

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Ulva lactuca* SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN UNTUK MELAWAN *V. harveyi* PADA UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*)**

TESIS



Oleh :

SULEMAN

NIM. 166080100011002

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Ulva lactuca* SEBAGAI
IMMUNOSTIMULAN UNTUK MELAWAN *V. harveyi* PADA UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**

Oleh:

SULEMAN

NIM. 166080100011002

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018

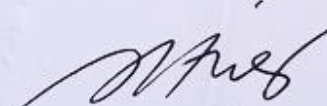
TESIS

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Ulva lactuca* SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN UNTUK MELAWAN *V. harveyi* PADA UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*)**

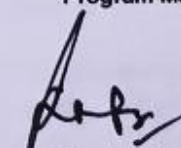
Oleh:
Suleman
166080100011002

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 12 Desember 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No :
Tanggal :

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Ketua  Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS NIP. 19611106 198602 2 001 Tanggal : 18 DEC 2018	Anggota  Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua NIP. 19750604 199903 2 002 Tanggal : 18 DEC 2018
---	---

Mengetahui,

Dekan  Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS NIP. 19600322 198601 1 001 Tanggal : 18 DEC 2018	Ketua Program Magister  Dr. Ir. Maftuch, M.Si NIP. 19660825 199203 1 001 Tanggal : 18 DEC 2018
---	---

JUDUL TESIS:

**POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *Ulva lactuca* SEBAGAI IMUNOSTIMULAN
UNTUK MELAWAN *V. harveyi* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

Nama Mahasiswa : Suleman

NIM : 166080100011002

Program Studi : Magister Budidaya Perikanan

Minat : Penyakit Ikan

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Dr. Sri Andayani, MS

Anggota : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua

KOMISI PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D

Dosen Penguji 2 : Dr. Yunita Maimunah, S.Pi., M.Sc

Tanggal Ujian : 12 Desember 2018

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU. No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Desember 2018

Penulis


Suleman

NIM. 166080100011002

RIWAYAT HIDUP

Suleman lahir di Malaysia, pada tanggal 12 April 1989, dari pasangan Bapak Siga dan Ibu (Alm). Morang. Penulis merupakan anak tunggal. Penulis menempuh pendidikan Sekolah Dasar di SDN 2 Laosu, Konawe pada tahun 1995-2001 kemudian melanjutkan pendidikan di SLTPN 3 Sampara, Kab, Konawe pada tahun 2001-2004 dan melanjutkan pendidikan di SMAN 6 Kendari pada tahun 2004-2007. Pada tahun 2009 penulis melanjutkan pendidikan D-IV di Sekolah Tinggi Perikanan, program studi teknologi akuakultur dan menyelesaikan pendidikan pada tahun 2013.

Pada tahun 2016, penulis melanjutkan pendidikan magister program studi budidaya perairan melalui jalur beasiswa Lembaga Pengelola Dana Pendidikan di bawah naungan Kementerian Keuangan. Penulis menyelesaikan pendidikan S2 dengan membuat tulisan ilmiah berupa Tesis yang berjudul "Potensi ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan untuk melawan *V. harveyi* pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)".

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam penyusunan laporan tesis ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT atas segala Rahmat, Karunia dan limpahan Rezeki dan Kasih Sayang-Nya yang tiada henti.
2. Prof. Dr. Sri Andayani, MS dan Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua selaku komisi pembimbing atas segala arahan, bimbingan dan ilmu yang diberikan kepada saya.
3. Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D dan Dr. Yunita Maimunah, S.Pi., M.Sc selaku dosen penguji atas kritik dan saran sehingga penulis semakin baik dalam penyusunan laporan tesis.
4. Orang Tua saya, bapak Siga dan teristimewa untuk (Alm) ibunda tercinta dan yang saya sayangi, yang tiada henti-hentinya memberi do'a kepada saya.
5. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah memberikan beasiswa, sehingga dapat melanjutkan pendidikan.
6. Ion, Agung, Anang, Liga, Mas Suyuti, yang sudah membantu dalam pengambilan sampel dari awal penelitian hingga selesai.
7. Endar, Prive, Azizah, Siti Lestari yang telah membantu dalam melakukan analisis sampel di laboratorium.
8. Keluarga besar Magister Budidaya Perairan 2016/2017 yang selalu memberikan semangat yang sangat luar biasa untuk menyelesaikan penyusunan laporan tesis ini

9. Keluarga besar kontrakan Galunggung dan Joyogrand yang telah memberikan semangat dan dukungan
10. Keluarga besar kos Halimah castle 206 yang selalu memberikan dukungan dan support
11. Keluarga besar Awardee LPDP Malang, yang selalu memberikan dukungan dan support dan
12. Seluruh pihak yang telah membantu terselainya laporan tesis ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.



RINGKASAN

SULEMAN. Tesis. Potensi ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan untuk melawan *V.harveyi* pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua.

Udang merupakan salah satu komoditas sektor perikanan yang bernilai ekonomi tinggi. Volume ekspor udang Indonesia masih tergolong fluktuatif, namun udang tetap menjadi salah satu komoditas andalan ekspor perikanan. Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan, produksi perikanan budidaya menurut komoditas utama 2010-2014 pada udang terus mengalami peningkatan pada tahun 2014 namun mengalami penurunan pada tahun 2015. Salah satu penyakit pada udang yaitu disebabkan oleh bakteri yang menyebabkan vibriosis. Salah satu agensia penyebab vibriosis pada udang adalah *Vibrio harveyi*. Salah satu upaya dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh *V. harveyi* pada udang adalah dengan menggunakan imunostimulan, vitamin dan hormon. Salah satu sumber imunostimulan yang bisa digunakan adalah rumput laut. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya potensi ekstrak *Ulva lactuta*. Saat ini penggunaan *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan pada udang vanname melalui perendaman lalu diuji tantang bakteri *V.harveyi* belum pernah dilakukan penelitian. Uji efektivitas aplikasi rumput laut jenis *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan pada udang *L.vannamei* dapat dilakukan dengan pengamatan berdasarkan beberapa parameter imun.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi senyawa aktif pada ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* yang berfungsi sebagai imunostimulan, menentukan dosis ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* untuk meningkatkan sistem imun udang vannamei terhadap *V.harveyi* dan mengukur respon imun udang vaname. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga September 2018 di Universitas Brawijaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan metode eksperimental dengan menggunakan rancangan percobaan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan dengan dosis ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* yang berbeda yaitu 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm, kontrol positif (tanpa pemberian ekstrak *Ulva lactuta* dan infeksi bakteri) dan kontrol negatif (infeksi bakteri tanpa pemberian ekstrak) melalui pemberian pada media pemeliharaan selama penelitian (6 hari) untuk meningkatkan sistem imun pada udang vaname. Parameter yang diamati yaitu total hemosit, aktivitas fagositosis, aktivitas phenoloksidase dan *respiratory burst* (RB).

Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa hasil ekstrak kasar *Ulva lactuta* berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap perlakuan pemberian polisakarida *Ulva lactuta*. Nilai THC dari pemberian ekstrak kasar lebih tinggi setelah 3 jam pemberian sebesar $5,33 \pm 0,01$ sel/ml, sedangkan diwaktu yang sama pada pemberian polisakarida sebesar $5,26 \pm 0,01$. Setelah 24 jam kedua perlakuan ini mengalami penurunan menjadi $5,25 \pm 0,00$ untuk pemberian ekstrak kasar dan $5,19 \pm 0,01$ untuk perlakuan pemberian polisakarida. Hasil aktivitas fagositosis (AF) menunjukkan perlakuan pemberian ekstrak kasar berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap perlakuan pemberian

polisakarida. Hasil AF ekstrak kasar sebesar $69,67 \pm 3,06\%$ dan polisakarida $53,67 \pm 2,08\%$ pada jam 4 (3 jam setelah pemberian perlakuan). Sama halnya AF juga mengalami penurunan setelah pemberian imunostimulan selama 24 jam. Sehingga hasil yang didapatkan dari penelitian tahap I ini adalah perlakuan dengan pemberian ekstrak kasar *Ulva lactuta* menunjukkan hasil yang lebih baik untuk digunakan sebagai imunostimulan pada udang vaname yang ditandai dengan meningkatnya nilai THC dan aktivitas fagositosis.

Hasil penelitian tahap 2 menunjukkan bahwa dosis 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan dan semua parameter imun, hal ini diindikasikan bahwa dosis yang diberikan mampu menstimulasi dan meningkatkan sistem imun pada udang vaname. Nilai THC pada dosis 2 ppm sebesar $5,45 \pm 0,004$, AF sebesar $73,33 \pm 2,08$, PO sebesar $0,522 \pm 0,120$ dan RB sebesar $0,401 \pm 0,16$. Berdasarkan pengamatan kelulushidupan dosis 2 ppm menunjukkan tingkat kelulushidupan paling tinggi sebesar 63,3% pada akhir penelitian. Hasil pengukuran kualitas air menunjukkan masih pada batas normal sehingga tidak mengganggu kelulushidupan dan pertumbuhan udang. Kisaran parameter kualitas air selama penelitian adalah suhu berkisar antara $24-26^{\circ}\text{C}$, pH berkisar antara 7,5-7,8, DO sebesar 4,55-5,63 mg/L dan salinitas sebesar 35 ppt.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah berdasarkan hasil Uji FTIR menunjukkan terdapat beberapa senyawa pada ekstrak kasar rumput laut *Ulva lactuta* antara lain penyerapan panjang gelombang 3437,042 menunjukkan adanya ikatan hidroksilat (-OH), serapan panjang gelombang pada 1384,027 menunjukkan adanya ikatan senyawa fenol, serta pada serapan panjang gelombang 1200-800 menunjukkan adanya ikatan senyawa polisakarida. Pemberian dosis ekstrak kasar 2 ppm adalah dosis yang terbaik dibandingkan perlakuan kontrol dan dosis lainnya pada semua parameter imun. Pemberian imunostimulan ekstrak kasar *Ulva lactuta* mampu merangsang aktivitas non spesifik udang vaname pada dosis 1, 1,5 dan 2 ppm. Aktivitas imun tersebut ditandai dengan peningkatan nilai THC, aktivitas fagositosis, aktivitas Phenoloksidase, dan *respiratory burst* yang didukung dengan kelulushidupan yang tinggi. Setelah diinfeksi bakteri *V.harveyi* menunjukkan dosis 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua parameter imun. Serta saran berupa Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penentuan waktu yang optimal setelah mengalami penurunan THC, AF, PO dan RB untuk menentukan penambahan booster.

SUMMARY

SULEMAN. Tesis. Potential of *Ulva lactuta* seaweed extract as immunostimulant against *V.harveyi* on vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Supervisor **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS and Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua.**

Shrimp is a commodity of the fisheries sector that has high economic value. The volume of Indonesian shrimp exports was still relatively volatile, but shrimp remains one of the mainstay of fisheries export commodities. Based on data from the Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, aquaculture production according to the main commodities of 2010-2014 in shrimp continued to increase in 2010 but decreased in 2014. A diseases in shrimp was caused by bacteria that cause vibriosis. A causes of vibriosis in shrimp is *Vibrio harveyi*. An effort in preventing diseases caused by *V. harveyi* in shrimp are to use immunostimulants, vitamins and hormones. An immunostimulants that could be used by seaweed. Several studies have been carried out showed the potential of *Ulva lactuta* extract. Currently the use of *Ulva lactuta* as immunostimulant in vanname shrimp through immersion is then tested against *V.harveyi* bacteria. The test of the effectiveness of the application of *Ulva lactuta* seaweed as immunostimulant to *L.vannamei* shrimp can be done by observation based on several immune parameters.

The purpose of this study was to identify the active compounds in *Ulva lactuta* seaweed extract which function as immunostimulants, determine the dose of *Ulva lactuta* seaweed extract through immersion to improve the immune system of vannamei shrimp against *V.harveyi* and measure the immune response of vaname shrimp. The research was conducted from July to September 2018 at Universitas Brawijaya.

The method used in this study was used the experimental method using a completely randomized design trial (CRD) with 5 treatments and 3 replications with different doses of *Ulva lactuta* seaweed extract, namely 1 ppm, 1.5 ppm and 2 ppm, positive control (without administration of *Ulva lactuta* extract and bacterial infection) and negative kontrol (bacterial infection without administration of extracts) by immersion method for increasing the immune system in vaname shrimp, the parameters observed were total hemocytes, phagocytic activity, phenoloxidase activity and respiratory burst (RB).

The results of the first phase study showed that the *Ulva lactuta* crude different significantly ($p < 0.05$) on the treatment of polysaccharide *Ulva lactuta*. The THC of the crude extract was highest after 3 hours of administration of 5.33 ± 0.01 cells / ml, while at the same time the administration of polysaccharides was 5.26 ± 0.01 . After 24 hours both treatments decreased to 5.25 ± 0.00 for the administration of crude extracts and 5.19 ± 0.01 for the treatment of polysaccharide administration. The results of phagocytosis (AF) activity showed that the treatment of crude extract was significantly different ($p < 0.05$) on the treatment of polysaccharide administration. The crude AF results of extract were $69.67 \pm 3.06\%$ and

polysaccharides $53.67 \pm 2.08\%$ at 4 hours (3 hours after administration of treatment).

Similarly, AF also decreases after 24 hours of immunostimulant administration. So the results obtained from this phase I study was treatment with the provision of crude *Ulva lactuta* extract showing better results to be used as immunostimulants in vaname shrimp which are characterized by increasing THC values and phagocytic activity.

