japonicus</i>	Kuruma prawn	TEM	1. large granulocyte 2. small granulocyte 3. undifferentiated haemocyte	Tsing <i>et al</i> (1989)

Bersambung

Tabel 1. (Lanjutan)

Species	English Name	Methode	Haemocyte Type	Reference
Saltwater crustacea				
<i>Penaeus japonicus</i>	Kuruma prawn	Percoll centr	1. Hyaline 2. Hyaline and semigranular 3. Semigranular and granular 4. Granular	Rodriguez et al (1995)
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp	EM	1. Hyaline cell 2. Semigranular cell 3. Granular cell	Present study (1996)
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp	TEM	1. Largegranulacyte 2. Small granulacyte 3. Undifferentiated haemocyte	Tsing et al (1989)
<i>Sicyonia ingentis</i>	Ridgeback prawn	TEM and PC	1. Agranulocyte 2. Small granulacyte 3. Large granulacyte	Martin and Graves (1985)
<i>Sicyonia ingentis</i>	Ridgeback prawn	EM	1. Agranular 2. Small granule with cytoplasmis 3. Small granule without cytoplasmis	Hose et al (1987)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Freshwater prawn	TEM	1. Largegranule haemocyte type 1 2. Largegranule haemocyte type 2 3. Smallgranule	Tsing et al (1989)

Bersambung

Tabel 1. (Lanjutan)

Species	English Name	Methode	Haemocyte Type	Reference
Freshwater crustacean				
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Freshwater prawn	TEM	4. Largegranule haemocyte type 1 5. Largegranule haemocyte type 2 6. Smallgranule haemocyte	
<i>Astacidae</i>	Freshwater crayfish	Percoll centr	1. Hyalineocyte 2. Semigranulocyte 3. Granulocyte	Soderhall <i>et al</i> (1988)
<i>Procambarus clarkii</i>	Freshwater crayfish	LM and EM	1.Hyaline cell 2.Semigranular cell 3. Granular cell	Lanz <i>et al</i> (1993)

Keterangan :

Percoll Centr : *Centrifugation on Percoll Gradients*

TEM and PC : *Transmission Electron Microscope and Phase Contrase*

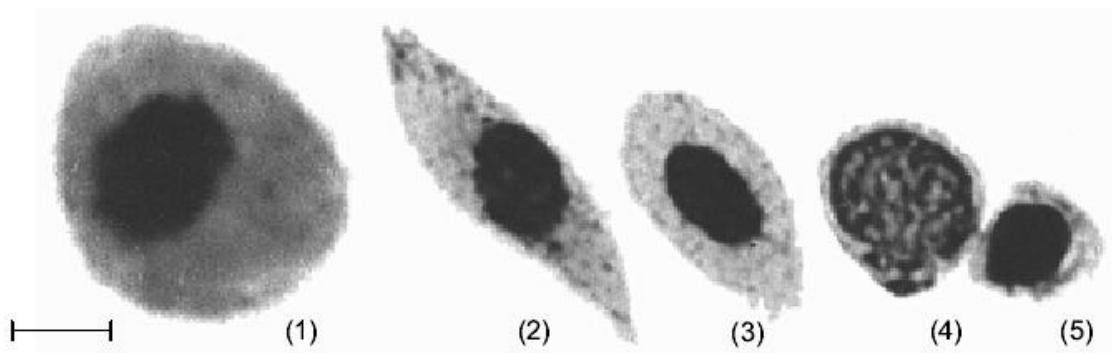
EM : *Electron Microscope*

LM : *Light Microscope*

Tabel 2. Perbedaan jenis hemosit krustasea menurut Subagio (1997)

No	Parameter	Sel Hyaline	Sel Semigranula	Sel Granula
1	Bentuk	Bulat oval	Oval atau kumparan	Oval
2	Inti	Ditengah, bulat, besar	Ditengah atau agak ke tepi, oval berlubang	Agak tepi, bentuk seperti ginjal
3	Granula	0 atau sedikit	Jumlahnya sedang	Jumlahnya banyak
4	Mitokondria	Jumlahnya sedang	Jumlahnya banyak	Jumlahnya banyak

Sedangkan karakter sel hemosit pada *Penaeus monodon* dijelaskan Van de Braak (1996) berdasarkan morfologinya yang diamati dengan mikroskop cahaya, sebagaimana tercantum pada Gambar 4 dan Tabel 3.



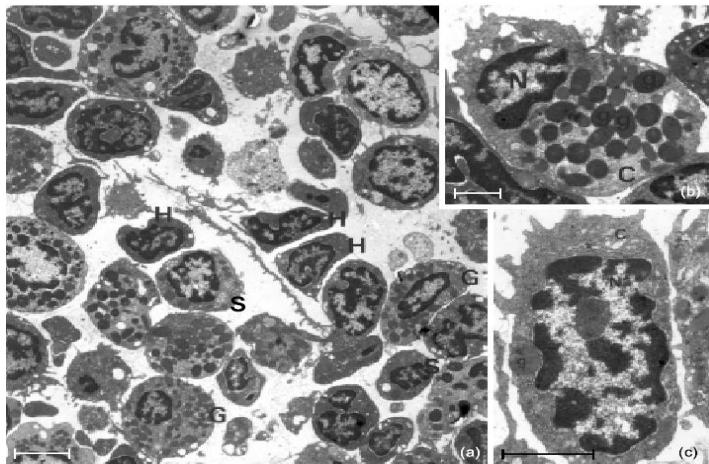
Gambar 4. Tipe hemosit *Penaeus monodon* yang diamati dengan mikroskop cahaya (Van De Braak, 1996)

Tabel 3. Karakteristik hemosit dari *Penaeus monodon* (Van De Braak, 1996)

Type Sel	Bentuk Nukleus	Warna Nukleus	Bentuk Sel	Warna Cytoplasma
1	Bulat, oval atau berbentuk bulat	Biru	Bulat atau oval	Merah
2	Oval atau bentuk sedel	Biru	Lonjong	Tak berwarna atau merah terang
3	Bulat, oval atau bentuk sedel	Biru	Bulat atau oval	Tak berwarna atau merah terang
4	Tidak nampak	Isinya berwarna biru yang mengandung butiran berwarna merah		
5	Bulat atau oval	Biru tua	Bulat dan kecil	Tak berwarna

Dengan menggunakan mikroskop cahaya, hemosit *Penaeus monodon* dapat dibagi menjadi 5 tipe seperti Tabel 3. Jika diamati lebih dalam gambaran ultrastrukturnya dengan mikroskop elektron (Gambar 5), hemosit dapat dibagi dalam sel hyalin, semi granular dan granular. Perbandingan gambar hemosit dengan pengamatan mikroskop

cahaya dan mikroskop elektron, Van De Braak (1996) menyatakan bahwa tipe sel I sebagaimana teramati dengan mikroskop cahaya merupakan sel granula, sel tipe 2 dan 3 merupakan sel semigranular dan tipe 5 merupakan sel hyalin, sedangkan sel tipe 4 adalah granula tanpa nukleus.



Gambar 5. Tipe hemosit *Penaeus monodon* yang diamati dengan mikroskop elektron. (Van De Braak, 1996)

Pada krustasea, pentingnya informasi THC terhadap resistansi kepada patogen telah dilaporkan. Persson *et al.*,(1987) melaporkan bahwa ada hubungan jumlah total hemosit *pacifastacus leniusculus* dengan resistansinya terhadap jamur parasit *Aphanomyces astaci*. Mereka menunjukkan bahwa penurunan jumlah hemosit dari *crayfish* merupakan hasil infeksi latent dari *Aphanomyces astaci* pada kondisi akut dengan melanisasi yang kurang lengkap. Le moullac *et al.*, (1998) mengamati bahwa *Penaeus stylirostris* dengan THC yang rendah memberikan sebuah situasi hypoxia, yang mana *penaeus stylirostris* menjadi lebih sensitif terhadap infeksi dengan faktor virulansi yang tinggi seperti *Vibrio alginolyticus*. Pada Arthropoda dan mollusca memiliki

jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*) yang berbeda seperti terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata jumlah total hemosit (THC) (Van De Braak, 1996)

Species	English Name	Metode	THC (sel/ml) (±std)	Refferensi
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp	Coulter counter ZM	$50,9 \times 10^6$ ($17,7 \times 10^6$)	Present study (1996)
<i>Penaeus californianus</i>	Californian prawn	haemocytometer	11×10^3 (7×10^3)	Martin and Graves (1985)
<i>Penaeus setifirus</i>	Northem white shrimp	haemocytometer	$8,9 \times 10^6$ ($2,0 \times 10^6$)	Yeager and Tauber (1935)
<i>Penaeus japonicus</i>	Kuruma prawn	DHC	$5,4-14,6 \times 10^6$	Tsing et al (1989)
Insect				
<i>Mamesta brassicae</i>		haemocytometer	$15-22 \times 10^6$	Pelc (1986)
Mollusc				
<i>Crassostrae virginia</i>	America cupped oyster	haemocytometer	$1,1 \times 10^6$, 21 ppt, 8 °C $16,4 \times 10^6$, 10 ppt, 18 °C	Oliver and fisher (1995)

Keterangan:

DHC= *Differential Haemocyte Count* dengan menggunakan mikroskop fase kontra

2.1.3.3 Fungsi Pertahanan Krustasea

Kutikula yang keras merupakan *barrier* fisik yang juga mengandung faktor antimikrobial, yang dapat dianggap sebagai pertahanan eksternal pada krustasea. Hemosit memainkan sebuah peran penting dalam mengatur pertahanan internal. Walaupun hingga sekarang 3 tipe sel yang berbeda telah umum dijelaskan, skema klasifikasi hemosit udang penaeid yang diterima secara universal belum ada. Secara umum sel hyaline adalah tipe sel yang paling kecil dengan rasio inti/sitoplasma sangat tinggi dan tidak atau sedikit granula sitoplasmik. Sel granula adalah tipe sel yang paling

besar dengan relatif kecil inti dan di sitoplasma penuh dengan granula. Sel semigranuler adalah sebuah peralihan antara sel granula dengan sel hyaline (Bauchau, 1981; Soderhall and Cerenius, 1992).

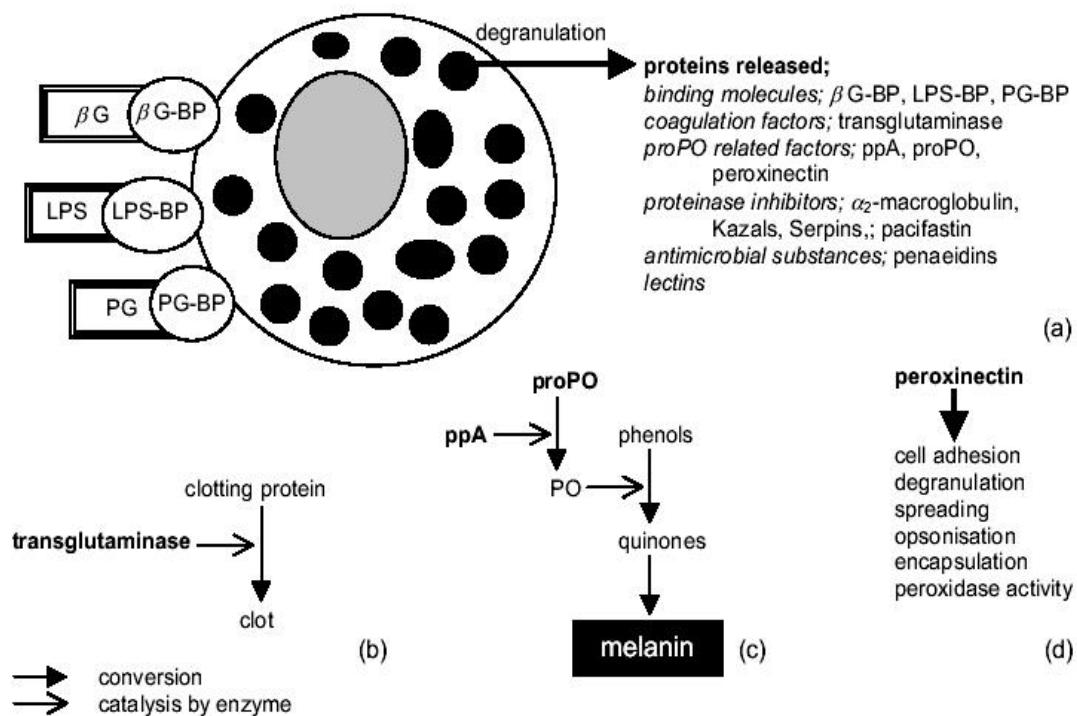
Sebuah illustrasi mengenai faktor-faktor yang berperan penting dalam sistem pertahanan krustasea telah diketahui seperti pada Gambar 6. Pertama dan yang terpenting dalam proses pertahanan internal adalah penggenalan mikro-organisme penginvasi yang di perankan oleh hemosit dan protein pada plasma hemosit (Vargas-Albores and Yepiz plaseencia, 2000).

Sistem imunitas invertebrata diperkirakan mengenali hampir semua patogen yang ada pada dirinya, yang direpresentasikan oleh suatu pola molekuler yang rumit, tidak hanya sekedar struktur saja tetapi juga spesifik terutama untuk mikroba (Soderhall *et al.*, 1996). Beberapa tipe protein target yang dikenali sebagai *non-self* telah dijelaskan dan disebut dengan “pola protein penggenal” (*Pattern Recognition Proteins/PRPs*). PRPs yang dikenal adalah turunan karbohidrat dari komponen dinding sel mikro-organisme seperti Lippopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif dan Peptidoglycan (PG) dari bakteri gram positif atau β -1,3-glucan dari jamur (Soderhall *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1996, 1997). Beberapa PRPs merupakan lektin dan dapat bekerja secara langsung sebagai aggulitin atau opsonin (Kopacek *et al.*, 1993; Soderhall *et al.*, 1996).

Setelah ikatan ligan PRPs dengan komponen mikrobial akan terjadi aktifasi hemosit seperti terlihat pada Gambar 6 (Vargas-Albores and Yepiz plaseencia, 2000). Terbaru, β -1,3-glucan binding protein dari *Penaeus monodon* telah dapat dikloning dan di *squeensing* (Sritunyalucksana *et al.*, 2002). Beberapa protein yang terlibat dalam

pertahanan tubuh *Penaeus monodon* dan yang telah mampu diisolasi terangkum pada

Tabel 5.



Gambar 6. Ilustrasi dari faktor-faktor yang berperan dalam pertahanan Krustacea.
(Van De Braak, 1996)

Tabel 5. Protein yang diisolasi dari *Penaeus monodon* (Van De Braak, 1996)

Protein	Referensi
β -1,3-glucan binding protein	Sritunyalucksana <i>et al</i> , 2002
Peroxinectin	Sritunyalucksana <i>et al</i> , 2001
Kazal inhibitor	Sritunyalucksana , 2001
Transglutaminase	H.H Song (Tidak Dipublikasikan)
Protein Penggumpalan(Clotting Protein)	Yeh <i>et al.</i> , 1999
proPO	Sritunyalucksana <i>et al</i> , 1999

Setelah mendeteksi partikel asing, hemosit bermigrasi ke lokasi yang terinvansi melalui proses kemotaksis yang dihasilkan pada proses inflamasi sebagaimana hal tersebut juga terjadi pada vertebrata. Hemosit terlibat juga dalam proses pembentukan, penyimpanan dan perombakan proenzyme dan komponen penggumpalan (Clotting) dan ProPO (Johanson and Soderhall, 19992; Soderhal, 1996; Sritunyalucksana and Soderhall, 2000).

Mekanisme penggumpalan (*Clotting*) merupakan respon terhadap material asing yang masuk dan mencegah terjadinya pendarahan. Reaksi penggumpalan (*Clotting*) pada Krustasea di tergantung pada enzim Transglutaminase (TGase) yang dijelaskan dengan baik pada *freshwater crayfish* (*Pacifastacus leniusculus*) (Kopacek *et al.*, 1993). Reaksi *Clotting* merupakan induksi saat TGase dilepaskan dari hemosit atau dari jaringan. Enzim TGase tergantung pada Ca^{2+} dalam mengkatalis proses polymerisasi Protein penggumpal (*Clotting Protein*) dan ia ditemukan dalam plasma hemosit berbentuk gel (Gambar 6).

Sistem ProPO krustasea dipelajari lebih dalam pada *Freshwater crayfish* (*Pacifastacus leniusculus*) (Soderhall *et al.*, 1996; Soderhall and Cerenius, 1998). Peran Protein dari sistem ProPO yang paling dominan dalam pengenalan non-self, komunikasi antar hemosit dan produksi melanin. Pada aktifasi dan degranulasi hemosit, ProPO yang tidak aktif diubah menjadi aktif melalui enzyme pengaktifasi prophenoloksidase (*Prophenoloksidase Aktivasing Enzyme/PPA*). Enzyme PO mengkatalis langkah oksidasi fenol menjadi quinon, yang diikuti pembentukan melanin. (Gambar 6) (Soderhall *et al.*, 1996; Soderhall and Cerenius, 1998). Melanin adalah pigmen coklat tua yang

mengisolasi patogen hingga mencegah mereka kontak dengan host dan terlihat sebagai titik (Spot) gelap di/bawah kutikula arthropoda.

