

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Gracilaria verrucosa* MELALUI
METODE PERENDAMAN SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UDANG VANNAME
(*Litopenaeus vannamei*) TERHADAP INFEKSI WSSV
(*White Spot Syndrome Virus*)**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**OLEH:
BADI'A HIMMATUR ROFI'AH
NIM. 125080101111037**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Gracilaria verrucosa* MELALUI
METODE PERENDAMAN SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UDANG VANNAME
(*Litopenaeus vannamei*) TERHADAP INFEKSI WSSV
(*White Spot Syndrome Virus*)**

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

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

Oleh:
**BADI'A HIMMATUR ROFI'AH
NIM. 125080101111037**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

SKRIPSI

POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Gracilaria verrucosa* MELALUI
METODE PERENDAMAN SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UDANG VANNAME
(*Litopenaeus vannamei*) TERHADAP INFEKSI WSSV
(*White Spot Syndrome Virus*)

Oleh:
BADI'A HIMMATUR ROFI'AH
NIM. 125080101111037

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 26 Juli 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

(Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, PhD)
NIP. 19610523 198703 2 003
Tanggal: 15 AUG 2016
Dosen Penguji I

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si)
NIP. 19730702 20051 2 001
Tanggal: 15 AUG 2016
Dosen Pembimbing I

(Dr. Agus Maizar S.H., S.Pi., M.P)
NIP. 19720529 200312 1 001
Tanggal: 15 AUG 2016
Dosen Penguji II

(Nanik Retno Burwono, S.Pi., MP)
NIP. 19840420 2014404 2 002
Tanggal: 15 AUG 2016
Dosen Pembimbing II



Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Anjien Wulijeno Ekawati, MS)
NIP. 19820805 198603 2 001
Tanggal: 15 AUG 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi) maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang,
Mahasiswa

Badi'a Himmatur Rofi'ah

LEMBAR PERSEMBAHAN

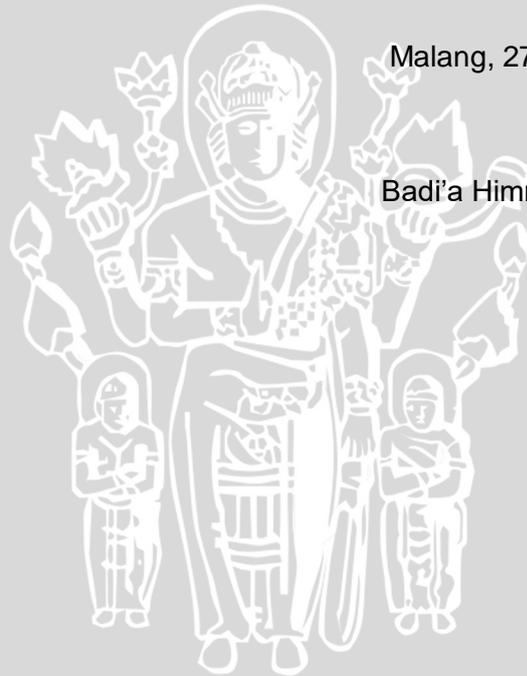
Saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Allah S.W.T, yang telah memberikan segala nikmat, kemudahan, ridhlo, serta kekuatan hati kepada saya selama ini.
2. Ayah dan Ibu tercinta, terimakasih tak terhingga atas do'a, semangat, kasih sayang, pengorbanan baik moril dan materiil, serta ketulusannya yang selalu mengiringi setiap langkah saya khususnya dalam penyelesaian dan penyusunan skripsi ini, serta kepada kedua adik saya yang selalu mampu menjadi tempat beristirahat dan melepas penat yang luar biasa.
3. Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si dan Nanik Retno Buwono, S.Pi., MP selaku pembimbing, terimakasih atas segala bantuan, masukan, kritik dan saran serta bimbingannya sehingga saya bisa menyelesaikan laporan ini.
4. Seluruh staff dan karyawan UPT PBAP Bangil khususnya Pak Parno, Pak Sugeng, Pak Wahyudi, terimakasih atas segala bantuan yang diberikan selama berjalannya penelitian ini.
5. Tim bimbingan 1 Bu Yuni: Sohir, Dian, Ilma, Tasya, Nindya, Yoshie, Fiing, Miftahudin dan Ulik, yang selalu memberi semangat dan bantuan penuh selama berjalannya penelitian skripsi ini.
6. Sahabat Zulfa, Eni, Mifta, Dian, Tumbeg, Yoeshi yang selalu memberikan keceriaan, do'a, senyuman, dan kekuatan dalam bingkai persahabatan. Kalian adalah sahabat-sahabat luar biasa, sukses selalu dalam mengejar mimpi kita masing-masing. Rian Dwi Saputro terimakasih sudah menjadi seseorang yang selalu tiada henti memberikan semangat, bantuan dan motivasi bagi saya. Mbak Nu terimakasih sudah bersedia memberikan banyak pengetahuan yang berhubungan dengan penelitian saya.

7. Cecil, Mbak Putri, Ana, Radel, terimakasih sudah menjadi sahabat yang sudah seperti keluarga di Malang. Teman satu kos Novi, Rani, Aini, Ferdina, Ma'e, Ika terimakasih atas segala do'a, semangat, dukungan dan keceriaan yang kalian berikan, kalian selalu mampu menjadi tempat beristirahat dan melepas stress di tengah penatnya pengerjaan laporan ini. Teman-Teman ARMY'12, MbK Siles, Dinda, Erma dan seluruh pihak yang tidak dapat saya tulis satu persatu disini, terimakasih atas segala dukungan, saran dan kritik yang sangat membantu dalam penyelesaian laporan.

Malang, 27 Mei 2016

Badi'a Himmatur Rofi'ah



RINGKASAN

BADI'A HIMMATUR ROFI'AH. Skripsi tentang Potensi Ekstrak Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* Melalui Metode Perendaman Sebagai Imunostimulan Udang Vanname (*Litopenaeus Vannamei*) Terhadap Infeksi WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) (Dibawah bimbingan Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si dan Nanik Retno Buwono, S.Pi., MP)

Udang vanname merupakan udang introduksi yang secara ekonomis bernilai tinggi sebagai komoditas ekspor karena diminati oleh pasar dunia. Namun budidaya udang vanname masih dihadapkan beberapa kendala berupa kematian massal akibat serangan penyakit yang mengakibatkan produktivitas menurun. Salah satu penyakit yang paling ganas dan menjadi penyebab utama kegagalan budidaya udang vanname adalah *white spot disease* yang disebabkan oleh *white spot syndrome virus* (WSSV). Berbagai upaya dalam penanggulangan dan pencegahan penyakit udang adalah melalui peningkatan sistem pertahanan tubuh udang, yaitu dengan menggunakan imunostimulan. Rumput laut merupakan sumber bahan bioaktif yang dapat digunakan sebagai imunostimulan karena mengandung polisakarida serta lebih aman karena tidak bersifat racun maupun patogenik bagi udang.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui respon imun udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) dan ketahanan terhadap WSSV setelah udang direndam selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda dan mengetahui dosis yang optimal untuk menjadikan ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan imunostimulan udang vanname melalui perendaman, ditinjau dari THC (*Total Hemosit Count*) dan DHC (*Diferensial Hemosit Count*).

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Februari 2016 sampai April 2016, di Laboratorium Universitas Islam Negeri (UIN) Malang sebagai tempat ekstraksi dan Laboratorium Basah Unit Pengembangan Teknis (UPT) Pengembangan Budidaya Air Payau (PBAP) Bangil, Pasuruan sebagai tempat pemeliharaan udang uji.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Teknik pengambilan data dalam penelitian ini didapatkan berdasarkan dari data primer dan data sekunder. Data primer dalam penelitian ini diperoleh dengan metode observasi, antara lain mengamati THC, DHC dan SR pada udang vanname sebagai udang uji. Serta dilakukannya pengamatan kualitas air meliputi suhu, pH, DO, salinitas dan ammonia sebagai faktor penunjang kehidupan udang vanname. Data sekunder dari penelitian ini yaitu mencari referensi dari berbagai sumber yang terkait penelitian ini seperti buku, jurnal, skripsi, tesis dan sebagainya yang mendukung dan memperkuat hasil penelitian yang telah diperoleh.

Berdasarkan hasil pengamatan THC dan DHC udang vanname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV menunjukkan peningkatan dan lebih tinggi dibanding kontrol dimana nilai tertinggi terdapat pada perlakuan dosis 300 mg/l. Udang yang mendapat perlakuan perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* setelah diinfeksi WSSV menunjukkan gejala klinis yang lebih lambat daripada udang yang tidak direndam dengan ekstrak. Pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* mampu meningkatkan kelulushidupan udang vanname. Hasil pengamatan kualitas air

didapatkan rata-rata air media pemeliharaan adalah suhu berkisar 29-33,5 °C, salinitas berkisar 2-10 ppm, pH berkisar 7-9, DO berkisar 5,57-7,36 ppm, dan ammonia berkisar 0,03-0,07ppm.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa perendaman udang vaname dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* selama 3 jam dapat meningkatkan respon imun udang vaname sebelum dan sesudah infeksi WSSV serta meningkatkan kelulushidupan udang vaname dengan dosis terbaik 300 mg/l. Saran yang dapat diberikan ialah perlu dilakukan penelitian dan kajian lebih lanjut mengenai dosis, frekuensi pengamatan dan waktu perendaman sehingga dapat diketahui dosis dan waktu perendaman yang paling tepat untuk mendapatkan hasil terbaik.



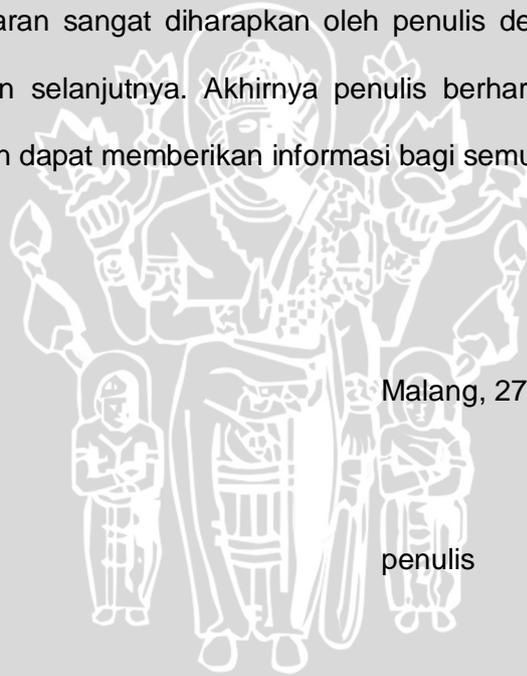
KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga laporan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* Melalui Metode Perendaman Sebagai Immunostimulan Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) Terhadap Infeksi WSSV (*White Spot Syndrome Virus*)”. Laporan skripsi ini disusun sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana Perikanan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran sangat diharapkan oleh penulis demi perbaikan dan kesempurnaan laporan selanjutnya. Akhirnya penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak.

Malang, 27 Mei 2016

penulis



DAFTAR ISI

RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesis.....	6
1.5 Kegunaan	6
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Udang Vanname (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	7
2.1.1 Morfologi udang vanname (<i>L. vannamei</i>)	8
2.1.2 Sistem pertahanan tubuh udang vanname (<i>Litopenaeus vannamei</i>) ..	10
2.1.3 Hemosit udang.....	12
2.1.4 Mekanisme masuknya bahan aktif ke dalam jaringan tubuh udang vanname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	13
2.2 <i>White spot syndrome virus</i> (WSSV).....	14
2.2.1 Morfologi dan karakteristik WSSV (<i>white spot syndrome virus</i>).....	15
2.2.2 Infeksi dan tanda penyerangan WSSV (<i>white spot syndrome virus</i>) ..	17
2.3 <i>Gracillaria verrucosa</i>	19
2.3.1 Kandungan bahan aktif	20
2.4 Ekstraksi Rumput Laut	22
2.6 Imunostimulan	24
2.7 Rumput Laut Sebagai Imunostimulan	28
2.7 Kualitas Air	29
2.7.1 pH	29
2.7.2 Suhu	30
2.7.3 <i>Dissolved oxygen</i> (DO)	31
2.7.4 Salinitas	31
2.7.5 Amonia	32
3. METODE PENELITIAN	33
3.1 Materi Penelitian.....	33
3.2 Alat dan Bahan.....	33
3.3 Metode Pengambilan Data	33
3.4 Teknik Pengumpulan Data	34
3.4.1 Data primer	34
3.4.2 Data sekunder	34

3.5 Rancangan Penelitian	35
3.6 Prosedur Penelitian	36
3.6.1 Ekstraksi rumput laut	37
3.6.2 Persiapan hewan uji.....	37
3.6.3 Persiapan bak percobaan	38
3.6.4 Penyediaan larutan inokulum WSSV (<i>white spot syndrom virus</i>)	38
3.6.5 Perendaman <i>L. vannamei</i> dengan ekstrak <i>G. verrucosa</i>	39
3.6.6 Ujiantang udang vannamei (<i>Litopenaeus vannamei</i>) dengan <i>white spot syndrome virus</i> (WSSV).....	40
3.7 Pemeriksaan Parameter Utama	41
3.7.1 THC (<i>total haemocyte count</i>)	41
3.7.2 DHC (<i>differential haemocyte count</i>)	41
3.7.3 SR (<i>survival rate</i>).....	42
3.8 Pengukuran Parameter Penunjang.....	42
3.8.1 Suhu	43
3.8.2 Ph	43
3.8.3 DO	43
3.8.4 Salinitas	44
3.8.5 Amonia	44
3.9 Analisis Data	45
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
4.1 Hasil Ekstraksi <i>Gracilaria verrucosa</i>	46
4.2 Hasil Uji Perendaman Udang Vanname dalam Ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> dengan Dosis Berbeda Terhadap Respon Imun Udang Vaname Sebelum dan Sesudah Diinfeksi WSSV	47
4.2.1 Total Hemosit.....	48
4.2.2 <i>Diferensial Hemosit count</i> (DHC)	52
4.3 Perubahan Tingkah Laku dan Gejala Klinis Udang Vannamei.....	62
4.4 Kelulushidupan Udang Vaname	65
4.5 Kualitas Air	66
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
5.1 Kesimpulan	69
5.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN.....	92

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Litopenaeus vannamei</i>	8
2. Morfologi Udang Vanname	9
3. Mekanisme Sistem pertahanan Tubuh Pada Crustacea	11
4. Struktur White Spot Syndrome virus	16
5. <i>Gracilaria verrucosa</i>	19
6. Mekanisme kerja imunostimulan	26
7. Ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> yang digunakan untuk penelitian	47
8. Histogram rerata THC udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV.....	48
9. (a) Sel hialin, (b) Sel semi Granular, (c) Sel granular	52
10. Histogram rerata sel hialin udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV	53
11. Histogram rerata sel granular udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV	57
12. Histogram rerata sel granular udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV	59
13. Perubahan Morfologi dan Tingkah Laku Udang Vaname Pasca Infeksi WSSV.....	63
14. Histogram rerata survival rate udang vaname dengan perlakuan perendaman ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> pada akhir penelitian	65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik tingkah laku dan morfologi udang yang terkena <i>white spot</i>	18
2. Rancangan Penelitian.....	36
3. Rerata total hemosit udang vaname yang direndam selama 3 jam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV.	51
4. Rerata sel hialin udang vaname yang direndam dalam ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	55
5. Rerata sel granular udang vaname yang direndam dalam ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	58
6. Rerata sel granular udang vaname yang direndam dalam ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	60
7. Perubahan Morfologi dan Tingkah Laku Udang Vaname Pasca Infeksi WSS	62
8. Parameter kualitas air media pemeliharaan PL vannamei selama penelitian..	67



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian.....	78
2. Prosedur Pengujian PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	79
3. Skema prosedur penyediaan virus WSSV	83
4. Skema Prosedur Pengenceran Larutan Virus yang Akan Diinfeksi	84
5. Skema Proses Pemberian Imunostimulan	85
6. Perhitungan Hemosit Dengan Menggunakan <i>Haemocytometer</i>	86
7. Data hasil pengamatan terhadap parameter hemosit udang vaname yang diberi perlakuan perendaman ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	89
8. Hasil analisis ragam terhadap total hemosit (sel/ml) udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	89
9. Hasil analisis ragam terhadap sel hialin (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	93
10. Hasil analisis ragam terhadap sel semi granular (SG) (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	96
11. Hasil analisis ragam terhadap sel granular (G) (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i> sebelum dan sesudah infeksi WSSV	99
12. Hasil Analisis Ragam <i>Survival Rate</i> (SR) Udang Vaname	103
13. Hasil Uji PCR Udang Vaname yang Digunakan sebagai Agen Penginfeksi WSSV	106
14. Hasil Uji PCR Sampel Udang yang Digunakan Sebagai Hewan Uji dalam Penelitian.....	107
15. Dokumentasi Kegiatan Ekstraksi <i>Gracilaria verrucosa</i>	108
16. Dokumentasi Kegiatan penelitian.....	109

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam upaya meningkatkan devisa non migas melalui peningkatan ekspor hasil perikanan, pemerintah telah menetapkan udang sebagai komoditas andalan utama. Budidaya udang, utamanya udang windu memiliki prospek yang cerah dengan nilai produksi pada tahun 1998 mencapai 142.116 ton, tetapi pada tahun 2001 mengalami penurunan menjadi 128.448 ton (Maryani *et al.*, 2002). Sebagai contoh, pada akhir tahun 1990-an terjadi kegagalan panen yang cukup besar di berbagai tambak di Indonesia. Penyebab utama kegagalan panen tersebut adalah serangan penyakit viral yang disebabkan *white spot syndrome virus* (WSSV). Dampak serangan virus tersebut menyebabkan petambak udang membudidayakan jenis udang baru yaitu udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

Udang vanname merupakan udang introduksi yang secara ekonomis bernilai tinggi sebagai komoditas ekspor karena diminati oleh pasar dunia. Budidaya udang vanname telah dilakukan di beberapa wilayah di Indonesia, namun masih dihadapkan beberapa kendala berupa kematian massal akibat serangan penyakit yang mengakibatkan produktivitas menurun. Penyakit disebabkan oleh virus merupakan masalah utama pada budidaya udang vaname. Salah satu penyakit yang paling ganas dan menjadi penyebab utama kegagalan budidaya udang vaname adalah *white spot disease* yang disebabkan oleh *white spot syndrome virus* (WSSV). Penyakit ini telah mewabah di Indonesia sejak 1993 dan masih menjadi masalah utama hingga sekarang. Selain menyerang semua jenis udang, penyakit ini juga menyerang semua stadium usia dan ukuran udang, sehingga mengakibatkan tingkat kematian yang sangat tinggi yaitu bisa mencapai 100 % (Prajitno, 2008). Walaupun jenis penyakit ini sangat sulit

diberantas, namun ada beberapa cara yang dapat dilakukan dalam penanggulangannya.

Berbagai upaya dalam penanggulangan dan pencegahan penyakit udang adalah melalui peningkatan sistem pertahanan tubuh udang, yaitu dengan menggunakan imunostimulan, vitamin dan hormon (Johny *et al.*, 2005). Udang tidak memproduksi limfosit dan tidak memiliki sistem imun adaptif seperti yang dimiliki vertebrata (van de Braak, 2002). Sistem pertahanan udang hanya berdasarkan pada imunitas innate. Sehingga strategi yang tepat digunakan dalam mengendalikan penyakit pada budidaya udang adalah dengan menggunakan imunostimulan, yang dapat menstimulasi sistem imun nonspesifik (Dugger and Jory, 1999).

Menurut Kamiso (2003) dalam Fariedah (2010), terdapat 10 kelompok imunostimulan diantaranya ialah produk bakteri, jamur, yeast, ikatan partikel pelarut dengan β -glukan, glycan-polisakarida, chitosan, peptide, ekstrak tumbuhan dan hewan. Pemberian imunostimulan dimaksudkan untuk mengaktifkan sistem imun nonspesifik udang. Sistem pertahanan tubuh udang akan berfungsi bila protein pengenal mengenali masuknya lipopolisakarida (LPS) atau peptidoglikan (PG) dari dinding sel mikroorganisme. Kehadiran LPS atau PG akan menstimulasi aktivitas sel-sel hemosit, sel-sel fagosit, maupun enzim-enzim yang berperan dalam sistem pertahanan udang. Meningkatnya ketahanan tubuh udang dapat diketahui dengan meningkatnya aktivitas sel-sel hemosit, baik itu sel hialin, semi granular, maupun sel granular. Meningkatnya aktivitas enzim-enzim dalam sistem pertahanan udang, akan menghasilkan protein faktor opsonin yang merangsang aktivitas fagositosis. Fagositosis merupakan bagian penting dalam sistem imun non spesifik untuk mengeliminasi patogen (Saraswati, 2014). Pentingnya pengendalian penyakit berbasis preventif membawa kepada kebutuhan untuk terus dilakukan eksplorasi dengan

tujuan mendapatkan jenis-jenis senyawa aktif yang dapat memproteksi udang terhadap serangan penyakit dan perubahan lingkungan. Selama ini eksplorasi telah dilakukan secara luas terhadap organisme yang berasal dari daratan. Hal ini membawa kepada upaya untuk mencari sumber-sumber baru yang berasal dari non daratan. Ekosistem laut dengan karakteristiknya yang secara signifikan berbeda dengan ekosistem darat maka dimungkinkan untuk diperoleh jenis-jenis baru dengan aktivitas yang lebih tinggi. Diantara organisme laut yang telah banyak digunakan dalam kehidupan manusia adalah rumput laut. Beberapa rumput laut dikenal mempunyai senyawa aktif secara imunologis.

Rumput laut merupakan sumber bahan bioaktif, yang menghasilkan sejumlah senyawa sebagai sitostatik, antiviral, antihelmin, anticendawan dan aktifitas antibakterial. Senyawa ini berasal dari alga hijau, coklat dan merah (Lindegust and Schweder, 2001). Selain itu rumput laut dapat digunakan sebagai imunostimulan yang mengandung polisakarida lebih aman karena tidak bersifat racun maupun patogenik bagi udang (Dugger and Jory, 1999). Jenis alga yang memiliki senyawa polisakarida adalah *Gracilaria verrucosa* (alga merah). Alga merah ini dapat menstimulasi fagositosis dan *respiratory burst in vitro* dan *in vivo* makrofage tikus (Yoshizawa *et al.*, 1996). Polisakarida yang terdapat pada *Gracilaria verrucosa* dapat memodifikasi beberapa komponen sistem imun pada ikan dan meningkatkan proteksi terhadap infeksi bakteri. Polisakarida dari rumput laut juga dapat menstimulasi sistem imun non spesifik dalam hal ini fagositosis dan aktifitas *respiratory burst* melalui mekanisme interaksi molekul dengan permukaan reseptor (*receptor-mediated*) (Castro *et al.*, 2006). Penggunaan *Gracilaria verrucosa* dinilai ramah lingkungan, memiliki kandungan nutrisi yang baik bagi udang karena terdapat kandungan senyawa bioaktif, serta alga ini mudah diperoleh karena telah banyak dibudidayakan. Menurut Marsoedi (2007) dalam Fariedah (2010), aplikasi imunostimulan dapat dilakukan melalui pakan,

perendaman maupun suntikan langsung ke dalam tubuh. Pemberian imunostimulan melalui perendaman dapat meningkatkan respon imun non spesifik dan lebih efektif dalam hal biaya daripada dengan penyuntikan

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan penelitian mengenai potensi ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebagai imunostimulan dengan metode perendaman, sehingga dapat meningkatkan sistem ketahanan tubuh udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap serangan WSSV.

1.2 Rumusan Masalah

White spot syndrome virus (WSSV) merupakan patogen yang sering menginfeksi udang vanname. WSSV adalah penyakit viral yang sangat virulen dan dapat menyerang berbagai jenis udang. Penyakit ini menjadi salah satu masalah penting pada kegiatan budidaya udang. Pengendalian penyakit ini dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik dan disinfektan. Namun penggunaan antibiotik pada budidaya udang mempunyai dampak negatif pada lingkungan akuatik dan residunya dapat membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsinya. Selain itu, penggunaan obat-obatan secara terus menerus merupakan faktor-faktor yang diduga sebagai penyebab terjadinya resistensi.

Penggunaan imunostimulan lebih aman dibandingkan dengan penggunaan antibiotik. Imunostimulan dapat mengurangi resiko terhadap serangan penyakit infeksi. Beberapa rumput laut diketahui dapat bersifat sebagai imunomodulatori yang dapat meningkatkan imunitas udang. Salah satu jenis alga seperti *Gracilaria* telah diketahui sebagai sumber senyawa bioaktif dan juga diketahui dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulan. Selain itu pula penggunaan rumput laut lebih ramah lingkungan dan mudah mengalami degradasi secara sempurna. Peningkatan imun pada udang dapat menyebabkan udang tahan terhadap serangan penyakit infeksi utamanya *White spot syndrome*

virus (WSSV) serta dapat memperbaiki kualitas performa udang pasca panen. Salah satu cara pemberian imunostimulant adalah melalui perendaman. Pemberian imunostimulan melalui perendaman harus memperhatikan waktu yang optimal. Menurut Truong-Giang Huynh *et al.* (2011), perendaman udang vanname dalam ekstrak *Sargassum* selama 3 jam menunjukkan udang resisten terhadap infeksi WSSV yang ditinjau dari meningkatnya respon imun udang vanname berupa bertambahnya jumlah hemosit, aktivitas *phenoloksidase*, pelepasan *superoxide anion*, dan aktivitas *lysozyme*. Namun belum banyak penelitian yang menjelaskan mengenai efek perendaman udang vanname dalam air yang mengandung ekstrak alga merah *G. verrucosa*.

Dari uraian diatas maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana respon imun udang vanname (*Litopanaeus vannamei*) dan ketahanan terhadap WSSV setelah udang direndam selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda?
2. Berapa dosis optimal untuk menjadikan ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan imunostimulan udang vanname melalui perendaman, ditinjau dari THC (*Total Hemosit Count*) dan DHC (*Diverensial Hemosit Count*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui respon imun udang vanname (*Litopanaeus vannamei*) dan ketahanan terhadap WSSV setelah udang direndam selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda

2. Mengetahui dosis yang optimal untuk menjadikan ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan imunostimulan udang vanname melalui perendaman, ditinjau dari THC (*Total Hemosit Count*) dan DHC (*Diverensial Hemosit Count*).

1.4 Hipotesis

H₀: Diduga perendaman udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* tidak berpengaruh terhadap respon imun dan ketahanan terhadap WSSV.

H₁: Diduga perendaman udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap respon imun dan ketahanan terhadap WSSV.

1.5 Kegunaan

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai manfaat ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebagai imunostimulan pada udang vanname sehingga tahan terhadap serangan infeksi WSSV (*White Spote Syndrome Virus*) dalam rangka pelestarian sumberdaya perikanan dan perairan.

1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2016 sampai April 2016, di Laboratorium Universitas Islam Negeri (UIN) Malang dan Laboratorium Ilmu Kelautan sebagai tempat ekstraksi serta Laboratorium Unit Pengembangan Teknis (UPT) Pengembangan Budidaya Air Payau (PBAP) Bangil, Pasuruan sebagai tempat pemeliharaan udang uji.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*)

Udang putih *L. vannamei* merupakan jenis introduksi dari Amerika Latin, yang tersebar meliputi Pantai Pasifik, Meksiko, Laut Tengah dan Selatan Amerika. Namun sekarang telah menjadi produk andalan di negara-negara Pasifik. Di Indonesia keberadaan jenis ini telah dijadikan produk unggulan sektor perikanan sejak tahun 2001. Di dunia *Litopenaeus vannamei* mempunyai berbagai nama yaitu *Pacific white shrimp*, *West coast white shrimp*, *Penaeus vannamei*, *Camaron blanco Langostino*, *White leg shrimp*, *Crevette pattes blanches*, *Camaron pati blanco* (Wahyudewantoro, 2011).