The results of phase 2 research showed that the dose of 2 ppm a significant difference ($p < 0.05$) for all treatments and all immune parameters, this indicated that the dosage given was able to stimulate and enhance the immune system in vaname shrimp. The THC at a dose of 2 ppm was 5.45 ± 0.004 , AF was 73.33 ± 2.08 , PO was 0.522 ± 0.120 and RB was 0.401 ± 0.16 . Based on the observation of the survival rate of 2 ppm, the highest survival rate was 63.3% at the end of the study. The results of the measurement of water quality show that was still normal, so it does not interfere with the survival and growth of shrimp. The range of water quality parameters during the study was temperatures ranging from 24-26°C, pH ranged from 7.5-7.8, DO was 4.55-5.63 mg / L and salinity was 35 ppt.

The conclusion of this study was based on the results of the FTIR Test, it showed that there were several compounds in the crude extract of *Ulva lactuta* seaweed including absorption of wavelength 3437,042 indicating the presence of hydroxylate bonds (-OH), wavelength uptake at 1384,027 indicating the presence of phenol bonds, and at wavelength absorption 1200-800 shows the polysaccharide bond. Giving a 2 ppm crude extract dose was the best dose compared to the kontrol treatment and other doses on all immune parameters. The administration of immunostimulant *Ulva lactuta* crude extract was able to stimulate non-specific activity of vaname shrimp at doses 1, 1.5 and 2 ppm. Immune activity were characterized by an increase in THC value, phagocytic activity, Phenoloxidase activity, and Respiratory bursts supported by high SR. After being infected with *V.harveyi*, the dose of 2 ppm showed a significant difference ($p < 0.05$) for all immune parameters. As well as suggestions in the form of the need for further research on determining the optimal time after experiencing a decrease in THC, AF, PO and RB to determine the addition of booster.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“POTENSI EKSTRAK RUMPUT LAUT *ULVA LACTUTA* SEBAGAI IMUNOSTIMULAN UNTUK MELAWAN *V. harveyi* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)”**. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister (S2) pada Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Dalam tulisan ini disajikan berbagai pokok bahasan terkait dengan potensi ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan untuk melawan *V.harveyi* pada udang vaname.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih belum sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan. Penulis berharap Tesis ini dapat bermanfaat dan menambah ilmu pengetahuan serta dapat memberikan informasi bagi berbagai pihak yang membutuhkan.

Penulis

DAFTAR ISI	xiv
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR ISTILAH	xix
1. PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.4
1.3 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.5
1.4 Manfaat Penelitian	Error! Bookmark not defined.5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Udang Vaname (<i>Litopenaeus vanamei</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Morfologi	6
2.1.3 Habitat dan Siklus Hidup	10
2.1.4 Pakan dan Kebiasaan Makan	11
2.2 Rumput Laut <i>Ulva lactuta</i>	12
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	12
2.2.2 Habitat dan Penyebaran	13
2.2.3 Kandungan Rumput laut <i>Ulva lactuta</i>	14
2.3 <i>Ulva</i> sp Sebagai Immunostimulan	16
2.4 Mekanisme Pertahanan Tubuh Pada Udang	17
2.5 Immunostimulan	22
2.6 Mekanisme Kerja Immunostimulan	23
2.7 <i>Vibrio harveyi</i>	25
2.8 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)	26
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	27
3.1 Landasan Teori	27
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	28
3.3 Kerangka Operasional Penelitian	30
3.4 Kebaruan Penelitian	31
3.5 Hipotesis	32
3.6 Strategi Publikasi	32
4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	33
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	33
4.2 Materi Penelitian	33
4.2.1 Bahan Penelitian	33

4.2.2 Alat Penelitian.....	33
4.3 Metode Penelitian.....	34
4.4 Rancangan Penelitian.....	34
4.5 Prosedur Penelitian.....	36
4.5.1 Penelitian Tahap 1.....	36
4.5.2 Penelitian Tahap 2.....	39
4.5.3 Analisis Data.....	42
5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1 Penelitian Tahap 1.....	43
5.1.1 Ekstraksi Rumput Laut <i>Ulva lactuta</i>	43
5.1.2 Uji Respon Imun.....	43
5.1.3 Identifikasi Senyawa Rumput Laut.....	48
5.2 Penelitian Tahap 2.....	51
5.2.1 Respon Imun.....	52
5.2.2 Kelulushidupan (SR).....	62
5.2.3 Kualitas Air.....	64
6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
6.1 Kesimpulan.....	67
6.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA.....	68
LAMPIRAN.....	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Udang Putih vaname	10
2. Rumput Laut <i>Ulva lactuta</i>	13
3. Klasifikasi hemosit; (A) Hyaline, (B) Semi granular, dan (C) Granular.....	18
4. Diagram Alir Sistem Pertahanan Tubuh Pada Krustasea	21
5. Proses Pertahanan Sel termasuk.....	22
6. Kerangka Konsep Penelitian	29
7. Kerangka Operasional Penelitian	30
8. Denah Penelitian.....	35
9. Skema Bagan Jadwal Sampling Pengambilan Parameter Uji.....	39
10. Hasil Pengamatan THC.....	44
11. Hasil Pengamatan Aktivitas Fagositosis	46
12. Gugus Fungsi Senyawa Kasar <i>Ulva lactuta</i> melalui uji FTIR	49
13. Struktur Kimia pada <i>Ulva Lactuta</i>	51
14. Pengamatan THC selama Penelitian.....	52
15. Pengamatan Aktivitas fagositosis Selama Penelitian	55
16. Pengamatan Aktivitas Phenoloksidase (PO) Selama Penelitian	59
17. Hasil Pengamatan <i>Respiratory Burst</i> (RB) Selama Pengamatan	61
18. Kelulushidupan udang vaname selama penelitian.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Mekanisme Efektor Pada Respon Imun Krustasea	20
2. Penelitian Terdahulu Yang Menggunakan Ekstrak Rumput Laut <i>Ulva</i> sp31	
3. Karakterisasi Panjang Gelombang Gugus Fungsi Ekstrak <i>Ulva lactuca</i> ..	50
4. Hasil Pengukuran Kualitas air selama penelitian.....	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Penelitian.....	78
2. Uji Patogenitas <i>V.harveyi</i> dengan Uji Lethal Dossage 50% (LD_{50}).....	80
3. Data Hasil Pengamatan THC dan Aktivitas Fagositosis	81
4. Data Hasil Perhitungan	85
5. Data Hasil Perhitungan aktivitas fagositosis (%).....	87
6. Data hasil perhitungan Aktivitas Phenoloksidase (PO)	89
7. Data hasil perhitungan Respiratoty Burst (RB) selama penilitian.....	91
8. Data Kelulushidupan/ SR (%) Udang vaname Selama Penelitian	93
9. Data Pengamatan Kualitas Air selama Penelitian.....	95