Faktor pertahanan penting lainnya yang berasosiasi dengan sistem proPO adalah Peroxinectin yang telah mampu dikloning pada *P. monodon* (Sritunyalucksana *et al*, 2001). Peroxinectin mempunyai dua fungsi yang berbeda: sebagai sel adhesi dan aktifasi peroksidase. Peroxinectin pada *crayfish* di sintesis pada hemosit, disimpan pada granula tersendiri dalam bentuk tidak aktif, dilepas dalam rangka merespon rangsangan dari luar. Reseptor transmembran dari bagian hemosit memainkan sebuah peran yang penting dalam fungsinya sebagai sel adhesi peroxinectin (Johansson, 1999). Sel adhesi terlibat dalam pelekatan, penyebaran, fagositosis, enkapsulasi, pembentukan nodul (Nodulasi) dan agglutinasi, sementara komponen antimikrobial dari aktifasi peroksidase protein membantu membunuh mikroorganisme penginvasi (Johson and Soderhall, 1988, 1989; Kobayashi *et al*, 1990, Thornqvist *et al*, 1994) (Gambar 6). Fagositosis adalah internalisasi partikel asing yang kecil melalui sel-sel individu. Setelah ditelan oleh hemosit udang, seperti pada sel darah vertebrata, kemudian menggunakan “*cytotoxic oxygen radicals*” untuk membunuh partikel asing tersebut (Song and Hsieh, 1994; Munaz *et al.*, 2000). Jika partikel asing yang masuk kedalam tubuh dalam jumlah besar atau jika partikel asing terlalu besar untuk diinternalisasi, beberapa hemosit akan bekerjasama untuk menutup rapat-rapat patogen, fenomena ini disebut pembentukan nodul (Nodulasi) dan encapsulasi (Soderhall *et al.*, 1996).

Enzyme penghambat (*inhibitor enzyme*) juga dihasilkan oleh hemosit yang diperlukan untuk mengatur penyebaran proteinase dan mencegah aktifasi yang berlebihan dan terjadinya kerusakan jaringan inang. *Serine proteinase inhibitor* dari

golongan kazal dan serpine telah diidentifikasi pada krustasea (Kanost, 1999). Juga α_2 -macroglobulin, yang bertugas sebagai spektrum besar ikatan protein yang tersimpan pada granula hemosit (Armstrong and Quigley, 1999). Ditambahkan, hemosit memainkan sebuah peran penting dalam memproduksi dan perombakan agglutinin (seperti lectin) (Kapocek *et al.*, 1993), peptide antimicrobial (Destoumieux *et al.*, 1997, 2000), dan molekul *cytotoxic* seperti enzyme lysosom (Lysosome, Esterase, Phosphatase, Phospholipase, Perokidase dan Protease) (Millar and Ratchliffe, 1994). Untuk sebuah efisiensi pertahanan immun, semua komponen yang berbeda dari sistem immun harus bekerja bersama-sama.

2.2 Biologi *Vibrio alginolyticus*

2.2.1 Klasifikasi dan morfologi *Vibrio alginolyticus*

Klasifikasi *Vibrio alginolyticus* berdasarkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 9 tahun 1994 adalah:

Devisio	: Bakteria
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Vibionaceae
Genus	: Vibrio
Spesies	: <i>Vibrio algynolyticus</i>

Vibrio alginolyticus dicirikan dengan pertumbuhannya yang bersifat bergerombol (Swarm) pada media padat selektif. Ciri yang lain adalah gram negatif, motil bentuk batang, fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa, membentuk kolom berukuran

0.8-1.2 cm yang berwarna kuning pada media TCBSA. Bakteri *Vibrio alginolyticus* memiliki flagelata yang bercabang ke samping dan bergerombol dalam media padat kompleks (Noel, Krieg dan John, 1984)

2.2.2 Aktifitas dan Pertumbuhan

Aktifitas dan pertumbuhan bakteri dipengaruhi faktor abiotik meliputi faktor fisik seperti suhu, cahaya, tekanan osmosis dan radiasi. Selain itu juga dipengaruhi faktor kimia seperti pH, salinitas, bahan organik dan zat-zat kimia lain yang bersifat bakteriosidal maupun bakteriostatis.

Vibrio spp bersifat anaerobik fakultatif dimana metabolismenya dapat dilakukan dengan atau tanpa oksigen (fermentatif), selain itu bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media mineral yang mengandung ammonium, karbon sederhana dan glutamat.

Faktor yang mempengaruhi aktifitas dan pertumbuhan bakteri tersebut adalah faktor kualitas air. Faktor kualitas air yang terbukti mempunyai korelasi yg positif terhadap peledakan populasi *Vibrio spp* yaitu bahan organik dan suhu air. Perubahan lingkungan yang terjadi secara mendadak seperti suhu dan peningkatan bahan organik dapat mengakibatkan meningkatnya jumlah penyakit (Rukyani *et al.*, 1992).

Pada umumnya bakteri *Vibrio spp* dapat tumbuh secara optimal pada suhu 30-35°C, salinitas optimum antara 20-30 ppt dan pH optimum antara 7,5-8,5. Bakteri *Vibrio spp* termasuk bakteri kemoorganotropik. Menurut Dwidjoseputro (1998), bakteri kemoorganotropik adalah mikroba yang dapat menggunakan komponen organik sebagai sumber karbon dan energi. Medium yang paling cocok bagi kehidupan bakteri adalah medium yang isotonis terhadap isi sel bakteri.

2.2.3 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangannya

Bagian utama tubuh udang windu yang terserang bakteri *Vibrio spp* adalah organ dalam. Pada tingkat awal, hepatopankreas terlihat mengalami perubahan warna menjadi kecoklat-coklatan dan pada tingkat serangan parah (berat), hepatopankreas menjadi berwarna coklat kehitaman. Pada organ ini banyak ditemukan bakteri vibrio spp yang bergerak aktif. Kondisi hepatopankreas yang sudah mengalami penyusutan dan penghancuran tidak bisa berfungsi secara normal. Hal ini mengkabatkan larva menjadi lemah dan akhirnya mati (Shariff dan Subasinghe, 1992).

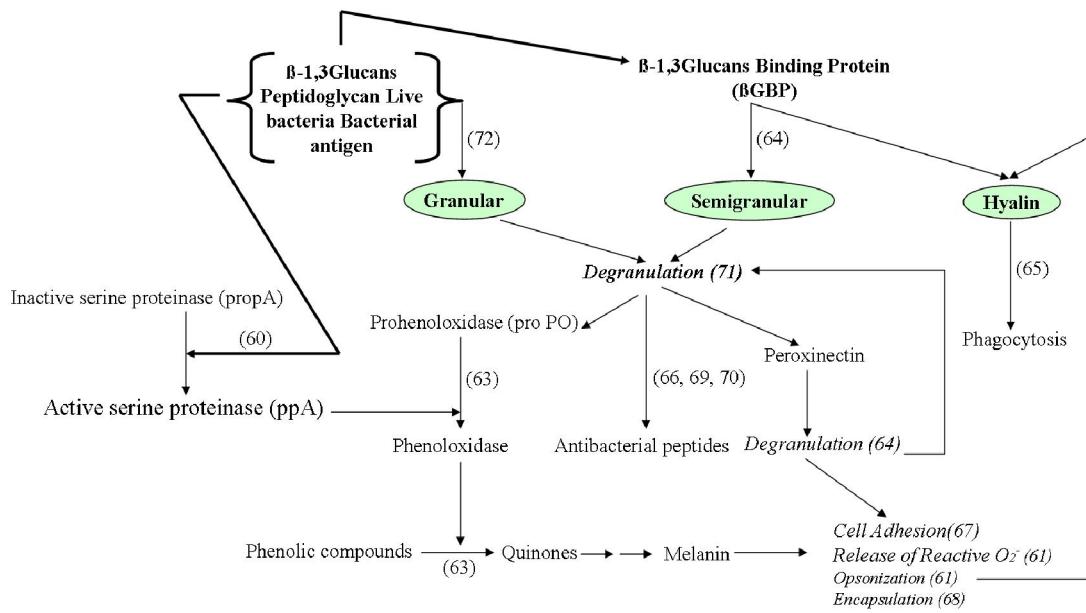
Gejala eksternal dari adanya infeksi bakteri *Vibrio spp* adalah terjadinya pembengkakan pada bagian perut (inflamasi), morfologi udang menjadi pucat, terjadi perubahan warna kemerahan pada bagian perut dan kaki renang, warna tubuh menjadi gelap, lebih banyak diam, nafsu makan berkurang, tubuh banyak mengeluarkan lendir, sungut (barbel) dan kaki renang mengalami perubahan warna kemerahan dan mulai terpotong.

2.3 Immunostimulan

Immunostimulan merupakan suatu zat yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan terhadap penyakit infeksi dengan meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh yang bersifat non spesifik, khususnya sistem fagositosis (Ellis, 1988). Diduga mekanisme kerja immunostimulan adalah dengan meningkatkan aktifitas sel fagosit seperti makrofage dan netrofil (Robertson *et al.*, 1990). Substansi immunostimulan dapat berupa B-1,3 glucan, Lipopolysakarida (LPS), peptidoglikan, dan endotoxin atau bakteri yang dimatikan (Boonyaratpalin *et al.*, 1999).

Mekanisme kerja dari immunostimulan adalah mengikuti mekanisme kerja imunisasi secara umum dan berbeda dengan vaksinasi. Vaksinasi akan memicu timbulnya respon immun berupa antibodi untuk melawan serangan penyakit tertentu, sesuai dengan antigen yang masuk ke dalam tubuhnya. Sedangkan dalam immunostimulan respon kekebalan tidak harus sama dengan antigen yang masuk (Austin, 2004).

Smith *et al.*, (2003) menjelaskan mekanisme dasar imunostimulan dalam merangsang sistem pertahanan tubuh pada udang (Gambar 7). Gambar tersebut memperlihatkan bahwa sirkulasi hemosit memainkan peran yang luar biasa, tidak hanya secara langsung membunuh agen invasi lewat proses fagositosis, nodulasi dan enkapsulasi, penggumpalan (*Clotting*), produksi toksis berupa *Reaktive Oxygen Metabolites/Intermediates* (ROMs/ROIs) dan protein antimikrobial, tetapi juga lewat produksi molekul bioaktif yang menjadi sumber energi dalam proses eksositosis. Selain itu, gambar tersebut juga menjelaskan peranan masing-masing tipe sel yang berbeda dari hemosit dalam mekanisme pertahanan tubuh guna merespon adanya invasi. Meskipun telah dimengerti mekanisme immonostimulan dalam meningkatkan sistem pertahanan non spesifik pada udang hususnya dan pada krustasea pada umumnya, masih banyak pertanyaan krusial yang belum bisa terjawab dari penggunaan semua bahan immunostimulan seperti apakah penggunaan bahan tersebut akan mempengaruhi ekspresi gen, modifikasi translasi dan pasca translasi serta pelepasannya kedalam peredaran hemolimp.



Gambar. 7 Peranan immunostimulan dalam mekanisme sistem pertahanan tubuh udang
Smith *et al.*, (2003)

BAB III

MATERI DAN METODELOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1 Bahan-Bahan Penelitian

- Udang windu (*Penaeus monodon*) dengan berat 20 gram / ekor
- Bakteri *Vibrio alginolyticus*
- *Thiosulphat Citrate Bile Sucrose Agar* (TCBSA)
- *Tryptic Soy Agar* (TSA)
- *Tryptic Soy Broth* (TSB)
- *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
- *Phosphat Buffer Saline* (PBS)
- Air mendidih 100 °C
- Natrium Sitrat 10%
- Hemosit
- Metilalkohol
- larutan giemsa
- Air
- *Trypan Blue Solution* (TBS)
- Alkalin CuSO₄
- Reagen Lowry
- Aquades
- Bovine Serum Albumen (BSA)

- Air laut
- Pellet komersil
- Tisu
- Alkohol 70 %

3.2 Alat-Alat Penelitian

- Aquarium 30x30x30 cm
- Filter
- Aerator
- Petridish
- Rak
- Tabung reaksi
- Jarum oase
- Erlenmeyer
- Timbangan analitis
- Botol semprot
- Mikropipet 100-1000 µl dan 20-200 µl
- *Shaker bath*
- Sentrifus
- Tabung falcon
- Vortex
- Syringe # 26

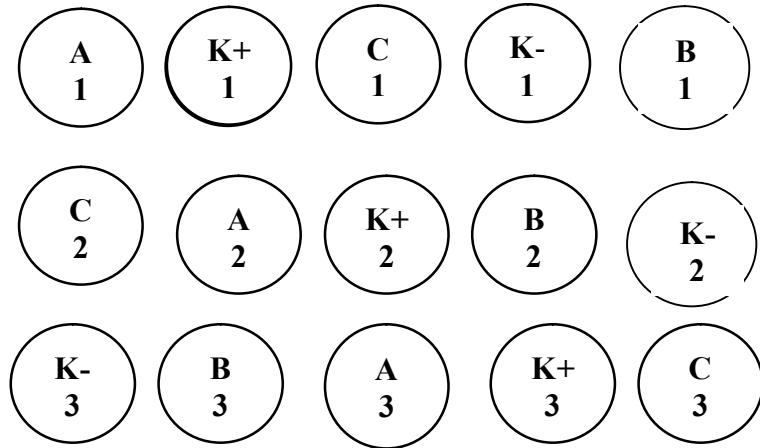
- Eppendorf
- Cover dan obyek glass
- Sentrifus dingin mikro 22 R
- Refraktometer
- DO meter
- PH meter
- Termometer
- Spektrofotometer

3.2 Metode Dan Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen menurut Nazir (2005) adalah suatu bentuk kegiatan penelitian yang dilakukan oleh peneliti untuk mencari hubungan sebab akibat (hubungan kausal) antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan mengeliminasi atau mengurangi faktor-faktor lain yang bisa mengganggu. Eksperimen selalu dilakukan dengan maksud untuk melihat akibat dari suatu perlakuan. Metode eksperimen ini dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian immunostimulan terhadap beberapa parameter yang tertera dalam tujuan penelitian ini.

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 2 kontrol serta 3 ulangan. Ketiga perlakuan tersebut adalah: A adalah pemberian bakterin dengan konsentrasi 25 mg/100 gram pakan, B adalah pemberian bakterin dengan konsentrasi 50 mg/100 gram pakan, C adalah pemberian bakterin dengan konsentrasi 100 mg/100 gram pakan, K- adalah perlakuan

tanpa pemberian bakterin dan tanpa pemaparan, K+ adalah perlakuan tanpa pemberian bakterin dan dilakukan pemaparan. Lamanya pemberian immunostimulan selama 14 hari. Untuk denah penelitian ini sebagai berikut :



3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji dipelihara dalam aquarium 27 liter yang di isi 15 liter air laut dengan kepadatan 2 ekor/aquarium. Udang di beri pakan pellet komersial sebesar 5 % dari berat biomass yang telah dicampur dengan bakterin sesuai dosis dan pemberian 4x sehari pada pukul 08.00 WIB, 13.00 WIB, 17.00 WIB dan pukul 21.00 WIB. Setiap pagi dilakukan penyipahan dan diberi aerasi terus-menerus. Pergantian air minimal 3 hari sekali tergantung kondisi air aquarium. Udang yang baru datang dilakukan aklimatisasi selama 7 hari.

3.3.2 Perbanyakan *Vibrio alginolyticus*

Guna memperbanyak bakteri *Vibrio alginolyticus* mengikuti metode Goarant *et al.*, (2000) dan Sung *et al.*,(2003) yaitu isolat bakteri *Vibrio alginolyticus* yang di peroleh

dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, ditumbuhkan pada media TCBSA selama 24 jam pada suhu 25 °C. Kemudian diambil sebanyak 1 jarum oase untuk dilakukan purifikasi pada media TSA dalam cawan Petri selama 48 jam pada suhu 25 °C. Selanjutnya diambil 20-200 koloni dengan menggunakan jarum oase dan ditumbuhkan pada *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) volume 500 ml dengan dilakukan *shaking* secara terus menerus pada *bath shaker* selama 48 jam pada suhu 25 °C.

3.3.3 Pemanenan bakteri *Vibrio alginolyticus*

Cara pemanenan bakteri mengikuti metode Murdjani (2002), yaitu bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi (*Beckman*) pada kecepatan 4.000 rpm menggunakan low speed centrifuge merk Gua Hua selama 20 menit. Pellet yang merupakan kumpulan sel bakteri dicuci 1x dengan PBS, PH 7,4 dan di sentrifugasi seperti sebelumnya.