Menurut Wyban dan Sweeney (1992), secara taksonomi udang vanname adalah decapoda crustacean yang termasuk golongan udang-udangan, lobster dan kepiting. Udang vanname memiliki 10 kaki dan memiliki carapace yang berkembang dengan baik menutupi kepala dan thorax. Taksonomi dari udang vanname adalah sebagai berikut:

Phylum	: Arthropoda
Class	: Crustacea
Subclass	: Malacostraca
Series	: Eumalacostraca
Superorder	: Eucarida
Ordo	: Decapoda
Sub Ordo	: Dendrobranchiata
Infraorder	: Penaeidea
Superfamily	: Penaeioidea
Family	: Penaeidae
Genus	: <i>Penaeus</i>
Subgenus	: <i>Litopenaeus</i>
Species	: <i>vannamei</i>

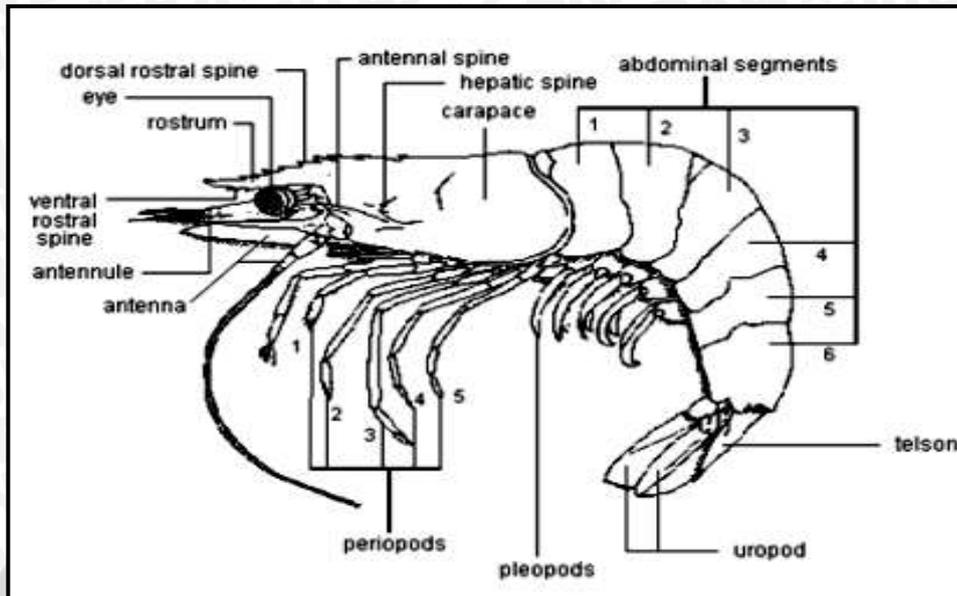


Gambar 1. *Litopenaeus vannamei* (Saraswati, 2013)

Udang vannamei memiliki ciri khas yang berbeda dari udang putih lainnya. Udang ini mempunyai penampakan luar berwarna putih transparan disertai dengan warna agak kebiruan akibat dari dominasi warna biru yang terdapat di dekat telson dan uropoda. Udang vanname memiliki dua gigi rostrum yang terletak di bagian dorsal (Wahyudewantoro, 2013).

2.1.1 Morfologi udang vanname (*L. vannamei*)

Litopenaeus vannamei merupakan krustacea yang tergolong dalam ordo deca yaitu 10 dan *poda* adalah kaki sehingga hewan yang bergabung dalam ordo ini memiliki 10 kaki. Hewan ini juga memiliki karapas yang berkembang menutupi bagian kepala dan dada menjadi satu (*cephalothorax*). Udang vannamei termasuk dalam famili penaeid dan berbeda dengan anggota decapoda yang lain yaitu anggota famili ini menetas di luar tubuh yang sebelumnya dikeluarkan oleh betina vannamei juga termasuk anggota genus penaeus, hal ini ditandai dengan adanya gigi pada bagian atas dan bawah rostrum. Udang penaeid dapat dibedakan dengan jenis lainnya dari bentuk dan jumlah gigi pada rostrumnya. Udang vanname memiliki 2 gigi pada tepi rostrum bagian ventral dan 8 – 9 gigi pada tepi rostrum bagian dorsal (Sutrisno *et al.*, 2010 dalam Dananjaya, 2013).



Gambar 2. Morfologi Udang Vanname (FAO, 2011 dalam Wahyudewantoro, 2011)

Dibagian kepala sampai dada terdapat anggota tubuh yang berpasangan. Berturut-turut dari depan ke belakang adalah sungut kecil (*antennula*), sirip kepala (*schaphocerite*), sungut besar antenna), rahang (*mandiula*), alat-alat pembantu rahang (*maxilla*) yang terdiri dari dua pasang, maxilliped yang terdiri dari tiga pasang dan kaki jalan (*perepoda*) yang terdiri dari 5 pasang. Tiga pasang kaki jalan yang pertama ujung-ujungnya bercapit yang dinamakan chela. Dibagian perut (*abdomen*) terdapat 5 pasang kaki renang (*pleopoda*) yaitu pada ruas ke 1 sampai dengan ke 5 sedangkan pada ruas ke 6 kaki renang mengalami perubahan bentuk menjadi ekor kipas atau ekor (*uropoda*). Ujung ruas ke 6 ke srsh belakang membentuk ujung ekor (telson) dan dibawah pangkal ujung ekor terdapat lubang dubur (anus) (Suryanto dan Mudjiman, 2006).

Udang vanname berasal dari pantai Timur Laut Pasifik Sonora, Mexico Utara dan Amerika Selatan dan tengah, suatu area dimana temperatue air laut berada di atas 20 °C sepanjang tahun. Populasi vanname dikenal pula dengan domestikasi yaitu populasi yang dapat dibudidayakan sepanjang tahun di wilayah tersebut. Hal ini disebabkan udang vanname relative mudah dibudidayakan dan

persediaannya juga telah tersebar di seluruh penjuru dunia (Wyban dan Sweeney, 1992).

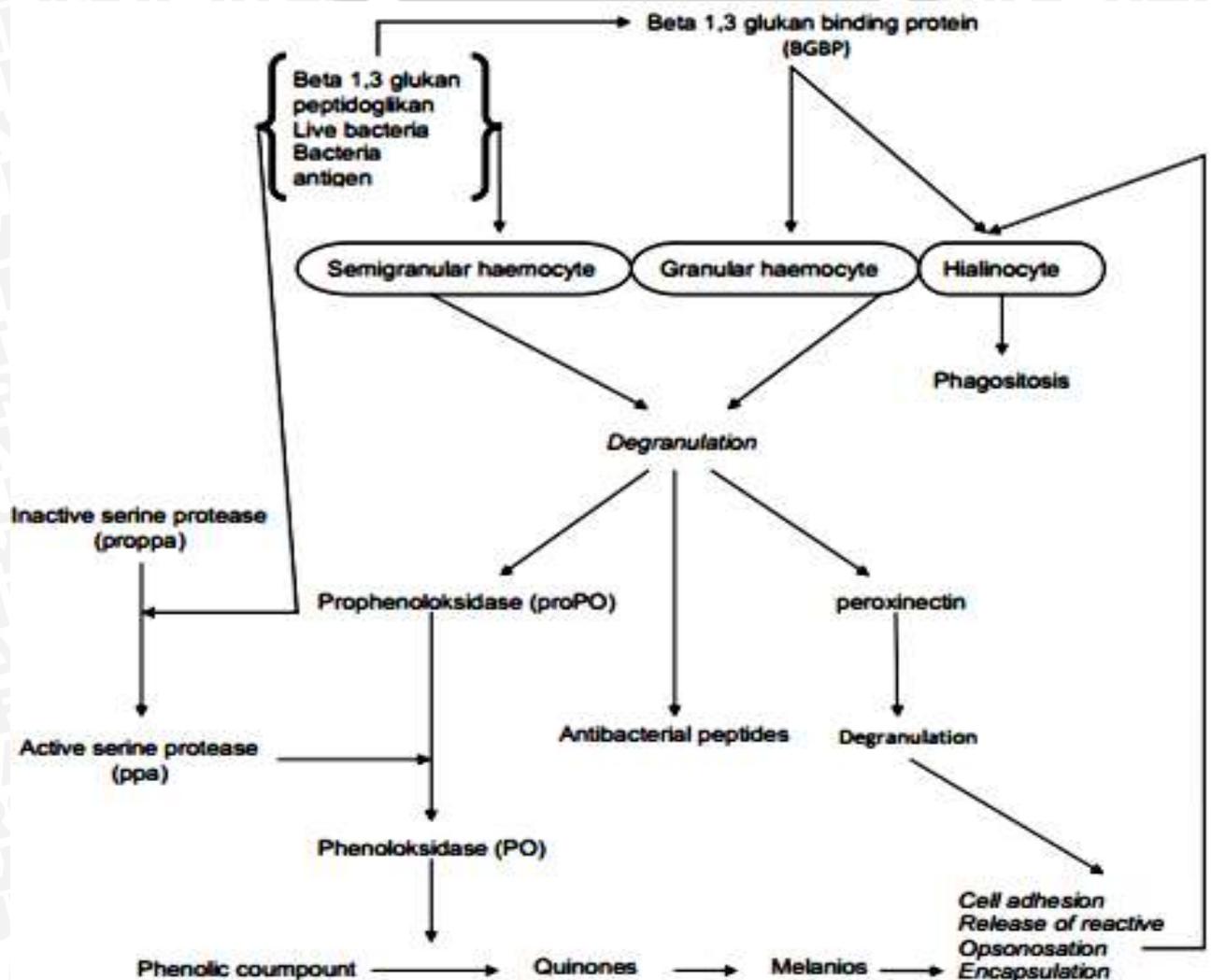
2.1.2 Sistem pertahanan tubuh udang vanname (*Litopenaeus vannamei*)

Sistem pertahanan kekebalan tubuh (*immune defense*) adalah sistem yang dimiliki tubuh (inang) untuk menghentikan penyusup (benda asing) yang dapat menyebabkan penyakit dan akhirnya membunuh inangnya, meliputi: (1) pengenalan terhadap material asing, (2) transmisi pesan yang akan menginduksi pelepasan dan produksi zat – zat yang akan menonaktifkan penyusup, dan (3) mengarahkan zat – zat tersebut ke penyusup dan mengkoordinasi tindakan untuk membuatnya tidak berbahaya (Holmbald dan Soderhall, 1999 *dalam* Saraswati, 2013).

Berbeda dengan vertebrata, imunitas avertebrata tidak berdasarkan pada imunoglobulin dan interaksi subpopulasi limfosit. Dalam hal ini tidak memproduksi antibodi spesifik atau antibodi sangat sedikit pada krustasea. Namun imunitas avertebrata efisien dan adanya interaksi komponen selular dan humoral. Sejak dulu dikatakan bahwa imunitas avertebrata dipengaruhi oleh interaksi sel fagositosis dengan patogen, bersamaan dengan sejumlah faktor humoral seperti lisosim (Jasmanindar, 2009).

Udang merupakan hewan arthropoda yang memiliki eksoskeleton yang terdiri atas kitin dan merupakan perlindungan terhadap berbagai jenis bahaya. Eksoskeleton adalah pertahanan tubuh pertama udang dalam mencegah infeksi penyakit melalui lendir yang dihasilkan oleh sel-sel epitel terluar. Apabila eksoskeleton ini gagal menangkal patogen yang masuk dalam tubuh, maka selanjutnya mengandalkan pertahanan internal dalam merespon infeksi tersebut melalui respon seluler dan humoral (Supamattaya *et al.*, 2000 *dalam* Saraswati, 2013).

Menurut Sritunyalucksana (2001), Sistem pertahanan tubuh udang vannamei tidak memiliki kemampuan mengingat antigen yang disebut dengan sistem kekebalan nonspesifik. Udang vannamei tidak memiliki antibody dan karena itu mekanisme pertahanannya sangat mengandalkan sistem imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam membasmi patogen yang masuk ke dalam tubuhnya.



Gambar 3. Mekanisme Sistem pertahanan Tubuh Pada Crustacea (Smith *et al.*, 2003)

2.1.3 Hemosit udang

Hemosit penting dalam menghilangkan partikel asing yang masuk tubuh udang. Terdapat tiga tipe hemosit pada hemolim udang (krustasea) yaitu sel hialin, semi granular dan granular. Ketiga sel ini mempunyai morfologi dan fungsinya masing-masing. Selain itu, Hemosit udang berperan penting pada awal dan memelihara respon imun non spesifik. Fagosit hemosit (makrofage pada hewan tingkat tinggi) merupakan sel kompeten immunology yang tertua dan sangat konsisten. Untuk mengaktifkan imunologi, hemosit ini harus melewati keadaan aktifasi dimana termasuk perubahan morfologi tertentu. Hemosit yang tidak diaktifkan cenderung untuk terlihat halus dan membulat, sementara hemosit yang aktif berserat (*crenellated*) dan *may extrude pseudopods* (mempunyai kaki semu) yang digunakan untuk menangkap dan fagositosis (mencerna) patogen (Jasmanindar, 2009).

Pertahanan pertama terhadap penyakit pada udang dilakukan oleh haemosit melalui fagositosis, enkapsulasi dan nodule formation. Aktifitas fagositosis dapat ditingkatkan dengan mengaktifkan sistem prophenol oksidase (Pro-PO) yang berada dalam haemosit semigranular dan granular (Selvin *et al.*, 2004). Meningkatnya jumlah hemosit dapat dijadikan sebagai Salah satu parameter suatu zat atau senyawa mampu menstimulasi sistem pertahanan non-spesifik udang (Smith *et al.*, 2003).

Hemosit merupakan faktor yang sangat penting dalam sistem pertahanan seluler yang bersifat non spesifik. Kemampuan hemosit dalam aktivitas fagositosis yang dapat meningkat pada kejadian infeksi, menunjukkan pertahanan tubuh yang bersifat seluler. Meningkatnya ketahanan tubuh udang dapat diketahui dari meningkatnya aktivitas fagositosis sel-sel hemosit. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan non spesifik yang secara umum dapat melindungi adanya serangan patogen (Fontaine and Lightner, 1974).

Maynard (1960) dalam Alifuddin (2002), menyatakan, bahwa sel hemosit yang identik dengan leukosit vertebrata adalah granulosit dan hialosit. Granula sekretori pada hemosit mengandung phenoloksidase (PO), prophenoloksidase (proPO) dan serin protease yang berperan dalam respon humoral.

Hemosit disintesis oleh jaringan hematopoietic yang merupakan sepasang epigastrik nodule. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis pasca introduksi imunostimulan. Jaringan tersebut terletak tepat di bagian dorsal pada lambung bagian depan (anterior stomach), merupakan tempat sintesa hemocyanin. Bila imunostimulan dapat meningkatkan hemocyanin, maka secara langsung akan terjadi pula peningkatan hemosit (Ekawati *et al.*, 2012).

2.1.4 Mekanisme masuknya bahan aktif ke dalam jaringan tubuh udang vanname (*Litopenaeus vannamei*)

Mekanisme masuknya bahan aktif ke dalam jaringan tubuh udang vanname dapat melalui banyak jalan antara lain melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan, permukaan kulit dan masih banyak lagi. Bahan aktif masuk ke dalam jaringan tubuh udang vanname melalui saluran pernafasan yaitu melalui insang. Pada saat udang vanname bernafas, maka air akan melintasi insang sehingga senyawa-senyawa dari imunostimulan yang berada pada perairan akan langsung berikatan dengan protein membran pada sel-sel epitel insang, kemudian sebagian besar bahan aktif *Gracilaria verrucosa* akan dibawa oleh protein reseptor melintasi membran dan diedarkan ke seluruh tubuh melalui rongga tubuh. Selanjutnya bahan aktif dapat masuk ke dalam jaringan tubuh udang vanname melalui penetrasi kulit. Hal ini dapat terjadi ketika udang mengalami molting (pergantian kulit). Ketika udang vanname mengalami molting maka kulit luar dari udang akan terlepas sehingga kulit dalam akan berhubungan langsung dengan air yang akan berdifusi melewati permukaan kulit. Bahan aktif

akan ikut terbawa oleh air dan akan berikatan dengan protein-protein membran pada sel-sel epitel kulit yang kemudian akan dibawa melintasi membran dan diedarkan keseluruh tubuh melalui rongga tubuh (Musallamah *et al.*, 2010).

β -Glukan dari ekstrak ragi roti masuk ke dalam tubuh pasca larva melalui saluran pencernaan bersama dengan air yang dikonsumsi untuk proses osmoregulasi. Perendaman β 1,3-Glukan pada larva Atlantic *Halibut Hippoglossus hippoglossus* (L.), menunjukkan bahwa makromolekul secara efektif akan melalui saluran pencernaan kemudian diabsorpsi oleh usus. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa terjadi absorpsi yang dilakukan oleh sel epitel pada permukaan kulit, walaupun kapasitas penyerapan terbatas (Strand dan Dalmo, 1997).

2.2 White Spot Syndrome Virus (WSSV)

White spot syndrome virus ini disebut juga dengan nama SEMBV (*Sistemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus*) dan penyakit merah atau penyakit *white spot*. Virus ini biasanya disebut *white spot syndrome virus* (WSSV) atau *white spot syndrome* penyakit ini biasanya menginfeksi jenis udang panaeid seperti *Panaeus monodon* yang menyerang semua umur udang dan berakibat pada kematian massal (Lightner, 1996).

White spot syndrome virus menyerang berbagai jenis krustacea termasuk udang. Virus tersebut termasuk family Baculoviridae dan merupakan virus DNA berantai ganda. Genus *Baculovirus* dari family Baculoviridae terdiri atas 3 grup, yaitu Baculovirus sub grup A, merupakan virus polyhedral yang berkembang biak dalam inti sel dan membentuk badan inklusi yang didalamnya banyak mengandung partikel virus, Baculovirus grup B mengandung satu partikel virus pada tiap-tiap inklusi dan Baculovirus grup C yang tidak mengandung badan inklusi. Berdasarkan keterangan di atas maka morfologi, ukuran, dan

perkembangbiakan patologis WSSV digolongkan dalam genus Baculovirus sub grup C (Bower, 1996 dalam Firmansyah, 2002).

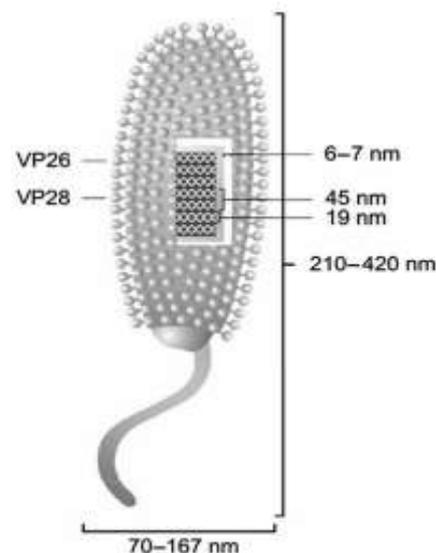
2.2.1 Morfologi dan karakteristik WSSV (*white spot syndrome virus*)

Penyakit *White spot syndrome* disebabkan oleh *white spot syndrome virus* yang merupakan virus golongan DNA (dsDNA) berbentuk silindris besar berukuran 275 x 83 nm yang termasuk dalam family Nimaviridae (Prajitno, 2008).

WSSV merupakan anggota dari genus Whyspovirus. Virion virus ini memiliki panjang 275 nm dan lebar mencapai 120 nm serta mengandung lebih dari 5 polipeptida dan mempunyai berat molekul 15-28 kilodalton (Vlak *et al.*, 2002).

Virion WSSV mempunyai pembungkus (*envelope*) yang mengandung 2 protein utama yaitu VP 28, VP 19 dan nukleokapsid yang mempunyai 3 protein utama yaitu VP 26, VP 244 dan VP 15. Bentuk dari WSSV seperti batang, menyerupai elips, dengan virion non okulasi berbentuk seperti ekor yang memanjang pada salah satu ujung yang merupakan perluasan dari sampul (Supriatna, 2004).

White spot syndrome virus berbentuk batang, terbungkus dalam sampul, tidak berbadan oklusi, eliptik dan nukleokapsidnya berbentuk silindris yang memiliki cincin-cincin yang melingkar serta memiliki badan inklusi yang intranuklear. Kapsid virus tersebut terdiri dari sub unit kapsid dilingkari oleh segment, bagian terakhir pembungkus kapsid berbentuk persegi empat (Durand *et al.*, 1997). Virus WSSV terdiri dari DNA double strand DNA tersebut panjangnya kira-kira 190 – 200 kilo bases. Komponen penyusun protein virus terdiri dari 3 jenis protein dan protein tersebut mempunyai molekul-molekul yang memiliki berat masing-masing 19, 23,5 dan 27,5 kDA. Ukuran dari virion virus WSSV bervariasi (Wang *et al.*, 1998).



Gambar 4. Struktur *White Spot Syndrome virus* (Sanchez-Paz, 2010)

Dari membran bilayer tampak lipidic, dengan daerah antara envelope dan nukleosida-kapsid bervariasi antara 2 dan 7,5 nm. Dimensi nukleokapsid dengan panjang 180-420 dan 54-85 nm diameter menunjukkan bahwa itu erat dikemas dalam virion. Analisa pemurnian oleh TEM partikel WSSV menunjukkan bahwa permukaan nukleokapsid terdiri dari 15 heliks vertikal terletak melalui sumbu panjang dari inti nukleokapsid. Setiap helix menyambung dari 13 sampai 15 capsomers, yang masing-masing berdiameter 8 nm. Ukuran masing-masing helix dan striations adalah 19-80 dan 8-80 nm. Jarak antara setiap helix adalah 7 nm, sedangkan dua striations dengan masing-masing area helix adalah 3 nm. VP28 dan VP26 adalah jumlah yang paling melimpah, terhitung sekitar 60% dari envelop. VP28 dikodekan dengan dibaca (ORF) 421 (wsv421), adalah protein envelope utama dan beberapa penelitian menunjukkan bahwa VP28 mungkin memainkan peran penting dalam langkah awal infeksi WSSV sistemik pada udang. Baru-baru ini ditemukan bahwa menunjukkan mengkodekan protein envelope WSSV (Sanchez-Paz, 2010).

2.2.2 Infeksi dan tanda penyerangan WSSV (*white spot syndrome virus*)

Penyebaran penyakit WSSV diawali oleh penularan partikel WSSV dengan cara mengikat sel rentan untuk memanfaatkan protein bagian luar dari sel. Pada inti sel virus melepaskan genom, kemudian genom WSSV mulai menggandakan diri. Pada sitoplasma, genom WSSV melakukan regenerasi dengan cara membentuk membran yang terdiri dari materi gelembung elektron berbentuk cincin. Gelembung tersebut ditempatkan pada inti sel yang rentan, kemudian menyebar pada sitoplasma sehingga menyebabkan membran terganggu (Wile, 2008 *dalam* Dananjaya, 2013).

Serangan virus *white spot* dapat menyebabkan udang menjadi lemah dan gejala klinis yang nampak antara lain usus kosong, tubuh pucat dan kemerah-merahan serta munculnya bercak putih berdiameter 0,5-2 mm pada bagian cephalotorax sampai menyebar keseluruh tubuh. Virus ini biasanya menyerang udang pada tahap pembesaran yaitu pada umur 1-2 bulan dan virus dapat menyebar ke seluruh tambak udang dalam waktu 2 hingga hari dan dapat menyebabkan kematian 70% hingga 100% (Tompo *et al.*, 2002 *dalam* Pranawaty *et al.*, 2012).

Organ target WSSV adalah epithelium kutikula dan jaringan ikat pada insang, sel epithelia sub kutikular, limfoid, kelenjar antennal dan hemolim. Tetapi infeksi WSSV jarang terjadi pada epithelium kelenjar antennal, sel sarung organ limfoid, simpul syaraf dan hepatopankreas. Bintik putih timbul pada bagian dalam karapas saat akhir fase infeksi. Diameter bintik putih berkisar antara 0,5 - 2 mm dan disebabkan oleh deposit garam kalsium yang abnormal pada epidermis kutikula (Ligthner, 1996). Menurut Wang *et al.* (1998), terdapat 16 organ target WSSV yaitu: pleopod, insang, perut, otot abdominal, hemolim, usus, hati, periopod, organ limfoid, epidermis, organ saraf, hepatopankreas, testes, ovary, spermatophorus dan tangkai mata.

Menurut Hameed *et al.* (1997) dalam Supriyatna (2004), *whispovirus* dapat menginfeksi berbagai krustase, dari udang *panaeid*, kepiting laut dan payau sampai udang karang tawar. WSSV dapat menginfeksi pada stadia post larva (PL) sampai udang berukuran 40 gram. WSSV dapat menyebabkan kematian udang hingga 100% selama 3-10 hari setelah timbulnya gejala klinis. Gejala klinis yang muncul pada udang akibat terinfeksi virus WSSV adalah terjadinya penurunan konsumsi pakan, lemah, kutikula lepas dan terjadi pelunturan warna (diskolorisasi) pada hepatopankreas dari warna merah muda hingga menjadi coklat kemerahan, anoreksia, lethargi, warna kemerahan pada abdomen dan bintik putih. Karakteristik tingkah laku dan morfologi udang yang terkena *white spot* terdapat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Karakteristik tingkah laku dan morfologi udang yang terkena *white spot*

Kriteria	Udang Sehat	Udang Sakit (WSSV)
Aktivitas Gerakan	Sering di bawah (bentis) Aktif	Sering di permukaan Pasif, lethargi (lemah)
Respon makan	Makan normal, usus penuh	Nafsu makan turun
Warna badan	Biru dan hijau normal	Kemerahan, karapas ada bintik putih
Hepatopankreas	Hepatopankreas coklat	Hepatopankreas pucat

Sumber: Wang *et al.*, 1995)

Pemeriksaan udang bertujuan untuk menghitung prevalensi dan tingkat keganasan infeksi WSSV pada udang uji. Penularan atau penyebaran penyakit WSSV dapat disebabkan oleh adanya organisme *carrier*, yaitu organisme pembawa penyakit yang dapat menularkan penyakit pada organisme lainnya, tetapi organisme *carrier* tersebut tidak menunjukkan gejala klinis penyakitnya. Penularan penyakit secara horizontal pada udang vannamee melalui organism *carrier* seperti rebon, udang putih, kepiting dan udang vannamee itu sendiri (Sumswidjadja, 2001 dalam Apriliza, 2010).

2.3 *Gracillaria verrucosa*

Gracillaria verrucosa merupakan algae bentik yaitu algae yang tumbuh menancap atau melekat pada substrat. Bentuk thallus menyerupai silinder, licin, berwarna coklat atau kuning hijau, percabangan tidak beraturan, memusat di bagian pangkal, cabang-cabang lateral memanjang menyerupai rambut dengan ukuran panjang berkisar 15-30 cm (Amalia, 2013).

Menurut Dawes (1981), *Gracillaria verrucosa* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisio	:Rhodophyta
Classis	:Rhodophyceae
Ordo	:Gigartinales
Familia	:Gracilariaceae
Genus	:Gracillaria
Species	: <i>Gracillaria verrucosa</i>



Gambar 5. *Gracillaria verrucosa* (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Gracillaria verrucosa merupakan salah satu jenis rumput laut yang memiliki ciri-ciri khusus yaitu talus berbentuk silindris dan permukaannya licin. Talus tersusun oleh jaringan yang kuat, bercabang-cabang dengan panjang kurang lebih 250 mm, garis tengah cabang antara 0,5-1,0 mm. Percabangan alternate yaitu posisi tegak percabanganangkal sampai kedalaman tertentu yang masih

dapat dicapai cahaya matahari. Beberapa jenis spesies *Gracillaria verrucosa* terdapat hampir di seluruh pantai di Indonesia (Sulistijo, 1985).