DAFTAR ISTILAH

1. Aklimatisasi : Suatu upaya penyesuaian fisiologis atau adaptasi dari suatu organisme terhadap suatu lingkungan baru yang akan dimasukinya.
2. Aktifitas Fagositosis : Proses dimana sel-sel (hemosit) menelan dan menghancurkan pathogen, partikel asing atau diubah oleh sel-sel tubuh itu sendiri
3. Aliquot : Porsi ukur sampel yang diambil untuk dianalisa.
4. Antikoagulan : Golongan obat yang dipakai untuk menghambat pembekuan darah.
5. Antibiotik : Segolongan molekul, baik alami maupun sintetik yang mempunyai efek menekan atau menghentikan suatu proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi bakteri.
6. Degranulasi : Pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis
7. Dosis : Kadar dari sesuatu zat yang dapat mempengaruhi suatu organisme secara biologis, makin besar kadarnya maka makin besar dosisnya.
8. Ekstrak : Zat yang dihasilkan dari ekstraksi bahan mentah secara kimiawi
9. Ekstraksi : Suatu proses pemisahan zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan yang tidak saling larut, biasanya air dan pelarut organik.
10. Enkapsulasi : Proses dimana beberapa hemosit bekerja sama dengan satu sama lain yang bertujuan untuk menghentikan aksi menyerang organisme
11. Enzim phenoloksidase : Enzim yang berperan penting dalam sistem pertahanan non spesifik humoral pada udang, yang akan mengkatalis terjadinya reaksi dasar pada tirosin.
12. Fiksasi : Melekatkan selapis tipis jaringan yang diambil dari organ organisme hidup pada sepotong kaca tembus cahaya. Fiksasi jaringan tersebut dilakukan dengan cara pemanasan atau dengan cara penyiraman zat kimia tertentu kepada preparat berisi jaringan yang difiksasi.
13. Fraksinasi : Suatu proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran
14. Filtrat : Zat yang dapat melewati kertas saring atau zat yang bisa melewati proses penyaringan.
15. Granular : Type hemosit yang ukurannya besar dan mempunyai nucleus relatif lebih kecil dan

16. haemocytometer : terbungkus oleh granula. Satu set alat yang digunakan untuk memeriksa dan menghitung jumlah darah ikan/udang.
17. hemolim : Disebut juga darah udang
18. hyalin : Type hemosit yang mempunyai ukuran kecil dengan rasio nucleus/sitoplasma tinggi dan sedikit atau tidak ada sitoplasmatik granular
19. imunostimulan : Bahan yang dapat meningkatkan kerja komponen-komponen sistem imun
20. Inkubasi : Proses memelihara kultur mikroba dalam suhu tertentu selama jangka waktu tertentu yang bertujuan untuk memantau pertumbuhan bakteri.
21. Infeksi : Proses invasi dan multiplikasi berbagai organisme ke dalam tubuh (seperti bakteri, virus, jamur dan parasit), yang saat dalam keadaan normal, mikroorganisme tersebut tidak terdapat dalam tubuh.
22. Kelulushidupan : Istilah ilmiah yang menunjukkan tingkat kelangsungan hidup (survival rate) dari suatu populasi dalam jangka waktu tertentu.
23. lektin : Protein mengikat sel pada glikoprotein dan glikolipid yang terekspresi pada permukaan sel, khususnya pada molekul glukosa, dan memiliki kemampuan untuk membuat sel tersebut menggumpal
24. Patogen : Organisme atau mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada mikroorganisme lainnya
25. Patogenitas : Kemampuan mikroba untuk menyebabkan suatu penyakit pada organisme inang.
26. Pelarut : Suatu zat yang melarutkan zat terlarut (cairan, padat atau gas yang berbeda secara kimiawi) menghasilkan suatu larutan.
27. Pellet : Substansi hasil sentrifugasi yang memiliki bobot jenis yang lebih tinggi. Posisinya berada pada bagian bawah (berupa endapan) dan warnanya lebih keruh.
28. Penyakit : Gangguan kesehatan yang disebabkan oleh bakteri, virus atau kelainan sistem jaringan pada organ tubuh pada makhluk hidup
29. Polisakarida : Polimer yang tersusun dari ratusan hingga ribuan satuan monosakarida yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik. Polisakarida adalah karbohidrat, sehingga tersusun dari atom karbon (C), hydrogen (H), dan Oksigen (O)

30. PPM (part per million) : Perbandingan konsentrasi zat terlarut dan pelarutnya.
31. Rendemen : Perbandingan jumlah (kuantitas) bahan yang dihasilkan dari ekstrak. Rendemen menggunakan satuan persen (%).
32. *Respiratory burst* : Merupakan terminology yang digunakan untuk menggambarkan proses dimana sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah besar selama fagositosis.
33. Semi granular : Type sel yang mempunyai ukuran dan karakteristik berada diantara keduanya yaitu sel hyaline dan granular.
34. Sentrifugasi : Proses pemisahan komponen yang terdiri dari bahan cair yang tidak saling melarutkan dengan memanfaatkan gaya sentrifugal.
35. Senyawa bioaktif : Senyawa esensial dan non esensial yang terdapat di alam, menjadi bagian dari rantai makanan dan memiliki pengaruh terhadap kesehatan manusia maupun hewan. Dihasilkan oleh organisme melalui jalur biosintetik metabolit sekunder.
36. Sistem imun : Sistem pertahanan sebagai perlindungan terhadap infeksi dari makromolekul asing atau serangan pathogen, termasuk virus, bakteri, parasite dan protozoa.
37. Supernatant : Substansi hasil sentrifugasi yang memiliki bobot jenis lebih rendah. Posisi dari substansi ini berada pada lapisan atas dan warnanya lebih jernih
38. Ujiantang : Untuk melihat kemampuan penghambatan kadidat bakteri terhadap pertumbuhan bakteri pathogen dari hasil isolasi.
39. Vibriosis : Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri Genus *Vibrio*

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang merupakan salah satu komoditas sektor perikanan yang bernilai ekonomi tinggi. Volume ekspor udang Indonesia masih tergolong fluktuatif, namun udang tetap menjadi salah satu komoditas andalan ekspor perikanan. Untuk kebutuhan ekspor, udang pada umumnya diperoleh dari hasil budidaya ditambah. Perolehan devisa dan ekspor lebih dari 40% didominasi oleh komoditas udang. Negara Amerika Serikat dan Jepang merupakan negara tujuan dengan volume ekspor terbanyak (Simamora, 2014).

Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP, 2015), produksi perikanan budidaya menurut komoditas utama 2010-2014 pada udang terus mengalami peningkatan pada tahun 2010 jumlah produksi udang hanya 380.972 ton dan mengalami peningkatan pada tahun 2014 yaitu 639.369 ton dimana mengalami pertumbuhan sekitar 15,82%. Namun pada tahun 2015 produksi udang mengalami penurunan hingga 325.337 ton, dimana produksi udang vaname sebesar 210.495 ton. Sejalan dengan program peningkatan produksi perikanan, KKP menetapkan target produksi perikanan sebesar 22,54 juta ton pada tahun 2014, dimana sebanyak 16,89 juta ton berasal dari perikanan budidaya, salah satunya adalah udang. Komoditas ini diproyeksikan mengalami peningkatan produksi tiap tahun sebesar 16% untuk udang vaname. Namun kendala yang dihadapi oleh banyak pembudidaya ikan dan udang adalah serangan penyakit yang menyebabkan kematian.

Penyakit pada krustasea dapat disebabkan oleh bakteri, jamur, virus dan berbagai jenis parasit yang selalu terdapat di perairan (Hatmanti, 2003). Salah satu penyakit pada udang yaitu disebabkan oleh bakteri yang menyebabkan vibriosis.

Penyakit ini disebabkan oleh serangan bakteri genus *Vibrio* yang menjadi salah satu masalah pada kegiatan budidaya udang (Sarjito *et al.*, 2015). Menurut Austin and Austin, (2016), salah satu agensia penyebab vibriosis pada udang adalah *vibrio harveyi*. (Nitimulyo *et al.*, 2005) menyatakan bahwa bakteri pathogen yang umum menyerang dalam budidaya perikanan adalah *Vibrio alginolyticus*, *V.harveyi*, *V.fluifialis*, *V.vulfinicus* dan *V.ordalli*.

Salah satu upaya dalam penanggulangan dan pencegahan penyakit yang disebabkan oleh *V. harveyi* pada udang adalah melalui peningkatan sistem pertahanan tubuh udang yaitu dengan menggunakan imunostimulan, vitamin dan hormone (Johnny *et al.*, 2005). Upaya untuk mencegah serangan yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* pada budidaya udang yang tidak memberikan dampak baik kepada konsumen maupun lingkungan yaitu dengan dengan pemberian imunostimulan dari bahan alami serta ramah lingkungan. Imunostimulan merupakan cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang menginduksi sistem tersebut (Baratawidjaja, 2006). Menurut Treves-Brown (2000) antibiotik merupakan bahan yang bisa meningkatkan resistensi organisme terhadap infeksi pathogen. Pemberian imunostimulan secara luas dengan maksud untuk mengaktifkan sistem imun non spesifik sel seperti makrofag pada vertebrata dan hemosit pada avertebrata.

Salah satu sumber imunostimulan yang bisa digunakan untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh udang adalah rumput laut. Rumput laut merupakan algae multiselular yang mengandung substansi yang aktif secara imunologi. Pemanfaatan rumput laut selama ini masih terbatas pada produk karageenan dan agar. Potensi rumput laut di bidang pengendalian penyakit masih belum banyak di eksplorasi dan di eksploitasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rumput laut mempunyai prospek

yang masih terbuka bagi pengembangannya dalam bidang pengendalian penyakit (Castro *et al.*, 2004).

Rumput laut *Ulva* sp memiliki senyawa bioaktif alami yang mengandung polisakarida sulfat (El-Baky *et al.*, 2008). Menurut Selvin *et al.*, 2004 menyatakan bahwa kandungan senyawa aktif dari rumput laut *Ulva fasciata* telah terbukti mampu meningkatkan aktifitas imunostimulan pada udang yang ditandai dengan meningkatnya total hemosit ketika diberikan ekstrak rumput laut *Ulva fasciata*. Selvin *et al.*, (2011) menambahkan bahwa ekstrak rumput laut *Ulva fasciata* yang diberikan pada udang windu dapat melawan bakteri vibrio dan meningkatkan jumlah hemosit. Castro *et al.*, (2006); Tabarsa *et al.*, (2018) menambahkan kandungan polisakarida dari ekstrak *Ulva* dapat meningkatkan sel makrofag, sel fagositosis dan *respiratory burst* (RB) melalui metode perendaman.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian imunostimulan pada udang vaname memberikan hasil yang positif. Hal ini ditampakkan pada penelitian Ghaednia *et al.*, (2011) bahwa perendaman ekstrak *Sargassum galucescens* selama 3 jam mampu meningkatkan aktivitas fagositosis. Maftuch *et al.*, (2012) menambahkan dengan pemberian imunostimulan *Gracilaria verrucosa* melalui perendaman mampu meningkatkan jumlah hemosit pada udang vaname.

Berdasarkan dari beberapa penelitian tersebut, jenis rumput laut *Ulva* telah banyak diteliti dan mengandung komponen bioaktif polisakarida yang dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh udang. Infeksi bakteri menyebabkan kematian yang tinggi pada udang. Saat ini penggunaan *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan pada udang vaname melalui perendaman menggunakan bakteri *V.alginolyticus* belum pernah dilakukan penelitian. Uji efektivitas aplikasi rumput laut jenis *Ulva lactuta* sebagai imunostimulan sistem pertahanan tubuh non spesifik udang

L. vanameii dapat dilakukan dengan pengamatan terhadap sistem kekebalan tubuh non spesifik berdasarkan gambaran hematologinya, yaitu dengan menghitung jumlah hemolim dan aktivitas fagositosis.

1.2 Rumusan Masalah

Serangan penyakit yang dikenal dengan vibriosis pada udang vaname saat ini telah menurunkan produktivitas udang vaname. Spesies vibrio sudah dikenal sebagai penyebab penyakit vibriosis pada udang penaeid. Agensia penyebab vibriosis dapat bersifat pathogen, menyebar dengan cepat pada budidaya sistem budidaya sehingga mampu menyebabkan mortalitas hingga mencapai 85% (Sarjito *et al.*, 2015). Kehadiran *Vibrio harveyi* pada pemeliharaan akan bersifat oportunistik dan akan menginfeksi udang jika kepadatannya telah melampaui ambang batas yang akan menyebabkan kematian pada udang. Penyakit yang cukup berbahaya ini diketahui menyerang baik larva yang dipelihara di hatchery maupun juvenile udang yang dipelihara pada tambak pembesaran serta udang dewasa (Tompo, 2016).