3.3.4 Pembuatan Bakterin

Pembuatan bakterin mengikuti metode Joly *et al.* (1990) yang dimodifikasi, Bakterin dibuat dengan cara mematikan *Vibrio alginolyticus* dengan cara dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Sebelum bakterin digunakan, dilakukan uji viabilitas dengan cara menumbuhkan pada media TSA selama 24 jam. Apabila terjadi pertumbuhan, inaktivasi di ulang kembali. Setelah itu bakterin dicampur PBS sebanyak 15 ml dan di *vortex* hingga homogen lalu dicampur dengan 100 g pellet komersial, baru kemudian dijemur sampai kering. Apabila tidak hendak digunakan bakterin tersebut disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.5 Pemaparan *Penaeus monodon* dengan *V. alginolyticus*

Setelah *P. monodon* diberi perlakuan selama 14 hari, dilakukan pemaparan dengan *V. alginolyticus* yang mengikuti metode Toban (2008) yaitu menginjeksikan bakteri tersebut secara intramuscular/IM (menurut Jayasree *et al.*, 2000, IM pada udang adalah bagian ventral diantara abdomen ke 2 dan 3) dengan kepadatan 10^7 sel/ml sebanyak 50 μl . Setelah diinfeksi, 6 jam kemudian dilakukan pengamatan terhadap TPP (*Total Plasma Protein*) serta 24 jam setelah diinfeksi dilakukan pengamatan terhadap DHC/*Differential Haemocyte Count* (1 kali), THC/*Total Haemocyte Count* (setiap 24 jam sekali selama 4 hari) serta gejala klinis selama 4 hari.

3.3.6 Sampling Hemosit

Sebelum dan setelah pemaparan dilakukan sampling. Pengambilan hemosit untuk keperluan TPP dan DHC diambil dari bagian ventral abdomen ke-2 (Van de Braak, 2002) sebanyak 100 μl serta untuk keperluan THC diambil dari *pleopod* 2,3 dan 4 secara bergantian (Martin *et al.*, 1993) sebanyak 30 μl dengan menggunakan *syringe* 1 ml (1 ml # 26) yang di isi dengan 100 μl Natrium Sitrat 10% (PH 7,2). Hemosit kemudian ditaruh eppendorf hingga dilakukanya pengamatan (maksimal 1 jam).

3.3.7 Pengamatan Total Protein pada Plasma Hemosit (*Total Plasma Protein/TPP*)

Pengukuran terhadap TPP mengikuti metode Van de Braak (2002), 100 μl hemolimp disentrifugasi menggunakan sentrifus dingin mikro 22 R merk Hettich pada kecepatan 1500 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Kemudian diukur TPP-nya menurut modifikasi metode Folin-Lowry dengan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai protein standar karena harganya yang murah, kemurnianya tinggi dan mudah

didapatkan. Prinsip kerjanya adalah mengabsorbansi warna biru-keunguan yang diproduksi oleh asam amino aromatik golongan tirosin dan tritopan pada protein yang ada pada plasma hemosit. Perbandingan reagen dengan protein sebagaimana tertera pada Tabel 6.

Tabel 6. Perbandingan reagen dengan protein (*Lowry et al., 1951*)

BSA (ml)	Aquades (ml)	Konsentrasi sampel BSA (mg/ml)	Volume sampel TPP (ml)	Alk.CuSO ₄ (ml)	Reagen Lowry (ml)	OD (660 nm)
0.25	4.75	0.05	0.05	0.5	0.05	
0.5	4.5	0.1	0.05	0.5	0.05	
1	4	0.2	0.05	0.5	0.05	
2	3	0.4	0.05	0.5	0.05	
3	2	0.6	0.05	0.5	0.05	
4	1	0.8	0.05	0.5	0.05	
5	0	1.0	0.05	0.5	0.05	

3.3.8 Pengamatan Hemosit

3.3.8.1 Jumlah Total Hemosit (*Total Haemocyte Count / THC*)

Hemosit *P. monodon* diambil dari eppendorff 30 μ l kemudian diberi *trypan blue solution* 60 μ l dan dihitung menggunakan haemocytometer (Radriguez and Gilles Le Moullac, 2000; Van de Braak, 2002) dengan bantuan mikroskop cahaya pembesaran 100x serta penghitungannya menurut metode Onsanit *et al.*, (2005) seperti berikut ini :

$$\text{THC} = \text{Jumlah total sel} \times 5 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}/10 \text{ (sel/ml)}$$

3.3.8.2 Jumlah Differensial Hemosit (*Differential Haemocyte Count / DHC*)

Hemosit diambil kira-kira 25 μ l, kemudian diwarnai terlebih dahulu dengan metode giemsa (Van de Braak, 1996). Menurut Bijanti (2005) langkah-langkah pewarnaan giemsa adalah dengan menaruh preparat yang akan dipulas diatas rak tempat

memulas dengan lapisan hemolimfa menghadap ke atas, lalu diteteskan sekian banyak metilalkohol keatas sediaan tersebut, sehingga lapisan hemolimfa tertutup seluruhnya. Dibiarkan selama 2 menit atau lebih, setelah itu selesai dilakukan, dituang kelebihan metilalkohol diatas sediaan tersebut dan dituangkan larutan giemsa yang sudah diencerkan dengan larutan penyangga diatas hapusan hemolimfa secara merata, kemudian dibiarkan selama 30 menit. Jika selesai melakukan hal tersebut, langkah berikutnya adalah membilas preparat hapusan hemolimfa tersebut dengan air mengalir lalu preparat ditaruh dalam posisi vertikal dan dibiarkan mengering pada udara.

Setelah pewarnaan hemosit selesai, dilanjutkan dengan pengamatan jumlah sel dalam persentase berdasarkan kriteria morfologi seperti tertera pada Gambar 4 dan Tabel 3 dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400X (Van de Braak, 1996).

3.3.9 Pengamatan Gejala klinis *P. monodon* Setelah Terinfeksi *V. alginolyticus*

Setelah pemaparan, dilakukan pengamatan gejala klinis terhadap *P. monodon* selama 4 hari dengan waktu pengamatan jam 0 (sebelum uji tantang), 5 menit, 4 jam, 12 jam dan 24 setelah uji tantang serta pengamatan selanjutnya setiap 24 jam sekali.

3.3.10 Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dalam penelitian ini meliputi suhu, pH , salinitas dan DO. Alat yang digunakan dalam pengukuran suhu adalah Termometer, pH dengan pH Meter, salinitas dengan Refraktometer sedangkan DO dengan DO Meter. Pengukuran kualitas dilakukan pada pagi hari mulai jam 8.00 WIB .

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama penelitian ini ialah jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count / THC*) dan jumlah hemosit terdfferensial (*Differintial Haemocyte Count / DHC*) pada udang windu (*Penaeus monodon*) sesudah diberi perlakuan dan pasca dilakukannya pemaparan dengan *V. alginolyticus*.

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjangnya adalah pengukuran kualitas air (suhu, DO, salinitas dan pH) dan pengamatan gejala klinis udang windu (*Penaeus monodon*) selama 4 hari setelah dilakukan pemaparan dengan *V. alginolyticus*.

3.5. Analisa Data

Pengaruh pemberian bakterin dengan dosis yang berbeda terhadap jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), jumlah differensial hemosit (*Differintial Haemocyte Count/DHC*) serta jumlah total protein pada plasma hemosit (*Total Plasma Proteins/ TPPs*) yang terlibat pada sistem pertahanan tubuh *P. monodon* dianalisa lewat perbedaan rata-ratanya dengan sidik ragam (*Analysis of Variances / one-way ANOVA*). Sebelum dianalisa statistik, data ditransformasi bentuk arc-sine untuk jumlah differensial hemosit (*Differintial Haemocyte Count/DHC*) dan transformasi logaritma untuk jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*). Analisa Statistik ANOVA dilakukan dengan program SPSS versi 16.00

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL

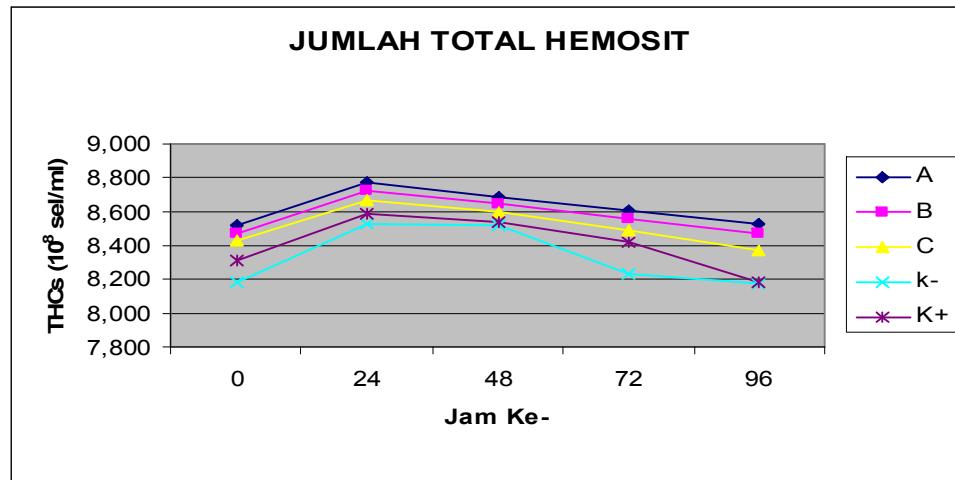
4.1.1 Jumlah Total Hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*)

Evaluasi hasil pemberian immunostimulan berupa bakterin *Vibrio alginolyticus* selama 14 hari terhadap THC pada udang windu (*Penaeus monodon*) dilakukan dari jam ke 0 (sebelum uji tantang) hingga 96 jam setelah uji tantang dengan interval pengamatan 24 jam, menunjukkan dinamika yang menarik untuk dicermati lebih lanjut seperti terlihat pada Tabel 7 dan Grafik 1 dibawah ini.

Tabel 7. Pengaruh bakterin terhadap THC (10^8 sel/ml)

PERLAKUAN	JAM KE				
	0	24	48	72	96
A	3.24±0.07 ^e	5.55±0.49 ^a	4.67±0.36 ^e	4.01±0.22 ^a	3.41±0.29 ^c
B	3.07±0.12 ^d	4.89±0.38 ^a	4.43±0.04 ^d	4.16±1.83 ^a	3.44±1.51 ^c
C	3.02±0.46 ^c	5.85±0.30 ^a	3.97±0.36 ^c	3.37±0.62 ^a	2.84±1.02 ^b
K-	2.05±0.57 ^b	3.37±0.08 ^a	2.19±0.74 ^b	1.74±0.43 ^a	1.53±0.46 ^a
K+	2.52±0.13 ^a	4.54±1.11 ^a	3.45±0.06 ^a	2.61±0.08 ^a	1.67±0.23 ^a

Rata-rata yang ada superscripts sama (a-e) berarti tidak berbeda nyata pada $P < 0.05$

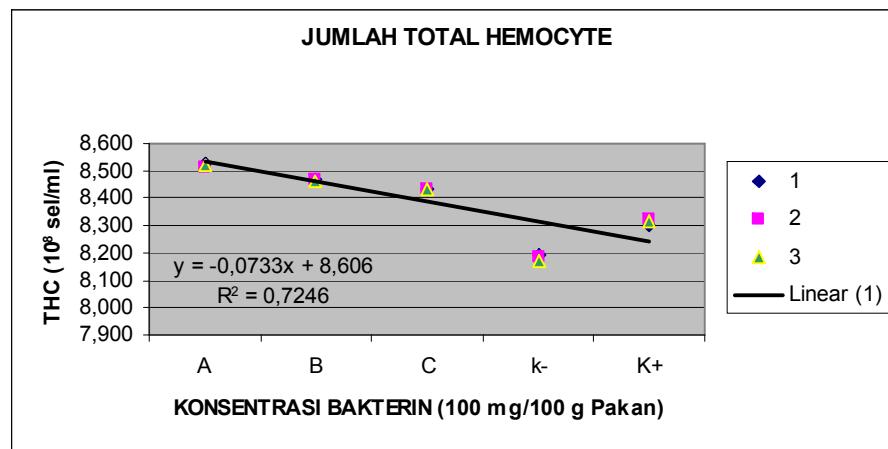


Grafik 1. Pengaruh bakterin terhadap THC

Sebelum dilakukan uji tantang (Jam ke 0), hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P<0.05$) terhadap nilai rerata THC. Hasil uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan bahwa pemberian bakterin dengan perlakuan A mempunyai nilai rerata THC terbaik yaitu 3.24×10^8 sel/ml diikuti perlakuan B (3.07×10^8 sel/ml) dan perlakuan C (3.02×10^8 sel/ml), sedang nilai rerata THC pada kontrol positif (K+) yaitu 2.52×10^8 sel/ml dan kontrol negatif (K-) yaitu 2.05×10^8 sel/ml. Jadi pemberian bakterin dengan konsentrasi yang rendah akan menaikkan nilai THC karena kecilnya jumlah hemosit yang dipakai untuk merespon bakteri yang dikenali sebagai *non self* lewat komponen struktur kimia dari dinding sel bakteri yang disebut lipopolisakarida (*Lipopolysaccharidae/LPS*). Penelitian dengan hasil serupa didapatkan oleh Onsanit *et al.*, (2005) pada *P. monodon* yang diberi beta karotin dengan dosis 100 ppm memiliki nilai rerata THC tertinggi (6.93×10^6 sel/ml) bila dibandingkan dengan dosis 150 ppm (6.68×10^6 sel/ml) dan 200 ppm (5.24×10^6 sel/ml). Nilai THC pada K+ dan K- lebih kecil bila dibandingkan dengan semua perlakuan yang diberi bakterin, hal ini dikarenakan tidak adanya *non self* yang menjadi pendorong untuk memproduksi hemosit lebih banyak. Hubungan masing-masing perlakuan terhadap nilai rerata THC bisa dijelaskan melalui persamaan regresi linier $Y = -0.0698x + 8.5929$ (Grafik 2). Dari persamaan tersebut terlihat bahwa semakin rendah dosis bakterin yang diberikan pada *P. monodon* maka akan memperbesar nilai rerata THC.

Jam ke 24 setelah uji tantang, hasil dari uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian bakterin tidak berpengaruh signifikan ($P<0.05$) terhadap nilai rerata THC. Hal ini memperlihatkan bahwa pengaruh bakterin sebagai immunostimulan hanya

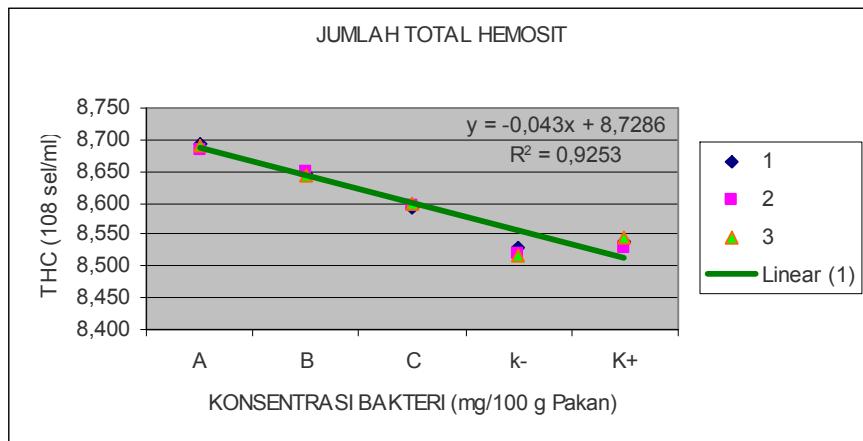
bersifat sesaat terhadap nilai rerata THC. Namun demikian, secara kuantitatif nilai rerata THC terbesar pada perlakuan C (5.85×10^8 sel/ml) yang diikuti perlakuan A (5.55×10^8 sel/ml) dan perlakuan B (4.89×10^8 sel/ml), sedang K+ nilai rerata THC-nya yaitu 4.54×10^8 sel/ml dan K- yaitu 3.37×10^8 sel/ml. Hasil ini memperlihatkan bahwa terjadi kenaikan nilai rerata THC pada semua perlakuan maupun kontrol setelah uji tantang (Tabel 7) untuk merespon adanya invasi bakteri patogen *V. alginolyticus* yang diinjeksi ke dalam tubuh *P. monodon*. Hasil ini bertolak belakang dengan hasil penelitian Persson *et al.*,(1987) yang melaporkan bahwa terjadi penurunan jumlah hemosit pada *crayfish* sesaat setelah terjadi infeksi jamur *Aphanomyces astaci*.