Gracillaria merupakan jenis rumput laut yang bersifat euryhalin. Hidup di perairan pantai berpasir, berair jernih dan berkadar garam antara 15-25 promil. Jenis agrofita ini tumbuh cepat dalam perairan pada kedalaman satu meter dimana kecerahan airnya mencapai 3 m (Cholik *et al.*, 2005).

2.3.1 Kandungan bahan aktif

Dinding sel rumput laut berisi matrix polisakarida yang berlimpah yang dibentuk oleh gula netral dan gula asam yang juga ditemukan pada tumbuhan darat. Namun rumput laut juga mengandung polisakarida bersulfat, yang tidak terdapat pada tumbuhan. Dengan demikian gula terbentuk dan dengan adanya kelompok sulfat diikuti pembentukan sejumlah molekul dengan bentuk dan fungsi biologis yang berbeda termasuk antiviral, antikoagulasi, antitumor dan aktifitas immunomodulatory pada mamalia. Ekstrak rumput laut telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai antitumor, meningkatkan aktivitas kemotaksis macrophage, menstimulasi aktivitas sekresi radikal oksigen dan fagositosis pada peritonial dan *splenic murine macrophage* (Castro *et al.*, 2006).

Alga merah termasuk juga didalamnya *G. verrucosa* mengandung beberapa zat yang penting antara lain: floridin starch, mannoglycerate, dan floridosida. Alga merah menghasilkan komponen utama kimianya yaitu karagenan dan agar. *G. verrucosa* merupakan penghasil agar, setiap jenis *Gracillaria spp.* menghasilkan agar dengan persentase kandungan dan kekuatan gelnya yang berbeda (Jasmanindar, 2009). Menurut Naidu (2000), Agar merupakan koloid hidropilik yang diekstrak dari alga merah. Komponen kimia ini mengandung polisakarida bersulfat, yang formasinya dengan senyawa lainnya dalam agar membentuk sejumlah molekul yang salah satunya berperan dalam

immunomodulatory. Polisakarida pada alga merah biasanya berisi galaktosa maupun galaktan bersulfat.

Alga merah diketahui mengandung senyawa phenol dari golongan florotannin yang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi. Senyawa fenolik adalah zat bioaktif secara luas pada tanaman. Senyawa fenolik terdiri dari berbagai macam senyawa flavonoid (anthocyanin, flavonol, flavol) dan beberapa kelas non flavonoid (asam fenola, lignins, stilbenes). Oleh karena itu senyawa ini telah dianggap sebagai calon potensial yang menjanjikan sebagai pelindung terhadap oksidasi lipid dan biologis penuaan jaringan (Maqsood, 2010 dalam Samad, 2010).

Polisakarida dari alga merah (karageenan) dapat meningkatkan aktivitas *phagocytic makrophag* dan mampu melawan infeksi bakteri setelah disuntik secara intraperitoneal pada ikan *Cyprinus carpio* (Castro *et al.*, 2006). Polisakarida diketahui merupakan komponen essensial bagi semua organisme dan mempunyai berbagai fungsi vital biologis diantaranya adalah sebagai antitumor, antiinflamasi, antikoagulan, antikomplementer, imunologi dan antivirus (Ridlo dan pramesti, 2009).

Kartika *et al.* (1999), menyatakan bahwa alga merah *Gracilaria verrucosa* memiliki kandungan bahan aktif hemaglutinin. Terdapat 4 jenis hemaglutinin yang terkandung di dalam *G. verrucosa*, yaitu: (1) GVA-1 yang merupakan protein atau glycoprotein dengan kandungan karbohidrat yang rendah, (2) proteo-glycan dengan berat 49 kDs, (3) H-GVH, polisakarida sulfat dengan berat molekul yang besar, (4) L-GVH dengan berat molekul yang rendah. Jenis pertama dan jenis kedua memiliki berat molekul rendah, struktur oligomer dan tidak memiliki ikatan disulfide.

2.4 Ekstraksi Rumput Laut

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemikiran metode ekstraksi senyawa bukan atom dipergunakan oleh beberapa faktor, yaitu sifat jaringan tanaman, sifat kandungan zat aktif serta kelarutan dalam pelarut yang digunakan. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan /q senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (diklor metan atau etil asetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (methanol, etanol dan air) (Prima, 2012).

Pada ekstraksi, pemilihan pelarut merupakan hal yang sangat penting. Hal utama yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, kemudahan terbakar, sifat racun, dan sifat korosif pelarut terhadap peralatan ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus memiliki daya melarutkan solute yang tinggi, dengan kata lain kepolaran pelarut harus sesuai dengan kepolaran bahan yang akan diekstrak (Prasetyo *et al.*, 2011).

Menurut Istiqomah (2013), metode ekstraksi yang dapat dilakukan antara lain: (1) Maserasi: proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. (2) *Ultrasound - Assisted Solvent Extraction*: Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan ultrasound (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz), (3) Perkolasi: ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru dan sempurna (*Exhaustiva extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prinsip perkolasi adalah dengan menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Proses terdiri dari tahap pengembangan

bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan, (4) Soxhlet: ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (5) Reflux: ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna, (6) Destilasi Uap: ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial. Pada destilasi uap, bahan simplisia benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinu ikut terdestilasi

Menurut Mukhriani (2011), proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut :

1. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut.
3. Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
4. Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
5. Pelarut nonpolar: n-heksan, petrole-umeter, kloroform dan sebagainya.

Proses ekstraksi rumput laut merupakan proses perpindahan massa dari fase padat ke fase cair. Dalam menentukan kecepatan ekstraksi perlu diketahui data mengenai koefisien transfer massa antar fase dan kesetimbangan. Dalam

peristiwa ekstraksi padat cair, perpindahan massa solut dari dalam padatan ke cairan melalui dua tahapan pokok, yaitu difusi dari dalam padatan ke permukaan padatan dan perpindahan massa dari permukaan padatan ke cairan (Treybal, 1981 *dalam* Distantina *et al.*, 2009).

2.6 Imunostimulan

Menurut Prajitno (2008), imunostimulan merupakan suatu bahan kimia, obat atau stressor yang bekerja dengan cara meningkatkan pertahanan tubuh non spesifik atau respon kekebalan fisik. Sistem kekebalan non spesifik ini memegang peranan yang lebih banyak pada hewan tingkat rendah seperti ikan, udang, dan hewan air lainnya. Pemberian imunostimulan secara luas dilakukan dengan maksud untuk mengaktifkan sistem imun non-spesifik sel seperti makrofag pada vertebrata dan hemosit pada avertebrata (Dugger and Jory, 1999).

Menurut Kamiso (2003) *dalam* Fariedah (2010), imunostimulan digunakan untuk meningkatkan mekanisme pertahanan non spesifik pada hewan, termasuk udang. Terdapat 10 kelompok imunostimulan diantaranya ialah produk bakteri, jamur, yeast, ikatan partikel pelarut dengan β -glukan, glycan-polisakarida, chitosan, peptide, ekstrak tumbuhan dan hewan. Menurut Dugger and Jory (1999), pemberian imunostimulan dapat dilakukan dengan:

1. Penyuntikan

Penyuntikan dapat memberikan respon non spesifik yang kuat, tetapi biasa tidak praktis dan efektif dalam hal biaya dalam usaha budidaya, kecuali untuk juvenile yang besar dan dewasa untuk tujuan memperbaiki individu seperti induk atau genetik.

2. Perendaman

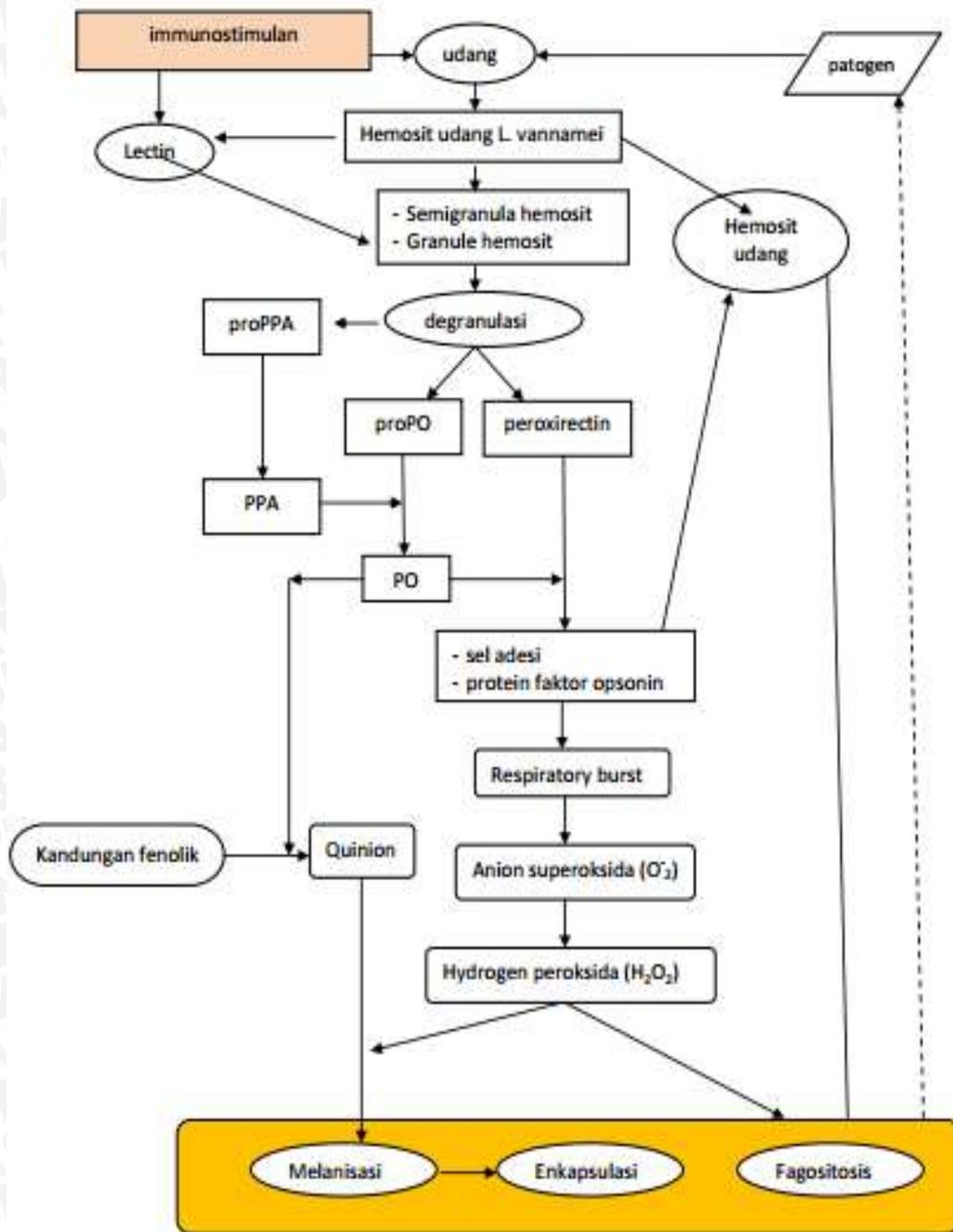
Memberikan respon imun non spesifik yang sedikit, tetapi lebih efektif dalam hal biaya daripada dengan penyuntikan. Namun dapat menimbulkan stress pada udang karena meningkatnya penanganan dan kepadatan dalam perendaman.

3. Oral

Memberikan respon imun non spesifik yang baik dan merupakan metode yang lebih efektif. Metode ini merupakan satu-satunya cara yang tidak berpotensi menimbulkan stress. Memungkinkan untuk digunakan pada imunostimulasi masal untuk ikan ukuran berapapun serta tidak membutuhkan banyak tenaga dan biaya. Namun kekurangan dari metode ini adalah keampuhan rendah sehingga membutuhkan banyak imunostimulan untuk mencapai tingkat proteksi.

Imunostimulan berhubungan langsung dengan sel sistem imun yang membuat sel tersebut lebih aktif. Sistem imun seluler terdiri dari Hemosit dan *fixed phagocytes* (sel yang tidak bergerak yang tersebar pada insang, jantung, dan jaringan pengikat). Faktor pertahanan humoral seperti protein penggumpalan, aglutinin (seperti lektin), enzim hidrolitik dan peptide antimikroba yang dihasilkan oleh dan akibat aksi sel imun (Prajitno, 2009).

Menurut Tizard (1982), proses terbentuknya sistem kekebalan tubuh adalah sebagai berikut: bila antigen memasuki tubuh, maka antigen tersebut akan dijerat oleh makrofage sedemikian rupa sehingga dapat diketahui sebagai bahan asing. Bahan asing tersebut akan dikirimkan ke sistem pembentuk antibody dan terjadilah pembentukan antibody. Sistem kekebalan (imunitas) juga harus menyimpan ingatan tentang kejadian tersebut sehingga pada kesempatan berikutnya dengan antigen yang sama tanggapannya akan jauh lebih efisien. Mekanisme kerja imunostimulan terdapat pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme kerja imunostimulan (Saraswati, 2013)

Imunostimulan yang masuk ke dalam tubuh udang akan dikenali oleh protein reseptor, yaitu LPS binding protein yang berperan sebagai opson untuk meningkatkan indeks fagositosis dan β -glukan binding protein yang dapat merangsang degranulasi dan aktivitas system proPO (Smith *et al.*, 2003),

Saat terdapat antigen yang masuk, maka akan segera dikenal dan diikat oleh plasma dalam hemolim. Ikatan tersebut dilakukan oleh agglutinin atau sering

disebut lektin yang merupakan komponen glikoprotein. Lektin merupakan bagian pertahanan humoral berfungsi untuk melakukan pengenalan terhadap benda asing. Ikatan antara antigen dengan glikoprotein tersebut terjadi dalam bentuk LPS binding protein atau β -glukan binding protein. Saat LPS masuk ke dalam hemolim maka sel semi granular dan granular akan melakukan degranulasi, yang akan melepaskan peroxinectin. Pada proses degranulasi juga terjadi enkositosis yang akan memacu proses aglutinasi. Ikatan glikoprotein dengan LPS akan mengaktivasi pro enzim pro-PPA menjadi enzim ppA. Enzim ppA akan mengaktivasi enzim proPO menjadi PO. Selama proses aktivasi ini akan dilepaskan beberapa protein (Johansson and Soderhall, 1989). Menurut Saraswati (2013), Peroxinectin berfungsi sebagai protein faktor opsonin yang akan menempel pada antigen/patogen. Selanjutnya dengan adanya ikatan tersebut sel fagosit akan mendekat dan berikatan dengan peroxinectin melalui integrin. Ikatan tersebut memulai proses fagositosis maupun enkapsulasi. Selama proses fagositosis dan enkapsulasi akan terjadi mekanisme penghancuran antigen/patogen melalui proses reaktif oksigen intermediet (ROIs).

Mekanisme lain eliminasi patogen adalah proses melanisasi. Hidrolisis prekursor proPO menjadi PO aktif, enzim PO akan mengkatalis oksidasi bertahap phenol menjadi quinon dalam pembentukan melanin, yaitu pengekapan patogen untuk mencegah infeksi (Saraswati, 2013).

Pemberian imunostimulan seperti polisakarida merupakan hal penting dalam proses pengenalan antigen. Apemberian imunostimulan akan meningkatkan protein pengenal (*recognition protein*) glikoprotein. Ikatan akan meningkatkan proses degranulasi sel granular dan semi granular, yang akan diikuti dengan meningkatnya peroxinectin sebagai faktor opsonin dalam memicu proses fagositosis dan enkapsulasi, serta meningkatnya aktivitas PO yang akan berperan dalam memicu proses melanisasi (Johansson and Soderhall, 1989).

2.7 Rumput Laut Sebagai Imunostimulan

Rumput laut merupakan alga multiselular yang mengandung substansi yang aktif secara imunologi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rumput laut mempunyai prospek yang masih terbuka bagi pengembangannya dalam bidang pengendalian penyakit. Ekstrak rumput laut telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai antitumor, meningkatkan aktivitas kemotaksis macrophage, menstimulasi aktivitas sekresi radikal oksigen dan fagositosis pada peritoneal and *splenic murine macrophage*. Metabolit sekunder dari *Halimeda macroloba* memiliki senyawa bioaktif anti jamur (Widiastuti, 2003). Rumput laut *Ulva* sp., *Dendrilla* sp., *Spirulina* sp., *Enteromorpha* sp., *Dictyota* sp., dan *Porphira* sp. telah terbukti mampu meningkatkan aktifitas imunostimulan udang (Castro *et al.*, 2006).

Rumput laut dari beberapa jenis alga coklat diketahui dapat memproduksi senyawa sulfat dan polisakarida jenis lain seperti fukoidan yang dihasilkan pada jaringan interseluler termasuk pada bagian permukaan yang berfungsi sebagai metabolit sekunder (Doner and Whistler, 1973). Lebih dari itu, polisakarida yang berasal dari jenis alga seperti karagenan, laminaran, alginat dan fukoidan menunjukkan aktivitas sebagai imunostimulan karena mempunyai potensi sebagai imunomodulatori pada udang (Cheng *et al.*, 2005).

Ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* dapat menghambat pertumbuhan bakteri, baik itu bakteri gram negatif maupun gram positif dan bioaktivitas ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* cenderung bersifat bakteriostatik. Ekstrak Alga merah *Gracilaria tenuistipitata* melalui perendaman dan injeksi dilaporkan dapat meningkatkan kekebalan udang putih *L. vannamei* terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* (Yong-Chin Lin *et al.*, 2011). *Gracilaria fisheri* juga menunjukkan efek imunostimulan dan antivirus. Penelitian mengenai isolasi *Gracilaria fisheri* yang telah menunjukkan kegiatan imunostimulan dan antivirus terhadap WSSV

(Wongprasert *et al.*, 2014). Ekstrak dari *Gracilaria corticata* adalah sangat aktif terhadap bakteri Gram-negatif *Proteus mirabilis* (Kanjana *et al.*, 2011).

2.7 Kualitas Air

Kesehatan udang salah satunya dipengaruhi oleh kualitas air. Kualitas air yang baik mampu mendukung pertumbuhan secara optimal. Hal itu berhubungan dengan faktor stress udang akibat perubahan parameter kualitas air. Faktor lingkungan ini mengakibatkan produksi antibodi berkurang sehingga imunitas atau kekebalan tubuh udang vannamei terhadap serangan penyakit menjadi berkurang (Soetomo, 2000 dalam Amrillah *et al.*, 2015).

Monitoring kualitas air dilakukan setiap hari. Usaha – usaha yang dapat dilakukan selama prses ini antara lain persiapan air yang steril, pengaturan ketinggian air, sirkulasi, pemberian pakan yang tepat jumlah, pengaturan aerasi, salinitas, temperature dan jika terdapat sisa makanan maka dilakukan penyiponan secara hati - hati. Parameter - parameter kualitas air yang diukur dalam pelaksanaan penelitian ini di adalah: suhu, salinitas, pH, oksigen terlarut, amonia. Parameter-parameter tersebut akan mempengaruhi proses metabolisme tubuh udang, seperti keaktifan mencari pakan, proses pencernaan dan pertumbuhan udang (Haliman dan Adijaya, 2005).

2.7.1 pH

Derajat keasaman (pH) air dapat berpengaruh terhadap meningkat tidaknya daya racun amonia dan hydrogen sulfida pada perairan. Pada pH tinggi lebih banyak ditemukan senyawa amonia dan bersifat toksik. Hal ini disebabkan karena amonia lebih mudah terserap ke dalam tubuh udang. Apabila pH semakin meningkat pada kadar tertentu, maka akan mengakibatkan daya racun amonia semakin meningkat (Effendi, 1997).

Menurut Ahmad (1991) dalam Dananjaya (2013), pada pH dibawah 4,5 atau diatas 9,0 ikan atau udang akan mudah sakit dan lemah serta nafsu makan menurun bahkan karapas udang cenderung keropos dan berlumut. Apabila nilai pH lebih besar dari 10 akan bersifat letal bagi ikan maupun udang.

Nilai pH yang normal untuk tambak udang berkisar 6 – 9. Nilai pH di atas 10 dapat mematikan udang sedangkan pH di bawah 5 mengakibatkan pertumbuhan udang lambat. Pada Udang vaname kisaran pH yang optimal adalah 7,5 – 8,5 (Amri dan Kanna, 2008).

2.7.2 Suhu

Suhu air sangat mempengaruhi laju metabolisme dan pertumbuhan organisme perairan. Suhu juga dapat mempengaruhi kelarutan gas-gas dalam air. Pengaruh suhu juga menentukan kehidupan udang, yaitu berkisar 23-30° C. Pada suhu air di bawah 15° C atau di atas 33°C selama 24 jam atau lebih akan terjadi kematian. Untuk udang yang masih muda akan dapat tumbuh dengan baik apabila kondisi perairan hangat, namun semakin dewasa maka lebih menyukai suhu yang relatif lebih rendah. Suhu yang baik untuk larva ialah 27°-29°C (Elovaara, 2001 dalam Wahyudewantoro. 2011).

Salah satu faktor lingkungan budidaya yang sangat berpengaruh terhadap imunostimulasi adalah suhu. Suhu media budidaya harus optimal bagi proses pembentukan respon imunitas spesifik. Respon spesifik yang terbentuk yakni respon yang sangat bergantung kepada suhu (*temperature dependent*). Karena itu, suhu media budidaya harus diatur sedemikian rupa berkisar 20 - 25 °C, agar respon spesifik dapat terbentuk optimum dalam waktu 1 - 2 minggu (Alifuddin, 2002).

2.7.3 Dissolved oxygen (DO)

Lingkungan budidaya sering merupakan hal yang sangat berpengaruh pada produksi udang vaname. *Dissolved oxygen* (DO) merupakan faktor pembatas dalam budidaya. Air pada dasar kolam dimana udang berada, dapat menjadi *hypoxic* atau bahkan *anoxic* karena respirasi organisme dan dekomposisi bahan organik dari sisa pakan dan feces, terutama pada malam hari. Kondisi *hypoxic* dapat membahayakan hidup udang. Nilai DO diatas 5 mg l⁻¹ sering direkomendasikan untuk budidaya intensif (Zhang *et al.*, 2006 dalam Jasmanindar, 2009).

Oksigen mutlak dibutuhkan oleh organisme dalam air untuk respirasi yang selanjutnya dimanfaatkan untuk kebutuhan metabolisme. Selain itu, adanya oksigen terlarut akan mempercepat reaksi kimia dari bahan-bahan toksik yang membahayakan kehidupan organisme. Kadar DO yang baik bagi pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup udang secara normal adalah lebih dari 3,77 mg/l. Kadar DO dalam air kurang dari 1,2 mg/lit dapat mematikan larva udang (Sutaman, 1993 dalam Panjaitan, 2012). Haliman dan Adijaya (2006), menyatakan bahwa kandungan oksigen terlarut sangat mempengaruhi metabolisme tubuh udang dan kadar oksigen yang baik berkisar antara 4-6 ppm.

2.7.4 Salinitas

Salinitas merupakan kadar garam yang terlarut pada air. Salinitas mempunyai hubungan dengan suhu. Makin tinggi suhu maka kadar garamnya juga tinggi. Salinitas juga berhubungan dengan kecepatan tumbuh udang. Salinitas yang tinggi akan mengakibatkan proses osmoregulasi meningkat. Selain itu salinitas yang tinggi juga akan mengakibatkan pertumbuhan udang menjadi lambat dikarenakan energi lebih banyak digunakan untuk kegiatan osmoregulasi (Haliman dan Adijaya, 2006).

Menurut Briggs *et al.* (2004), udang vanname dapat mentolerir kandungan salinitas di perairan antara 0,5 – 45 ppt. Udang vanname dapat tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas 7 – 34 ppt, namun untuk pertumbuhan optimal berkisar antara 10 - 15 ppt. Menurut Rukyani, (2000) dalam Supriyatna (2004), virus WSSV dapat hidup dan berkembang pada berbagai kondisi kualitas air dan salinitas (0-40 ppt). Akan tetapi umumnya penyakit bintik putih jarang terjadi pada tambak bersalinitas 0-5 ppt.

2.7.5 Amonia

Amonia merupakan senyawa yang berpengaruh terhadap pertumbuhan udang. Penyebab timbulnya amonia di dalam tambak adalah akibat adanya sisa pakan yang tidak termakan, bangkai hewan dan tumbuhan, kotoran udang dan bahan organik lainnya (seperti ganggang) yang membusuk. Pada dosis di atas 0,45 ppm amonia dapat menghambat pertumbuhan udang sampai 50 %. Untuk menunjang pertumbuhan udang maka kandungan udang di dalam tambak tidak boleh lebih dari 0,1 ppm (Amri dan Kanna, 2008).

Amonia di perairan merupakan racun bagi biota hewani. Nilai amonia yang tinggi dapat memberikan efek negatif bagi kehidupan organisme. Daya racun amonia akan meningkat sebanding dengan meningkatnya pH dan kandungan CO₂ bebas. Demikian pula sebaliknya, daya racun amonia akan menurun dengan berkurangnya dosis CO₂ bebas dan pH (Basmi, 1988 dalam Wulandari, 2008). Udang dapat mentoleransi kandungan amonia dalam perairan sebesar 0.5 mg/l. Amonia di perairan dapat mempengaruhi pertumbuhan, menambah energi untuk keperluan detoksifikasi, mengganggu osmoregulasi dan mengakibatkan kerusakan fisik pada jaringan (Tienssongrusme, 1980 dalam Wahyudewantoro, 2011).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah mengenai respon imun udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) dan ketahanan terhadap WSSV ketika udang direndam dalam air yang mengandung ekstrak alga merah *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda. Sedangkan parameter kualitas air yang diukur meliputi pH, suhu, DO, salinitas dan amonia.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.3 Metode Pengambilan Data

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen merupakan suatu metode penelitian yang bertujuan untuk menilai pengaruh dari berbagai perlakuan. Menurut Jaedun (2011), penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja oleh peneliti dengan cara memberikan treatment/perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan sesuatu kejadian/keadaan yang akan diteliti bagaimana akibatnya.

Penelitian eksperimen bertujuan untuk menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengenakan kepada suatu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan sesuatu atau lebih kelompok terkontrol (Suryana, 2010). Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan hipotesis mengenai potensi ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebagai imunostimulan melalui perendaman dalam meningkatkan respon imun dan ketahanan tubuh udang vanname terhadap serangan WSSV. Secara kuantitatif, untuk membuktikan efek dari

ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* melalui metode perendaman dengan dilakukan perhitungan perubahan *Total Haemocyte Count* (THC), *Differential Haemocyte Count* DHC serta *Survival Rate* (SR) pada udang vannamei yang diuji tantang dengan WSSV.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini didapatkan berdasarkan dari data primer dan data sekunder. Dara primer merupakan data yang dikumpulkan langsung oleh peneliti. Sedangkan data sekunder merupakan data yang peneliti dapatkan dari berbagai referensi seperti jurnal, buku, dan artikel yang menunjang penelitian ini.