Sejauh ini penyakit udang yang disebabkan oleh vibriosis hanya bisa diantisipasi dengan tindakan pencegahan meliputi benih yang unggul, manajemen budidaya yang baik dan vaksin, serta penggunaan antibiotik, sehingga dibutuhkan upaya untuk mencegah infeksi vibriosis pada udang vaname yang efektif, salah satunya dengan pemberian imunostimulan. Pada budidaya udang vaname (*Litopenaeus vanamei*) perlu adanya upaya alternatif untuk mencegah terjadinya penyakit vibriosis menggunakan bahan alami. Ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* merupakan salah satu bahan alami yang dapat dijadikan sebagai imunostimulan yang aman dan ramah lingkungan sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui :

- a. Jenis senyawa aktif ekstrak rumput laut *Ulva lactuta*. apakah mempunyai senyawa aktif polisakarida yang berpengaruh terhadap

perubahan jumlah hemosit, aktivitas fagositosis, aktivitas phenoloksidase (PO) dan *respiratory burst* (RB) melalui perendaman?

b. Apakah ekstrak rumput laut memberi pengaruh pada respon imun udang vaname yang diberi ekstrak rumput laut *Ulva lactuta*?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi senyawa aktif polisakarida pada ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* yang berfungsi sebagai imunostimulan.
2. Menentukan dosis pemberian ekstrak *Ulva lactuta* yang terbaik dalam memberikan respon sistem imun udang vaname terhadap *V.harveyi*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian tesis ini adalah memberikan informasi tentang kemampuan ekstrak rumput laut *Ulva lactuta*. sebagai salah satu alternatif bahan alami yang berfungsi sebagai imunostimulan yang ramah lingkungan pengganti antibiotik sintesis untuk menangani serangan penyakit vibriosis yang disebabkan oleh bakteri *V.harveyi* pada budidaya udang vaname. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu dan pengetahuan khususnya pada usaha budidaya air payau dalam rangka pencegahan terjadinya kematian massal pada budidaya udang vaname yang disebabkan oleh *V.harveyi*.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Udang Vaname (*Litopenaeus vanamei*)

2.1.1 Klasifikasi

Udang vaname digolongkan ke dalam genus penaeid pada filum Arthropoda. Ada ribuan spesies di filum ini. Namun, yang mendominasi perairan berasal dari subfilum Crustacea. Ciri-ciri subfilum Crustacea yaitu memiliki tiga pasang kaki berjalan yang berfungsi untuk mencapit, terutama dari ordo Decapoda, seperti *Litopenaeus chinensis*, *L. japonicus*, *L. monodon*, *L. stylirostris*, dan *Litopenaeus vanamei* (Haliman dan Adijaya, 2005).

Menurut Boone (1980), berikut ini tata nama udang vaname menurut ilmu taksonomi:

Filum: Arthropoda

Subfilum: Crustacea

Kelas: Malacostraca

Ordo: Decapoda

Famili: Penaeidae

Genus: *Litopenaeus*

Spesies: *vaname*

Nama latin : *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931)

2.1.2 Morfologi

Udang penaeid seperti halnya dengan krustase lainnya adalah binatang air beruas-ruas dimana pada tiap ruasnya terdapat sepasang anggota badan.

Anggota ini pada umumnya bercabang dua atau biramus (Martosudarmo dan Ranoemihardjo, 1983). Warna tubuhnya secara keseluruhan putih, agak mengkilap dengan titik-titik warna hitam yang menyebar di sepanjang tubuhnya.

Bagian tubuh udang vaname dibagi dua, bagian terdiri dari kepala dan dada

(cephalothorax) dan perut (abdomen) (Farchan, 2007), bagian cephalothorax terlindung oleh kulit chitin yang tebal yang dinamakan carapace (Martosudarmo dan Ranoemihardjo, 1983). Hal ini lebih lanjut dijelaskan oleh Haliman dan Adijaya (2005) bahwa vaname memiliki tubuh berbuku-buku dan aktifitas berganti kulit luar atau eksoskeleton secara periodik (*moulting*). Bagian tubuh udang vaname sudah mengalami modifikasi sehingga dapat digunakan untuk keperluan sebagai berikut:

1. Makan, bergerak, dan membenamkan diri kedalam lumpur (*burrowing*).
2. Menopang insang karena struktur insang udang mirip bulu unggas.
3. Organ sensor, seperti pada antenna dan antenula.

Tubuh udang *penaeid* terdiri dari tiga bagian utama yaitu :

a. Kepala

Menurut Martosudarmo dan Ranoemihardjo (1983), kepala terdiri dari enam ruas, pada ruas kepala pertama terdapat mata majemuk yang bertangkai. Beberapa ahli berpendapat bahwa mata bertangkai ini bukan suatu anggota badan seperti pada ruas-ruas yang lain, sehingga ruas kepala dianggap berjumlah lima buah. Pada ruas kedua terdapat antenna I atau *antennule* yang mempunyai dua buah flagella pendek yang berfungsi sebagai alat peraba dan pencium. Ruas ketiga yaitu Antena II atau *antennae* mempunyai dua buah cabang yaitu cabang pertama (*Exopodite*) yang berbentuk pipih dan tidak beruas dinamakan *prosartema*. Sedangkan yang lain (*Endopodite*) berupa cambuk yang panjang yang berfungsi sebagai alat perasa dan peraba. Tiga ruas terakhir dari bagian kepala mempunyai anggota badan yang berfungsi sebagai pembantu mulut yaitu sepasang *mandibula* yang bertugas menghancurkan makanan yang keras dan dua pasang *maxilla* yang berfungsi sebagai pembawa makanan ke *mandibula*. Ketiga pasang anggota badan ini letaknya berdekatan satu dengan lainnya sehingga terjadi kerjasama yang harmonis antara ketiganya.

Haliman dan Adijaya (2005), kepala udang vaname terdiri dari antenula, antena, mandibula, dan dua pasang maxillae. Kepala udang vaname juga dilengkapi dengan tiga pasang maxilliped dan lima pasang kaki berjalan (peripoda) atau kaki sepuluh (decapoda). Maxilliped sudah mengalami modifikasi dan berfungsi sebagai organ untuk makan. Endopodite kaki berjalan menempel pada cephalotorax yang dihubungkan oleh coxa. Bentuk peripoda beruas-ruas yang berujung di bagian dactylus. Dactylus ada yang berbentuk capit (kaki ke-1, ke-2, dan ke-3) dan tanpa capit (kaki ke-4 dan ke-5).

b. Dada

Bagian dada terdiri dari delapan ruas yang masing-masing ruas mempunyai sepasang anggota badan yang disebut *thoracopoda*. *Thoracopoda* pertama sampai dengan ketiga dinamakan *maxilliped* yang berfungsi sebagai pelengkap bagian mulut dalam memegang makanan. *Thoracopoda* lainnya (ke-5 s/d ke-8) berfungsi sebagai kaki jalan yang disebut *pereiopoda*. *Pereiopoda* pertama sampai dengan ke tiga memiliki capit kecil yang merupakan ciri khas dari jenis udang *penaeid* (Martosudarmo dan Ranoemihardjo., 1983).

c. Perut

Martosudarmo dan Ranoemihardjo (1983) menjelaskan bahwa bagian perut atau *abdomen* terdiri dari enam ruas. Ruas yang pertama sampai dengan ruas yang kelima masing-masing memiliki sepasang anggota badan yang dinamakan *pleopoda* atau swimmeret. *Pleopoda* berfungsi sebagai alat untuk berenang oleh karena itu bentuknya pendek dan kedua ujungnya pipih dan berbulu. Pada ruas yang keenam *pleopoda* berubah bentuk menjadi pipih dan melebar yang dinamakan *uropoda*, yang bersama-sama dengan telson berfungsi sebagai kemudi.