Grafik 2. Pengaruh bakterin terhadap THC pada Jam ke 0

Jam ke 48 setelah uji tantang, hasil dari uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap nilai rerata THC. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa pemberian bakterin dengan perlakuan A mempunyai nilai rerata THC terbaik yaitu 4.67×10^8 sel/ml diikuti perlakuan B (4.43×10^8 sel/ml) dan perlakuan C (3.97×10^8 sel/ml), sedang nilai rerata THC pada K+ yaitu 3.45×10^8 sel/ml dan K- yaitu 2.19×10^8 sel/ml. Jadi pemberian bakterin dengan konsentrasi yang rendah

akan menaikkan nilai rerata THC karena kecilnya jumlah hemosit yang dipakai untuk merespon adanya invasi bakteri. Hal ini kontras dengan penemuan Huang *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa aktivitas immun seperti terjadinya kenaikan nilai THC dipengaruhi dosis immunostimulan yang semakin besar. Hubungan pemberian bakterin dengan nilai rerata THC pada 48 jam setelah uji tantang dapat dijelaskan dengan persamaan regresi $Y = -0.0427x + 8.7262$ (Grafik 3). Dari persamaan tersebut terlihat bahwa semakin kecil dosis yang diberikan pada *P. monodon* maka akan memperbesar nilai rerata THC.

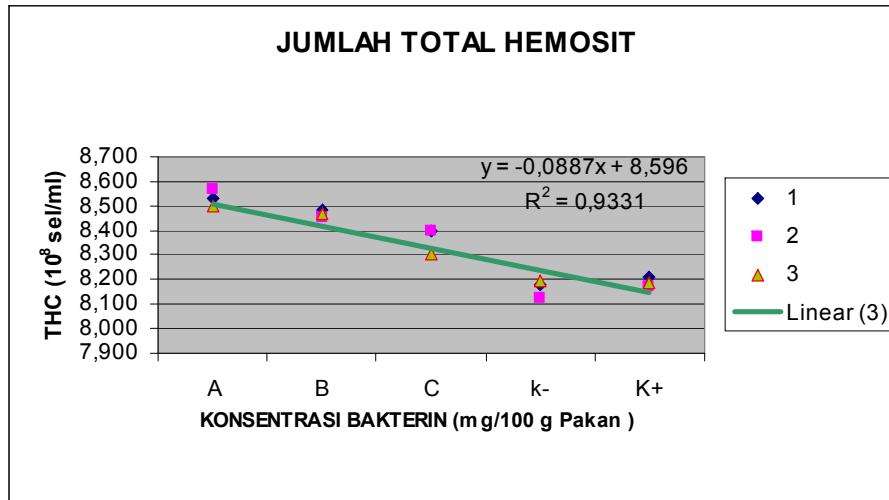


Grafik 3. Pengaruh bakterin terhadap THC pada jam ke 48 setelah uji tantang.

Jam ke 72 setelah uji tantang, hasil dari uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian bakterin tidak berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap nilai rerata THC. Hal ini memperlihatkan bahwa pengaruh bakterin sebagai immunostimulan hanya bersifat sesaat terhadap nilai rerata THC. Namun demikian, secara kuantitatif nilai rerata THC terbesar yaitu 4.16×10^8 sel/ml pada perlakuan B, kemudian perlakuan A yaitu 4.01×10^8 sel/ml dan perlakuan C yaitu 3.37×10^8 sel/ml, sedang nilai rerata THC K+ dan K- adalah 2.61×10^8 sel/ml dan 1.74×10^8 sel/ml. Jadi perlakuan B memberikan nilai

rerata THC yang paling besar antar perlakuan maupun dengan kontrol. Hal ini terjadi mungkin dikarenakan jumlah hemosit yang dimobilisasi untuk pertahanan disesuaikan dengan jumlah invasi patogen yang mulai berkurang. Menurut Kanost (1999), hemosit yang teraktivasi karena adanya *non-self* akan melepaskan enzim penghambat (*inhibitor enzyme*) berupa serine proteinase dari golongan kazal dan serpin yang salah satu fungsinya adalah untuk mencegah aktifasi hemosit yang berlebihan.

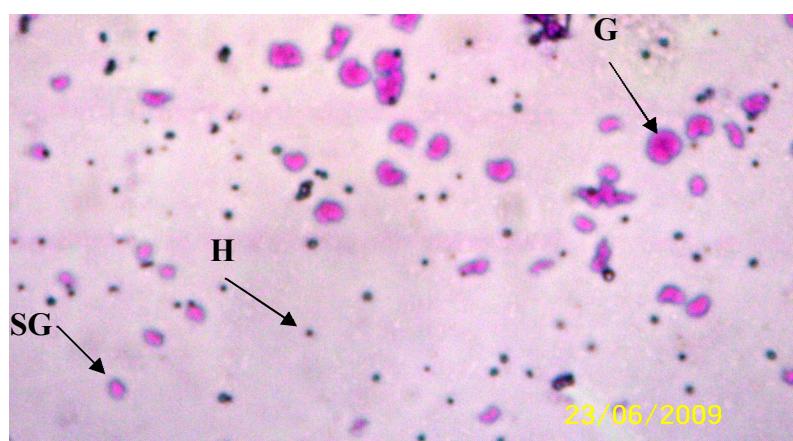
Jam ke 96 setelah uji tantang, hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P<0.05$) terhadap nilai rerata THC. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa pemberian bakterin pada perlakuan B mempunyai nilai rerata THC terbaik yaitu 3.44×10^8 sel/ml yang diikuti perlakuan A yaitu 3.41×10^8 sel/ml dan perlakuan C yaitu 2.84×10^8 sel/ml, sedang nilai rerata THC dari K+ dan K- adalah 1.67×10^8 sel/ml dan 1.53×10^8 sel/ml. Jadi perlakuan B memberikan nilai THC paling besar diantara perlakuan maupun dengan kontrol K+. Hal ini terjadi mungkin dikarenakan jumlah hemosit yang dimobilisasi untuk pertahanan disesuaikan dengan keberadaan jumlah *non-self* mulai berkurang seiring tidak diberikannya immunostimulan berupa bakterin dalam waktu yang relatif lama bila dibandingkan periode sebelumnya, sehingga hasil ini mempertegas pendapat Smith *et al.*,(2003) yang menyatakan bahwa pemberian immunostimulan hanya memberikan perlindungan dalam waktu yang singkat (*Short Time Protection*). Penurunan nilai THC pada 96 jam setelah uji tantang dapat dijelaskan lewat persamaan $Y = -0.0696X + 8.6408$. (Grafik 4). Dari persamaan tersebut terlihat bahwa semakin rendah dosis yang diberikan pada *P. monodon* maka akan memperbesar nilai rerata THC.



Grafik 4. Pengaruh bakterin terhadap THC pada jam ke 96 setelah uji tantang.

4.1.2 Jumlah Differensial Hemosit (*Differential Haemocyte Count/DHC*)

Jenis differensial hemosit pada penelitian ini mengacu klasifikasi yang dibuat oleh Bachau (1981) yang membagi tipe hemosit menjadi 3 jenis berdasarkan ada tidaknya granula yaitu sel hyalin, sel semigranular dan sel granular. Lebih lanjut perbedaan ketiga sel hemosit tersebut secara morfologi mengikuti penjelasan Van de Braak (1996) seperti tercantum pada Tabel 3 dan hasilnya seperti terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Tiga sel hemosit pada *P. monodon* sel Hyalin (H), sel semigranular (SG) dan sel Granular (G) dengan mikroskop cahaya (pembesaran 400X)

4.1.2.1 Sel Hyalin

Sel hyalin merupakan komponen terbesar pada hemosit hewan crustacea. Tabel 8 dibawah ini menyajikan hasil pemberian immunostimulan bakterin *Vibrio alginolyticus* terhadap komposisi sel hyalin pada THC yang dibahas dibagian sebelumnya.

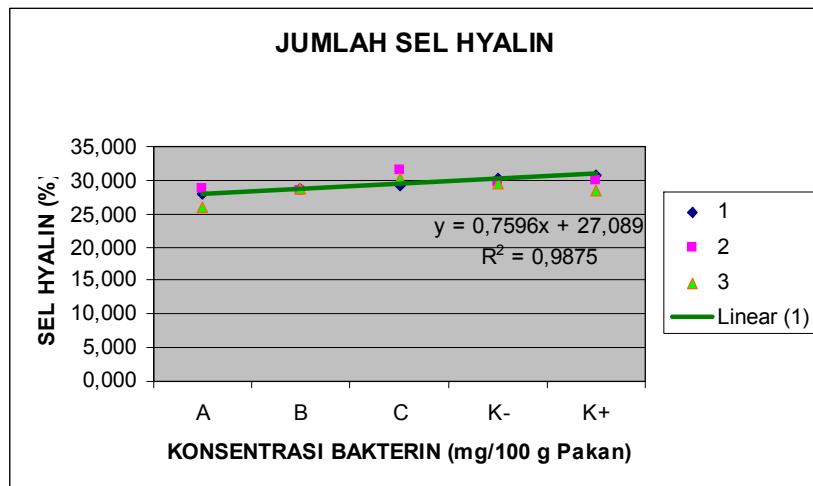
Tabel 8. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel hyalin (%)

PERLAKUAN	UJI TANTANG	
	SEBELUM	SESUDAH
A	46.09±2.16 ^b	58.49±1.44 ^a
B	47.91±0.22 ^a	57.73±1.85 ^a
C	50.42±1.74 ^c	59.56±0.86 ^a
K-	49.69±0.74 ^a	51.59±1.67 ^a
K+	49.60±1.86 ^a	58.88±2.10 ^a

Rata-rata yang ada superscripts sama (a-c) berarti tidak berbeda nyata pada $P < 0.05$

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap persentase jumlah sel hyalin sebelum uji tantang. Hasil uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan bahwa pemberian bakterin pada perlakuan C mempunyai persentase jumlah sel hyalin terbaik yaitu 50.42 % diikuti perlakuan A (46.09%), sedang perlakuan B jumlah sel hyalinnya 47.91 % tetapi tidak memberi pengaruh signifikan yang berarti perlakuan B memberikan pengaruh yang sama dengan kedua kontrol. Jadi perlakuan C memberikan persentase jumlah sel hyalin terbesar. Hal ini terjadi karena kebutuhan yang besar untuk merespon adanya benda asing (*non-self*) yang masuk dalam jumlah besar berupa bakterin yang dikenali melalui lipopolisakarida/LPS (Soderhall *et al.*, 1996). Hasil ini mengindikasikan bahwa respon immun pada *P. monodon* yang paling utama adalah aktifitas fagositosis mengingat fungsi ini menurut Smith dan Soderhall (1983) diperankan oleh sel hyalin. Hubungan antara perlakuan dengan persentase jumlah sel hyalin sebelum uji tantang dapat dijelaskan melalui persamaan $Y = 0.7596X + 27.089$

seperti terlihat pada Grafik 5. Dari persamaan tersebut terlihat bahwa semakin tinggi dosis bakterin yang diberikan pada *P. monodon* maka akan memperbesar persentase jumlah sel hyalin dengan catatan bahwa tidak terjadi infeksi pada hewan tersebut.



Grafik 5. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel hyalin

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin tidak berpengaruh signifikan ($P<0.05$) terhadap persentase jumlah sel hyalin setelah uji tantang. Hal ini memperlihatkan bahwa pengaruh bakterin sebagai immunostimulan hanya bersifat sesaat terhadap komposisi sel hyalin dalam hemolimp. Namun demikian, secara kuantitatif persentase jumlah sel hyalin hampir sama yaitu, perlakuan A = 58.49 %, perlakuan B 57.73 % 59.56 % dan perlakuan C 59.56 %, sedang K+ dan K- adalah 58.88 % dan 51.59 %. Jadi persentase jumlah sel hyalin hampir sama baik diantara perlakuan yang ada maupun dengan K+. Hal ini terjadi karena kebutuhan yang hampir sama dari jumlah sel hyalin pada semua perlakuan maupun K+ untuk merespon invasi *V. Alginolyticus* di tubuh *P. monodon*. Jadi setelah uji tantang tetap menunjukkan bahwa respon immun berupa fagositosis yang paling dominan (Thornqvist *et al.*, 1994).

1.4.2.2 Sel Semigranular

Hasil pemberian bakterin *Vibrio alginolyticus* terhadap komposisi sel semigranular pada THC yang dibahas dibagian sebelumnya ditunjukkan pada Tabel 9.

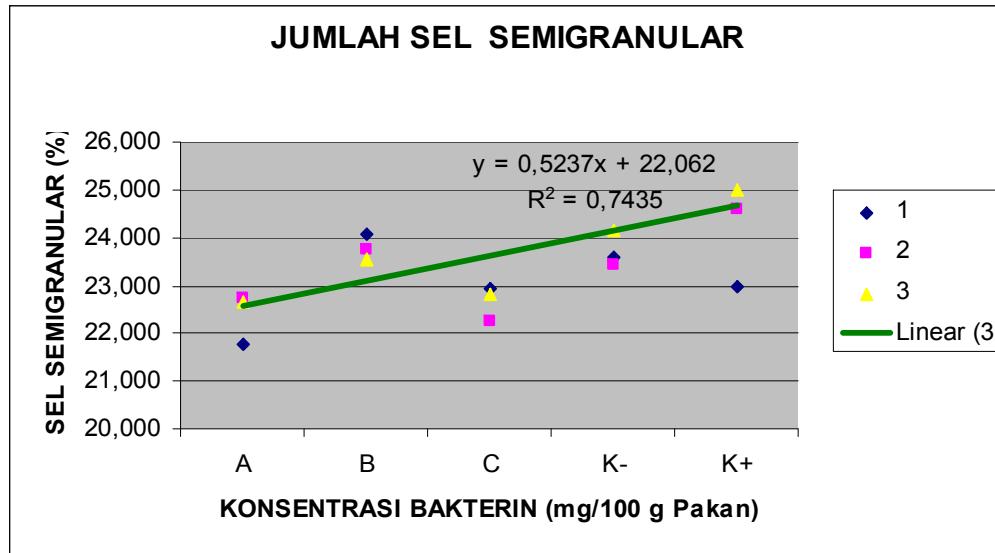
Tabel. 9 Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel semigranular (%)

PERLAKUAN	UJI TANTANG	
	SEBELUM	SESUDAH
A	38.11±0.86 ^b	36.56±1.23 ^a
B	39.79±0.57 ^{ab}	36.62±0.99 ^a
C	38.74±0.87 ^{ab}	36.13±1.91 ^a
K-	40.22±0.65 ^{ab}	40.73±1.37 ^a
K+	40.95±1.70 ^a	33.33±5.76 ^a

Rata-rata yang ada superscripts sama (a-b) berarti tidak berbeda nyata pada $P < 0.05$

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap persentase jumlah sel semigranular sebelum uji tantang. Hasil uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan bahwa pemberian bakterin pada perlakuan A mempunyai pengaruh signifikan terhadap persentase jumlah sel semigranular (38.11 %). Selain itu dari hasil uji BNT juga menunjukkan bahwa perlakuan B (39.79%), perlakuan C (38.74%) dan K- (40.22%) mempunyai pengaruh signifikansi yang sama tetapi berbeda dengan K + (40.95%). Hal ini terjadi karena pemberian bakterin tidak mempengaruhi proses produksi dan maturasi sel semigranular. Hubungan antara perlakuan terhadap jumlah sel semigranular dapat diperjelas melalui persamaan $Y = 0.5237x + 22.062$ seperti terlihat pada Grafik 6.

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin tidak berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap persentase jumlah sel semigranular setelah uji tantang. Hal ini memperlihatkan bahwa pengaruh bakterin sebagai immunostimulan hanya bersifat sesaat terhadap komposisi sel semigranular



Grafik 6. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel semigranular

dalam hemolimp. Namun demikian, secara kuantitatif persentase jumlah sel semigranular hampir sama yaitu, perlakuan A 36.56 %, perlakuan B 36.62 % dan perlakuan C 36.13 %, sedang K+ dan K- adalah 33.33 % dan 40.73 %. Jadi persentase jumlah sel semigranular hampir sama baik diantara perlakuan yang ada maupun dengan K+. Hal ini terjadi karena kebutuhan yang hampir sama dari sel semigranular pada semua perlakuan maupun K+ untuk merespon adanya invasi *V. Alginolyticus* di tubuh *P. monodon*. Menurut Persson *et al.*, (1987) sel semigranular berperan dalam respon immun berupa enkapsulasi tetapi juga dapat melakukan aktifitas fagositosis tetapi terbatas kemampuannya.

1.4.2.3 Sel Granular

Hasil pemberian bakterin *Vibrio alginolyticus* terhadap komposisi sel granular pada THC yang dibahas dibagian sebelumnya ditunjukkan pada Tabel 10.