3.4.1 Data primer

Menurut Hasan (2002), data primer adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan langsung dilapang oleh orang yang melakukan penelitian atau yang memerlukan. Data primer dalam peelitian ini diperoleh dengan metode observasi. Observasi adalah upaya mengamati dan mendokumentasikan hal-hal yang terjadi selama tindakan berlangsung. Pada saat dilakukan tindakan, secara bersamaan juga dilakukan pengamatan tentang segala sesuatu yang terjadi selama proses pembelajaran berlangsung (Suryana, 2010). Adapun observasi yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain mengamati THC, DHC dan SR pada udang vanname sebagai udang uji. Serta dilakukannya pengamatan kualitas air meliputi suhu, pH, DO, salinitas dan amonia di dalam perairan sebagai faktor penunjang kehidupan udang vanname.

3.4.2 Data sekunder

Menurut Marzuki (1983), data sekunder adalah data yang pengumpulannya bukan dikumpulkan sendiri secara langsung oleh peneliti, tetapi

diambil dari statistik, majalah, keterangan - keterangan atau publikasi lainnya. Data sekunder dari penelitian ini yaitu mencari referensi dari berbagai sumber yang terkait penelitian ini seperti buku, jurnal, skripsi, tesis dan sebagainya yang mendukung dan memperkuat hasil penelitian yang telah diperoleh.

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen di laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan perbedaan dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* 100, 300 dan 500 mg/l dengan masing-masing tiga ulangan. Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol positif tanpa pemberian ekstrak dan tanpa ujiantang dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak dengan ujiantang.

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu: (1) Menguji ketahanan *L. vannamei* terhadap WSSV setelah udang direndam selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak *Gracilaria verrucosa*; (2) Mengukur parameter imun dari *L. vannamei* yang direndam selama 3 jam dalam air yang mengandung ekstrak *G. verrucosa* dilihat dari THC dan DHC; 3) Mengetahui dosis pemberian ekstrak yang efektif dalam perendaman terhadap daya tahan optimal serangan WSSV. Penentuan dosis penambahan ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* pada perendaman mengacu pada penelitian terdahulu, yaitu Truong-Giang *et al.* (2011), dengan waktu perendaman terbaik untuk meningkatkan ketahanan terhadap WSSV selama 3 jam. Perlakuan penambahan dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* yaitu sebesar 0, 100, 300, and 500 mg/L. Berikut merupakan rancangan penelitian disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Rancangan Penelitian

Ulangan	Perlakuan				
	(K+)	(K-)	GA	GB	GC
1	K+1	K-1	GA1	GB1	GC1
2	K+2	K-2	GA2	GB2	GC2
3	K+3	K-3	GA3	GB3	GC3

Keterangan:

K+n : perlakuan udang normal tanpa diinfeksi WSSV dan tanpa perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa*

K-n : perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* 0 mg/L

GA_n : perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* 100 mg/L

GB_n : perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* 300 mg/L

GC_n : perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* 500 mg/L

Dalam penelitian kali ini dipilih pemberian imunostimulan dengan metode perendaman dikarenakan dengan perendaman dalam air atau media, lebih efektif dibanding penyuntikan. Metode perendaman dilakukan dengan mempertimbangkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* meliputi flavonoid, saponin, tannin dan steroid, dimana dalam air senyawa tersebut tidak bersifat volatil, karena memiliki struktur molekul yang besar dan didalamnya terdapat gugus OH sehingga mudah berikatan dengan air. Senyawa yang sudah berikatan dengan air tidak akan mudah untuk lepas ke udara (Wahjuningrum, 2006).

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu ekstraksi rumput laut, persiapan hewan uji, Persiapan Bak percobaan, Penyediaan Larutan Inokulum WSSV, perendaman larva udang windu dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa*, ujiantang udang vannamei dengan WSSV, pengamatan fisiologi dan tingkah laku,

3.6.1 Ekstraksi rumput laut

Sampel *Gracilaria verrucosa* dikumpulkan dari lokasi budidaya rumput laut di daerah Jepara, dicuci dengan air laut dan tawar untuk menghilangkan garam, epifit, mikroorganisme dan bahan lainnya. Alga yang telah bersih dikeringkan di udara terbuka (kering udara) tanpa terkena cahaya matahari langsung. Selanjutnya sampel yang sudah kering digiling halus dan diayak menggunakan saringan halus (50 mesh size). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 80%, dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:5 (weight/volume), artinya 10 gram simplisia direndam dalam 50 ml etanol 80%. Diaduk dengan stirrer, diendapkan selama 1 x 24 jam, kemudian disaring. Hasil saringan (filtrat) dievaporasi dengan menggunakan penguap putar (rotary evaporator) pada suhu 50 °C.

3.6.2 Persiapan hewan uji

Udang vannamei diperoleh dari UPT PBAP Bangil, Pasuruan Jawa Timur. Udang vanname yang digunakan berada pada stadia PL 30. Udang *L. vannamei* dipelihara dalam bak dengan padat tebar 1 ekor/2 liter. Wadah pemeliharaan berupa ember plastik ukuran 20 L sebanyak 15 buah yang diisi air sebanyak 18 L, tiap bak berisi 10 ekor udang vaname dan dilengkapi dengan sistem aerasi. Ember tersebut ditutup dengan waring agar udang uji tidak lompat (Prawira, 2014). Sebelum diberikan perlakuan udang vanname diaklimatisasi 7 hari (Wahjuningrum, 2006). Selama periode aklimatisasi, udang diberi pakan komersial dua kali, yaitu pada pukul 10.00 dan 19.00 WIB. Pakan yang diberikan adalah pakan udang komersial, dengan *feeding rate* 3% dari bobot *biomassa*/hari (Truong-Giang Huynh *et al.*, 2011). Sebelum diberi perlakuan perendaman, terlebih dahulu dilakukan uji PCR untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi

udang tidak terinfeksi WSSV, Hanya udang sehat, yang digunakan untuk penelitian (Wahjuningrum *et al.*, 2006).

3.6.3 Persiapan bak percobaan

Bak percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak dengan ukuran 20 L yang dilengkapi dengan sistem aerasi pada masing-masing bak. Sebelum digunakan wadah disterilisasi menggunakan kaporit sebanyak 100 ppm selama 24 jam, kemudian dibilas dengan air bersih dan dikeringkan (Jasmanindar, 2009). Setiap bak diisi air sebanyak 18 L dengan air yang sudah *ditreatment*. Metode *treatment* air ialah air ditampung pada bak penampungan, kemudian diberi kaporit 60 ppm dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, air tersebut diberi Na-thiosulfat sebanyak 30 ppm yang berfungsi untuk menetralkan kadar kaporit yang ada pada air tersebut. Kemudian air dibiarkan selama 3 hari hingga air siap digunakan untuk media hidup udang vaname selama penelitian.

3.6.4 Penyediaan larutan inokulum WSSV (*white spot syndrom virus*)

Virus diisolasi dari organ (insang dan daging) udang vanname yang terinfeksi WSSV dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Sebelumnya dilakukan uji PCR untuk memastikan udang positif terserang WSSV. Sebanyak 1 g organ (insang dan daging) digerus sampai halus, kemudian disuspensikan dalam 9 ml air laut steril, lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit dan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit masing-masing dengan suhu 4°C. Kemudian supernatannya disaring dengan kertas miliopore 0,45 µm menggunakan *filter holder* dan *shyringe* sehingga didapatkan suspensi virus dengan dosis 10% (w/v) yang setara dengan dosis 20 mg/ml virus (Hameed *et al.*, 1998 *dalam* Rahma *et al.*, 2014). Metode inokulum virus terdapat pada

Lampiran 3.

Metode yang digunakan untuk penginfeksi virus WSSV pada udang uji adalah metode perendaman dalam 1 liter larutan virus dengan pengenceran 10^{-3} (dosis 20 $\mu\text{g/ml}$). Untuk mendapatkan virus dengan dosis 20 $\mu\text{g/ml}$ digunakan metode Amrillah *et al.* (2015), yaitu dengan menyiapkan 2 tabung reaksi, pada tabung 1, ambil 1 ml larutan virus 20 mg/ml ditambahkan dengan 9 ml air laut kemudian dihomogenisasi dengan menggoyang-goyangkan tabung reaksi. Ambil 10 ml larutan virus 2 mg/ml dan tambahkan 90 ml air laut. Ambil 100 ml larutan virus 0,2 mg/ml ditambahkan 900 ml air laut. 1000 ml larutan virus 0,02 mg/ml yang digunakan sebagai perendam (**Lampiran 4**).

3.6.5 Perendaman *L. vannamei* dengan ekstrak *G. verrucosa*

Udang uji ukuran PL 30 dimasukkan dalam bak dengan padat tebar 1 ekor/2 liter. Wadah perendaman berupa ember plastik ukuran 20 L sebanyak 15 buah yang diisi air sebanyak 18 L dan dilengkapi dengan sistem aerasi (Prawira, 2014). Dalam 1 bak perendaman berisi 10 ekor udang vanname. Udang vanname direndam dalam air yang mengandung ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda selama 3 jam, hal ini dilakukan karena waktu perendaman terbaik untuk meningkatkan ketahanan terhadap WSSV adalah selama 3 jam (Truong-Giang *et al.*, 2011)

Pada eksperimen ini udang uji diberi lima (5) perlakuan yaitu 100, 300, 500 mg/L ekstrak rumput laut, kontrol (+) serta kontrol (-) dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga (3) kali. Perlakuan kontrol negatif yaitu tanpa perendaman dengan larutan ekstrak dan diuji tantang; sedangkan perlakuan kontrol positif yaitu tanpa perendaman dengan larutan ekstrak dan tidak diuji tantang, masing-masing diulang 3 kali. Setelah perendaman dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa*, udang tersebut selanjutnya dikembalikan ke bak pemeliharaan dan dipelihara selama 5 hari. Pada hari ke-6 setelah perendaman

dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* diamati parameter imun meliputi THC dan DHC.

3.6.6 Uji tantang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan *white spot syndrome virus* (WSSV)

Setelah perendaman dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa*, udang selanjutnya dikembalikan ke akuarium pemeliharaan dan dipelihara selama 5 hari. Pada hari ke-6 setelah perendaman dengan ekstrak, udang diuji tantang dengan WSSV. Proses penginfeksi udang vanname dengan WSSV dilakukan dengan metode perendaman dalam 1 liter larutan virus dengan pengenceran 10^{-3} (dosis 20 $\mu\text{g/ml}$) selama 3 jam (Depita, 2004). Proses ini menggunakan ember dengan volume air 3 liter/ember, jaring penutup ember dan aerasi. Kepadatan udang vanname adalah 10 ekor/ember. Inokulum WSSV dimasukkan menggunakan spuit suntik kedalam akuarium yang telah berisi air dan udang secara merata. Setelah 3 jam, udang vanname ditempatkan kembali dalam bak awal dengan volume air 18 L dan kepadatan 10 ekor/akuarium. Udang uji yang telah diinfeksi WSSV dipelihara selama 5 hari (Saraswati, 2013).

Pengambilan sampel untuk pengamatan respon imun dilakukan sebelum (6 hari setelah perendaman dengan ekstrak) dan sesudah (5 hari setelah) diinfeksi WSSV (Saraswati, 2013). Selama pemeliharaan dilakukan pengamatan terhadap tingkat kematian dan tanda-tanda klinis udang. Untuk mengetahui perubahan tingkah laku dan gejala klinis udang yang diinfeksi WSSV maka dilakukan pengamatan secara morfologi terhadap aktivitas, gerakan, respon makan, warna tubuh dan kematian. Pengamatan ini dilakukan setelah uji tantang sampai dengan hari ke-5 setelah diinfeksi dengan WSSV. Pada akhir pemeliharaan dilakukan pengamatan terhadap kelulushidupan udang.

3.7 Pemeriksaan Parameter Utama

Parameter utama yang diukur dalam penelitian ini meliputi THC, DHC dan SR dengan metode sebagai berikut:

3.7.1 THC (*total haemocyte count*)

Total Haemocyte Count (THC) dihitung sesuai metode Ekawati *et al.* (2012), 0,1 ml hemolim diambil dari pangkal kaki renang keempat, menggunakan srynge 1 ml berisi 0,1 ml antikoagulan Na-sitrat 10%, lalu dihomogenkan dengan cara menggerakkan tangan membentuk angka delapan selama 5 menit. Ditambahkan 0,1 ml trypan blue dan dihomogenkan. Trypan blue berfungsi sebagai pemberi warna pada hemosit, sehingga mudah diamati di bawah mikroskop. Kemudian satu tetes larutan diletakkan pada *haemocytometer* dan jumlah sel per ml dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total hemosit} = \frac{\text{Jumlah sel yang dihitung}}{\text{Jumlah bidang pandang}} \times 10^4 \times \text{faktor pengencer}$$

3.7.2 DHC (*differential haemocyte count*)

Differential Haemocyte Count (THC) dihitung sesuai metode Ekawati *et al.* (2012), 0,1 ml hemolim diambil dari pangkal kaki renang keempat menggunakan srynge 1 ml berisi 0,1 ml antikoagulan Na-sitrat 10%, lalu dihomogenkan dengan cara menggerakkan tangan membentuk angka delapan selama 5 menit. Ditambahkan 0,1ml trypan blue dan dihomogenkan. Trypan blue berfungsi sebagai pemberi warna pada hemosit, sehingga mudah diamati di bawah mikroskop. Satu tetes larutan diletakkan pada hemocytometer dan jumlah

sel per ml dihitung persentase berdasarkan kriteria morfologi hemosit (hialin, semi granular dan granular) dengan menggunakan mikroskop. Persentase tiap jenis sel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Presentase Jenis Sel hemosit} = \frac{\text{Jumlah tiap sel hemosit}}{\text{Total hemosit}} \times 100$$

3.7.3 SR (*survival rate*)

Indikator kelulushidupan udang dihitung pada akhir pengamatan dengan menghitung jumlah udang yang masih hidup pada setiap wadah percobaan dibandingkan dengan jumlah udang pada awal penelitian dinyatakan dalam persen (%) (Saraswati, 2014). Perhitungan nilai *survival rate* (SR) udang vanname dilakukan dengan rumus Effendi (1997) sebagai berikut:

$$SR = \frac{Nt}{N0} \times 100 \%$$

Keterangan :

- SR :Tingkat kelangsungan hidup %
 Nt :Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)
 No :Jumlah ikan yang hidup pada uji tantang (ekor)

3.8 Pengukuran Parameter Penunjang

Pengukuran penunjang yang dilakukan adalah pengukuran parameter kualitas air yang meliputi DO, pH, salinitas dan suhu setiap hari, serta pengukuran amonia pada awal, tengah dan akhir penelitian. Untuk menjaga kualitas air tetap baik, feses disipon dan diganti dengan air baru sebanyak volume air yang terbuang. Penyifonan dilakukan setiap hari (Widyantoko, 2015).

3.8.1 Suhu

Prosedur pengukuran suhu air menurut Hariyadi *et al.* (1992), ialah:

- Mencilupkan thermometer langsung ke dalam air dengan membelakangi sinar matahari sampai batas skala baca dan membiarkan 2 -5 menit sampai skala suhu pada thermometer menunjukkan angka yang stabil
- Melakukan pembacaan skala thermometer dengan cepat setelah mengangkat thermometer dari air.

3.8.2 Ph

Prosedur pengukuran pH menurut Bloom (1998), adalah sebagai berikut:

- Mengkalibrasi pH pen menggunakan akuades.
- Menekan tombol ON dan mencelupkan ujung sensor pH pen pada larutan buffer pH 7 atau 4.
- Memasukkan pH pen ke dalam perairan kemudian.
- Mencatat nilai yang muncul pada pH pen.

3.8.3 DO

Prosedur pengukuran DO meter menurut Panjaitan (2012), adalah sebagai berikut

- Menyalakan power dengan menekan tombol On/off.
- Mengambil sensor elektronik kemudian membilasnyaa dengan akuades.
- Memasukkan alat sensor tersebut ke dalam air secara benar dan tepat.
- Membaca nilai pada layar yang merupakan nilai kandungan DO air media.
- Setelah digunakan, sensor elektronik dibilas menggunakan akuades kemudian dimasukan ke dalam tempat sensor.

3.8.4 Salinitas

Prosedur pengukuran salinitas menurut Hariyadi *et al.* (1992), adalah sebagai berikut:

- Meneteskan akuades pada prisma refraktometer.
- Membersihkan prisma refraktometer dengan kertas tissue.
- Mengambil sampel air dengan pipet tetes.
- Meneteskan air yang akan dihitung salinitasnya pada prisma refraktometer.
- Menutup prisma refraktometer.
- Membaca skala refraktometer.

3.7.5 Amonia

Prosedur pengukuran nitrat berdasarkan Tes Kit adalah sebagai berikut:

- Menyaaring sampel air sebanyak 10 ml kedalam elmayer menggunakan kertas saring.
- Menyalakan hach kemudian memprogram untuk pengukuran NH_3 dengan cara menekan angka 7, memasukan kode 64 dan enter .
- Menambahkan serbuk reagen *salicylat* pada sampel yang telah tersaring kemudian tekan timer pada hach dan enter, maka akan terprogram selama 3 menit.
- Jika sudah 3 menit, menambahkan *amonium cyanurate* dan menekan enter, maka akan terprogram timer 15 menit.
- Setelah 15 menit, memasukan blang sempel kedalam hach setelah itu tekan zero untuk menol kan alat hach.
- Kemudian memasukan sempel kedalam botol hach dan dimasukkan kedalam alat hach dan ditutup setelah itu menekan tombol read.
- Mencatat hasil yang muncul pada layar hach.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, akan di analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman (ANOVA) menggunakan software program SPSS.16 serta untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi *Gracilaria verrucosa*

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari ekstraksi *Gracilaria verrucosa* yang dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana, yaitu dengan cara merendam bahan dalam pelarut organik pada suhu ruangan (Gritter *et al.*, 1985). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung metabolit primer maupun sekunder, sehingga metabolit tersebut akan larut. Perbedaan dosis antara larutan di dalam sel dan di luar sel mengakibatkan larutan yang pekat didesak keluar.

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol 80%. Pemilihan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol dapat menarik senyawa polar maupun non polar dengan indeks kepolaran 5,2, sehingga cocok untuk menarik senyawa yang terkandung dalam *Gracilaria verrucosa* berupa saponin, tripenoid, flavonoid dimana senyawa ini sangat berperan dalam peningkatan respon imun (Fard, 2011). Beberapa saponin, flavonoid dan tripenoid pada umumnya berada dalam bentuk glikosida. Ikatan glikosida yang tersusun dari banyak unit antara satu dengan yang lain disebut polisakarida. Polisakarida ini dapat memodifikasi beberapa komponen sistem imun pada ikan dan udang sehingga dapat meningkatkan proteksi terhadap infeksi penyakit. Polisakarida dapat tertarik dalam pelarut etanol (Haryani, 2010).

Etanol merupakan pelarut serbaguna, dapat menyatu dengan air dan dengan sebagian besar bahan organik yang bersifat cair, termasuk zat cair non-polar seperti hidrokarbon alifatik tidak beracun, tidak berasa tetapi memiliki bau yang khas, etanol bersifat lebih selektif, kapang dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol 20 %, dengan kadar etanol 80 % dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang

optimal karena bahan pengotor yang ikut dalam cairan pengekstraksiannya hanya dalam skala kecil (Aritrixso *et al.*, 1996). Menurut penelitian Prima (2012), beberapa rumput laut dari Pantai Selatan Daerah Istimewa Yogyakarta yang diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol, metanol, aquades, benzen, dan heksan menunjukkan bahwa ekstrak rumput laut yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi adalah ekstrak rumput laut yang diekstrak dengan menggunakan etanol.

Hasil ekstraksi simplisia rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 600 gram dengan pelarut etanol adalah sebanyak 70 gram ekstrak kental dengan rendemen ekstrak sebesar 11.67%. Selanjutnya ekstrak kental ini digunakan dalam penelitian. Hasil ekstrak dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Ekstrak *Gracilaria verrucosa* yang digunakan untuk penelitian (Dokumentsi pribadi, 2016)

4.2 Hasil Pengamatan Respon Imun Selular Udang Vaname Sebelum dan Sesudah Diinfeksi Dengan WSSV

Kemampuan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dalam menstimulasi respon imun udang vaname perlu diuji kemampuannya terhadap infeksi patogen. Untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dalam meningkatkan respon pertahanan terhadap infeksi WSSV, maka dilakukan pengamatan respon imun sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV yang meliputi total hemosit (THC) dan differensial hemosit (DHC). Selain itu juga dilakukan pengamatan terhadap

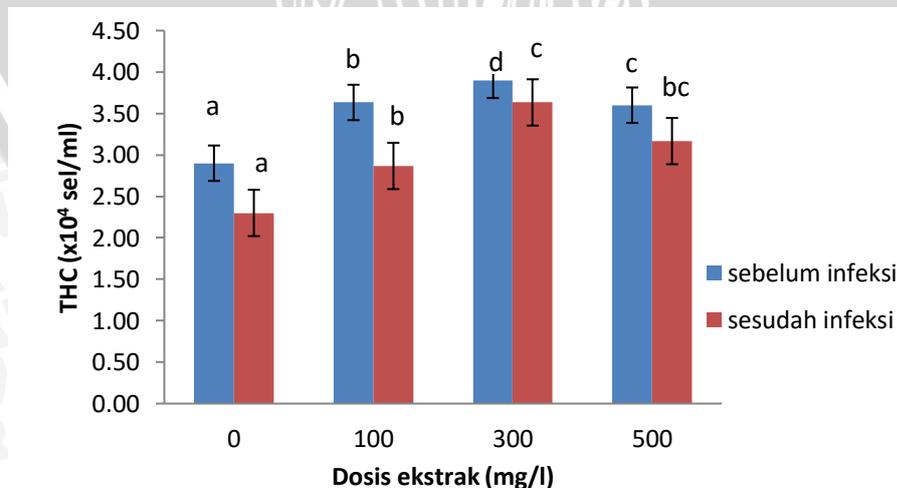
gejala klinis dan kelulushidupan udang vaname. Dalam penelitian ini terdapat perlakuan kontrol positif (tanpa ekstrak dan tanpa infeksi WSSV) sebagai variabel pembanding. Hasil perhitungan THC dan DHC pada perlakuan kontrol positif menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif sebelum infeksi, selain itu pada kontrol positif udang uji tidak diinfeksi WSSV sehingga tidak terdapat nilai hemosit pasca infeksi WSSV, oleh sebab itu perlakuan kontrol positif tidak dimasukkan ke dalam grafik.

4.2.1 Total Hemosit

Hemosit merupakan salah satu bentuk pertahanan tubuh secara selular. Hemosit mampu mematikan agen penyebab infeksi melalui sintesis dan eksositosis molekul bioaktif protein mikrobisidal (Smith *et al.*, 2003 dalam Ridlo dan Pramesti, 2009). Faktor-faktor immunoreaktif seperti peroxinectin, peptide antibakteri dan *clotting components* disimpan dalam hemosit, sehingga peningkatan jumlah hemosit merupakan ukuran kemampuan suatu zat untuk untuk menstimulasi sistem pertahanan tubuh udang (Ridlo dan Pramesti, 2009).

Hasil rata-rata THC udang vanname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV terlihat dalam

Gambar 8.



Gambar 8. Histogram rerata THC udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV

Pada gambar di atas terlihat perbedaan THC pada setiap perlakuan. Sebelum diinfeksi WSSV rerata THC udang vanname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* lebih tinggi dibandingkan kontrol. Setelah diinfeksi WSSV, rerata THC pada dosis yang sama menunjukkan penurunan meskipun masih lebih tinggi dibandingkan kontrol. THC tertinggi setelah direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* terdapat pada perlakuan dosis 300 mg/l dengan rata-rata jumlah hemosit $5,47 \times 10^4$ mg/l dan total hemosit terendah terdapat pada perlakuan kontrol (0 mg/l) dengan rata-rata THC $2,90 \times 10^4$ mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* dapat memacu proliferasi sel hemosit sehingga jumlahnya meningkat dan lebih tinggi dibandingkan tanpa pemberian ekstrak. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Maftuch *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa imunostimulan alga laut *G. verrucosa* meningkatkan total hemosit udang windu dibandingkan kontrol. Penelitian Selvin *et al.* (2004) menunjukkan bahwa ekstrak *Ulva* sp. dan *Dendrilla* sp. dapat meningkatkan jumlah total hemosit udang masing-masing sampai $0,672 \times 10^7$ sel/L dan $0,620 \times 10^7$ sel/L.

Peningkatan jumlah hemosit pada udang vaname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* terjadi karena pada ekstrak tersebut mengandung senyawa polisakarida. Polisakarida utama dari *Gracilaria verrucosa* adalah karaginan, agar dan agarose. Polisakarida ini mengandung molekul α -D-galaktosa bergabung dengan β -1,34 ikatan 3,6-anhydro-galaktosa (Yeh and Chen, 2009). Polisakarida agar dapat dikenali oleh *lipopolisakarida and β -glucan binding protein* (LGBP), *β -glukan binding protein* (β GBP), atau *patern-recognition protein* (PRPs) lainnya pada udang vaname, dan ikatan kompleks pada permukaan hemosit melalui RGD motif dan kemudian mengaktifasi fagositosis dan sistem *prophenoloxidase* (proPO). Dengan meningkatnya fagositosis maka

akan meningkatkan respon imun udang vaname (Lin *et al.*, 2008 dalam Saraswati 2014). Menurut Van de Braak *et al.* (2002), peningkatan jumlah hemosit udang yang diberi ekstrak rumput laut dikarenakan adanya kandungan LPS dalam ekstrak tersebut. LPS ini akan dikenali oleh reseptor udang vaname sebagai antigen yang akan menginduksi imun udang untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh melalui aktivasi jaringan hematopoetik untuk melakukan proliferasi sel hemosit.

Meningkatnya dosis perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* diikuti dengan meningkatnya total hemosit udang vaname, sampai dengan dosis 300 mg/l. Selanjutnya pada dosis yang lebih tinggi yaitu 500 mg/l, total hemosit mulai menurun. Menurut Ridlo dan pramesti (2009), kemampuan imunostimulan untuk meningkatkan respon imun dan mengembangkan proteksi terhadap infeksi patogen dipengaruhi oleh dosis aplikasi. Pemberian imunostimulan pada dosis dibawah nilai minimal untuk terjadinya respon imun tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah hemosit, namun apabila pemberian imunostimulan melebihi batas kemampuan tubuh untuk meresponnya justru akan menjadi imunostresor yang dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh udang.

Pasca infeksi WSSV total hemosit udang vaname mengalami penurunan. Total hemosit tertinggi pasca infeksi WSSV sebesar $3,63 \times 10^4$ sel/ml dicapai oleh dosis 300 mg/l dan terendah terdapat pada perlakuan kontrol (0 mg/l) sebesar $2,20 \times 10^4$ mg/l. Hasil ini sesuai dengan penelitian Gullian *et al.*

(2004) bahwa terdapat penurunan total hemosit pada udang yang diberi bakteri probiotik *Bacillus*P62 setelah diuji tantang. Penurunan total hemosit terjadi karena masuknya patogen WSSV dapat menyebabkan proses proliferasi dan degranulasi sel hemosit. Proses degranulasi akan mengurangi jumlah hemosit yang beredar, sehingga total hemosit menjadi turun (Saraswati, 2014). Penurunan THC setelah infeksi WSSV merupakan salah satu dampak dari

respon hemosit atau dari infeksi yang terjadi, dimana selama periode pembersihan virus dari sirkulasi, THC lebih rendah, hal ini menandakan adanya aktivitas pertahanan (Van de Braak *et al.*, 2002). Pada saat patogen mulai menginfeksi, hemolim krustase yang mengandung haemosit dan plasma protein akan berusaha mengenali benda asing. Salah satu plasma protein tersebut adalah *multivalent sugar-binding agglutinin* (hemagglutinin) atau lektin. Agglutinin terdapat pada membran haemosit dan umumnya mampu berikatan dengan lipopolisakarida (LPS) dan disebut ikatan LPS – *Binding Agglutinin* (LPS-BA) (Effendi, 2004 *dalam* Ammas, 2013).