Udang putih vaname memiliki rostrum yang bergerigi dan pada umumnya 4-8, gigi ventral, dimana dengan jelas pada udang muda melebihi *peduncle antenula*. *Carapace* mencangkup antena dan tulang belakang *hepatis*. Pada jantan dewasa *petasma* adalah simetris, semiopen, dan tidak berkerudung. Bentuk dari *Spermatophore*-nya sangat kompleks, terdiri dari berbagai struktur gumpalan sperma yang *encapsulated* oleh suatu pelindung (bercabang dan terbungkus), seperti halnya lem dan material yang lengket. Betina dewasa mempunyai *thelycum* terbuka dan bubungan *sternite*. Ini adalah salah satu perbedaan yang paling mencolok terlihat pada udang windu betina (Suyanto dan Mudjiman, 2002).

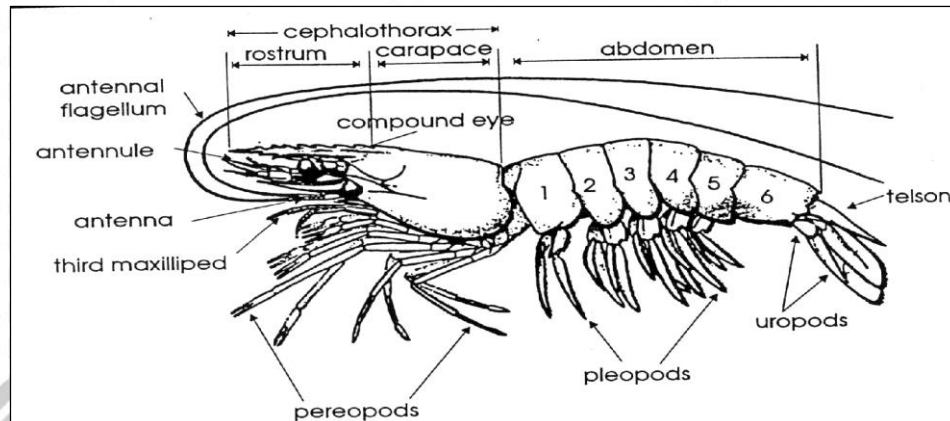
Ciri khusus pada *Litopenaeus vanamei* adalah gigi rostrum bagian bawah dua buah sehingga diperoleh rumus gigi 8/2. Warna dari udang putih vaname ini putih transparan dengan warna biru yang terdapat dekat dengan bagian telson dan *uropoda*. Alat kelamin udang jantan disebut juga *petasma*, yang terletak pada pangkal kaki renang pertama. Sedangkan alat kelamin udang betina disebut juga dengan *thelycum*, terbuka dan terletak diantara pangkal kaki jalan keempat dan kelima (Wyban dan Sweeney, 1991). Alat kelamin jantan (*petasma*) berbentuk seperti huruf "V" dan alat kelamin betina seperti huruf "I" (Farchan, 2007).

Pada stadia larva, udang putih vaname memiliki enam stadia nauplii, tiga stadia *protozoa*, dan tiga stadia *mysis* dalam daur hidupnya. Stadia larva (1,95-2,73 mm) dapat dikenali dengan tidak adanya tulang belakang yaitu dengan dada dan rostral yang panjangnya relatif berlawanan dengan panjang mata.

Karakter morfologi yang paling mudah dibedakan adalah perkembangan supra orbital tulang belakang pada stadia kedua dan ketiga *protozoa*. Warna putih tembus cahaya dan tubuh mempunyai warna kebiru-biruan yang disebabkan oleh *chromatophore* biru yang dominan, yang terletak dekat garis tepi telson dan

uropoda, panjangnya dapat menjangkau sekitar 230 mm yaitu ± 9 inci (Suyanto dan Mudjiman, 2002).

Morfologi udang vaname sama halnya dengan udang *penaeid* lainnya dan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Udang Putih vaname (Haliman dan Adijaya, 2005)

2.1.3 Habitat dan Siklus Hidup

L. vanamei berasal dari pantai yang tenang di Mexico, Amerika, dan Amerika selatan, suatu area di mana temperatur air laut secara umum berada di atas 20°C sepanjang tahun, populasi *L. vanamei* dikenal juga terisolasi atau suatu populasi yang dapat dibudidayakan disepanjang dari seluruh wilayah tersebut. Sebab jenis udang ini relative lebih mudah dibudidayakan, persediaan *L. vanamei* telah tersebar diseluruh penjuru dunia (Wyban dan Sweeney, 1991).

Menurut Wyban dan Sweeney (1991) dalam pertumbuhan larva dan perkembangan larva udang vaname (*L. vanamei*) mengalami beberapa kali perubahan bentuk atau ganti kulit. Secara umum pergantian bentuk dimulai dari stadia nauplii sampai post larva. Sedangkan Haliman dan Adijaya (2005), menjelaskan siklus hidup udang vaname sebagai berikut :

a. Stadia Nauplii

Pada stadia ini, larva berukuran 0,32-0,58 mm. Sistem pencernaannya belum sempurna dan masih memiliki cadangan makanan berupa kuning telur

sehingga pada stadia ini benih udang vaname belum membutuhkan makanan dari luar.

b. Stadia Zoea

Stadia zoea terjadi setelah nauplii ditebar pada bak pemeliharaan sekitar 15-24 jam. Larva sudah berukuran 1,05-3,30 mm. Pada stadia ini, benih udang mengalami moulting sebanyak tiga kali, yaitu stadia Zoea1, Zoea2, Zoea3.

Lama waktu proses pergantian kulit sebelum memasuki stadia berikutnya (Mysis) sekitar 4-5 hari. Pada stadia ini, larva sudah dapat diberi pakan alami berupa artemia (Martosudarmo dan Ranoemihardjo 1983).

c. Stadia Mysis

Pada stadia ini larva hampir sudah menyerupai bentuk udang yang bercirikan sudah terlihat ekor kipas (*urupoda*) dan ekor (*telson*). Larva pada stadia ini sudah mampu memakan fitoplankton dan zooplankton. Larva berukuran berkisar antara 3,50-4,80 mm. Pada stadia ini berlangsung selama 3-4 hari, dimulai dari stadia Mysis1, Mysis2, Mysis3 sebelum memasuki pada stadia Post Larva (PL).

d. Stadia Post Larva (PL)

Haliman dan Adijaya (2005), menyatakan bahwa pada stadia postlarva, akan tampak jelas seperti udang dewasa. Pada stadia ini larva sudah mulai aktif bergerak lurus kedepan dan mempunyai sifat cenderung karnivora. Stadia Post Larva ini dimulai dari Post Larva1 (PL1) sampai dengan panen benur.