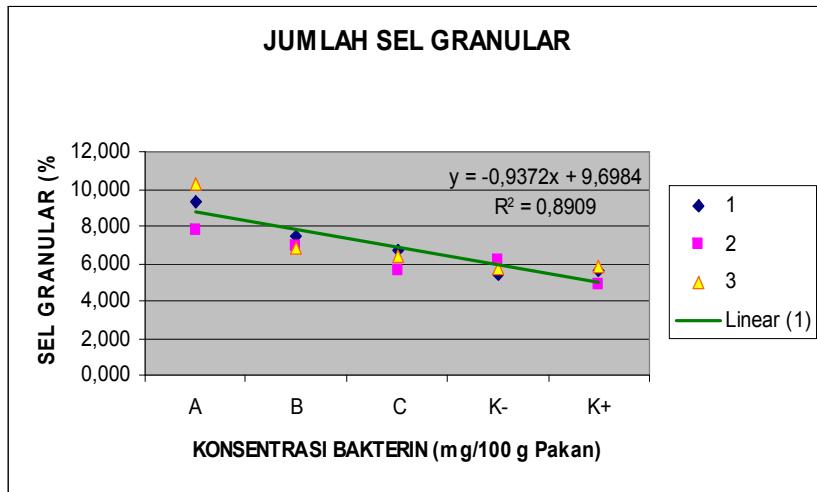
Tabel 10. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel granular (%)

PERLAKUAN	UJI TANTANG	
	SEBELUM	SESUDAH
A	15,81±2.16 ^b	4,95±1.44 ^a
B	12,30±0.56 ^a	5,65±1.97 ^a
C	10,83±0.88 ^a	4,31±1.22 ^a
K-	10,08±0.63 ^a	7,68±1.91 ^a
K+	9,46±0.93 ^a	7,80±3.89 ^a

Rata-rata yang ada superscripts sama (a-b) berarti tidak berbeda nyata pada $P < 0.05$

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap persentase jumlah sel granular sebelum uji tantang. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa pemberian pemberian bakterin pada perlakuan A mempunyai pengaruh signifikan terhadap persentase jumlah sel granular (15.81 %). Selain itu dari hasil uji BNT juga menunjukkan bahwa perlakuan B (12.30 %), perlakuan C (10.83 %), K- (10.08 %) dan K + (9.46 %) mempunyai pengaruh signifikansi yang sama. Hal ini terjadi karena pemberian bakterin tidak mempengaruhi proses produksi dan maturasi serta jumlah sel granular dalam hemolimp. Hal ini dijelaskan oleh Van De Braak (2002) yang menyatakan bahwa proses produksi dan maturasi sel granular ditentukan oleh waktu dan tempat (tepatnya berlangsung di jaringan penghubung). Hubungan antara perlakuan terhadap jumlah sel ganular dapat diperjelas melalui persamaan $Y = -0.9372x + 22.062$ seperti terlihat pada Grafik 7.

Hasil dari uji ANOVA (*Analysis of Variances*) menunjukkan bahwa pemberian bakterin tidak berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap persentase jumlah sel granular setelah uji tantang. Hal ini memperlihatkan bahwa pengaruh bakterin sebagai immunostimulan hanya bersifat sesaat terhadap komposisi sel granular dalam hemolimp



Grafik 7. Pengaruh bakterin terhadap jumlah sel granular

Namun demikian, secara kuantitatif persentase jumlah sel granular pada semua perlakuan hampir sama yaitu, perlakuan A 4.95 %, perlakuan B 5.56 % dan perlakuan C 4.31 %. Persentase jumlah sel granular pada K+ dan K- adalah 7.80 % dan 7.68 %. Jadi persentase jumlah sel granular pada semua perlakuan hampir sama tetapi berbeda dengan K+ dan K-. Hal ini terjadi karena kebutuhan jumlah sel granular yang hampir sama dari semua perlakuan untuk merespon adanya invasi *V. Alginolyticus* di tubuh *P. monodon* tetapi berbeda dengan K+. Menurut Barraco *et al.*, (1991) bahwa saat terjadi invasi patogen, sel granular akan memberikan respon berupa proses degranulasi pada granula yang ada pada dirinya.

4.1.3 Total Protein Pada Plasma Hemosit (*Total Plasma Protein/TPP*)

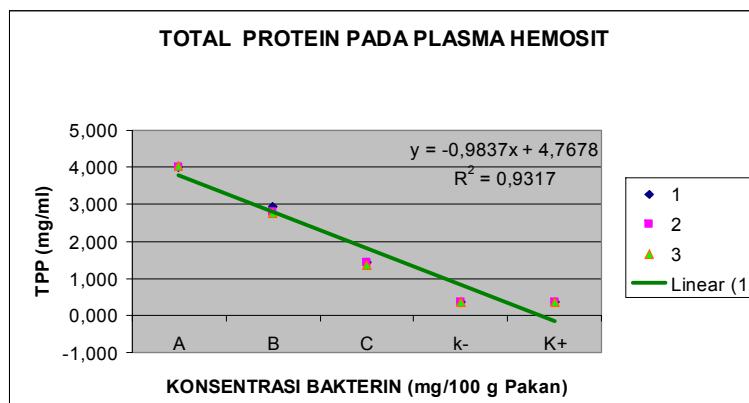
Guna mengetahui pengaruh perlakuan terhadap jumlah protein yang terlibat dalam mekanisme pertahanan tubuh udang windu (*Penaeus monodon*) pada plasma hemosit dilakukan evaluasi 12 jam setelah uji tantang dengan hasil yang terangkum pada Tabel 11.

Tabel 11. Pengaruh bakterin terhadap total protein pada plasma hemosit

PERLAKUAN	TPP (mg/ml)
A	4.01 ^d ±0.02
B	2.84 ^c ±0.09
C	1.40 ^b ±0.03
K-	0.37 ^a ±0.01
K+	0.37 ^a ±0.01

Rata-rata yang ada superscripts sama (a-d) berarti tidak berbeda nyata pada $P < 0.05$

Immunostimulan berupa bakterin berdasarkan hasil dari uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian bakterin berpengaruh signifikan ($P < 0.05$) terhadap TPP. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa pemberian bakterin pada perlakuan A mempunyai jumlah TPP terbaik 4.01 mg/ml kemudian diikuti perlakuan B (2.84 mg/ml, C (1.40 mg/ml) dan K-serta K+ yang memiliki nilai sama sebesar 0.37 mg/ml. Hal ini terjadi karena pemberian bakterin dengan dosis rendah akan merangsang proses produksi dan maturasi sel yang mengandung granula terutama sel granular dan semi granular. Menurut Van De Braak (2002) jika tidak terjadi invasi patogen akan memberi kesempatan sel hyalin mengalami proses maturasi menjadi semigranular dan selanjutnya menjadi sel granular. Hubungan pemberian bakterin terhadap total protein imunologi dapat dinyatakan dengan persamaan $Y = -0.9837x + 4.7678$ (Grafik 8).

**Grafik 8.** Pengaruh immunostimulan terhadap total protein pada plasma hemosit.

4.1.4 Perubahan Gejala Klinis

Bila sebelumnya dibahas mengenai pengaruh pemberian immunostimulan terhadap parameter tingkat seluler pada Lampiran 1 menyajikan perubahan gejala klinis yang mengambarkan pengaruh pemberian bakterin pada *P. monodon* sebelum dan setelah uji tantang yang dilihat melalui terjadinya perubahan perilaku, warna tubuh dan tingkat konsumsi pakan. Secara umum terdapat perbedaan perubahan diantara udang yang diberi perlakuan maupun dengan kontrol. Perbedaan perubahan yang terjadi diantara perlakuan hanya dibedakan waktu mulai berlangsungnya saja, sedang dibandingkan dengan kontrol positif selain mulai waktu perubahan yang berbeda, juga terjadi perbedaan tingkat warna tubuh.

Setelah dilakukan uji tantang, memperlihatkan adanya perubahan yang ditandai dengan berkurangnya nafsu makan yang terjadi pada jam ke 12 setelah uji tantang untuk perlakuan A, B, C dan K+ sedangkan pada K – nafsu makan normal. Aktivitas mulai berkurang/lebih banyak diam terjadi pada jam ke 48 (Perlakuan A), jam ke 24 setelah uji tantang (Perlakuan B dan C), jam ke 12 setelah uji tantang untuk K+, sedangkan pada K- aktivitas gerakannya normal. Gejala utama terjadinya serangan vibriosis berupa terjadinya perubahan warna tubuh menjadi agak merah/*Red Discoloration slight* terjadi pada jam ke 96 setelah uji tantang (Perlakuan A), jam ke 72 setelah uji tantang (Perlakuan B), jam ke 24 setelah uji tantang (Perlakuan C), terjadi pada jam ke 12 setelah uji tantang (K+) dan berubah menjadi merah/*Red Discoloration moderately* pada jam ke 24 setelah uji tantang, sedangkan pada K- tidak terjadi perubahan warna tubuh. Menurut Kamiso (2004) bahwa gejala *red discoloration* muncul sekitar 4 hari dan menyebabkan kematian 8 hari setelah gejala tersebut muncul.

4.1.5 Kualitas Air

Selama Penelitian parameter kualitas air berusaha dijaga kondisinya agar tetap stabil dan hasilnya tersaji pada Tabel 12. Parameter kualitas air yang diukur selama penelitian meliputi suhu, salinitas, pH dan Oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen/DO*). Nilai Suhu berkisar antara 24 °C sampai 28.6 °C dengan rata-rata suhu di masing-masing perlakuan maupun kontrol antara 25.4-25.5 °C. Nilai Salinitas rata-rata pada semua perlakuan maupun kontrol tidak berbeda yaitu berkisar 15 ppt. Nilai pH berkisar antara 6.6-8.1 dengan rata-rata pH masing-masing perlakuan antara 5.8 sampai dengan 6.0. Nilai DO berkisar antara 4.49 sampai 5.59 mg/l dengan rata-rata pada semua perlakuan maupun kontrol antara 4.3-4.7 mg/l.

Tabel 12. Nilai parameter kualitas air selama penelitian

PERLAKUAN (TREATMENT)	SUHU (°C)	SALINITAS (PPT)	pH	DO (mg/l)
A	25,5	15,0	6,0	4,7
B	25,4	15,0	5,9	4,5
C	25,5	15,0	5,9	4,3
K-	25,4	15,0	5,7	4,0
K+	25,4	15,0	5,8	4,3
MAX	28,6	15,0	8,1	5,59
MIN	24,0	15,0	6,6	4,48
Standar ^(*)	24-31	5-25	6.5-8.5	>5

(*) Sumber : Departemen Kelautan dan Perikanan

Secara keseluruhan nilai parameter kualitas air berada dalam kisaran optimum (kecuali pH) untuk budidaya *P. monodon* selama penelitian berlangsung.

4.2 PEMBAHASAN

Pendekatan immunologi dalam upaya pencegahan penyakit ikan dan udang biasa menggunakan antibiotik, obat-obatan ataupun vaksinasi dalam melawan patogen tertentu, sementara penggunaan immunostimulan relatif baru dan sedang berkembang. Secara umum krustasea termasuk *P. monodon* mempunyai tiga jenis tipe hemosit yang mengikuti klasifikasi Bachau (1981) yaitu sel hyalin, sel semigranular dan sel granular. Setiap sel memiliki karakteristik morfologi dan fungsi yang berbeda seperti pada Tabel 3. Hemosit bertanggung jawab terhadap proses penggumpalan (*Clotting*), pengerasan eksoskeleton dan mengeliminir material asing. Rata-rata udang penaied sehat memiliki THC berkisar antara $20-40 \times 10^6$ sel/ml (Chang *et al.*, 1999) sedangkan menurut Supamattaya (2000), THC pada *P. monodon* yang sehat berkisar antara 10^4-10^5 sel/ml.

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh yang positif bakterin *Vibrio alginolyticus* terhadap kelimpahan THC baik sebelum maupun setelah dilakukan infeksi bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian Boonyaratpalin (1999) menyatakan bahwa sejumlah substansi seperti β -1,3 glucan, Lipopolysakarida (LPS), peptidoglikan, dan endotoxin atau bakteri yang dimatikan (bakterin) dapat meningkatkan respon immun krustasea. Disinggah yang lain hasil penelitian ini menunjukkan terjadinya penurunan nilai rerata THC pada *P. monodon* yang diberi perlakuan ataupun tidak diberi perlakuan setelah uji tantang. Penurunan nilai THC ini mengindikasikan bahwa bakterin *V.alginolyticus* sebagai immunostimulan hanya memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertahanan / perlindungan bagi *P. monodon* dalam waktu yang singkat (*Short Time Protection*). Terjadinya penurunan nilai THC ini karena pada saat adanya invasi *V. Alginolyticus* ke tubuh *P. monodon* hemosit dimobilisasi menuju daerah yang terinfeksi

(*Infection site*) untuk melakukan reaksi immun baik pada tingkat seluler maupun humoral. Pada tingkat seluler reaksi immun yang dilakukan diantaranya fagositosis, enkapsulasi dan nodulasi sedang pada tingkat humoral diantaranya penggumpalan (*Clotting*), melanisasi dan reaksi-reaksi lain yang terlibat/berasosiasi dalam proses *Clotting* (seperti aktifasi transgluminase) maupun melanisasi (Peroxinektin, aktifasi ppa/ prophenoloxidase aktivating enzim, protein penghambat, dll.). Konsentrasi bakterin 25 mg/100 g pakan memberikan hasil terbaik diantara perlakuan maupun kontrol karena mobilisasi hemosit relatif kecil dalam merespon bakterin yang akan dianggap sebagai *non-self* bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Lebih lanjut Smith (2003) menjelaskan bahwa penggunaan immunostimulan dalam waktu yang panjang menurunkan kemampuan pertahanan sehingga akan mempengaruhi kemampuan dalam melawan jika terjadi infeksi. Pada 24 jam setelah diinfeksi bakteri, nilai THC pada semua perlakuan maupun kontrol mengalami kenaikan dan mengalami penurunan secara bertahap hingga pada 96 jam kemudian. Hal ini sejalan dengan yang dikatakan Citarasu *et al.*, (2006) bahwa setelah terinfeksi nilai THC akan menurun sampai periode waktu tertentu dan kembali mengalami kenaikan secara bertahap kembali ke nilai THC semula. Penelitian lebih lanjut akan hal ini dilakukan Hannig *et al.*, (1998) yang menemukan bahwa ketika *Penaeus japonicus* diberi pakan komersil yang dicampur dengan β -1,3 glucan (BG) selama 14 hari dan kemudian diinfeksi dengan virus, THC dari kelompok yang diberi BG meningkat 1.2-1.3X lebih tinggi daripada kelompok yang tidak diberi Pakan BG disetiap sampling sebelum dan sesudah uji tantang. Temuan tersebut juga didukung Chang *et al.*, (2003) yang menyatakan bahwa

THC *P. monodon* turun drastis hingga 60% dari jumlah sebelumnya setelah 24 jam diinfeksi WSSV.

Hemosit memainkan peran penting pada pertahanan seluler, jumlah hemosit yang ada bila lebih rendah dari keadaan normalnya pada krustasea akan berhubungan dengan berkurangnya kemampuan dalam melawan jika ada infeksi (Le Moullac *et al.*, 1998, 2000). Juga Yoganandhan *et al.*, (2002) mengamati perbedaan signifikan dari nilai THC udang *P. indicus* antara yang diinfeksi WSSV dengan yang tidak. Jumlah hemosit dipengaruhi oleh kondisi fisiologis seperti moulting, perkembangan organ, status reproduksi, kondisi nutrisi dan penyakit (Cheng and Chen, 2001). Le Moullac *et al.*, (2000) menyatakan bahwa faktor lingkungan seperti suhu, DO, salinitas, amoniak mempengaruhi THC. Penelitian yang lain dilakukan oleh Maeda *et al.*, (1997) mengamati terjadinya penurunan THC pada udang yang diinfeksi dengan PRDV. Penurunan THC pada hewan yang diinfeksi disebabkan oleh akumulasi hemosit pada lokasi terjadinya infeksi untuk menangani luka dan mengeliminir material asing (Ratcliffe *et al.*, 1979, Sahul Hameed, 1989).