Tabel 3. Rerata total hemosit udang vaname yang direndam selama 3 jam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV.

Dosis ekstrak (mg/l)	THC ($\times 10^4$ sel/ml)	
	Sebelum Infeksi WSSV	Setelah Infeksi WSSV
0	2.90 \pm 0.10 _a	2.20 \pm 0.10 _a
100	3.63 \pm 0.15 _b	2.87 \pm 0.15 _b
300	3.90 \pm 0.50 _c	3.63 \pm 0.15 _c
500	3.60 \pm 0.10 _b	3.17 \pm 0.15 _d

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

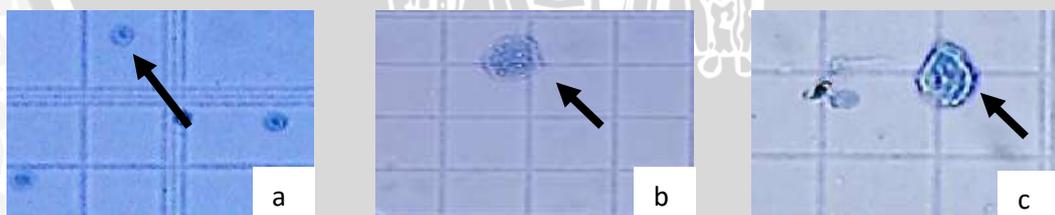
Hasil analisis ragam rerata total hemosit udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV adalah berbeda sangat nyata ($P < 0,05$). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa semua perlakuan dengan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) dimana THC sebelum dan sesudah infeksi, tertinggi dicapai dengan dosis ekstrak 300 mg/l, berbeda sangat nyata dibanding perlakuan dosis 100mg/l, 500 mg/l dan perlakuan kontrol. Namun pada dosis 100 mg/l dan 500 mg/l sebelum infeksi WSSV tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Pada penelitian ini, udang yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* terbukti meningkatkan jumlah THC udang vanname. Seiring dengan

peningkatan total hemosit udang, sistem kekebalan tubuh udang juga akan meningkat sehingga tingkat serangan infeksi WSSV dapat tereduksi. Hal ini sesuai dengan pendapat Sukenda *et al.* (2007) bahwa, jumlah total hemosit mengindikasikan kemampuan inang dalam merespon material asing dalam tubuhnya. Semakin tinggi total hemosit, maka semakin tinggi pula aktivitas fagositosis yang diberikan inang dalam mengendalikan mikroorganisme asing.

4.2.2 Diferensial Hemosit count (DHC)

Diferensial hemosit menggambarkan perbandingan tipe-tipe hemosit pada udang vaname yang direndam dalam air yang mengandung ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan setelah diinfeksi WSSV. Menurut Hartinah (2012), perubahan jumlah hemosit sampai batas tertentu diikuti dengan perubahan komposisi diferensiasi sel-sel hemosit. Perubahan jumlah hemosit dan perubahan komposisi diferensiasi sel dapat menjadi indikator awal bagi kondisi kesehatan udang. Terdapat tiga tipe hemosit yang berbeda, yaitu sel hialin, sel semi granular dan sel granular. Penggolongan tipe berdasarkan pada keberadaan sitoplasma granular. Gambar tipe-tipe sel hemosit yang ditemukan saat penelitian dapat dilihat pada **Gambar 9**.

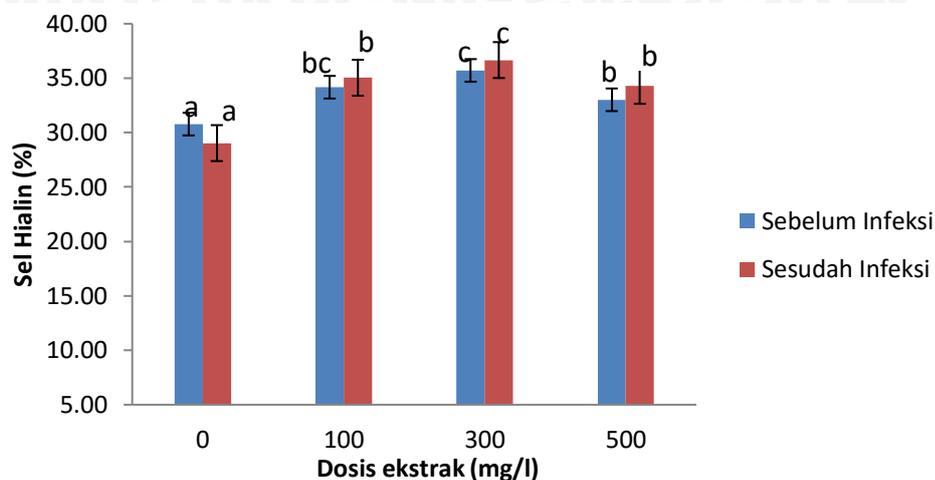


Gambar 9. (a) Sel hialin, (b) Sel Semi Granular, (c) Sel granular (Dokumentasi Pribadi, 2016)

a. Sel Hialin

Sel hialin merupakan sel dengan perbandingan inti sel lebih tinggi dari sitoplasma dan tidak memiliki granula atau agranular. Sel hialin melakukan fungsi dalam imunitas sebagai fagositosis (Johansson *et al.*, 2000). Hasil rata-rata sel

hialin pada udang vaname setelah perendaman dengan ekstrak, sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV terlihat pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Histogram rerata sel hialin udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV

Berdasarkan gambar tersebut terlihat bahwa jumlah sel hialin tertinggi sebelum dan sesudah infeksi WSSV ditunjukkan pada perlakuan dosis 300 mg/l dengan nilai berturut-turut 33,58% dan 36,66%, sedangkan sel hialin terendah terdapat pada perlakuan kontrol (0 mg/l) dengan nilai secara berurutan 33,01% dan 29,03%. Truong-Giang *et al.* (2011), menyatakan bahwa sel hialin udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Sargassum hemiphyllum* pada dosis 300 dan 500 mg/l secara signifikan lebih tinggi dibanding kontrol setelah 3 jam perendaman. Hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulan ekstrak *Gracilaria verrucosa* melalui perendaman meningkatkan prosentase sel hialin baik sebelum maupun sesudah infeksi WSSV daripada kontrol. Menurut Chotogeat *et al.* (2004) dalam Saraswati (2013), peningkatan sel hialin dikarenakan adanya LPS pada ekstrak yang dapat menginduksi terjadinya proliferasi sel hemosit. Proliferasi sel terjadi karena adanya polisakarida LPS ekstrak *Gracilaria verrucosa*. Ekstrak yang mengandung polisakarida dapat memacu respon imun pada hewan air.

Pada proses proliferasi sel mula-mula akan disintesa pre hemosit yang dalam perkembangannya akan menjadi sel hialin yang tidak memiliki granul. Pada penelitian ini ditemukan bahwa terjadi peningkatan pada presentase sel hialin pada perlakuan yang mendapat ekstrak *Gracilaria verrucosa*, hal ini mengindikasikan bahwa terjadi pula peningkatan kemampuan hialin untuk melakukan fagositosis terhadap infeksi patogen. Peningkatan hialin ini biasanya dihubungkan dengan peningkatan resistensi terhadap patogen (Jasmanindar, 2009).

Sesudah infeksi WSSV, rerata sel hialin pada perlakuan kontrol (0 mg/l) menunjukkan penurunan, sedangkan pada udang yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* menunjukkan peningkatan. Hal ini menunjukkan fungsi sel hialin dalam proses fagositosis. Menurut Ammas (2013), udang tidak memiliki imunoglobulin dan limfosit T dan hanya tergantung pada respon inflamasi. Dalam hal ini, fagositosis memainkan peranan utama dan dikatakan sebagai mekanisme pertahanan seluler utama yang dilakukan oleh sel hialin. Partikel-partikel asing difagositosis oleh haemosit dan dilumpuhkan dalam agregat-agregat nodular dari hialin atau di enkapsulasi oleh sel. Aktifitas fagositosis dari haemosit udang akan meningkat dapat dilihat melalui hialin yang merupakan salah satu sumber lisozim yang bersifat toksik terhadap patogen. Lisozim mempunyai aktifitas antibakteri dan meningkatkan fagositosis yang selanjutnya akan menurunkan infeksi patogen dalam tubuh udang dan meningkatkan sistem kekebalan non spesifik udang. Pada udang lisozim bisa berasal dari hialin (Rantetondok, 2002).

Menurunnya jumlah hemosit pada perlakuan kontrol diduga akibat proses fagositosis yang mengakibatkan terjadinya penghancuran partikel patogen bersama dengan sel hialin dan tidak mendapat dukungan dari pihak lain, dalam hal ini adalah senyawa polisakarida yang terkandung dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa*. Sementara pada udang yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria*

verrucosa terjadi peningkatan hialin setelah infeksi WSSV dimungkinkan karena meningkatnya proliferasi sel seiring dengan peningkatan dosis ekstrak sampai dosis 300 mg/l.

Tabel 4. Rerata sel hialin udang vaname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Dosis Ekstrak (mg/l)	Presentase Sel Hialin (%) \pm SD	
	Sebelum Infeksi WSSV	Sesudah Infeksi WSSV
0	33,01 \pm 0.650 _a	29,03 \pm 0.718 _a
100	34,16 \pm 0.617 _{ab}	35,04 \pm 0,882 _b
300	35,38 \pm 0.749 _b	36,66 \pm 0,540 _b
500	33,89 \pm 1,478 _a	34,30 \pm 0,295 _c

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil analisis ragam terhadap presentase sel hialin menunjukkan bahwa perlakuan perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan sel hialin. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum diinfeksi WSSV menunjukkan perbedaan nyata dimana nilai hialin tertinggi pada dosis 300 mg/l, tidak berbeda nyata dengan perlakuan 100 mg/l, namun berbeda nyata dengan perlakuan dosis 500 mg/l dan kontrol. Meningkatnya dosis perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* diikuti dengan meningkatnya hialin sel udang vaname sampai dengan dosis 300 mg/l, selanjutnya pada dosis 500 mg/l, hialin mulai menurun. Pasca infeksi WSSV hialin sel mengalami peningkatan yang bervariasi. memperlihatkan bahwa semua perlakuan dengan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* menunjukkan perbedaan nyata. Peningkatan sel hialin tertinggi terjadi pada perlakuan dosis 300 mg/l hasil ini berbeda nyata dengan semua perlakuan. Pada perlakuan dosis 100 mg/l dan 500 mg/l menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata, namun keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol (0 mg/l), sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa perendaman dengan ekstrak

Gracilaria verrucosa memberikan pengaruh yang nyata terhadap sel hemosit baik sebelum maupun sesudah infeksi WSSV dengan dosis perlakuan terbaik 300 mg/l. Hasil penelitian Saraswati (2014), menunjukkan bahwa persentase sel hialin memperlihatkan perbedaan yang nyata setelah diinjeksi dengan *Chaetoceros ceratosporum* baik sebelum maupun sesudah ujiantang.

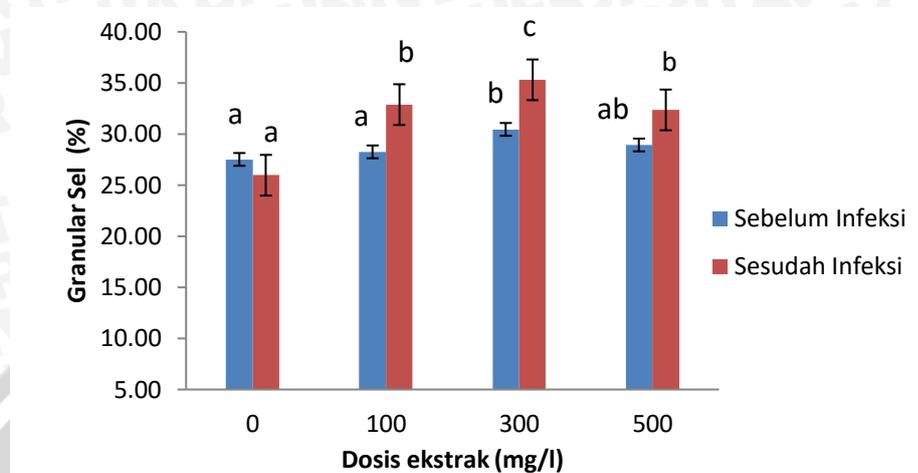
Menurut Widanarni *et al.* (2010), peningkatan sel-sel hialin hemosit yang signifikan pada udang yang direndam ekstrak *Gracilaria verrucosa* dapat memberikan pengaruh positif terhadap ketahanan tubuh udang dalam mengendalikan virus WSSV dalam tubuh sehingga jenis sel tersebut merupakan sel hemosit yang besar peranannya dalam meningkatkan ketahanan tubuh udang. Dengan demikian, peningkatan sel-sel hialin dalam hemosit merupakan salah satu parameter peningkatan status kesehatan atau ketahanan tubuh udang yang tentunya tidak lepas dari peran dan fungsi dari jenis sel lain dalam hemosit.

Hasil penelitian ini menjelaskan ekstrak *Gracilaria verrucosa* kemungkinan mampu mempercepat proses maturasi precursor cell hemosit di jaringan hematopoietik yang kemudian diikuti dengan pelepasan hemosit baru ke hemolim. Pelepasan hemosit baru ke hemolim akan meningkatkan total sel hialin dan mempercepat proses maturasi hemosit di jaringan penghubung (*Connective Tissue*) sehingga memberikan kontribusi pada kelimpahan sel granular di hemolim saat terjadi infeksi patogen (Johansson and Soderhall, 1989).

b. Sel Granular

Sel Granular merupakan sel dengan perbandingan inti sel lebih rendah dari sitoplasma. Sel ini berfungsi dalam menyimpan dan melepaskan sistem proPO maupun sebagai sitotoksis bersama-sama dengan sel semi granular (Johansson *et al.*, 2000). Pola perubahan presentase sel granular udang vaname

yang diendam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Histogram rerata sel granular udang vaname yang diendam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV

Gambar grafik tersebut menunjukkan perbedaan prosentase sel granular pada setiap perlakuan. Dimana presentase sel granular tertinggi sebelum dan sesudah infeksi WSSV terdapat pada perlakuan 300 mg/l dengan nilai dan terendah pada perlakuan kontrol (0 mg/l). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Truong-Giang *et al* (2011), yang menyatakan bahwa sel granular udang vaname yang diendam dengan ekstrak *Sargassum hemiphyllum* pada dosis 300 dan 500 mg/l secara signifikan lebih tinggi dibanding kontrol setelah 3 jam perendaman.

Peningkatan granular secara drastik pada perlakuan setelah udang vaname diendam ekstrak *Gracilaria verrucosa* terjadi karena produksi hemosit yang dilakukan melalui proses mitosis oleh jaringan haematopoetic. Proses mitosis tersebut akan dilakukan secara cepat untuk mencapai keadaan homeostasis pasca introduksi β -Glukan (Smith *et al.*, 2003).

Tabel 5. Rerata sel granular udang vaname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Dosis Ekstrak (mg/l)	Presentase Sel Granular (%) \pm SD	
	Sebelum Infeksi WSSV	Sesudah Infeksi WSSV
0	27,51 \pm 0,67 _a	25,97 \pm 0,38 _a
100	28,25 \pm 1,50 _a	32,88 \pm 0,63 _{bc}
300	30,45 \pm 0,54 _b	35,34 \pm 1,02 _c
500	28,93 \pm 0,60 _{ab}	32,36 \pm 0,92 _b

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

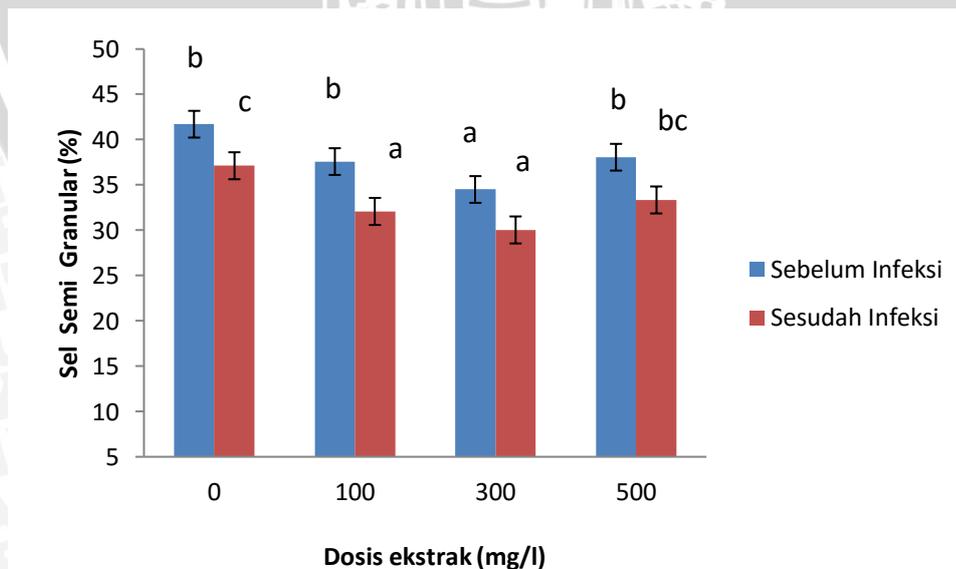
Hasil analisis ragam terhadap sel granular menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dosis berbeda berpengaruh nyata terhadap peningkatan sel granular baik sesudah maupun sebelum infeksi WSSV. Hasil uji Duncan sebelum infeksi menunjukkan bahwa perlakuan tertinggi pada dosis 300 mg/l dengan nilai 28,25 \pm 1,50 sel/ml berbeda nyata dengan perlakuan kontrol dan 100 mg/l. Namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan 500 mg/l. Sedangkan sesudah infeksi menunjukkan bahwa nilai tertinggi tetap pada perlakuan 300 mg/l dengan nilai 35,34 \pm 1,02 sel/ml berbeda nyata dengan perlakuan kontrol dan 500 mg/l namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan 100 mg/l. peningkatan sel-sel granulosit setelah perlakuan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* dapat meningkatkan jumlah granular pada perlakuan sebelum dan sesudah infeksi WSSV. Hasil penelitian Syahailatua (2009), menunjukkan Persentase sel granular secara nyata berbeda diantara perlakuan. Sebelum uji tantang sel granular secara nyata pada udang yang diberi bakteri probiotik *V. alginolyticus* lebih tinggi dibanding kontrol. Setelah uji tantang perbedaan sel granular terdeteksi pada hari ke-2, 4 dan ke-6 dimana semua udang yang diberi bakteri probiotik lebih tinggi ($p < 0,05$) dari kontrol.

Fungsi sel granular lebih pada proses menghasilkan enzim phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan non spesifik. Granula pada sel granular hemosit terdiri dari prophenoloksidase. Dalam

aktivasi prophenoloksidase (proPO) akan membebaskan suatu enzim dari sel granular. Sistem ini juga dipacu oleh adanya komponen mikrobial seperti β -glucan (Ekawati *et al.*, 2012). Menurut Jasmanindar, (2009) Peningkatan THC juga menjadikan daya peningkatan sel granular untuk melakukan aktifitas phenoloksidase sehingga udang dapat bertahan terhadap serangan patogen. Granulosit merupakan sel fagositik utama pada udang. Bilamana sel granular meningkat maka sel ini akan mampu melepaskan sistem proPO. Peningkatan aktifitas phenoloksidase mengakibatkan kemampuan dari sel-sel fagositik untuk melakukan fagositosis terhadap partikel asing juga meningkat.

c. Sel Semi Granular

Sel semi granular merupakan sel dengan jumlah inti sel yang lebih rendah dibandingkan sitoplasmanya. Sel semigranular berperan dalam enkapsulasi, sitotoksis dan melepaskan sistem proPO. Presentase sel semi granular berkisar pada 13-49% (Johansson *et al.*, 2000). presentase sel semi granular udang vaname yang diirendam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 12. Histogram rerata sel semi granular udang vaname yang diirendam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah diinfeksi WSSV

Berdasarkan gambar di atas, dapat diketahui bahwa sel semi granular tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol (0 mg/l) dan terendah pada perlakuan dosis 300 mg/l baik pada perlakuan sebelum infeksi maupun sesudah infeksi WSSV. Rendahnya sel semi granular pada perlakuan dibanding pada kontrol dikarenakan ekstrak *Gracilaria verrucosa* mengandung LPS dan asam pentadekanoat yang dapat meningkatkan proses degranulasi sehingga jumlah sel semi granular menurun dengan meningkatnya dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa*. Sesudah infeksi WSSV, proses proliferasi sel hemosit semakin meningkat dengan bertambahnya dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* untuk mencapai kondisi homeostatis, sehingga sel semi granular menurun. Menurut Van De Braak *et al.* (2002), sel semi granular merupakan pematangan dari sel hialin yang ketika terjadi serangan patogen maka yang berperan pertama adalah sel hialin, sehingga sel ini tidak berkembang menjadi sel semi granular dan terlihat penurunan jumlah sel semi granular yang terdapat dalam hemosit.

Tabel 6. Rerata sel semi granular udang vaname yang direndam dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Dosis Ekstrak (mg/l)	Sel Semi granular (%)	
	Sebelum Infeksi WSSV	Sesudah Infeksi WSSV
0	39,31±0,31 _b	37,2±0,63 _c
100	37,35±0,89 _b	31,75±0,87 _a
300	34,50±0,86 _a	29,83±1,39 _a
500	38,06±1,83 _b	33,34±1,21 _{bc}

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil analisis ragam terhadap presentase sel semi granular perlakuan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum infeksi WSSV menunjukkan bahwa perlakuan tertinggi pada kontrol dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan 100 mg/l dan 500 mg/l namun berbeda nyata dengan perlakuan 300 mg/l. Sedangkan sesudah infeksi WSSV, sel semi granular tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol tidak berbeda nyata dengan perlakuan 500 mg/l namun berbeda nyata dengan

perlakuan 300 mg/l dan 100 mg/l. Hasil ini sesuai dengan penelitian Ermatianingrum *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa penambahan *Chlorella* sp. pada pakan tidak berpengaruh terhadap persentase sel semi granular udang windu hari ke-21 dan hari ke-23. Jasmanindar (2009) pada hari keenam persentase sel semi granular udang yang diinjeksi dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada perlakuan dosis ekstrak 50 µg/g bobot udang lebih rendah dari kontrol ($p < 0,05$).

Pengamatan presentase sel hemosit udang vaname pasca infeksi WSSV menunjukkan presentase sel granular dan sel hialin mengalami peningkatan sedangkan presentase sel semi granular mengalami penurunan. Hal ini diduga karena sel semi granular lebih mudah terinfeksi WSSV sehingga berdampak pada menurunnya persentase sel semi granular dan meningkatnya persentase sel granular dan sel hialin. Penurunan persentase sel semi granular yang terjadi pascainfeksi WSSV merupakan salah satu implikasi dari peningkatan sel granular di daerah infeksi WSSV (Van de Braak *et al.*, 2002). Sel semi granular lebih dimungkinkan mudah terinfeksi virus WSSV (Andrade, 2011) dan virus tersebut melakukan replikasi lebih cepat di sel semi granular daripada sel granular sehingga jumlah sel semi granular secara bertahap menurun dalam sirkulasi darah (Jiravanichpaisal *et al.*, 2005). Hal ini mungkin disebabkan sistem imun crustacean mempunyai mekanisme yang dapat menghilangkan hemosit yang terinfeksi virus dari peredaran darah dengan mengambilnya ke jaringan terinfeksi (Lo *et al.*, 2004). Menurut Kurniaji (2015), saat terjadinya serangan patogen, sel semi granular akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut dengan demikian jumlah sel semi granular yang beredar dalam hemolim akan mengalami penurunan.

4.3 Perubahan Tingkah Laku dan Gejala Klinis Udang Vannamei

Ujiantang udang vanname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dilakukan dengan penginfeksi WSSV melalui perendaman selama 3 jam. Untuk mengetahui perubahan tingkah laku dan gejala klinis udang yang diinfeksi WSSV, maka dilakukan pengamatan secara morfologi terhadap aktivitas, nafsu makan, gejala klinis dan kematian. Pengamatan ini dilakukan setelah ujiantang sampai dengan hari ke-5 setelah diinfeksi dengan virus WSSV. Hasil pengamatan tingkah laku dan gejala klinis udang vaname adalah sebagaimana dalam **Tabel 7** berikut.

Tabel 7. Perubahan Morfologi dan Tingkah Laku Udang Vaname Pasca Infeksi WSSV

Kemunculan (Hari Ke-)	Perlakuan				
	K+	K-	GA	GB	GC
1	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-
3	-	++	+	-	+
4	-	+++	++	+	++
5	-	++++	+++	+	++

Keterangan:Perlakuan K+ (Kontrol positif), K-(0 mg/l), GA(Dosis 100 mg/l), GB (Dosis 300 mg/l), GC (Dosis 500 mg/l)

++++ : Bintik putih pada karapas

+++ : hepatopankreas pucat, tubuh kemerahan, dan berenang miring/berputar

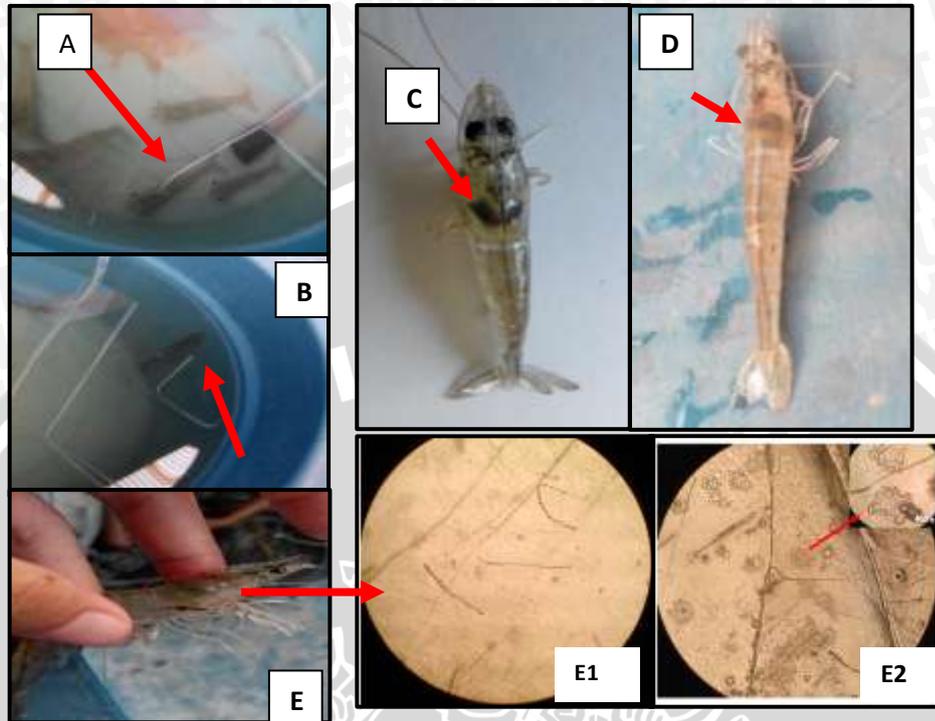
++ : penurunan respon makan, penurunan aktifitas

+ : mendekati aerasi

- : normal

Dari pengamatan parameter perubahan morfologi dan tingkah laku udang uji selama pemeliharaan, menunjukkan bahwa WSSV masih dapat menginfeksi udang uji yang direndam dengan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada semua perlakuan. Waktu kemunculan gejala klinis yang berbeda tiap perlakuan dan kontrol menunjukkan bahwa tingkat infeksi WSSV berbeda bahkan tidak virulen terhadap tubuh udang. Munculnya gejala klinis yang lebih awal atau lebih cepat terjadi pada kontrol daripada kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan secara perendaman udang uji dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap patogenisitas WSSV.

Perubahan tingkah laku dan morfologi udang pasca infeksi WSSV dapat dilihat pada **Gambar 13**.



Gambar 13. Perubahan Morfologi dan Tingkah Laku Udang Vaname Pasca Infeksi WSSV (Dokumentasi Pribadi, 2016).

Keterangan: A. Udang mendekati aerasi, B. berenang miring, C. hepatopankreas udang normal, D. hepatopankreas pucat pasca infeksi WSSV, E. Penampakan karapas udang, E1. karapas udang normal (perbesaran 40 x), E2. Karapas udang terinfeksi WSSV (perbesaran 40 x).

Pengamatan gejala klinis pasca infeksi WSSV pada udang vaname menunjukkan perubahan tingkah laku dan morfologi. Hari pertama pasca infeksi masing-masing perlakuan belum menampakkan gejala apaun. Hari kedua pasca infeksi pada perlakuan K- udang mulai mendekati aerasi. Hari ketiga terjadi penurunan respon makan dan penurunan aktifitas pada perlakuan K-, pada perlakuan 100 mg/l dan 500 mg/l mulai menunjukkan gejala awal terinfeksi WSSV yaitu udang mendekati aerasi. Pada hari keempat perlakuan K- menunjukkan tanda-tanda terinfeksi berupa hepatopankreas pucat, dan mulai berenang miring. Pada perlakuan 100 mg/l dan 500 mg/l mulai terjadi penurunan aktifitas dan respon makan, sedangkan pada perlakuan 300 mg/l masih mulai

menunjukkan gejala awal yaitu udang mendekati aerasi. Pada hari kelima perlakuan K- mulai terdapat bintik putih pada karapas, pada perlakuan 100 mg/l udang mulai berenang miring dan hepatopankreas pucat, namun pada perlakuan 300 mg/l dan 500 mg/l masih menunjukkan gejala yang sama seperti hari sebelumnya.

Menurut Mahardika *et al.* (2004), udang yang terinfeksi WSSV akan mengalami perubahan tingkah laku yaitu menurunnya aktifitas berenang, berenang tidak terarah, dan sering kali berenang pada salah satu sisinya saja. Selain itu udang cenderung bergerombol di tepi tambak dan berenang ke permukaan. Pada fase akut terdapat bercak-bercak putih pada karapas dengan diameter 0.5-3.0 mm. Sedangkan Penurunan respon pakan diakibatkan oleh terganggunya fungsi organ tubuh seperti antena dan antenulla yang diakibatkan oleh adanya infeksi udang uji, sehingga menyebabkan perubahan metabolisme tubuh. Hal ini disebabkan oleh udang tidak dapat mendeteksi makanan sehingga energi yang masuk ke dalam tubuh menjadi kurang, dan hal tersebut mempengaruhi aktivitas renang udang yang menjadi pasif (Priatni, 2006).

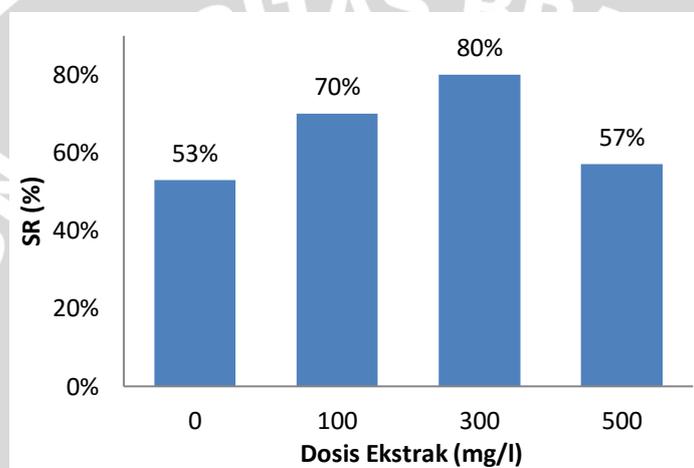
Dari uraian diatas diketahui bahwa udang yang mendapat perlakuan perendaman dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* setelah diinfeksi WSSV menunjukkan gejala klinis yang lebih lambat daripada udang yang tidak direndam dengan ekstrak. Hal ini disebabkan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* diduga mampu meningkatkan sistem pertahanan udang sehingga waktu yang dibutuhkan untuk virulensi WSSV lebih lama.

Edison (2009), menyebutkan bahwa infeksi WSSV pada udang penaeid ada 3 jenis. Tipe I infeksi akut atau sub akut, tingkat keparahan jaringan adalah sedang sampai tinggi, kematian terjadi dalam waktu 7 – 10 hari, dan udang memiliki bintik putih pada karapas. Tipe II (parakut) udang tampak memerah, tingkat keparahan jaringan yang terinfeksi sangat tinggi dan terjadi kematian

masal dalam waktu 2 – 3 hari. Tipe III (kronis) dimana infeksi yang dialami oleh jaringan rendah sehingga bintik putih dan kemerahan pada udang tidak tampak. Kemudian disebutkan pula bahwa kematian akan terjadi lebih lama yaitu 15-28 hari.

4.4 Kelulushidupan Udang Vaname

Tingkat kelulushidupan atau *Survival Rate* (SR) udang vaname selama penelitian dapat dilihat pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Histogram rerata survival rate udang vaname dengan perlakuan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada akhir penelitian

Pada grafik terlihat bahwa kelulushidupan tertinggi terdapat pada perlakuan dosis ekstrak 300 mg/l dengan SR sebesar 80% dan terendah pada perlakuan kontrol (0 mg/l) sebesar 53%.

Berdasarkan analisis ragam menunjukkan bahwa kelulushidupan udang vaname dengan perlakuan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap SR. Hasil uji Duncan diperoleh perlakuan 300 mg/l tidak berbeda nyata dengan perlakuan 100 mg/l tetapi berbeda nyata dengan perlakuan 500 mg/l dan kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Supriatna (2004), yang menunjukkan bahwa ekstrak biji mangrove *Xylocarpus granatum* dengan dosis tertentu mampu meningkatkan sistem imunitas tubuh udang yang ditunjukkan dengan tingkat kelangsungan hidup yang tinggi.

Pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum ujiantang mampu meningkatkan nilai parameter imun sehingga ketika diujiantang, sel-sel hemosit melalui aktifitas fagositosis dapat mengendalikan virus WSSV yang masuk dalam tubuh udang uji sehingga kelangsungan hidup udang pada perlakuan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* lebih tinggi dibanding kontrol (0 mg/l) (Syahailatua, 2009). Rendahnya nilai kelulushidupan pada kontrol diduga karena tidak adanya penambahan bahan aktif yang mampu merangsang peningkatan sistem imun. Menurut Utomo *et al.* (2015), hemosit pada udang perlakuan kontrol berkurang setelah aktifitas perlawanan terhadap infeksi secara pagositik maupun sel hemosit melakukan apoptosis setelah enkapsulasi virus. Oleh karena itu dapat diasumsikan bahwa semakin sedikit hemosit pada tubuh udang maka pertahanan tubuh semakin berkurang dan tidak mampu melawan infeksi pathogen yang menyebabkan kematian inang.

Kelulushidupan udang uji diduga pula berkaitan erat dengan peningkatan THC, karena daya tahan tubuh udang bersifat non spesifik. Tidak seperti hewan vertebrata yang memiliki sel memori dan memiliki antibody spesifik. Pertahanan pertama udang terhadap infeksi dilakukan oleh hemosit melalui fagositosis, enkapsulasi dan formasi nodul (Selvin *et al.*, 2000). Oleh karena itu, kenaikan THC diduga akan meningkatkan kemampuan sistem imun dan juga diasumsikan sebagai bentuk dari peningkatan respon imun seluler tubuh udang (Van de Braak, 2002). Dengan demikian, semakin tinggi THC maka semakin baik pertahanan tubuh dan kelulushidupan udang uji.

4.5 Kualitas Air

Faktor lingkungan sangat berpengaruh terhadap fungsi imun pada udang diantaranya faktor-faktor fisika-kimia, inilah yang memiliki pengaruh yang nyata terhadap peubah-peubah imunologis seperti aktifitas antibakteri, pelepasan

reactive oxygen intermediate. Perubahan-perubahan yang drastis pada faktor-faktor lingkungan khususnya peubah fisika-kimia dan pencemaran air dapat menekan sistem kekebalan udang mengakibatkan udang gampang terserang agen-agen penyakit infeksi (Ammas, 2013).

Hasil pengamatan terhadap rata-rata air media pemeliharaan udang vaname yang didapatkan selama penelitian, ditunjukkan pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Parameter kualitas air media pemeliharaan PL vanamei selama penelitian

Parameter	Rata-Rata Hasil pengukuran	Kisaran Optimum
Suhu (°C)	29-33,5	23-33 (Haliman dan Adijaya, 2005)
Salinitas (ppm)	5-10	10-15 (Briggs <i>et al.</i> , 2004)
pH	7-9	6 - 9 (Amri dan Kanna, 2008)
Oksigen terlarut (ppm)	5,55-7,36	4 - 8 (Amri dan Kanna, 2008)
Amonia (ppm)	0,03-0,07	<0,1 (Amri dan Kanna, 2008)

Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian masih berada pada kisaran yang layak bagi pertumbuhan dan sintasan udang vaname. Berdasarkan pengukuran suhu selama pemeliharaan menunjukkan suhu berkisar antara 29-33,5 °C. Menurut Haliman dan Adijaya (2005), suhu optimal untuk pertumbuhan udang vaname adalah 26-32 °C, namun menurut Panjaitan (2012), batas suhu paling tinggi untuk udang vaname adalah berkisar 35°C, sehingga dapat dikatakan kisaran suhu pemeliharaan selama penelitian masih dalam kisaran yang baik untuk kehidupan vaname.

Salinitas berperan dalam pengaturan osmoregulasi. Hasil pengukuran salinitas selama penelitian berkisar antara 5 - 10 ppt. Menurut Briggs *et al.* (2004), kisaran optimal untuk pertumbuhan optimal berkisar antara 10-15 ppt, bahkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa pada salinitas 5 ppt masih

layak untuk pertumbuhan udang vaname. Sehingga dapat dikatakan kisaran salinitas selama penelitian masih menunjukkan kisaran yang baik untuk kehidupan udang vaname.

Kisaran nilai pH yang diperoleh selama penelitian adalah berkisar 7-9. Pengamatan ini menunjukkan bahwa pH air pemeliharaan udang tersebut cukup optimal. Menurut Amri dan Kanna (2008), nilai normal pH berkisar 6-9 dengan kisaran optimal adalah 7,5 – 8,5.

Berdasarkan pengukuran selama penelitian. Didapat nilai DO yang berkisar antara 5,55-7,36 mg/l. Menurut Amri dan Kanna (2008) nilai optimum DO pada perairan adalah berkisar antara 4-8 mg/l. Sehingga dapat dikatakan kadar DO selama penelitian masih dalam kisaran optimal untuk kehidupan udang vaname.

Hasil pengukuran ammonia menunjukkan nilai 0,03 - 0,07 ppm. Sedangkan menurut Amri dan Kanna (2008) untuk menunjang pertumbuhan udang maka kandungan ammonia tidak boleh lebih dari 0,1 ppm. Sehingga dapat dikatakan kadar ammonia selama penelitian masih dalam kisaran optimal untuk kehidupan udang vaname.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis data serta pembahasan yang telah diuraikan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Perendaman udang vaname dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* selama 3 jam dapat meningkatkan respon imun udang vaname yang dilihat dari meningkatnya THC dan DHC sebelum dan sesudah infeksi WSSV serta meningkatkan kelulushidupan udang vaname.
2. Dosis optimal ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan imunostimulan melalui perendaman ditinjau dari THC dan DHC adalah 300 mg/l.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Ekstrak *Gracilaria verrucosa* dapat digunakan sebagai alternative bahan imunostimulan dalam upaya pencegahan virus WSSV pada budidaya udang vaname.
2. Perlu dilakukan penelitian dan kajian lebih lanjut mengenai dosis, frekuensi pengamatan dan waktu perendaman sehingga dapat diketahui dosis dan waktu perendaman yang paling tepat untuk mendapatkan hasil terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adds, J., E. Larkcom, R. Miller dan R. Sutton. 1999. *Tools, Techniques and Assessment in Biology*. Nelson Thomes Ltd.: Chemtenham.
- Alifuddin. 2002. Alifuddin, M. 2002. Imunostimulasi Pada Hewan Akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 1(2) : 87-92.
- Amalia, D. R. N. 2013. Efek Temperatur Terhadap Pertumbuhan *Gracilaria verrucosa*. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember: Jember.
- Ammas, S. 2013. Analisis Peningkatan Haemosit Post Larva Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei* Linnaeus) Pasca Perendaman Ekstrak Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) vada Dosis Berbeda Terhadap bakteri Vibrio Harveyi. Tesis. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Amri, K dan I. Kanna. 2008. *Budidaya Udang Vanname Secara Intensif*. Agromeda Pustaka: Jakarta.
- Amrillah, A. M., S. Widyarti dan Y. Kilawati. 2015. Dampak Stres Salinitas Terhadap Prevalensi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dan Survival Rate Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) pada Kondisi Terkontrol. 2 (1): 34-47.
- Apriliza, E. 2010. Potensi Udang Rebon (*Carrier*) dalam Penularan WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) Pada Udang Vannamei yang Dipelihara Dengan Berbagai Teknologi Budidaya di Tambak Kabupaten Indramayu. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjajaran: Jatinagor.
- Aritrixso, TPW. A., W. Sujatmiko dan J. Anggadiredja. 1996. Pengujian Fitokimia dan Penelusuran Senyawa Aktif Antibakteri dari Alga Makro *Gracilaria verrucosa*. Seminar Nasional Industri Rumput Laut. Jakarta.
- Bloom, J. H. 1998. Analisis Mutu Air Secara Kimiwi Dan Fisis. Sebuah Laporan Tentang Pelatihan dan Praktek Pada Fakultas Perikanan. Nuffic -Unibraw. Malang.
- Briggs, M., S. F Smith, R. Subasinghe dan M. Philip. 2004. Introductions And Movement Of *Panaeus vannamei* and *Panaeus stylyrostris* In Asia And The Pacific. Food Agriculture Organization Of The United Nations, Regional Office For Asia And The Pacific. Bangkok. Thailand.
- Castro R., Mc. Piazzon, I. Zarra, J. Leiro, M. Noya, and J. Lamas. 2006. Stimulation Of Turbot Phagocytes By *Ulva rigidac*. *Agardh Polysaccharides*. *Aquaculture* 254:9-20.

- Cheng W., Liu C.H., Kuo C.M. Chen J.C. (2005). Fish Shellfish Immunol. 18, 1-12.
- Doner, L.W., Whistler, R.L. (1973). Fucoidan. Industrial Gums Polysaccharide and their Derivatives. Academic Press, New York, pp 115–120.
- Campbell. 2002. Biologi. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Cholik, F., A. G. Jagatraya., Poernomo dan A. Jauzi. 2005. Akuakultur: Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa. Victoria Kreasi Mandiri: Jakarta.
- Dananjaya, R. M. 2013. Deteksi Virus WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) Pada DNA Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) di Tambak yang menggunakan Biosecurity dan Tambak Tanpa Biosecurity. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan. Universitas Brawijaya: Malang.
- Dawes, C. J. 1981. Marine Botany. Jhon Wiley & Sons, Inc: New York. 229 hal.
- Distantina, S., D. R. Anggraeni dan L. E. Fitri. 2009. Pengaruh Dosis dan Jenis Larutan Perendaman terhadap Kecepatan Ekstraksi dan Sifat Gel Agar-agar dari Rumut Laut *Gracilaria verrucosa*. Jurnal Rekayasa Proses. 2 (1): 11-16.
- Dugger Dm., and De Jory. 1999. Bio-Modulation Of The Non-Specific Immune Response In Marine Shrimp With β -Glucan. Aquaculture Magazine. 1(25): 81-89.
- Durand, S., Donald. V, Lightner, L. M. Nunan, R. M. Redman, J. Mari and Jean-Robert Bonami. Application of gene probes as diagnostic tools for *White Spot Baculovirus* (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases Of Aquatic Organisms. 27: 59-66.
- Effendie, M.I. 1997. Biologi Perikanan. Yayasan Pustaka Nusatama: Yogyakarta,
- Ekawati, A. W., H. Nursyam, E. Widjayanto dan Marsoedi. Diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam Formula Pakan Meningkatkan Respon Imun Seluler Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.). J. Exp. Life Sci. 2 (1): 20-28.
- Fard, S.G., T.S. Fatemeh dan Mozdheh. 2011. Ethanolic Extract of *Eucheuma cottoni* Promotes In Vitro Hair Growth and Wound Healing. UPM. Selangor.
- Fariedah, F. 2010. Pengaruh Immunostimulan Outer Membrane Protein (OMP) *Vibrio alginolyticus* dan Infeksi *Vibrio harveyi* Terhadap DNA Mitokondria Udang Windu *Penaeus monodon* Fab. Tesis. Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya: Malang.
- Firmansyah, A. 2002. Uji Patogenitas White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus monodon* fabr.). Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor.

- Fontaine, C.T. and Lighter, D.V. 1974. Observation on Phagocytosis and Elimination of Carmine Particle Injected into the Abdominal Musculature of the White Shrimp. *J. Invertebrate Pathology*. 5: 11-40.
- Gritter, R. J. Bobbit, J. M. Schwatting. 1985. Introduction of chromatography. Penerjemah: Kosasih Pamawinata. 1992. Pengantar Kromatografi. Edisi ke-3. Bandung. Penerbit ITB. Hal:36-39.
- Haliman, R. W. dan D. Adijaya. 2005. Udang Vanname, Pembudidayaan Dan Prospek Pasar Udang Putih yang Tahan Penyakit. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Hariyadi, S., N. N. Suryadiputra dan W. Bambang. 1992. Limnologi Metode Analisis Kualitas Air. Fakultas Perikanan Institute Pertanian Bogor: Bogor.
- Hartinah. 2012. Respon Fisiologi Juvenil Udang windu, *Penaeus monodon*, Fabricius, pada Bobot dan Densitas Pemeliharaan yang Berbeda. Disertasi pada Pascasarjana Universitas Hasanuddin: Makassar
- Haryani. K. 2010. Pengambilan Polisakarida Acemannan dari *Aloevera* Menggunakan Etanol Sebagai Pengendap. Prosiding Seminar Nasional teknik Kimia Kejuangan. Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia. Yogyakarta.
- Hasan, I. 2002. Metodologi Penelitian dan Aplikasinya. Ghalia Indonesia: Bogor.
- Hijaz, M.N. 2008. Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Euclidean spinosum* dan *Gracillaria verrucosa*. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Malang: Malang.
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan sokletasi terhadap kadar priperin buah cabe jawa (*Piperis retraracti fructus*). Skripsi. Universitas Islam negeri Syarif Hidayatullah: Jakarta.
- Jasmanindar, Y. 2009. Penggunaan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* Untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Thesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor : Bogor.
- Jiravanichpaisal, P., S. Sricharoen, I. Soderhall, and K. Soderhall. 2005. White Spot Syndrome Virus (WSSV) Interaction with Crayfish Haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(5):718–727.
- Johansson M. W. dan K. Soderhall. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion faktor from crayfish blood cells. *J. Cell. Biol.* 106: 1795-803.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Sonderhall, K. 2000. Crustacean Haemocytes and Haematopiesis. *Aquaculture* 101 ; 45-52.
- Johny, F. Roza, D. K. Mahardika. Zafran dan A. Prijono. 2005. Penggunaan Imunostimulan Untuk Meningkatkan Kekebalan Nonspesifik Benih Ikan kerapu Lumpur, *Epinephelus coiodes*. Terhadap infeksi Virus irido. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 9 (5): 75-83.

- Kanjana, K., T. Radtanatip, S. Asuvapongpatana, B. Withyachumnarnkul dan K. Wongprasert. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp. *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 389-396.
- Kartika, H., F. Satoshi, O. Hideki And K. Hiroshi. 1999. Isolation And Characterisation of A Fourth Hemagglutinin From The Red Alga, *Gracilaria verrucosa* From Japan. *Journal Of Applied Phycology* 11: 49-56.
- Kurniaji, A. 2015. Pengamatan *Total Hemocyte Count* (THC), *Diferensial Hemocyte Count* (DHC), *Phenoloxidase* dan Lisosim Pada Krustasea dan Moluska. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Lightner, D. V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Culture Penaeid Shrimp. The World Aquaculture Society: USA.
- Lo, C.F, J.L Wu, Y.S Chang, H.C Wang, J.M Tsai and G.H Kou. 2004. Molecular Characterization and Pathogenicity of *White Spot Syndrome Virus*. In: Leung, K.Y (ed.). *Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Disease*. World Scientific Publishing, Singapura.
- Maftuch., M. A. Adam, V. Hasan. E. Sanoesi, S. Andayani dan Marsoedi. 2013. Pengaruh Pemberian Imunostimulan Ekstrak Kasar *Gracilaria verrucosa* Terhadap Respon Seluler Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Pasca Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Konferensi Akuakultur Indonesia.
- Mahardika, K., Zafran dan I. Koesharyani. 2004. Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) di Bali dan Jawa Timur Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 10 (1): 55 -60 Edison (2009).
- Maryani, D. Dana dan Sukenda. 2002. Peranan Ekstrak Kelopak dan Buah Mangrove *Sonneratia caseolaris* (L) Terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi* Pada Udang Windu (*Penaeus monodon* FAB.). *jurnal Akuakultur Indonesia*. 1(3): 129-138.
- Marzuki, M. 1983. Metode Penelitian. Fakultas Ekonomi. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta .
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2): 361-367.
- Musallamah, Aunurohim dan N. Abdulgani. 2010. Pengaruh Paparan Timbal (Pb) Terhadap Perubahan Histopatologis Hepatopankreas Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii* De Mann). Paper. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam .Institut Teknologi Sepuluh Nopember: Surabaya.
- Naidu As. 2000. Natural Food Antimicrobial System. Crc Press. P 417-427.
- Panjaitan, A. S. 2012. Pemeliharaan Larva udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) Dengan Pemberian Jenis Fitoplankton Yang

- Berbeda. Thesis. Magister Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Terbuka: Jakarta.
- Prajitno, A. 2008. Virus Penyakit Ikan/ Udang: Virus. Penerbit Universitas Negeri Malang: Malang. 106 Hlm.
- Pranawaty, R. N., I. D. Burwono dan E. Liviawaty. 2012. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan Real Time PCR Untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* Pada kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3(4): 61-74.
- Prawira, A. M. 2014. Penggantian Tepung Ikan dengan Tepung Kepala Lele dalam Pakan terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan dan Pertumbuhan Juvenil Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (4) : 1-8.
- Prasetyo, S. S., A. Prima K. dan F. Yosephine. 2011. Pengaruh Biti The/ Pelarut Air dan Temperature Pada Ekstraksi Saponin Biji The Secara *Batch*. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Katolik Parahyangan Bandung. Bandung.
- Priatni, D. 2006. Pengaruh Pemanasan pada Temperatur Berbeda Selama 30 Menit terhadap Patogenitas Udang Windu. *Jurnal Aquaculture Indonesia*. Institut Pertanian Bogor.
- Prima, M. I. 2012. Uji aktivitas antibakteri methanol ganggang merah (*Gracilaria verrucosa*) terhadap beberapa bakteri patogen gram positif dan gram negatif. Skripsi. Kakiltas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah: Jakarta
- Rahma H.N., S. B. Prayitno dan A. H. C. Haditomo. 2014. Infeksi White Spot Syndrom Virus (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.) Yang Dipelihara Pada Salinitas Media yang Berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 3(3): 25-34.
- Rantetondok, A. 2002. Pengaruh Imunostimulan β -Glukan dan Lipopolisakarida Terhadap Respon Imun dan Sintasan Udang Windu (*Penaeus monodon Fabricus*). Disertasi. Program Pascasarjana UNHAS: Makasar.
- Ridlo, A. dan R. Pramesti. 2009. Aplikasi Ekstrak Rumput Laut Sebagai Agen Imunostimulan Sistem Pertahanan Non Spesifik Pada Udang. *Ilmu Kelautan*. 14(3): 133-137.
- Sanchez-Paz, A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res* : 41:43
- Samad, M. S. F. 2010. Pengaruh Senyawa Fenolik Ubur-Ubur (*Aureia* sp) Terhadap Hematologi Dan Aktivitas Fagositosis Ikan Mas (*Ciprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Tesis. Fpik: Ub. 109 Hal.

Saraswati, E. 2013. Respons Imun Udang Putih *Litopenaeus vannamei* Dengan Pemberian Ekstrak *Chaetoceros ceratosporum* Terhadap *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV). Disertasi. FPIK UB: Malang.

_____. 2014. Status Kesehatan Udang *Litopenaeus Vannamei* yang Diinjeksi Ekstrak *Chaetoceros ceratosporum*. Seminar Nasional Tahunan Penelitian Perikanan dan Kelautan. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta.

Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang pertanian. Kanisius: Malang. 267 Hlm.

Selvin J., A.J. Huxleya, & A.P. Lipton, 2004, Immunomodulatory Potential Of Marine Secondary Metabolites Against Bacterial Diseases Of Shrimp, *Aquaculture* 230: 241–248.

Smith, V.J, J.H. Brown And C. Hauton. 2003. Immunostimulation In Crustaceans: Does It Really Protect Against Infection. *Fish And Shellfish Immunology*, 15(1): 71-90.

Soegiarto, A., Sulistijo, W.S Atmadja dan H. Mubarak. 1978. Rumput Laut (*Algae*). Lembaga Oseanografi Nasional-LIPI: Jakarta.

Sritunyalucksana, K. 2001. Characteristic of Some Immune Genes In The Black Tiger Shrim, *Panaeus Monodon*. Comprehensive Summaries Of Uppsala Dissertations From The Faculty Of Science And Technology. Uppsala University: Sweden. 390 hlm.

Strand, H.K., R.A. Delmo. 1997. Absorption of Immunomodulating β 1,3 Glucanin Yolk Sac Larvae of Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *Journal of Fish Diseases* 20 : 41 – 49.

Sukenda., Anggoro, Y. T., Wahyuningrum, D., dan Rahma. 2007. Penggunaan Kitosan Untuk Pengendalian Infeksi *Vibrio harveyi* pada Udang putih (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Aquaculture Indonesia*. 6(2): 205-209.

Sulistijo, 1985. Upaya Pengembangan budidaya rumput laut *Euchema* dan *Gracilaria* "workshop budidaya rumput laut" di Bandar lampung tanggal 28 oktober-1 November. 1-11 hlm.

Supriatna, A. 2004. Pengaruh Perendaman *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Dalam Ekstrak Biji Mangrove (*Xylocarpus granatum*) Terhadap Patogenitasnya Pada Udang Windu (*Panaeus monodon* Fabr.). Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor.

Suryana. 2010. Metodologi Penelitian: Model Praktis Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Buku Ajar perkuliahan. Universitas Pendidikan Indonesia: Jakarta.

Suryanto dan Mudjiman. 2006. Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya: Jakarta.