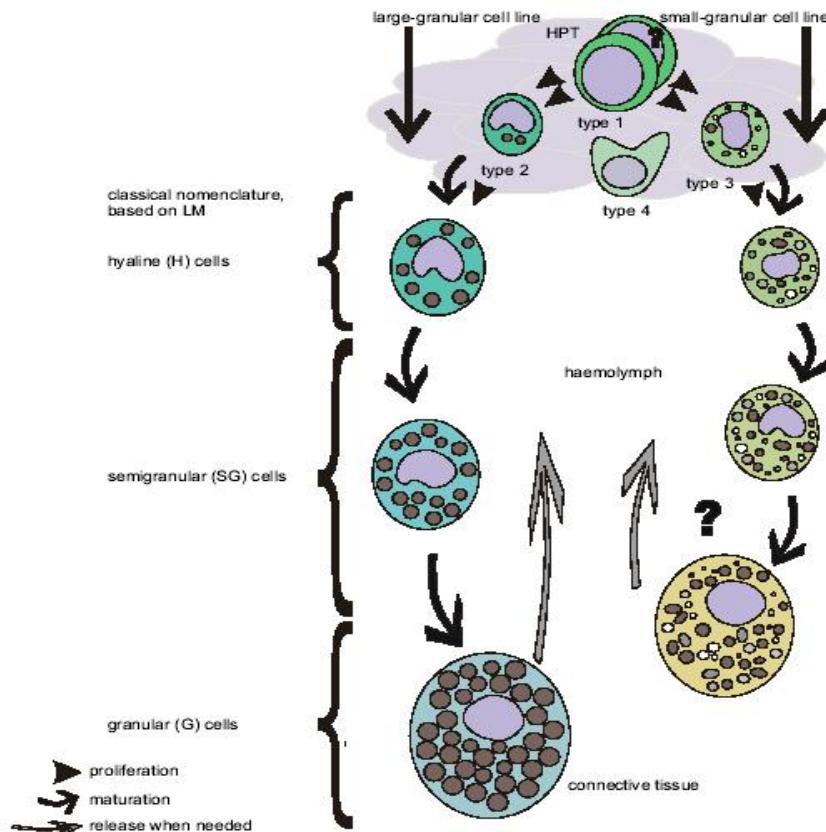
Penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi bakterin yang besar (100 mg/100 g pakan) justru berpengaruh negatif dengan berkurangnya nilai THC karena mobilisasi hemosit harus lebih banyak sehingga dengan banyaknya bakterin yang dianggap sebagai *non self* bagi tubuh dan pada dosis ini gejala serangan vibriosis lebih cepat terjadi bila dibandingkan dosis yang lebih rendah sehingga bisa dikatakan resistansi terhadap *V. alginolyticus* rendah. Fenomena yang mirip dilaporkan Huang *et al.*, (2006) pada *F. chinensis* yang diberi pakan berisi SFSE tidak memiliki resistansi yang lebih tinggi kepada *V. harveyi* daripada kontrol. Boonyaratpalin *et al.*, (1993) mencatat

bahwa pertumbuhan dan respon immun *P.monodon* terhambat oleh dosis yang berlebihan dari pemberian peptidoglukan (PG).

Evaluasi terhadap komposisi persentase sel hyalin (H), sel semigranular (SG) dan Sel Granular (G) menunjukkan bahwa sel H (48.74 %) paling dominan pada populasi hemosit disemua perlakuan yang diikuti sel SG (39.56 %) pada posisi kedua dan yang terakhir sel G (11.69 %). Komposisi yang sama ditemukan juga oleh Hose *et al.*,(1990) pada *P. Panulirus* dengan persentase berbeda, yaitu sel H (61.00 %), sel SG (29.20 %) dan sel G (9.80 %) sedangkan Onsanit *et al.*, (2005) mengatakan bahwa pada krustasea umumnya terdiri dari sel H (80 %), sel SG (10-13 %) dan sel G (4-10 %).

Pada penelitian ini *P. monodon* yang terinfeksi mengalami penurunan pada masing-masing tipe sel hemosit. Hal ini mengindikasikan bahwa ketiga tipe sel hemosit terlibat dan saling bekerjasama dalam merespon adanya invasi. Dapat di jelaskan lebih lanjut bahwa penurunan ini terkait dengan fungsinya dalam merespon adanya material asing. Seperti dijelaskan Soderhall *et al.*,(2000) bahwa tipe sel yang berbeda mempunyai fungsi yang tidak sama. Sel hyalin berfungsi dalam proses fagositosis (Smith and Soderhall et al., 1983), sel semigranular berperan utama dalam proses enkapsulasi (Kobayashi *et al.*, 1990) dan berperan juga dalam proses fagositosis yang terbatas (Smith and Soderhall, 1983), menyimpan dan melepaskan sistem proPO (Johansson and Soderhall (1985). Sel granular berperan utama dalam sitotoksis (Soderhll *et al.*, 1985), sistem penyimpanan dan pelepasan sistem proPO (Johansson and Soderhall, 1985). Jadi penurunan semua sel-sel tersebut terjadi dalam rangka merespon adanya invasi *V. alginolyticus*. Hal ini sejalan dengan pernyataan Soderhall and Cerenius (1992), meski berbeda tipe sel akan berkomunikasi dan berkerjasama untuk merespon terjadinya

infeksi dan mengeliminirnya. Walau penurunan tersebut merupakan peristiwa alamiah, ternyata penelitian ini membuktikan bahwa immunostimulan berupa bakterin dalam konsentrasi rendah (25 mg/100 g pakan) berperan dalam menentukan komposisi persentase ketiga tipe sel di hemolimp bila tidak terjadi invasi. Temuan itu diperkuat dengan hasil pengamatan gejala klinis yang menunjukkan bahwa perlakuan dengan konsentrasi rendah lebih lama memunculkan gejala serangan infeksi bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain, meskipun mekanismenya belum dipahami secara jelas. Namun demikian, hal itu dapat dijelaskan oleh peneliti dengan menggunakan pendekatan model produksi dan maturasi hemosit yang ditulis oleh Van de Braak (2002) seperti tertera pada Gambar 9.



Gambar 9. Model produksi dan maturasi hemosit (Van De Braak, 2002)

Dari gambar tersebut dapat dijelaskan bahwa satu atau dua varietas dari salah satu tipe *precursor cell line* tersebut (*Large granular* atau *small granular* cell line precursor) berkembang menjadi tipe ke-2 dan ke-3 pada jaringan haematopoietic (*Haematopoietic Tissue/HPT*). Namun belum jelas apakah tipe *precursor cell line* yang satu bisa berkembang menjadi *precursor cell line* yang lain. Saat dilepaskan menuju hemolimp, tipe hemosit yang masih muda dikenal dengan sebutan sel hyalin (H) yang kemudian berkembang menjadi *large granular* dan atau *small granular*. *Large granular* diangkut menuju jaringan penghubung sedang *small granular* diangkut menuju organ limfoid untuk proses maturasi hemosit. Setelah matang (*mature*) dikenal dengan sebutan sel granular (G) untuk *Large granular* dan sel Semigranular (SG) untuk *small granular*. Saat stress, terluka ataupun adanya invasi material asing, sel G kembali ke hemolimp menuju tempat dimana dibutuhkan. Namun demikian apa dapat kembali ke bentuk sebelumnya setelah mengalami maturasi, masih belum jelas dan butuh penelitian lebih lanjut.

Dari penjelasan diatas, telah menjawab pertanyaan penyebab persentase jumlah masing-masing tipe hemosit berbeda dan mengapa sel H paling dominan pada populasi hemosit dibanding sel yang lain dan sel G yang paling sedikit. Ternyata hal ini berkaitan dengan ada tidaknya granula pada sitoplasma dan adanya proses maturasi.

Total Protein pada plasma hemosit (Total Protein Plasma/TPP) merupakan parameter lain yang sering digunakan karena dapat dijadikan indikasi mengenai respon immun seluler pada hewan krustasea seperti *P. monodon*. TPP adalah kumpulan berbagai protein yang terlibat dalam mekanisme pertahanan ketika terjadinya invasi oleh patogen. Beberapa Protein yang terlibat dalam mekanisme pertahanan tubuh *P. monodon*

telah diisolasi sebagaimana terlihat pada Tabel 5. Hasil penelitian ini menunjukan bahwa immunostimulan berupa bakterin berpengaruh nyata terhadap jumlah TPP. Perlakuan A dengan konsentrasi rendah mempunyai hasil TPP tertinggi (4.01 mg/ml) diantara perlakuan yang lain maupun kontrol. Hasil ini kontras dengan yang diperoleh Citasaru (2006) menggunakan bahan herbal sebagai immunostimulan bagi *P. monodon* yang hasil terbaik diperoleh pada dosis yang tinggi yaitu dosis 800 mg/kg. Namun demikian penelitian ini maupun Citasaru (2006) telah mampu membuktikan bahwa immunostimulan dapat meningkatkan konsentrasi protein pada hemosit. Catatan yang perlu diperhatikan adalah banyaknya faktor yang mempengaruhi nilai TPP diantaranya ukuran hewan uji (Chen and Cheng, 1993), jenis kelamin (Miranpuri *et al.*, 1991), kondisi nutrisi (Ullrich *et al.*, 1992) dan faktor lingkungan seperti suhu (Oliver and Fisher, 1995), salinitas (Dall, 1974), dan amoniak (Chen *et al.*, 1994). Dall (1974) melaporkan bahwa konsentrasi protein dalam darah berubah selama moulting tetapi ini berkebalikan dengan volume hemolimp.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa bakterin *V. alginolyticus* dapat dijadikan sebagai immunostimulan yang mampu meningkatkan respon immun seluler *P. monodon* yang dibuktikan dengan meningkatnya jumlah total hemosit (Total Hemocyte Count/THC), total protein pada plasma hemosit (Total Plasma Protein TPP) dan memperlambat munculnya gejala infeksi vibriosis.

5.2 Saran

Perlu kajian lebih dalam dan komprehensif mengenai penggunaan bakterin *V. alginolyticus* sebagai immunostimulan bagi *P. monodon* agar dapat memberikan perlindungan dalam jangka waktu yang lama (*Long Time Protection*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2006. Marine and Fisheries Statistics. Ministry of Marine Affair and Fisheries. 348 page.
- Amstrong, P.B. and Quigley,J.P. 1999. α_2 -Macroglobulin: An Evolustionarily Conserved Arm of the Innate Immune System. Development and Comparatife Immunology. 23: 3 – 11.
- Austin, B. 2004. Control of Fish Disease. Proseding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV.18-19 Mei 2004. Purwokerto.
- Baily-Brock,J.H. and Moss, S.M. 1992. Penaeid Taxonomy,Biology and Zoogeography. in : Fast, A.W. and Lester, L.J. (Editors). Marine Shrimp Culture : Principles and Practices. Elsevier Science Publisher,Amsterdam, pp.9 – 28.
- Barracco, M.A., B. Duvic and K. Soderhall. 1991. The β -1,3 Glucan-Binding Protein from the Crayfish *Pasifastacus leniusculus*, When Reacted with a β -1,3 Glucan, Induces Spreading and degranulation of Crayfish Granular Cells. Cell Tissue Research, 266 : 491-497.
- Bauchau, A.G. 1981. Crustacea. in : Ratcliffe N.A. and Rowley,A.F. (Editors). Invertebrate blood cell. Academic Press, London and New York, pp. 385 – 420.
- Bell, T.A and Lightner, D.V. 1988. A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society, Baton Roueg , 114 pp.
- Bijanti, R. Himatologi Ikan: Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematology Ikan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 31 Hal.
- Boonyaratpalin, M. 1993. Nutritional Requesment Of Grouper *Epinephelus*. In : The Proceeding Of Grouper Culture. Thailand: National Institute Of Coastal Aquaculture. Departemen Of Fisheries. pp 50-55.
- Boonyaratpalin, S., U. Ekpanithanpong, K.Supamattaya. 1999. Separation of Shrimp Haemocytes (*Penaeus monodon*) and The Opsonic Effect of Serum on Phagocytic Actifity. Asian Fisheries Science. 32: 337-342.
- Chang, C.F., Su M.S., Chen H.Y., Lo C.F., Kou G.H. and Liao I.C. 1999. Effect Of Dietary β -1,3 Glucan On Resistance To White Spote Syndrome Virus (WSSV) In Post Larva And Juvenile *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ. 36: 163-168.

- Chang, C.F., Su M.S., Chen H.Y., Lo C.F. and Liao I.C. 2003. Dietary β -1,3 Glucan Effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with White Spote Syndrome Virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology. 15: 297-310.
- Chen, J.C. and Cheng S.Y. 1993. Studies on Hemocyanin and Haemolymph Protein Levels of *Penaeus japonicus* Based on Sex, Size and Moulting Cycle. Comparative Biochemistry and Physiology B. 106 : 293-296.
- Chen, J.C. and Cheng S.Y. and Chen C.T. 1994. Change of hemocyanin , Protein and free Amino Acid Levels in Hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonoa. Comparative Biochemistry and Physiology A. 109 : 339-347.
- Cheng, W.T. and Chen J.F. 2001. Effects Of Intrinsic And Extrinsic Factors On The Hemocyte Profile Of The Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunol. 11: 53-63.
- Citarasu, T., Veeramani S., Grasian I., Namita R.and Vadivel M. 2006. Influence of Selected Indian Immunostimulant Herbs Against White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* With Reference Haematological, Biochemical and Immunological Changes. Fish and Shellfish Immunology. 26 : 372-384.
- Dall, W. 1974. Indices Of Nutritional State in The Western Rock Lobster, *Panulirus langipes*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 16 : 167-180.
- Destoumiceux, D., Bullet , P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez,J. and Bachere, E. 1997. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptide Isolated from the Shrimp *Penaeus Vannamei* (Decapoda). The Journal Of Biological Chemistry. 272: 28398 – 28406.
- Destoumiceux, D., Monaz, M., Cosseau,C., Rodriguez,J., Bullet, P., Comps,M., Bachere, E. 2000. Penaidiens, Antimicrobial Peptides with Chitin - Binding Activity, are Produced and Stroge in Shrimp Granulocyte and Release after Microbial Challenge. Journal of Cell Science. 113 : 433 – 469.
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. Academic Press. London. 284 Page.
- Garriques,D., Arevalo,G. 1995. An Evaluation of The Production and Use of A Live Bacterial Isolate to Manipulate *Penaeus vanemai* Post Larvae in Ecuador. In : Browdy,C.L., Hopkins,J.S. (Eds). Swimming Trough Trouble Water.Proceeding of The Special Session on Shrimp Farming aquaculture'95. Pp.55-59.

- Gatessoupe, F.J.S. 1990. The Continues Feeding Of Turbot Larva (Scaphthalmus Maximus)and Control Of The Bacterial Environment Of Rotifer. Aquaculture. 89: 139- 148.
- Goarant, C., Jose Herlin, Raphael Brzirad, Bernand Martin. 2000. Toxic Factors of Vibrio strains Phatogenic of Shrimp. Diseases aquatic org. 40 : 101-107.
- Hall, M.R, Van Ham, E.H. 1999. The Effect of Different Type of Stress on Blood Glocuse in the Giant Black Tiger Prawn (*Penaeus Monodon*). Journal of the World Aquaculture Society .29: 290 – 299.
- Hannig, O., Itami T., Maeda M., Kondo M., Natsukari Y. and Takahashi Y. 1998. Analyses of Hemolymph Immunoparameter in Kuruma Shrimp Infected With Penaeid Rod-Shape DNA Virus. Fish Pathol. 33: 389-393.
- Harris, E. 2000. Shrimp Culture Health Management (SCHM): Manajemen Operasional Tambak Udang Mencapai Target Protekan 2003. Makalah Disampaikan Pada Sarasehan Aqaukultur Nasional, 5-6 Oktober, FPIK- IPB. Bogor.11 hal.
- Hose, J.E., G.G. Martin, A.S. Gerard. 1990. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry and Function. Biol.Bull. 178 : 33- 45.
- Huang, X., Hongsqi Zhou, Hui Zhang. 2006. The Effect of *Sargassum fusiforme* Polysaccharide Extracts (SFPSE) on Vibriosis Resistance and Immune Activity of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish and Shellfish Immunology. 20 : 750-757.
- Jayasree, L., P. Janakiram and R. Madhavi. Characteristics, Pathogenicity and Antibiotic Sensitivity of Bacterial Isolate from White Spot Diseases Shrimp. Asian Fisheries Society. 13 : 327-334.
- Johansson, M.W. and Soderhall, K. 1985. Cellular Immunity In Crustacean and ProPO System. Parasitol Today. 5 : 171-176.
- Johnsson, M.W., Soderhall, K. 1988. Isolation and Purification of A Cell Adhesion Factors from Crayfish Blood Cell . Journal of Cell Bioogy. 106 : 1795 – 1803.
- Johnsson, M.W., Soderhall, K. 1992. Cellurer Defence and Cell Adhesion in Crustaceans. Animal Biology. 1: 97 – 107.
- Johansson, M. 1999. Cell Adhesion Molecules Invertebrate Immunity. Development and Comparative Immunology. 23: 303 – 315.
- Joly, E., Jane Kirk, Keith Jermyn, and Jeffrey Williams.1990. Addition Of Heat-Killed Bacteria To *Dictyostelium* Transformamnts. *An Online Informatics Resource for Dictyostelium*.

- Kamiso, H.N. 2004. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia. Proseding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV.18-19 Mei 2004. Purwokerto.
- Kanost, M.R. 1999. Serine Proteinase Inhibitors in Arthropoda Immunity. Development and Comparative Immunology. 23: 291 – 301.
- Kobayashi, M., Johnsson, M.W., Soderhall, K. 1990. The 76 KDa Cell Adhesion Factor from Crayfish Haemocyte Promotes Encapsulation In Vitro. Cell and Tissue Research. 260: 13 – 18.
- Kopacek, P., Grubhoffer, L., Soderhall, K. 1993. Isolation and Characterization of a Hemagglutinin with Affinity for Lipopolysaccharides from Plasma of the Crayfish *Pacifastacus Leniusculus*. Development and Comparative Immunology. 17 : 401 – 418.
- Kurmaly, K. 1992. Mikro-Ingredient dan Reseptor Kekebalan. Roche Aquaculture Center for East. Bangkok. Thailand.
- Le Moullac, G., Soyez C., Soulner D., Ansquer D., Averre J.C., and Levy P.1998. Effect of Hypoxia Stress on The Respon Immune and Resistance to Vibriosis of The Shrimp *Penaeus stylostris*. Fish Selfish Immunol. 8 : 621-629.
- Le Moullac, G. and Hanner P. 2000. Environmental Factors Affecting Immune Responses in Crustacean. Aquaculture. 191: 121-131.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.F., Far A.L. and Randall R.J. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. Biol Chem. 193 ; 265-275.
- Maftuch. 2006. Pengaruh Outer Membrane Protein (Omp) *Vibrio Alginolyticus* pada Ikan Kerapu Tikus di Perairan. Ringkasan Disertasi. Universitas Brawijaya. Malang.68 Hal.
- Maeda, M., Itami T., kondo M.,hennig O., Takahashi Y. And Hirono I.1997. Characteristics of Penaeid Rod-Shape DNA Virus of Kuruma Shrimp. NRIA International Workshop. In : New Approaches to Viral Diseases of Aquatiq Animal. Nansei, Mie, Japan : National Reserch Institutes of Aquaculture. pp : 218-228.
- Millar, D., Ratcliffe N.A. 1994. Invertebrate. In : Turner , R.J.(Editors). Immunology , a Comparative Approach . John and Sons Ltd, England, pp. 29 – 68.
- Miranpuri, G.S., Bidochka M.J. and Khachatourians G.G. 1991. Morphology and Cytochemistry Analysis of Hemolymph from *Melanophelus sanguisnipes*. Journal of Economic Entomology. 84 ; 371-378.

- Muliani, E.Suryati, A.Tenriulodan dan B.R.Tampanggalo. 2002. Efektifitas Ekstrak Mangrove *Osbornia Octodonta* Untuk penanggulangan Penyakit Vibrosis pada budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon*). Proseding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV.18-19 Mei 2004. Purwokerto.
- Munaz, M., Rodriguez,J., Van der Knaap,W.P.W., Mialhe, E and Bachere, E. 2000. Measurement of Reactive Oxygen Intermediate Production in Haemocyte of the Penaeid Shrimp, *Penaeus Vannamei*. Aquaculture. 191 : 87 – 107.
- Murdjani, M. Nuraini, Y.I dan Triastutik, G. 2003. Hama Penyakit Ikan dan Udang Pada Usaha Pembenihan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Situbondo. 13 hal.
- Murdjani. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu. *Cromileptes altivelis*. Disertasi. Universitas Brawijaya. Malang.117 Hal.
- Nazir. 2005. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Bogor. 152 Hal.
- Noel, krieg and John. 1984. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Volume I. Penerbit Williams and Wilking. USA. 964 page .
- Oliver, L.M. and Fisher W.S. 1995. Comparative Form and Fuction of Oyster *Crassostrea virginica* Hemocyte From Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachiochola Bay (Florida). Diseases of Aquatic Organisms. 22 : 217-225.
- Onsanit, S., M. Tamtim, J. Kaukauw, S.Thongrod and E. Fell. 2005. Effect of Beta Carotene From Blakeslea trispora on Immune Function of Shrimp *Penaeus monodon*. RURED Poster 127 on the WAS 2005.
- Persson, M., Cerenius, L and Soderhall. 1987. The Influence of Hemocyte Number on the Resistance of the Freshwater Crayfish (*Pasifastacus luniusculus*) to the Parasitic Fungus *Aphanomices astaci*. Journal fish diseases, 10 : 471-477.
- Radriguez, J. and Gilles Le Moullac. 2000. State of The Art Of Immunological Tools and Health Control of Peinated Shrimp. Elsevier.Aquaculture. 191: 109-119.
- Ratcliffe, N.A. and Rowley A.F. 1979. Role of Hemocyte in Defence Againts Biological Agents. In : Gupta AP, editor. Insecthemocytes-Development forms, Functions and Techniques. Cambridge, UK,Cambridge University Press. pp: 331-414.
- Robertsen, B., G. Rorstad and J. Raa. 1990. Enchancement of Non Spesific Diseases Resistance In Atlantic Salmon (*Salmon salar*) by a glucan From *Saccharomyces cerevisiae* Cell walls. J Fish Diseases,13 : 391-400.

- Roza, D., Frish Jony dan Yunus. 2001. Pengendalian Vibriosis pada Larva Kepiting Bakau Melalui Penggunaan Bakterin. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 7(3): 28-32.
- Rukyani, A., Taufuk, A dan Tauhid. 1992. Penyakit Kunang-Kunang di Hatchery Udang Windu dan Cara Penanggulanganya. Primadona. Bindel kedua. Edisi April. Jakarta. 10 hal.
- Sahul Hameed, A.S. 1989. Studies on the Pathobiology of Penaeid Larvae and Post Larvae. PhD Thesis. Cochin University of science and Technology. Chocin, India. 243 page.
- Sharief dan Subasinghe. 1992. Sustainable Shrimp Culture Development: Biotechnological Issue and Challenge. Proceedings to The Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiengmai, Thailand 11-14 November 1992.
- Smith,V.J. and Soderhall, K.1983. Separation of The Henocyte Population of *Carcinus maenas* and Others Marine Decapodas, and Prophenoloxidase Distribution. *Developmental and Comparative Immunology*. 7 : 229-239.
- Smith,V.J., J.H Brown and Crish Houton. 2003. Immunostimulation in Crustacean : Does It Really Protection Againts Infection?. *Fish and Shellfish Immunology*, 15 : 71-90.
- Soderhall, K., A. Wingren, Johansson M.W., Bertheussen K. 1985. The Cytotoxic Reaction of Hemocyte From The Freshwater Crayfish, *Astacus astacus*. *Cell Immunol*. 94 : 326-332.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 3 – 23.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. and Johnsson, M.W 1996. The Prophenoloxidase Activating System in Invertebrate. In: Soderhall, K., Iwanaga, S., and vasta, G.R (Editors). *New Direction in Invertebrate Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, Pp. 229 – 253.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. 1998. Role of Prophenoloxidase – Activity System in Invertebrate Immunity. *Current Opinion In Immunology*. 10: 23 – 28.
- Soderhall, K., Johansson M.W., Pia Keyser and K. Sritunyalucksana. 2000. Crustacean Hemocyte and Haematopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.

- Solis, N.B. 1998. Biology and Ecology. In: Biology and Culture of *Penaeus monodon*. SEAFDEC, Brackish Water Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbaouan, Iloilosoderhall, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean Immunity. Annual Review of Fish Diseases. 2: 3 – 23.
- Song, Y.L., Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulant of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Haemocyte for Generation Microbial Substances: Analysis of Reactive Oxygen Species. Development and Comparative Immunology. 18: 201 – 209.
- Sritunyalucksana, K. and K. Soderhall. 2000. The proPO and Clotting System in Crustacea. Aquaculture. 191 : 53 – 68.
- Sritunyalucksana, K., K. Wongsuebsantati, M.W. Johnsson and K. Soderhall. 2001. Peroxinectin, a Cell Adhesion Protein Association with the proPO System the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. Development and Comparative Immunology. 25 : 179 – 186.
- Sritunyalucksana, K., S.Y. Lee, K. Soderhall. 2002. A β -1,3-Glucan Binding Protein from The Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. Development and Comparative Immunology. 26: 237 – 245.
- Subagio, H. 1997. Tinjauan Fisiologis Hematopoiesis dan Imunitas pada Crustacea. Jurnal Perikanan. I (1) : 10-14.
- Sung, Hung., Pei An Hih, Yung Yuang Ting And Shih Rong Koa. 2003. Observation Of Effects Of Timsen TM On The Cultivate Of Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*)- Pond Water Quality, Vibrio Community And Virus Distribution Of Hepatopancrease,Growth And Cellular Immunity. J.Fish. Soc. Taiwan 31 (1): 39-53.
- Supamattaya, K., C. Chittiwat, M. Boonyaratpalin. 2000. Immunological Factors in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*. J.Sci.Technol. 22 : 346-359.
- Thornqvist, P.O., M.W. Johnsson, K. Soderhall. 1994. Opsonic Activity of Cell Adhesion Proteins and β -1,3-Glucan Binding Proteins from Two Crustacean. Development and Comparative Immunology. 18: 3 -12.
- Toban, H. Mahfud. 2008. Perubahan Jumlah Hemosit, Kandungan Anion Superoksida dan Aktifitas Enzim Protease Udang Windu (*Penaeus monodons*) Pasca Pemberian Immunostimulan *Gracilaria verrucosa*. Thesis Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. 55 Hal.
- Ullrich, B., Vollmer S. and V. Storch. 1992. Hemolymph Protein Patterns and Coprophagous Behavior in *Osnicus asellus*. Invertebrate Reproduction and Development. 21 : 193-200.

- Van de Brak, K. 1996. Cellular and Humoral Characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) Haemolymph. Comparative Haematology International. 6: 194-203.
- Van de Brak, K. 2002. Haemocyte Defence in The Blak Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Disertasi. Wageningen University. Netherland. 159 page
- Vargas - Alberos, F., Jimenez – Vega, F., Soderhall, K. 1996. A Plasma Protein Isolated from Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*) Which Enhance The Activity of Prophenoloxidase System By β -1,3-Glucan. Development and Comparative Immunology. 20: 299 – 306.
- Vargas - Alberos, F., Jimenez – Vega, F., Yepiz - Plascencia, G. 1997. Purification and Comparation of β -1,3-Glucan Binding Proteinfrom White Shrimp (*Penaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology. 116B: 453 – 458.
- Vargas - Alberos, F. and Yepiz - Plascencia, G. 2000. β -1,3-Glucan Binding Protein and Its Role in Shrimp Immune Response. Aquaculture. 191: 13 – 21.
- Volk, W.A. dan M.F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Editor Soenartono Adisoemarto. Erlangga Jakarta. 396 hal.
- Wu, J. and Chang Lin. 1981. Biological Control of Fish Bacterial Pathogen *Aeromonas Hydrophilla* By Bacteriophage. Fish Pathology.
- Yoganandhan K, Thirupathi S, Sahul Hameed A.S. 2002. Biochemical, Physiological and Hematological Change in White Spot Syndrome Virus Infected Shrimp *Penaeus indicus*. Aquaculture. 62 : 1-11.

Lampiran 1. Perubahan Gejala Klinis Setelah Uji Tantang

Perlakuan	Perubahan Gejala Klinis							
	0	5 menit	4 jam	12 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
A 1	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Aktif, warna normal, nafsu makan sedikit berkurang	Diam, warna normal, nafsu makan berkurang	Mati dg ciri-ciri : badan kaku dan melengkung, pada tubuh dan uropod agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>)	-
A 2	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Aktif, warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, tubuh normal, lemas, nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan berkurang
A 3	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Aktif, warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, warna tubuh normal, nafsu makan normal	Aktif, whirling, uropod agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>)
B 1	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal, uropod sedikit merah	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam , warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, warna normal, nafsu makan berkurang	Mati dg ciri-ciri : badan kaku, tubuh melengkung, uropod agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>)	-
B 2	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam, warna normal, nafsu makan sedikit normal	Diam, warna normal, nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan berkurang

(Bersambung)

Lampiran 1. (Lanjutan)

Perlakuan	Perubahan Gejala Klinis							
	0	5 menit	4 jam	12 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
B 3	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam, warna tubuh normal, nafsu makan berkurang	Diam, warna normal, nafsu makan berkurang	Diam, warna agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan berkurang	Whirling, uropod agak merah, nafsu makan berkurang
C1	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam, warna agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan berkurang	Diam, warna agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan berkurang
C2	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Diam diri, tubuh posisi berbaring (<i>Sleeping Death</i>)	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Aktif, nafsu makan berkurang, warna tubuh agak merah	Diam, lemas, nafsu makan berkurang, warna tubuh agak merah	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan berkurang	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan berkurang
C3	Aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Diam, posisi berbaring (<i>Sleeping Death</i>)	Mati		-	-	-	-
K-1	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Mati	-	-	-	-	-	-

(Bersambung)

Lampiran 1. (Lanjutan)

Perlakuan	Perubahan Gejala Klinis							
	0	5 menit	4 jam	12 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
C3	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Diam, posisi berbaring (<i>Sleeping Death</i>)	Mati		-	-	-	-
K-1	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Mati	-	-	-	-	-	-
K-2	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Aktif, nafsu makan normal, warna normal	Diam, warna normal, nafsu makan normal	Aktif, warna normal, nafsu makan normal	Aktif, warna tubuh normal, nafsu makan normal	Aktif, warna tubuh normal, nafsu makan normal
K-3	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal,	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Diam, warna normal, nafsu makan normal	Aktif, warna normal, nafsu makan normal	Aktif, warna tubuh normal, nafsu makan normal	Aktif, warna tubuh normal, nafsu makan normal
K+1	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Diam, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam, warna tubuh agak merah, nafsu makan normal	Aktif, warna tubuh merah (<i>Red Discoloration Moderately</i>), nafsu makan normal	Diam, warna tubuh merah (<i>Red Discoloration Heavy</i>), nafsu makan normal	Diam, uropod sangat merah (<i>Red Discoloration Heavy</i>), nafsu makan normal

(Bersambung)

Lampiran 1. (Lanjutan)

Perlakuan	Perubahan Gejala Klinis							
	0	5 menit	4 jam	12 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
K+2	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Mati	-	-	-	-	-	-
K+3	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Bergerak aktif, nafsu makan normal, warna tubuh normal	Diam, nafsu makan berkurang, warna tubuh normal	Diam, warna tubuh agak merah (<i>Red Discoloration Slight</i>), nafsu makan normal	Lemas, diam, warna tubuh merah (<i>Red Discoloration Moderately</i>)	Diam, abdomen 2-3 melengkung, warna tubuh merah (<i>Red Discoloration Moderately</i>), nafsu makan berkurang	Diam, tubuh agak melengkung di abdomen 2-3, warna merah (<i>Red Discoloration Moderately</i>), nafsu makan normal

Lampiran 2. Data terkait analisis statistik THC

Deskriptif

Jam ke-	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
0	K-	3	2.05E8	5.692E7	3.287E7	63565460.76	3.46E8	1.E8	3.E8
	K+	3	2.52E8	1.305E7	7.534E6	2.20E8	2.84E8	2.E8	3.E8
	A	3	3.24E8	7148251.534	4.127E6	3.06E8	3.42E8	3.E8	3.E8
	B	3	3.07E8	1.216E7	7.021E6	2.77E8	3.37E8	3.E8	3.E8
	C	3	3.02E8	4.581E7	2.645E7	1.88E8	4.16E8	3.E8	4.E8
24	K-	3	3.37E8	8325000.000	4.806E6	3.17E8	3.58E8	3.E8	3.E8
	K+	3	4.54E8	1.108E8	6.396E7	1.79E8	7.29E8	4.E8	6.E8
	A	3	5.55E8	4.924E7	2.843E7	4.33E8	6.77E8	5.E8	6.E8
	B	3	4.89E8	3.826E7	2.209E7	3.94E8	5.85E8	5.E8	5.E8
	C	3	5.85E8	3.015E7	1.741E7	5.10E8	6.59E8	6.E8	6.E8
48	K-	3	2.19E8	7.425E7	4.287E7	34252774.90	4.03E8	1.E8	3.E8
	K+	3	3.45E8	5626499.800	3.248E6	3.31E8	3.59E8	3.E8	4.E8
	A	3	4.67E8	3.626E7	2.093E7	3.77E8	5.57E8	4.E8	5.E8
	B	3	4.43E8	3825000.000	2.208E6	4.34E8	4.53E8	4.E8	4.E8
	C	3	3.97E8	3.645E7	2.104E7	3.07E8	4.88E8	4.E8	4.E8