- Syahailatua, D. Y. 2009. Seleksi Bakteri Probiotik Sebagai Stimulator Sistem Imun Pada Udang Vaname *Litopenaeus vannamei*. Tesis, Institut Pertanian Bogor: Bogor,
- Tizard, I. 1982. *Veterinary Immunology*. An Introduction. Third Ed. W. B. Saunders co Masduki Partodirejo, Penerjemah. 1988. Airlangga Universiti Press. Surabaya. 90 hlm.
- Truong-Giang Huynh, Su-Tuen Yeh, Yong-Chin Lin, Jeng-Feng Shyu, Li-Li Chen and Jiann-Chu Chen. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing Sargassum hemiphyllym var. chinense powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 31: 286-293.
- Van de Braak, C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W.M. Rombout and W.P. W. Van der Knaap. 2002. Preliminary Study on Haemocyte Response to White Spot Syndrome Virus Infection in Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organism*. 51(2):149-155.
- Vlak, J. M. J. R. Bonami, T.W. Flegel, Guang-Hsiung Kou, D. V. Lightner, Chufang Lo, P. C. Loh dan P. J. Walker. 2002. A New Virus Family Infecting Aquatic Invertebrates. XIIIth International Congress of Virology: Paris.
- Wahjuningrum, D., S. H. Sholeh dan S. Nuryati. 2006. Pencegahan Infeksi Virus White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Windu *Penaeus monodon* dengan Cairan Ekstrak Pohon Mangrove (CEPM) *Avicennia* sp. dan *Sonneratia* sp. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 5(1):65-75.
- Wang, Q., B. L. White, R. M. Redman and D. V. Lightner. 1998. Per os Challenge of *Litopenaeus vannamei* Post Larvae and *Farfantepenaeus duorarum* Juvenile with Six Geographic Isolates of White Spot Syndrome Virus. *Aquaculture* 170(1999): 179-194.
- Widyantoko, W., Pinandoyo Dan V. E. Herawati. 2015. Optimalisasi Penambahan Tepung Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) yang Berbeda Dalam Pakan Terhadap Pertumbuhan Dan Kelulushidupan Juvenil Udang Windu (*Penaeus monodon*). *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. 4(2): 9-17.
- Wulandari, D. 2009. Keterikatan Antara Kelimpahan Fitoplankton Dengan Parameter Fisika Kimia Di Estuari Sungai Brantas (Porong), Jawa Timur. Msp Fpik: IPB: Bogor.
- Wyban, J. A. dan Sweeney J. A. 1992. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute: USA.
- Wahyudewantoro, G. 2011. Catatan Biologi Udang Putih *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Fauna Indonesia*. 10(2): 1-7.
- Widanarni, D., Yuniasri, Sukenda dan J. Ekasari. 2010. Nursery Culture Performance of *Litopenaeus vannamei* with Probiotics Addition and

Different C/N Ratio Under Laboratory Condition. Journal of Bioscience. 17(3): 115-119.

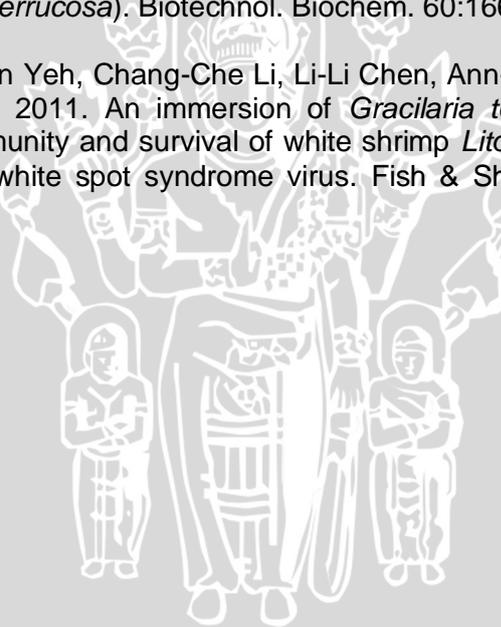
Widiastuti, H.N. 2003. Uji aktivitas metabolit sekunder dari rumput laut *Halimeda macrolob* sebagai senyawa bioaktif antijamur *Candida albicans* dan *Torula histolutica*. Ilmu Kelautan. 8(2): 114-118.

Wongprasert, K., T. Rudtanatip and J. Praiboon. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 36:52-60.

Yeh, S-T. & J-C. Chen. 2009. White shrimp *L.vannamei* that received the hot water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish and Shellfish Immunology* 26: 724 – 730

Yoshizawa Y., J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui, A. Ametani, And S. Kaminogawa. 1996. In Vivo Macrophage-Stimulation Activity Of The Enzyme-Degraded Water-Soluble Polysaccharide Fraction From A Marine Alga (*Gracilaria verrucosa*). *Biotechnol. Biochem.* 60:1667-671.

Yong-Chin Lin, Su-Tuen Yeh, Chang-Che Li, Li-Li Chen, Ann-Chang Cheng, and Jiann-Chu Chen. 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 31: 1239-1246.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

Kegiatan Penelitian	Alat	Bahan
Persiapan dan perlakuan hewan uji dengan perendaman	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bak plastik kapasitas 20 L 2. Sesor 3. Syringe 1 ml 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Udang vanname 2. Air laut 3. Air tawar 4. Pakan udang 5. Ekstrak <i>Gracilaria verrucosa</i>
Inokulum Virus	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mortar 2. Sentrifuse 3. kertas filter milipore 0,45 μm 4. tabung reaksi 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Udang vaname yang positif terinfeksi WSSV 2. Air laut steril 3. Pipet volume
Ekstraksi <i>Gracilaria verrucosa</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Rotary evaporator 2. Selep 3. Ayakan 50 mes size 4. Tabung elenmeyer 5. Lemari pendingin 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Gracilaria verrucosa</i> 2. Etanol 80%
Pengukuran kualitas Air	<ol style="list-style-type: none"> 1. Do meter 2. pH meter 3. refraktometer 4. thermometer 5. spektrofotometer 6. cuvet 7. pipet tete 8. tabung Erlenmeyer 	<ol style="list-style-type: none"> 1. air sampel 2. nessler 3. aquades
Perhitungan THC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Syringe 1 ml 2. Haemocytometer 3. Tube 4. Mikroskop 5. Hand tally counter 6. Pipet tetes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hemosit udang 2. Na Sitrat 3. Aquades
Perhitungan DHC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Syringe 1 ml 2. Objek glass 3. Tube 4. Mikroskop 5. Hand tally counter 6. Pipet tetes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hemosit udang 2. Na Sitrat 3. Aquades 4. Methanol 100% 5. Pewarna giemsa 10%

Lampiran 2. Prosedur Pengujian PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Kegiatan	Prosedur Kegiatan
Pembuatan Larutan TAE (stok 50x)	<ul style="list-style-type: none"> • Memasukkan masukkan 800 mL akuades steril ke dalam beaker glass ukuran 1 L • Melarutkan 242 gram Tris base dengan 57,1 mL glacial acetic acid dan 100 mL EDTA 0,5 M (pH 8) ke dalam beaker glass yang berisi akuades steril • Mengaduk larutan dengan Magnetic stirier sampai tercampur rata • Menambahkan akuades steril sampai 1 L • Cara membuat larutan TAE 1x (siap pakai) yaitu dengan melarutkan 1 bagian larutan stok dengan 49 bagian akuades steril.
Pembuatan EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Menambahkan 186,1 gram Disodium Ethylenediaminetetra acetate -2H₂O dalam erlenmeyer yang berisi 800 ml akuades • Mengaduk larutan dengan Magnetic stirier sampai tercampur rata • Menunggu sampai nilai pH menjadi 8 • Menambahkan 20 g/L NaOH pellet • Menyeterilkan larutan dengan menggunakan Autoclave selama 15 menit pada suhu 1210C
Pembuatan Ethidium Bromide (10 mg/ML)	<ul style="list-style-type: none"> • Menambahkan 1 gram Ethidium Bromide kedalam 100 ml akuades • Mengaduk dengan Magnetic stirrer selama beberapa jam sampai Ethidium Bromide larut • Membungkus tabung yang berisi larutan dengan menggunakan aluminium foil atau memindahkan kedalam botol gelap • Menyimpan larutan dalam suhu kamar
Pembuatan 2% Gel Agarose	<ul style="list-style-type: none"> • Menimbang 0,8 mg bubuk agarose • Memasukkan bubuk kedalam erlenmeyer dengan ukuran 100 mL • Melarutkan bubuk agarose dengan TAE 45 mL lalu memanaskannya diatas hotplate sampai mendidih atau larutan berubah warna menjadi bening • Memindahkan larutan dari hot plate ke atas waterbath dengan suhu 60oC selama 10 menit • Mencetak agarose di atas cetakan gel yang sudah di pasang sisir (comb) selama 20-60 menit • Gel siap digunakan

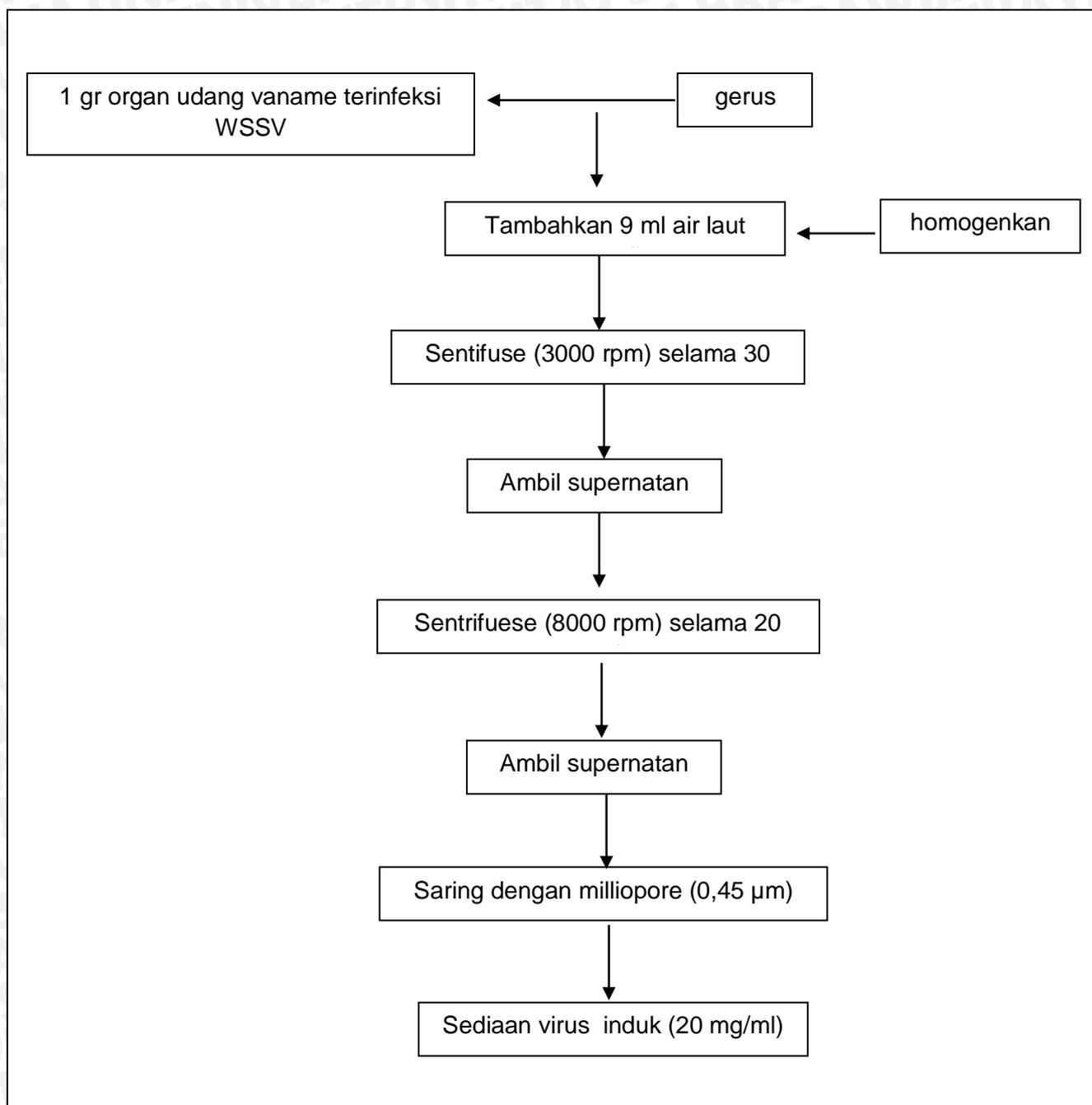
<p>Persiapan Sampel</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Menyiapkan alat (gunting, pinset, tabung, penggerus, sarung tangan, mikropipet, tip mikropipet, penggerus, rak (tempat dudukan tabung) pada satu meja ekstraksi dengan keadaan steril. • Sampel yang dalam keadaan beku dikeluarkan terlebih dahulu dari freezer kemudian didiamkan sampai esnya mencair. • Menggunakan gunting/pinset yang berbeda untuk sampel yang berbeda asal serta menggunakan sarung tangan • Memberi label/kode sampel pada tabung/tube.
<p>Proses Ekstraksi DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meletakkan organ yang akan di PCR (insang atau organ lainnya) sebanyak 20 mg ke dalam tabung ukuran 1,5 mL atau 2 mL • Menambahkan 500 μL Lysis Buffer ke dalam tabung kemudian menghancurkan organ dan dicampur sampai rata • Menginkubasi larutan dengan suhu 95°C selama 10 menit • Melakukan sentrifugasi pada larutan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit • Memindahkan 200 μL supernatan ke dalam tabung baru ukuran 1,5 mL atau 2 mL dan menambahkan 400 μL alkohol 95% • Larutan kemudian di vortex dan di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit • Membuang larutan alkohol sedangkan pelletnya dikeringkan • Melarutkan pellet dengan DEPC ddH₂O, TE Buffer atau DDW sebanyak 20 – 100 μL atau lebih sesuai dengan ketebalan pellet • DNA telah siap digunakan, apabila masih belum digunakan maka DNA harus disimpan pada suhu - 20°C.
<p>Reaksi PCR untuk Deteksi WSSV</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Menyiapkan reagen dalam keadaan cair dengan cara divortex • Komposisi larutan PCR untuk deteksi WSSV (25 μL/reaksi) dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut: <ul style="list-style-type: none"> - Nucleus Free Water : 17,375 μL - 10x PCR buffer : 2,5 μL - dNTP : 0,5 μL - MgCL₂ : 1,5 μL

	<ul style="list-style-type: none"> - Primer WSSV 292-F : 1,0 µL - Primer WSSV 292-R : 1,0 µL - Taq DNA Polymerase : 0,125 µL - Template DNA udang : 1,0 µL <ul style="list-style-type: none"> • Setelah semua bahan dicampur (kecuali template DNA) kemudian membagikan larutan ke dalam mikrotube 0,2 mL dengan volume masing-masing 24 µL • Menambahkan template DNA, termasuk kontrol positif (standart positif WSSV) dan kontrol negatif (ddH₂O), masing-masing sebanyak 1 µL. • Melakukan vortex sebentar pada larutan sebelum dimasukkan kedalam mesin PCR (Thermalcycler); • Memastikan bahwa program yang akan dijalankan adalah WSSV • Mengatur suhu pada Thermalcycler sebagai berikut <table border="1" data-bbox="609 936 1310 1249"> <thead> <tr> <th>No.</th> <th>Reaksi</th> <th>Suhu (oC)</th> <th>Waktu</th> <th>Jml. Siklus</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>Hot Start</td> <td>94</td> <td>30 detik</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>Denaturasi</td> <td>94</td> <td>30 detik</td> <td rowspan="2">40 siklus</td> </tr> <tr> <td>3.</td> <td>Annealing</td> <td>63</td> <td>30 detik</td> </tr> <tr> <td>4.</td> <td>Extention</td> <td>72</td> <td>30 detik</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5.</td> <td>Final extention</td> <td>72</td> <td>7 Menit</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • Mematikan mesin dan mengeluarkan tabung jika proses telah selesai • Produk PCR siap dijalankan pada electrophoresis 	No.	Reaksi	Suhu (oC)	Waktu	Jml. Siklus	1.	Hot Start	94	30 detik	1	2.	Denaturasi	94	30 detik	40 siklus	3.	Annealing	63	30 detik	4.	Extention	72	30 detik		5.	Final extention	72	7 Menit	1
No.	Reaksi	Suhu (oC)	Waktu	Jml. Siklus																										
1.	Hot Start	94	30 detik	1																										
2.	Denaturasi	94	30 detik	40 siklus																										
3.	Annealing	63	30 detik																											
4.	Extention	72	30 detik																											
5.	Final extention	72	7 Menit	1																										
<p>Proses Elektrophoresis</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Menyiapkan tabung yang sudah di amplifikasi kemudian menambahkan 5 µL Loading Dye pada masing-masing tabung. Pengambilan menggunakan Loading Dye untuk setiap tabung diusahakan menggunakan tip mikropipet yang berbeda • Menghomogenkan larutan • Sebelumnya meletakkan gel yang sudah dicetak di atas tangka electrophoresis lalu mengisi tangka dengan larutan TAE 1x sebanyak 500 mL (sampai gel terendam) • Memasukkan produk PCR yang sudah tercampur dengan Loading Dye dengan mikropipet ke dalam sumuran gel sebanyak 5-10 µL. • Meletakkan marker atau penanda DNA dengan berat molekul 100 bp sebanyak 5 µL pada bagian 																													

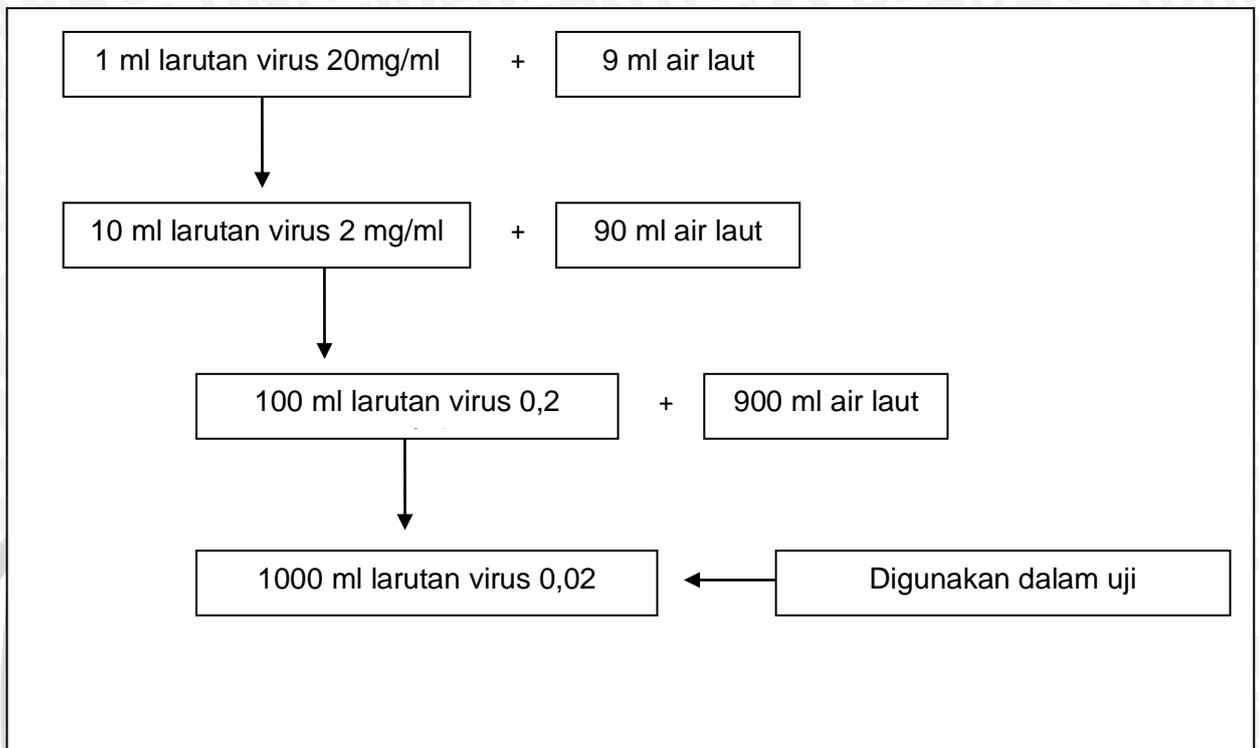
	<p>awal dan akhir deretan sumuran gel</p> <ul style="list-style-type: none"> • Setelah semua sampel berada dalam sumuran, selanjutnya memasang tutup elektroforesis dan menghidupkan listrik dengan voltase 120 V selama 30 menit.
Pengamatan dan Dokumentasi	<ul style="list-style-type: none"> • Setelah proses elektroforesis kemudian gel diangkat • Merendam gel dalam larutan Ethidium Bromide (EtBr) 0,05% selama 4 menit • Merendam gel dengan akuades steril selama 10 menit • Mengamati gel dengan UV Transilluminator • Mendokumentasikan hasil gambar menggunakan kamera digital
Pembacaan Hasil	<ul style="list-style-type: none"> • Hasil positif WSSV bila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 292 bp • Hasil negative bila tidak terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 292 bp



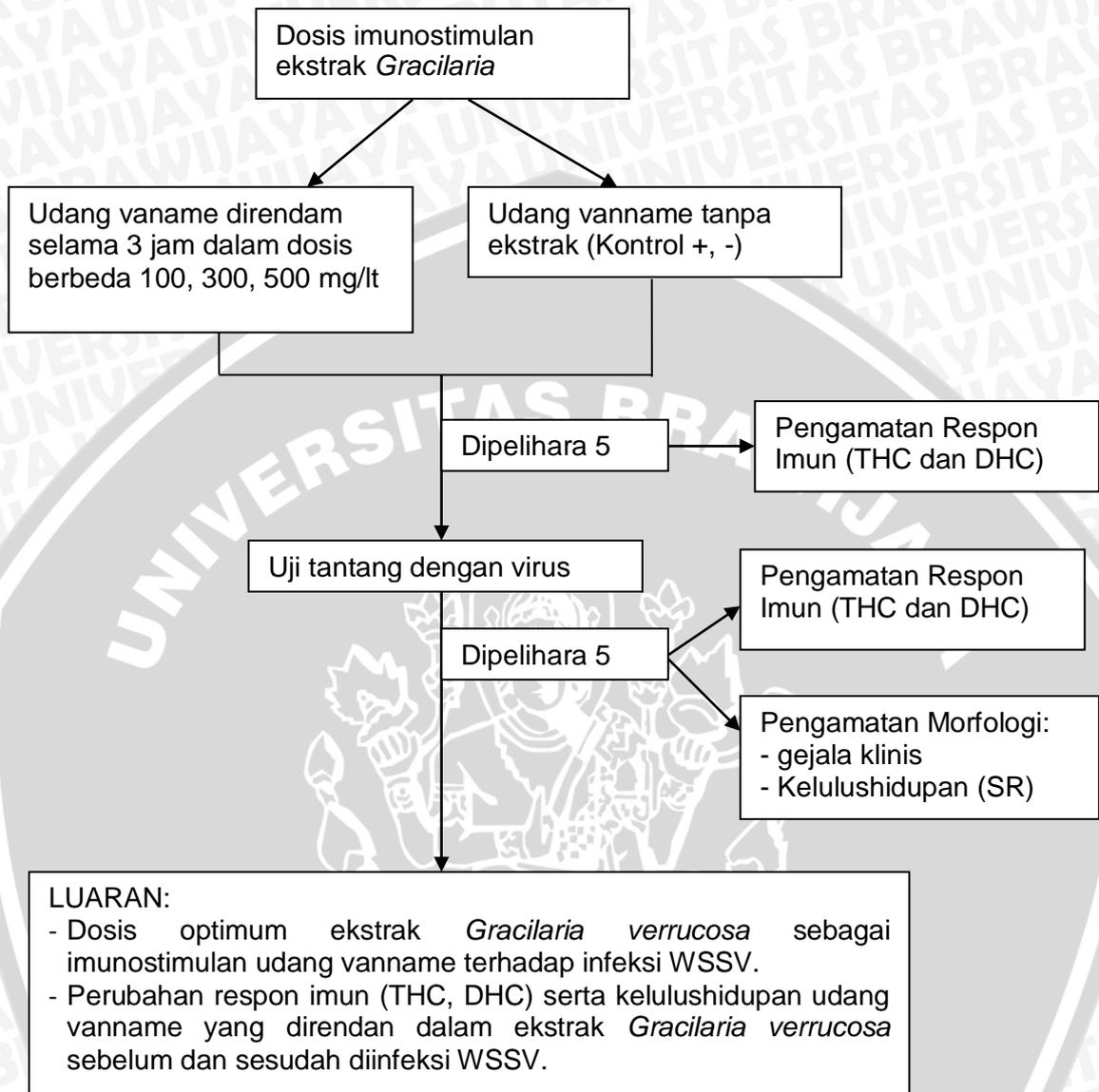
Lampiran 3. Skema prosedur penyediaan virus WSSV



Lampiran 4. Skema Prosedur Pengenceran Larutan Virus yang Akan Diinfeksi

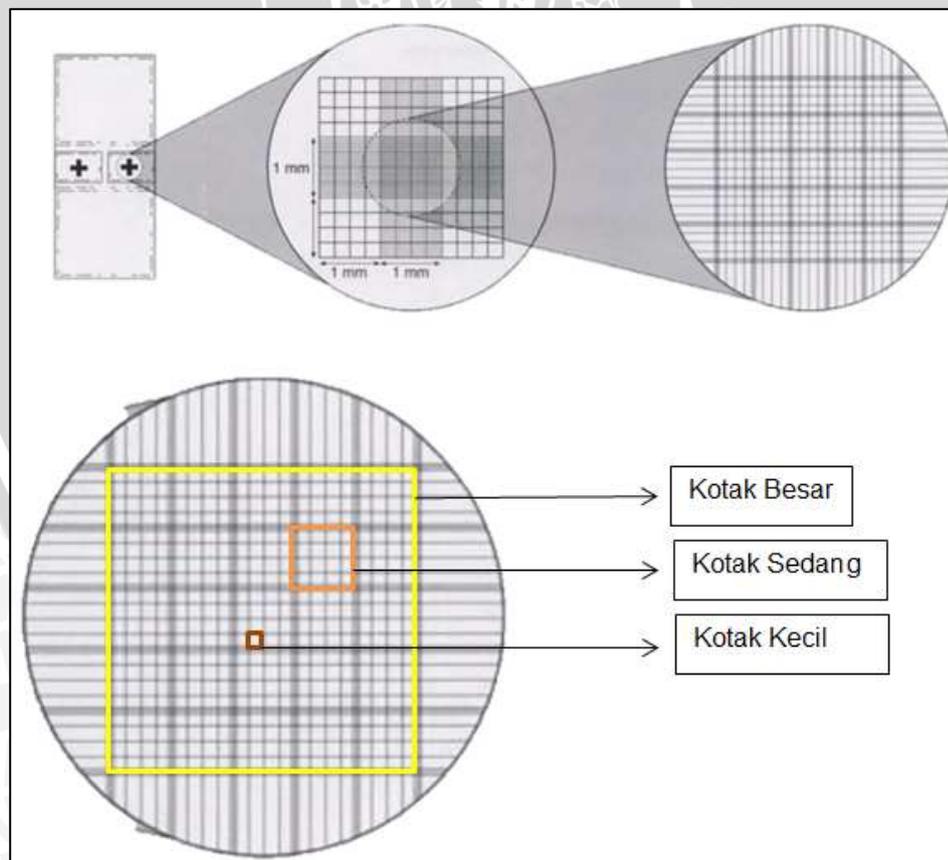


Lampiran 5. Skema Proses Pemberian Immunostimulan



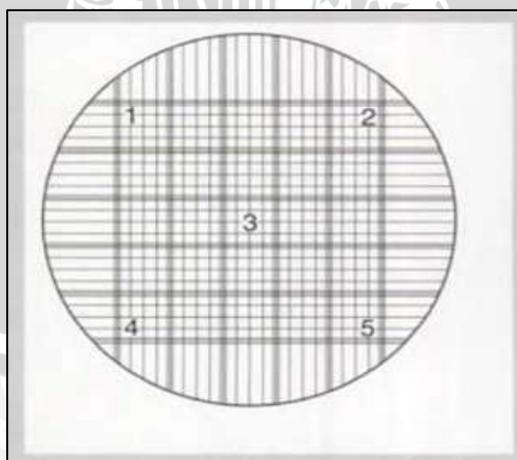
Lampiran 6. Perhitungan Hemosit Dengan Menggunakan *Haemocytometer*

Haemocytometer memiliki 2 *grid* atau kotak besar yang masing-masing terdiri dari 25 kotak sedang yang dibatasi oleh 3 garis tepi dan di dalam kotak sedang tersusun 16 kotak kecil, sehingga terdapat $25 \times 16 = 400$ kotak kecil dalam 1 kotak besar *Haemocytometer*. Setiap kotak besar berukuran 1 mm x 1 mm dengan kedalaman 0,1 mm. Ukuran setiap kotak sedang adalah $1/5$ mm x $1/5$ mm, sedangkan kotak kecil berukuran $1/20$ mm x $1/20$ mm dengan kedalaman 0,1 mm, sehingga volume setiap kotak kecil adalah $1/4000$ mm³. Perhitungan hemosit menggunakan *Haemocytometer* dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang ada pada 5 kotak sedang yang terdiri dari 16 kotak kecil.