ANOVA

Jam ke-	Diversity Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	2.867E16	4	7.168E15	6.279	.009
	Within Groups	1.142E16	10	1.142E15		
	Total	4.009E16	14			
24	Between Groups	1.128E17	4	2.819E16	8.223	.003
	Within Groups	3.428E16	10	3.428E15		
	Total	1.470E17	14			
48	Between Groups	1.168E17	4	2.921E16	17.805	.000
	Within Groups	1.641E16	10	1.641E15		
	Total	1.332E17	14			
72	Between Groups	1.228E17	4	3.069E16	3.868	.038
	Within Groups	7.933E16	10	7.933E15		
	Total	2.021E17	14			
96	Between Groups	1.030E17	4	2.575E16	3.498	.049
	Within Groups	7.361E16	10	7.361E15		
	Total	1.766E17	14			

Uji BNT (Multiple Comparisons)

Jam Ke-	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
0	K-	K+	-4.702E7	2.759E7	.119	-1.08E8	14443198.81
		A	-1.192E8*	2.759E7	.002	-1.81E8	-5.77E7
		B	-1.022E8*	2.759E7	.004	-1.64E8	-4.08E7
		C	-9.682E7*	2.759E7	.006	-1.58E8	-3.54E7
	K+	K-	4.702E7	2.759E7	.119	-1.44E7	1.08E8
		A	-7.215E7*	2.759E7	.026	-1.34E8	-1.07E7
		B	-5.520E7	2.759E7	.073	-1.17E8	6268198.81
		C	-4.980E7	2.759E7	.101	-1.11E8	11668198.81
	A	K-	1.192E8*	2.759E7	.002	57706801.19	1.81E8
		K+	7.215E7*	2.759E7	.026	10681801.19	1.34E8
		B	1.695E7	2.759E7	.553	-4.45E7	78418198.81
		C	2.235E7	2.759E7	.437	-3.91E7	83818198.81
	B	K-	1.022E8*	2.759E7	.004	40756801.19	1.64E8
		K+	5.520E7	2.759E7	.073	-6268198.81	1.17E8
		A	-1.695E7	2.759E7	.553	-7.84E7	44518198.81
		C	5400000.000	2.759E7	.849	-5.61E7	66868198.81
	C	K-	9.682E7*	2.759E7	.006	35356801.19	1.58E8
		K+	4.980E7	2.759E7	.101	-1.17E7	1.11E8

		A	-2.235E7	2.759E7	.437	-8.38E7	39118198.81
		B	-5400000.000	2.759E7	.849	-6.69E7	56068198.81
24	K-	K+	-1.168E8*	4.781E7	.035	-2.23E8	-1.03E7
		A	-2.176E8*	4.781E7	.001	-3.24E8	-1.11E8
		B	-1.522E8*	4.781E7	.010	-2.59E8	-4.57E7
		C	-2.473E8*	4.781E7	.000	-3.54E8	-1.41E8
	K+	K-	1.168E8*	4.781E7	.035	10254936.82	2.23E8
		A	-1.008E8	4.781E7	.061	-2.07E8	5720063.18
		B	-3.540E7	4.781E7	.476	-1.42E8	71120063.18
		C	-1.305E8*	4.781E7	.021	-2.37E8	-2.40E7
	A	K-	2.176E8*	4.781E7	.001	1.11E8	3.24E8
		K+	1.008E8	4.781E7	.061	-5720063.18	2.07E8
		B	6.540E7	4.781E7	.201	-4.11E7	1.72E8
		C	-2.970E7	4.781E7	.548	-1.36E8	76820063.18
	B	K-	1.522E8*	4.781E7	.010	45654936.82	2.59E8
		K+	3.540E7	4.781E7	.476	-7.11E7	1.42E8
		A	-6.540E7	4.781E7	.201	-1.72E8	41120063.18
		C	-9.510E7	4.781E7	.075	-2.02E8	11420063.18
	C	K-	2.473E8*	4.781E7	.000	1.41E8	3.54E8
		K+	1.305E8*	4.781E7	.021	23979936.82	2.37E8
		A	2.970E7	4.781E7	.548	-7.68E7	1.36E8
		B	9.510E7	4.781E7	.075	-1.14E7	2.02E8
48	K-	K+	-1.262E8*	3.307E7	.003	-2.00E8	-5.25E7

		A	-2.484E8*	3.307E7	.000	-3.22E8	-1.75E8
		B	-2.243E8*	3.307E7	.000	-2.98E8	-1.51E8
		C	-1.786E8*	3.307E7	.000	-2.52E8	-1.05E8
K+		K-	1.262E8*	3.307E7	.003	52463667.76	2.00E8
		A	-1.222E8*	3.307E7	.004	-1.96E8	-4.86E7
		B	-9.818E7*	3.307E7	.014	-1.72E8	-2.45E7
		C	-5.250E7	3.307E7	.143	-1.26E8	21186332.24
A		K-	2.484E8*	3.307E7	.000	1.75E8	3.22E8
		K+	1.222E8*	3.307E7	.004	48563667.76	1.96E8
		B	2.408E7	3.307E7	.483	-4.96E7	97761332.24
		C	6.975E7	3.307E7	.061	-3936332.24	1.43E8
B		K-	2.243E8*	3.307E7	.000	1.51E8	2.98E8
		K+	9.818E7*	3.307E7	.014	24488667.76	1.72E8
		A	-2.408E7	3.307E7	.483	-9.78E7	49611332.24
		C	4.568E7	3.307E7	.197	-2.80E7	1.19E8
C		K-	1.786E8*	3.307E7	.000	1.05E8	2.52E8
		K+	5.250E7	3.307E7	.143	-2.12E7	1.26E8
		A	-6.975E7	3.307E7	.061	-1.43E8	3936332.24
		B	-4.568E7	3.307E7	.197	-1.19E8	28011332.24
72	K-	K+	-8.730E7	7.272E7	.258	-2.49E8	74735241.60
		A	-2.275E8*	7.272E7	.011	-3.90E8	-6.54E7
		B	-2.421E8*	7.272E7	.008	-4.04E8	-8.01E7
		C	-1.634E8*	7.272E7	.048	-3.25E8	-1314758.40

	K+	K-	8.730E7	7.272E7	.258	-7.47E7	2.49E8
		A	-1.402E8	7.272E7	.083	-3.02E8	21860241.60
		B	-1.548E8	7.272E7	.059	-3.17E8	7235241.60
		C	-7.605E7	7.272E7	.320	-2.38E8	85985241.60
A		K-	2.275E8*	7.272E7	.011	65439758.40	3.90E8
		K+	1.402E8	7.272E7	.083	-2.19E7	3.02E8
		B	-1.462E7	7.272E7	.845	-1.77E8	1.47E8
		C	6.412E7	7.272E7	.399	-9.79E7	2.26E8
B		K-	2.421E8*	7.272E7	.008	80064758.40	4.04E8
		K+	1.548E8	7.272E7	.059	-7235241.60	3.17E8
		A	1.462E7	7.272E7	.845	-1.47E8	1.77E8
		C	7.875E7	7.272E7	.304	-8.33E7	2.41E8
C		K-	1.634E8*	7.272E7	.048	1314758.40	3.25E8
		K+	7.605E7	7.272E7	.320	-8.60E7	2.38E8
		A	-6.412E7	7.272E7	.399	-2.26E8	97910241.60
		B	-7.875E7	7.272E7	.304	-2.41E8	83285241.60
96	K-	K+	-1.470E7	7.005E7	.838	-1.71E8	1.41E8
		A	-1.886E8*	7.005E7	.023	-3.45E8	-3.25E7
		B	-1.916E8*	7.005E7	.021	-3.48E8	-3.55E7
		C	-1.311E8	7.005E7	.091	-2.87E8	24991074.17
	K+	K-	1.470E7	7.005E7	.838	-1.41E8	1.71E8
		A	-1.738E8*	7.005E7	.032	-3.30E8	-1.78E7
		B	-1.768E8*	7.005E7	.030	-3.33E8	-2.08E7

	C	-1.164E8	7.005E7	.128	-2.72E8	39691074.17
A	K-	1.886E8*	7.005E7	.023	32458925.83	3.45E8
	K+	1.738E8*	7.005E7	.032	17758925.83	3.30E8
	B	-3000000.000	7.005E7	.967	-1.59E8	1.53E8
	C	5.745E7	7.005E7	.431	-9.86E7	2.14E8
B	K-	1.916E8*	7.005E7	.021	35458925.83	3.48E8
	K+	1.768E8*	7.005E7	.030	20758925.83	3.33E8
	A	3000000.000	7.005E7	.967	-1.53E8	1.59E8
	C	6.045E7	7.005E7	.408	-9.56E7	2.17E8
C	K-	1.311E8	7.005E7	.091	-2.50E7	2.87E8
	K+	1.164E8	7.005E7	.128	-3.97E7	2.72E8
	A	-5.745E7	7.005E7	.431	-2.14E8	98641074.17
	B	-6.045E7	7.005E7	.408	-2.17E8	95641074.17

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 3. Data terkait analisis statistik sel hyalin

Deskriptif

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	3.28930E1	3.915530	2.260632	23.16628	42.61972	29.712	37.266
K+	3	3.60503E1	1.437027	.829668	32.48056	39.62011	34.420	37.133
A	3	4.34667E1	13.400311	7.736673	10.17845	76.75489	34.742	58.896
B	3	3.52673E1	1.293826	.746991	32.05329	38.48137	33.786	36.176
C	3	3.65503E1	.603757	.348579	35.05052	38.05015	36.152	37.245

ANOVA

Diversity Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	188.016	4	47.004	1.181	.376
Within Groups	398.007	10	39.801		
Total	586.023	14			

Uji BNT (Multiple Comparisons)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-3.157333	5.151094	.554	-14.63469	8.32002
	A	-10.573667	5.151094	.067	-22.05102	.90369
	B	-2.374333	5.151094	.655	-13.85169	9.10302
	C	-3.657333	5.151094	.494	-15.13469	7.82002
K+	K-	3.157333	5.151094	.554	-8.32002	14.63469
	A	-7.416333	5.151094	.180	-18.89369	4.06102
	B	.783000	5.151094	.882	-10.69435	12.26035
	C	-.500000	5.151094	.925	-11.97735	10.97735
A	K-	10.573667	5.151094	.067	-.90369	22.05102
	K+	7.416333	5.151094	.180	-4.06102	18.89369
	B	8.199333	5.151094	.143	-3.27802	19.67669
	C	6.916333	5.151094	.209	-4.56102	18.39369
B	K-	2.374333	5.151094	.655	-9.10302	13.85169
	K+	-.783000	5.151094	.882	-12.26035	10.69435
	A	-8.199333	5.151094	.143	-19.67669	3.27802
	C	-1.283000	5.151094	.808	-12.76035	10.19435
C	K-	3.657333	5.151094	.494	-7.82002	15.13469
	K+	.500000	5.151094	.925	-10.97735	11.97735
	A	-6.916333	5.151094	.209	-18.39369	4.56102
	B	1.283000	5.151094	.808	-10.19435	12.76035

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 3. Data terkait analisis statistik sel semigranular

Deskriptif

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	2.40377E1	.857896	.495306	21.90654	26.16880	23.089	24.759
K+	3	1.94913E1	3.497657	2.019373	10.80267	28.17999	15.864	22.843
A	3	2.11977E1	.872376	.503667	19.03056	23.36477	20.694	22.205
B	3	2.14847E1	.607289	.350619	19.97608	22.99326	20.809	21.985
C	3	2.19627E1	.553102	.319333	20.58869	23.33665	21.324	22.282

ANOVA

Diversity Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.068	4	8.017	2.783	.086
Within Groups	28.811	10	2.881		
Total	60.879	14			

Uji BNT (Multiple Comparisons)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	4.546333*	1.385898	.008	1.45836	7.63431
	A	2.840000	1.385898	.068	-.24797	5.92797
	B	2.553000	1.385898	.095	-.53497	5.64097
	C	2.075000	1.385898	.165	-1.01297	5.16297
K+	K-	-4.546333*	1.385898	.008	-7.63431	-1.45836
	A	-1.706333	1.385898	.246	-4.79431	1.38164
	B	-1.993333	1.385898	.181	-5.08131	1.09464
	C	-2.471333	1.385898	.105	-5.55931	.61664
A	K-	-2.840000	1.385898	.068	-5.92797	.24797
	K+	1.706333	1.385898	.246	-1.38164	4.79431
	B	-.287000	1.385898	.840	-3.37497	2.80097
	C	-.765000	1.385898	.593	-3.85297	2.32297
B	K-	-2.553000	1.385898	.095	-5.64097	.53497
	K+	1.993333	1.385898	.181	-1.09464	5.08131
	A	.287000	1.385898	.840	-2.80097	3.37497
	C	-.478000	1.385898	.737	-3.56597	2.60997
C	K-	-2.075000	1.385898	.165	-5.16297	1.01297
	K+	2.471333	1.385898	.105	-.61664	5.55931
	A	.765000	1.385898	.593	-2.32297	3.85297
	B	.478000	1.385898	.737	-2.60997	3.56597

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 4. Data terkait analisis statistik sel granular

Deskriptif

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	4.40500	1.095893	.632714	1.68265	7.12735	3.185	5.306
K+	3	4.47367	2.238046	1.292137	-1.08595	10.03328	2.675	6.980
A	3	2.83400	.829615	.478978	.77312	4.89488	2.045	3.699
B	3	3.23767	1.138578	.657358	.40928	6.06605	2.029	4.290
C	3	2.46600	.702668	.405686	.72047	4.21153	1.687	3.052

ANOVA

Diversity Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.042	4	2.510	1.445	.289
Within Groups	17.376	10	1.738		
Total	27.418	14			

Uji BNT (Multiple Comparisons)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-.068667	1.076302	.950	-2.46682	2.32948
	A	1.571000	1.076302	.175	-.82715	3.96915
	B	1.167333	1.076302	.304	-1.23082	3.56548
	C	1.939000	1.076302	.102	-.45915	4.33715
K+	K-	.068667	1.076302	.950	-2.32948	2.46682
	A	1.639667	1.076302	.159	-.75848	4.03782
	B	1.236000	1.076302	.278	-1.16215	3.63415
	C	2.007667	1.076302	.092	-.39048	4.40582
A	K-	-1.571000	1.076302	.175	-3.96915	.82715
	K+	-1.639667	1.076302	.159	-4.03782	.75848
	B	-.403667	1.076302	.715	-2.80182	1.99448
	C	.368000	1.076302	.739	-2.03015	2.76615
B	K-	-1.167333	1.076302	.304	-3.56548	1.23082
	K+	-1.236000	1.076302	.278	-3.63415	1.16215
	A	.403667	1.076302	.715	-1.99448	2.80182
	C	.771667	1.076302	.490	-1.62648	3.16982
C	K-	-1.939000	1.076302	.102	-4.33715	.45915
	K+	-2.007667	1.076302	.092	-4.40582	.39048
	A	-.368000	1.076302	.739	-2.76615	2.03015
	B	-.771667	1.076302	.490	-3.16982	1.62648

Lampiran 6. Data terkait analisis statistik TPP

Deskriptif

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	.37033	.007506	.004333	.35169	.38898	.366	.379
K+	3	.37033	.007506	.004333	.35169	.38898	.366	.379
A	3	4.01200	.018248	.010536	3.96667	4.05733	4.000	4.033
B	3	2.83733	.086581	.049988	2.62225	3.05241	2.770	2.935
C	3	1.39733	.031501	.018187	1.31908	1.47559	1.361	1.417

ANOVA

Diversity Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30.657	4	7.664	4.289E3	.000
Within Groups	.018	10	.002		
Total	30.675	14			

Uji BNT

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	.000000	.034514	1.000	-.07690	.07690
	A	-3.641667*	.034514	.000	-3.71857	-3.56476
	B	-2.467000*	.034514	.000	-2.54390	-2.39010
	C	-1.027000*	.034514	.000	-1.10390	-.95010
K+	K-	.000000	.034514	1.000	-.07690	.07690
	A	-3.641667*	.034514	.000	-3.71857	-3.56476
	B	-2.467000*	.034514	.000	-2.54390	-2.39010
	C	-1.027000*	.034514	.000	-1.10390	-.95010
A	K-	3.641667*	.034514	.000	3.56476	3.71857
	K+	3.641667*	.034514	.000	3.56476	3.71857
	B	1.174667*	.034514	.000	1.09776	1.25157
	C	2.614667*	.034514	.000	2.53776	2.69157
B	K-	2.467000*	.034514	.000	2.39010	2.54390
	K+	2.467000*	.034514	.000	2.39010	2.54390
	A	-1.174667*	.034514	.000	-1.25157	-1.09776
	C	1.440000*	.034514	.000	1.36310	1.51690
C	K-	1.027000*	.034514	.000	.95010	1.10390
	K+	1.027000*	.034514	.000	.95010	1.10390
	A	-2.614667*	.034514	.000	-2.69157	-2.53776
	B	-1.440000*	.034514	.000	-1.51690	-1.36310

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.