Sumber. Addis *et al.*, 1999

Cara penghitungan jumlah hemosit dengan menggunakan *Haemocytometer* adalah sebagai berikut: *Haemocytometer* dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu dengan tissue. 0,1 ml hemolim diambil dari pangkal kaki renang, menggunakan srynge 1 ml berisi 0,1 ml antikoagulan Na-sitrat 10 %, kemudian dimasukkan ke dalam tube. Dihomogenkan, dengan cara menggerakkan tangan membentuk angka delapan selama 5 menit. Ditambahkan 0,1 tryplan blue yang berfungsi sebagai pewarna hemosit, sehingga mudah diamati diatas mikroskop. Satu tetes larutan diletakkan pada *Haemocytometer* dengan menggunakan pipet tetes pada bagian parit yang melintang hingga penuh. Penetesan dilakukan secara hati-hati agar tidak terjadi gelembung udara dibawah gelas penutup. Selanjutnya *Haemocytometer* tersebut diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 kali dan dicari bidang yang berkotak-kotak. Menghitung jumlah sel hemosit yang ada pada 5 kotak sedang (80 kotak kecil), Sel yang dihitung adalah sel yang terdapat di dalam kotak-kotak kecil yang tidak menyentuh garis tepi sebagai batas antara kotak. kelimpahan sel dihitung dengan rumus pada **halaman 42**. Pola perhitungan sel hemosit pada *Haemocytometer* terdapat pada gambar berikut.



Sumber. Adds *et al.*, 1999

Lampiran 7. Data hasil pengamatan terhadap parameter hemosit udang vaname yang diberi perlakuan perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Perlakuan	Ulangan	THC		HC (%)		SG (%)		GC (%)		SR (%)
		Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	
K-	1	30.000	24.000	30,53	29,85	39,62	37,85	27,85	26,41	60
	2	28.000	23.000	31,06	28,50	39,30	36,76	27,95	25,75	70
	3	29.000	26.000	30,75	28,75	39,50	36,75	26,75	25,75	70
100 mg/l	1	35.000	29.000	34,75	35,66	38,69	32,05	26,56	32,29	60
	2	36.000	23.000	33,52	34,03	37,71	32,42	28,77	33,55	70
	3	38.000	26.000	34,23	35,43	36,34	30,77	29,43	32,80	70
300 mg/l	1	42.000	38.000	35,52	36,04	33,93	29,82	30,55	35,14	70
	2	45.000	36.000	36,05	36,95	34,08	30,68	29,87	34,37	90
	3	47.000	35.000	35,57	37,00	35,49	30,6	30,94	36,40	80
500 mg/l	1	38.000	30.000	33,55	33,96	38,03	34,74	28,43	31,30	50
	2	38.000	32.000	31,34	34,50	39,91	32,73	28,75	32,77	60
	3	39.000	33.000	34,15	34,44	36,25	32,56	29,60	33,00	50
K+	1	31.000	-	35,56	-	38,79	-	25,65	-	100
	2	30.000	-	34,75	-	39,55	-	25,70	-	100
	3	29.500	-	35,50	-	38,65	-	25,85	-	100

Lampiran 8. Hasil analisis ragam terhadap total hemosit (sel/ml) udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Respon: THC SEBELUM INFEKSI

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
THC1	12	3.51E4	3970.535	28000	39500

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	perlakuan	ulangan	THC1
N	12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00
	Std. Deviation	1.168	.853
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213
	Positive	.166	.213
	Negative	-.166	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z	.574	.737	.837
Asymp. Sig. (2-tailed)	.897	.648	.485

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi ($p=0,485>0,05$)

Descriptives

THC1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	3	2.90E4	1000.000	577.350	26515.86	31484.14	28000	30000
Dosis 100 mg/l	3	3.63E4	1527.525	881.917	32538.75	40127.92	35000	38000
Dosis 300 mg/l	3	3.90E4	500.000	288.675	37757.93	40242.07	38500	39500
Dosis 500 mg/l	3	3.60E4	1000.000	577.350	33515.86	38484.14	35000	37000
Total	12	3.51E4	3970.535	1146.195	32560.58	37606.09	28000	39500

Test of Homogeneity of Variances

THC1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.992	3	8	.444

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi ($p=0,444>0,05$)

Lanjutan Lampiran 8

ANOVA

THC1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.642E8	3	5.475E7	47.782	.000
Within Groups	9166666.667	8	1145833.333		
Total	1.734E8	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0
 Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi THC sebelum infeksi

Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan				
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	3	2.90E4		
Dosis 500 mg/l	3		3.60E4	
Dosis 100 mg/l	3		3.63E4	
Dosis 300 mg/l	3			3.90E4
Sig.		1.000	.713	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan THC tertinggi sebelum infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.

Lanjutan Lampiran 8

Respon: THC Sesudah Infeksi

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
THC1	12	2.97E4	5565.042	21000	38000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	perlakuan	ulangan	THC1
N	12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00
	Std. Deviation	1.168	.853
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213
	Positive	.166	.213
	Negative	-.166	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z	.574	.737	.466
Asymp. Sig. (2-tailed)	.897	.648	.982

a. Test distribution is Normal.

Asum Normalitas → Terpenuhi ($p=0,982>0,05$)

Descriptives

THC1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	3	2.20E4	1000.000	577.350	19515.86	24484.14
Dosis 100 mg/l	3	2.87E4	1527.525	881.917	24872.08	32461.25
Dosis 300 mg/l	3	3.63E4	1527.525	881.917	32538.75	40127.92
Dosis 500 mg/l	3	3.17E4	1527.525	881.917	27872.08	35461.25
Total	12	2.97E4	5565.042	1606.489	26130.81	33202.53

Descriptives

THC1	Minimum	Maximum
kontrol	21000	23000
Dosis 100 mg/l	27000	30000
Dosis 300 mg/l	35000	38000
Dosis 500 mg/l	30000	33000
Total	21000	38000

Test of Homogeneity of Variances

THC1	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.333	3	8	.802

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi ($p=0,802>0,05$)



Lanjutan Lampiran 8

ANOVA

THC1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.247E8	3	1.082E8	54.111	.000
Within Groups	1.600E7	8	2000000.000		
Total	3.407E8	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0

Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi THC sesudah infeksi

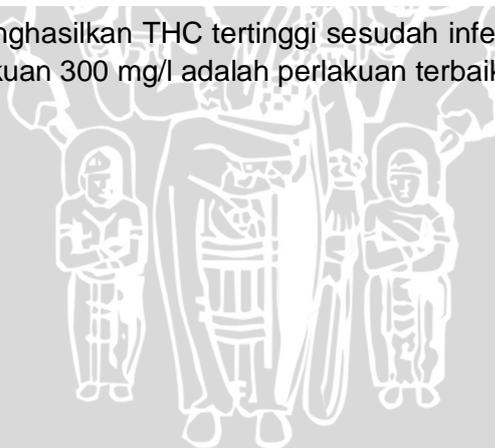
Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol	3	2.20E4			
Dosis 100 mg/l	3		2.87E4		
Dosis 500 mg/l	3			3.17E4	
Dosis 300 mg/l	3				3.63E4
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan THC tertinggi sesudah infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.



Lampiran 9. Hasil analisis ragam terhadap sel hialin (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Respon: SEL HIALIN SEBELUM INFEKSI

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
H1	12	33.8925	1.30145	31.34	36.05

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	H1
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	33.8925
	Std. Deviation	1.168	.853	1.30145
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.137
	Positive	.166	.213	.088
	Negative	-.166	-.213	-.137
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.476
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.977

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value=0,977>0,05)

Descriptives

H1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	3	33.0100	.65023	.37541	31.3947	34.6253
Dosis 100 mg/l	3	34.1667	.61744	.35648	32.6329	35.7005
Dosis 300 mg/l	3	35.3800	.74987	.43294	33.5172	37.2428
Dosis 500 mg/l	3	33.0133	1.47968	.85441	29.3371	36.6895
Total	12	33.8925	1.30145	.37570	33.0856	34.7194

Descriptives

H1	Minimum	Maximum
kontrol	32.53	33.75
Dosis 100 mg/l	33.52	34.75
Dosis 300 mg/l	34.57	36.05
Dosis 500 mg/l	31.34	34.15
Total	31.34	36.05

Test of Homogeneity of Variances

H1	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	1.980	3	8	.196

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value=0,196>0,05)

Lanjutan Lampiran 9

ANOVA

H1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.519	3	3.840	4.319	.044
Within Groups	7.113	8	.889		
Total	18.631	11			

Keputusan : $P=0,044 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0
 Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel hialin sebelum infeksi

Perlakuan Terbaik \rightarrow

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol	3	33.0100	
Dosis 500 mg/l	3	33.0133	
Dosis 100 mg/l	3	34.1667	34.1667
Dosis 300 mg/l	3		35.3800
Sig.		.187	.154

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel hialin tertinggi sebelum infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.

Respon: HIALIN SESUDAH INFEKSI WSSV

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
ulangan	12	2.00	.853	1	3
H1	12	33.7592	3.03689	28.50	37.00

Lanjutan Lampiran 9

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	H1
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	33.7592
	Std. Deviation	1.168	.853	3.03689
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.276
	Positive	.166	.213	.151
	Negative	-.166	-.213	-.276
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.957
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.319

a. Test distribution is Normal.

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0

Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel hialin sesudah infeksi

Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	3	29.0333		
Dosis 500 mg/l	3		34.3000	
Dosis 100 mg/l	3		35.0400	
Dosis 300 mg/l	3			36.6633
Sig.		1.000	.199	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel hialin tertinggi sesudah infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.

Lampiran 10. Hasil analisis ragam terhadap sel semi granular (SG) (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Respon → SEL SEMI GRANULAR SEBELUM INFEKSI WSSV

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
SG1	12	37.3042	2.07334	33.93	39.91

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	perlakuan	ulangan	SG1
N	12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00
	Std. Deviation	1.168	.853
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213
	Positive	.166	.213
	Negative	-.166	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z	.574	.737	.557
Asymp. Sig. (2-tailed)	.897	.648	.915

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value = 0,915 > 0,05)

Descriptives

SG1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	3	39.3067	.31005	.17901	38.5365	40.0769
Dosis 100 mg/l	3	37.3500	.88662	.51189	35.1475	39.5525
Dosis 300 mg/l	3	34.5000	.86064	.49689	32.3621	36.6379
Dosis 500 mg/l	3	38.0600	1.83033	1.05674	33.5132	42.6068
Total	12	37.3042	2.07334	.59852	35.9868	38.6215

Descriptives

SG1	Minimum	Maximum
kontrol	39.00	39.62
Dosis 100 mg/l	36.34	38.00
Dosis 300 mg/l	33.93	35.49
Dosis 500 mg/l	36.25	39.91
Total	33.93	39.91

Test of Homogeneity of Variances

SG1	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	1.633	3	8	.257

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value = 0,257 > 0,05)

Lanjutan Lampiran 10

ANOVA

SG1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.340	3	12.447	10.011	.004
Within Groups	9.946	8	1.243		
Total	47.286	11			

Keputusan : $P=0,004 < 0,05$ → Tolak H_0

Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel semi granular (SG) sebelum infeksi

Perlakuan Terbaik →

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Dosis 300 mg/l	3	34.5000	
Dosis 100 mg/l	3		37.3500
Dosis 500 mg/l	3		38.0600
kontrol	3		39.3067
Sig.		1.000	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel semi granular tertinggi sebelum infeksi adalah 0 mg/l dengan demikian perlakuan 0 mg/l adalah perlakuan terbaik.

Respon → SEL SEMI GRANULAR SESUDAH INFEKSI WSSV

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
SG2	12	33.0108	2.94214	28.22	37.85

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	SG2
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	33.0108
	Std. Deviation	1.168	.853	2.94214
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.205
	Positive	.166	.213	.205
	Negative	-.166	-.213	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.709
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.696

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → (P-value = 0,696 > 0,05)

Lanjutan Lampiran 10

Descriptives

SG2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
					kontrol	3
Dosis 100 mg/l	3	31.7467	.86581	.49988	29.5959	33.8975
Dosis 300 mg/l	3	29.8333	1.39776	.80700	26.3611	33.3056
Dosis 500 mg/l	3	33.3433	1.21253	.70006	30.3312	36.3554
Total	12	33.0108	2.94214	.84932	31.1415	34.8802

Descriptives

SG2	Minimum	Maximum
	kontrol	36.75
Dosis 100 mg/l	30.77	32.42
Dosis 300 mg/l	28.22	30.68
Dosis 500 mg/l	32.56	34.74
Total	28.22	37.85

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.557	3	8	.274

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value = 0,274 > 0,05)

ANOVA

SG2	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86.071	3	28.690	25.094	.000
Within Groups	9.147	8	1.143		
Total	95.218	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0
 Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel semi granular (SG) sesudah infeksi WSSV

Perlakuan Terbaik →

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Dosis 300 mg/l	3	29.8333		
Dosis 100 mg/l	3	31.7467	31.7467	
Dosis 500 mg/l	3		33.3433	
kontrol	3			37.1200
Sig.		.060	.105	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel semi granular tertinggi sesudah infeksi adalah 0 mg/l dengan demikian perlakuan 0 mg/l adalah perlakuan terbaik.



Lampiran 11. Hasil analisis ragam terhadap sel granular (G) (%) udang vaname yang direndam dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah infeksi WSSV

Respon → SEL GRANULAR SEBELUM INFEKSI WSSV

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
ulangan	12	2.00	.853	1	3
G1	12	28.7875	1.37535	26.56	30.94

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	G1
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	28.7875
	Std. Deviation	1.168	.853	1.37535
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.097
	Positive	.166	.213	.097
	Negative	-.166	-.213	-.096
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.337
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	1.000

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value = 1,000 > 0,05)

Descriptives

G1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	3	27.5167	.66583	.38442	25.8626	29.1707
Dosis 100 mg/l	3	28.2533	1.50314	.86784	24.5193	31.9873
Dosis 300 mg/l	3	30.4533	.54151	.31264	29.1081	31.7985
Dosis 500 mg/l	3	28.9267	.60468	.34911	27.4246	30.4288
Total	12	28.7875	1.37535	.39703	27.9136	29.6614

Descriptives

G1	Minimum	Maximum
	kontrol	26.75
Dosis 100 mg/l	26.56	29.43
Dosis 300 mg/l	29.87	30.94
Dosis 500 mg/l	28.43	29.60
Total	26.56	30.94

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value = 0,118 > 0,05)

Lanjutan Lampiran 11

ANOVA

G1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.084	3	4.695	5.586	.023
Within Groups	6.723	8	.840		
Total	20.807	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0

Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel granular (G) sebelum infeksi WSSV

Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan			
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol	3	27.5167	
Dosis 100 mg/l	3	28.2533	
Dosis 500 mg/l	3	28.9267	28.9267
Dosis 300 mg/l	3		30.4533
Sig.		.108	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel granular tertinggi sebelum infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.

espon: SEL GRANULAR SESUDAH INFEKSI WSSV

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
ulangan	12	2.00	.853	1	3
G2	12	31.6358	3.67381	25.75	36.40

Lanjutan Lampiran 11

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	G2
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	31.6358
	Std. Deviation	1.168	.853	3.67381
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.237
	Positive	.166	.213	.173
	Negative	-.166	-.213	-.237
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.822
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.509

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value = 0,509 > 0,05)

Descriptives

G2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	3	25.9700	.38105	.22000	25.0234	26.9166
Dosis 100 mg/l	3	32.8800	.63380	.36592	31.3056	34.4544
Dosis 300 mg/l	3	35.3367	1.01845	.58800	32.8067	37.8666
Dosis 500 mg/l	3	32.3567	.92230	.53249	30.0656	34.6478
Total	12	31.6358	3.67381	1.06054	29.3016	33.9701

Descriptives

G2		
	Minimum	Maximum
kontrol	25.75	26.41
Dosis 100 mg/l	32.29	33.55
Dosis 300 mg/l	34.37	36.40
Dosis 500 mg/l	31.30	33.00
Total	25.75	36.40

Test of Homogeneity of Variances

G2				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.985	3	8	.447

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value = 0,447 > 0,05)

Lanjutan Lampiran 11

ANOVA

G2					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	143.596	3	47.865	78.637	.000
Within Groups	4.870	8	.609		
Total	148.466	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0
 Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi sel granular (G) sesudah infeksi WSSV

Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan				
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	3	25.9700		
Dosis 500 mg/l	3		32.3567	
Dosis 100 mg/l	3		32.8800	
Dosis 300 mg/l	3			35.3367
Sig.		1.000	.435	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan sel granular tertinggi sesudah infeksi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.



Lampiran 12. Hasil Analisis Ragam *Survival Rate* (SR) Udang Vaname

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
SR	12	68.3058	11.46449	50.00	83.00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	SR
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	68.3058
	Std. Deviation	1.168	.853	1.1464E1
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.184
	Positive	.166	.213	.100
	Negative	-.166	-.213	-.184
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.637
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.812

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value = 0,812 > 0,05)

Descriptives

SR	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	53.3333	3.33500	1.92546	45.0487	61.6179	50.00	56.67
Dosis 100 mg/l	3	76.6667	3.33500	1.92546	68.3821	84.9513	73.33	80.00
Dosis 300 mg/l	3	79.8900	3.16643	1.82814	72.0241	87.7559	76.67	83.00
Dosis 500 mg/l	3	63.3333	3.33500	1.92546	55.0487	71.6179	60.00	66.67
Total	12	68.3058	11.46449	3.30951	61.0216	75.5900	50.00	83.00

Test of Homogeneity of Variances

SR	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.001	3	8	1.000

Lanjutan Lampiran 12

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2.50	1.168	1	4
ulangan	12	2.00	.853	1	3
SR	12	68.3058	11.46449	50.00	83.00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan	ulangan	SR
N		12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	2.50	2.00	68.3058
	Std. Deviation	1.168	.853	1.1464E1
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.213	.184
	Positive	.166	.213	.100
	Negative	-.166	-.213	-.184
Kolmogorov-Smirnov Z		.574	.737	.637
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897	.648	.812

a. Test distribution is Normal.

Asumsi Normalitas → Terpenuhi (P-value = 0,812 > 0,05)

Descriptives

SR	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	53.3333	3.33500	1.92546	45.0487	61.6179	50.00	56.67
Dosis 100 mg/l	3	76.6667	3.33500	1.92546	68.3821	84.9513	73.33	80.00
Dosis 300 mg/l	3	79.8900	3.16643	1.82814	72.0241	87.7559	76.67	83.00
Dosis 500 mg/l	3	63.3333	3.33500	1.92546	55.0487	71.6179	60.00	66.67
Total	12	68.3058	11.46449	3.30951	61.0216	75.5900	50.00	83.00

Test of Homogeneity of Variances

SR	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.001	3	8	1.000

Asumsi Homogenitas → Terpenuhi (P-value = 1,000 > 0,05)

Lanjutan Lampiran 12

ANOVA

SR	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1358.994	3	452.998	41.758	.000
Within Groups	86.786	8	10.848		
Total	1445.780	11			

Keputusan : $P=0,000 < 0,05 \rightarrow$ Tolak H_0
 Kesimpulan : Ekstrak rumput laut *Gracilaria verrucosa* mempengaruhi *survival rate* (SR) udang vaname

Perlakuan Terbaik \rightarrow

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	3	53.3333		
Dosis 500 mg/l	3		63.3333	
Dosis 100 mg/l	3			76.6667
Dosis 300 mg/l	3			79.8900
Sig.		1.000	1.000	.265

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Dosis ekstrak yang menghasilkan *survival rate* (SR) tertinggi adalah 300 mg/l dengan demikian perlakuan 300 mg/l adalah perlakuan terbaik.



Lampiran 13. Hasil Uji PCR Udang Vaname yang Digunakan sebagai Agen Penginfeksi WSSV



LABORATORIUM PENGUJI
BALAI PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU BANGIL
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN PROVINSI JAWA TIMUR
JL. Perikanan Kalianyar No. 746 PO. BOX 6 Bangil - Pasuruan
Telp./Fax. (0343) 741654, E-mail : pbap_bangil@yahoo.co.id



ASLI
ISO/IEC 17025:2015
KAN
LP-391-IDN Komite Akreditasi Nasional

LAPORAN HASIL UJI
Report of Analysis

No.: 621 /LHU/UPT-PBAP/IV/2016

Nama Pelanggan : Sdri. Himma
Customer Name

Pejabat yang dihubungi : -
Contact Person

Alamat : UB - Malang
Address

Jenis Sampel : Udang Vannamei
Type of sample (s)

No. Sampel : 278
No. Sample

Tanggal Penerimaan : 1-04-2016
Received Date

Tanggal Pengujian : 4-04-2016
Date of Analysis

No FPPS: 079/FPPS/UPT-PBAP/IV/2016

NO	PARAMETER <i>Parameters</i>	SATUAN <i>Units</i>	HASIL <i>Test Result</i>			SPESIFIKASI METODE <i>Method Specification</i>
			No. Sampel <i>No. Sample</i>	Gambar <i>Figure</i>	Keterangan <i>Note</i>	
1.	WSSV	-	278		1. Marker 2. Kontrol Positif 292 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel Positif WSSV	IKM/5.4.1/UPT PBAP (PCR)

Catatan : 1. Hasil uji ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.
Note : These analytical results are only valid for the tested sample.

2. Laporan Hasil Uji ini terdiri dari 1 (satu) lembar asli (stempel **ASLI**).
This Report of Analysis only 1 (one) page original (ORIGINAL sign).

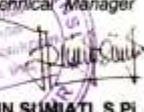
3. Laporan Hasil Uji ini tidak boleh dipandakan, kecuali secara lengkap oleh Manajer Administrasi atas seizin Manajer Puncak (stempel **COPY**).
The Report of Analysis shall not be reproduced (copied) except the completed one by Administration Manager with written permission of the Top Manager (COPY sign).

Bangil, 4 April 2016

An. Kepala URT-PBAP Bangil
Manajer Teknis
Technical Manager


YWIN SUMIATI, S.Pi

Lampiran 14. Hasil Uji PCR Sampel Udang yang Digunakan Sebagai Hewan Uji dalam Penelitian

	LABORATORIUM PENGUJI BALAI PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU BANGIL DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN PROVINSI JAWA TIMUR JL. Perikanan Kalianyar No. 746 PO. BOX 6 Bangil - Pasuruan Telp./Fax. (0343) 741654, E-mail : pbap_bangil@yahoo.co.id	  LP-391-00N Komite Akreditasi Nasional																	
LAPORAN HASIL UJI <i>Report of Analysis</i>																			
No.: 673 /LHU/UPT-PBAP/IV/2016																			
Nama Pelanggan <i>Customer Name</i>	: Sdri. Himma																		
Pejabat yang dihubungi <i>Contact Person</i>	: -																		
Alamat <i>Address</i>	: UB - Malang																		
Jenis Sampel <i>Type of sample (s)</i>	: Udang Vannamei	No.FPPS: 067/FPPS/UPT-PBAP/IV/2016																	
No. Sampel <i>No. Sample</i>	: 297																		
Tanggal Penerimaan <i>Received Date</i>	: 8-04-2016	Tanggal Pengujian <i>Date of Analysis</i> : 11-04-2016																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">NO</th> <th rowspan="2">PARAMETER <i>Parameters</i></th> <th rowspan="2">SATUAN <i>Units</i></th> <th colspan="3">HASIL <i>Test Result</i></th> <th rowspan="2">SPESIFIKASI METODE <i>Method Specification</i></th> </tr> <tr> <th>No. Sampel <i>No. Sample</i></th> <th>Gambar <i>Figure</i></th> <th>Keterangan <i>Note</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>WSSV</td> <td>-</td> <td>297</td> <td>  </td> <td> 1. Marker 2. Kontrol Positif 292 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel Negatif WSSV </td> <td>IKM/5.4.1/UPT PBAP (PCR)</td> </tr> </tbody> </table>	NO	PARAMETER <i>Parameters</i>	SATUAN <i>Units</i>	HASIL <i>Test Result</i>			SPESIFIKASI METODE <i>Method Specification</i>	No. Sampel <i>No. Sample</i>	Gambar <i>Figure</i>	Keterangan <i>Note</i>	1.	WSSV	-	297		1. Marker 2. Kontrol Positif 292 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel Negatif WSSV	IKM/5.4.1/UPT PBAP (PCR)		
NO				PARAMETER <i>Parameters</i>	SATUAN <i>Units</i>	HASIL <i>Test Result</i>			SPESIFIKASI METODE <i>Method Specification</i>										
	No. Sampel <i>No. Sample</i>	Gambar <i>Figure</i>	Keterangan <i>Note</i>																
1.	WSSV	-	297		1. Marker 2. Kontrol Positif 292 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel Negatif WSSV	IKM/5.4.1/UPT PBAP (PCR)													
Catatan <i>Note</i>	1. Hasil uji ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji. <i>These analytical results are only valid for the tested sample.</i> 2. Laporan Hasil Uji ini terdiri dari 1 (satu) lembar asli (stempel ASLI). <i>This Report of Analysis only 1 (one) page original (ORIGINAL sign).</i> 3. Laporan Hasil Uji ini tidak boleh digandakan, kecuali secara lengkap oleh Manajer Administrasi atas seizin Manajer Puncak (stempel COPY). <i>The Report of Analysis shall not be reproduced (copied) except the completed one by Administration Manager with written permission of the Top Manager (COPY sign).</i>																		
Bangil, 11 April 2016 An. Kepala UPT-PBAP Bangil Manajer Teknis <i>Technical Manager</i>  WIWIN SUMIATI, S.Pi																			

Lampiran 15. Dokumentasi Kegiatan Ekstraksi *Gracilaria verrucosa*

Lampiran 16. Dokumentasi Kegiatan penelitian



Bak pemeliharaan udang vaname



Pengukuran DO menggunakan DO meter



Pengambilan hemosit



Perendaman udang vaname dengan ekstrak *Gracilaria verrucosa*



Penggerusan udang positif WSSV



Sentrifuge sampel udang positif WSSV



Pengambilan supernatan hasil sentrifuge sampel udang positif WSSV



Penyaringan filtrat WSSV hasil sentrifuge



Penyiponan bak pemeliharaan



Pengamatan THC dan DHC dibawah mikroskop



Uji tantang dengan virus WSSV