Biasanya Post Larva 12 (PL12) benur sudah siap dipanen dan ditebar pada tambak yang sudah berukuran rata-rata 10 mm

2.1.4 Pakan dan Kebiasaan Makan

Makanan larva udang putih vaname di alam pada stadia protozoa biasanya terdiri dari phytoplankton dari jenis diatomae seperti *Chaetoceros* sp., yang sangat cocok diberikan dan disukai oleh larva udang putih vaname (Wyban

& Sweeney, 1991). Menurut Suyanto dan Mudjiman (2002), *Chaetoceros* sp. merupakan jenis alga dari kelompok diatomae dimana alga ini mempunyai kelebihan dibandingkan beberapa jenis diatomae lainnya yaitu mengandung Omega 3 HUFA yang secara tidak langsung dapat meningkatkan antibodi dan daya tahan tubuh bagi larva. Nutrisi ini sangat dibutuhkan oleh larva udang putih vaname terutama pada fase-fase transisi seperti dari stadia Nauplii ke stadia Zoea, dimana pada fase ini sering dikenal dengan istilah *Zoea syndrome* atau Zoea lemah yaitu larva kelihatan lemah, bentuk organ tubuh tidak normal dan kotor yang dapat menyebabkan mortalitas hingga 90%.

Udang putih vaname termasuk golongan udang penaeid, maka sifat-sifatnya antara lain *nokturnal*, artinya aktif mencari makan pada malam hari atau apabila intensitas cahaya berkurang. Pada siang hari cenderung lebih banyak pasif. Sedangkan udang putih vaname fase larva makan setiap saat, hal ini yang menyebabkan pemberian pakan harus sering dilakukan. Cara makan ini sebagaimana dinyatakan oleh Farchan (2007).

2.2 Rumput Laut *Ulva lactuta*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Selada laut (*Ulva lactuta*) adalah rumput laut yang tergolong dalam divisi Chlorophyta. Termasuk dalam divisi Chlorophyta karena sel-selnya banyak mengandung klorofil a sehingga memberikan warna hijau pada rumput laut.

Menurut Guiry (2007), taksonomi selada laut adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Filum	: Chlorophyta
Kelas	: Ulvophyceae
Ordo	: Ulvales
Famili	: Ulvaceae

Genus : *Ulva*

Spesies : *Ulva lactuta*.

Menurut Guiry (2007), morfologi dari selada laut berupa *thallus* tipis dan gepeng seperti pedang yang terdiri atas 2 lapis sel. Tidak ada diferensiasi jaringan dan seluruh sel memiliki bentuk yang kurang lebih sama, kecuali pada sel-sel basal yang mengalami translasi membentuk rhizoid penempel. Masing-masing sel pada spesies ini terdiri atas sebuah nucleus dengan kloroplas berbentuk cangkir dan sebuah pirenoid.

Ulva lactuta memiliki panjang sampai 100 cm dan berwarna hijau apel terang, dan memiliki bentuk pedang melipat (*strap-shaped blades*) dengan tepi yang halus tapi bergelombang dapat dilihat pada Gambar 2. Bagian tengah dari setiap helaian seringkali berwarna pucat dan semakin ke arah tepi warnanya semakin gelap (Littler *et al.*, 1989; Reine and Junior, 2002).



Gambar 2. Rumput Laut *Ulva lactuta* (Guiry, 2007)

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Habitat selada laut (*Ulva lactuta*.) adalah di air laut dan hidup di zona intertidal atau daerah yang dangkal (Littler *et al.*, 1989; Reine & Junior, 2002).

Selada laut tumbuh diberbagai habitat, di bebatuan, terutama pada fragmen karang mati. Selada laut tumbuh baik pada pH 7,5-9 (Aslan,1991). Salinitas yang baik untuk pertumbuhan selada laut adalah 29-31,5 ppm (Nybakken,1988) dan kisaran suhu 28-31°C (Brotowidjoyo *et al.*,1984). Selada laut (*Ulva lactuta*.) banyak ditemukan di Indonesia seperti daerah pesisir Gunung Kidul (Yogyakarta), Bali (sekitar pesisir pulau Serangan) dan pesisir Nusa Tenggara (Julyasih *et al.*,2009).

2.2.3 Kandungan Rumput laut *Ulva lactuta*.

a. Polisakarida

Rumput laut mengandung berbagai jenis polisakarida yang berbeda, dimana struktur kimia berhubungan dengan klasifikasi taxonomi pada alga dan struktur selnya. Sulfat polisakarida dapat menghambat aktivitas dari bakteri dan juga virus. Polisakarida dapat bertindak sebagai prebiotik (zat yang merangsang pertumbuhan bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan) dan memberikan efek untuk pertumbuhan dan meningkatkan kesehatan. Beberapa rumput laut memiliki serat yang mampu memberikan efek positif pada saluran pencernaan (misalnya asam alginat). Polisakarida juga yang berasal dari rumput laut merupakan antioksidan yang efektif dan mengandung racun. Kandungan polisakarida yang terdapat pada rumput laut tergantung pada musim. Total senyawa polisakarida yang terkandung pada rumput laut sekitar 76% dari berat kering. Diantara banyak polisakarida alga yang berbeda, yang paling penting adalah galaktan, fucoidan, laminarin dan alginat (Chojnacka *et al.*, 2012).

Sulfat galaktan ditemukan baik dalam matriks interselular maupun pada dinding sel. Galaktan merupakan makromolekul yang mengandung unit pengulangan berbasis disakarida. Tergantung pada konfigurasi optik unit kedua dibedakan pada agaran (D) dan karaginana (L). substituen dari rantai utama galaktan adalah gugus sulfat, gugus metoksil, asetat asam piruvat dan glukosil

rantai samping. Kelompok-kelompok ini dapat didistribusikan secara tidak teratur melalui makromolekul. Galaktan memiliki kandungan sebagai anti-tumor, anti-virus dan imunostimulan (Fereira *et al.*, 2012).

Fucoidan, laminarin dan alginate banyak ditemukan pada ekstrak rumput laut coklat. Dimana kandungan fucoidan dan laminarin sekitar 10% dari berat kering, dan alginate sekitar 47%. Ketiga jenis bioaktif ini juga dapat berfungsi penghambat anti virus dan antibakteri, selain itu juga berguna sebagai antiinflamasi, antitumor dan antioksidan (Synytsya *et al.*, 2010).

b. Protein

Struktur dan sifat biologis protein yang diekstrak dari rumput laut belum didokumentasikan secara luas seperti polisakarida. Biasanya kandungan protein dalam rumput laut kurang dari 5% (Leonard *et al.*, 2010). Kandungan protein paling rendah dimiliki dari rumput laut yang berwarna coklat. Sebagian besar spesies alga mengandung semua unsur asam amino esensial. Bioaktif protein penting yang dapat diekstrak dari makroalga adalah lectin, yang berikatan dengan karbohidrat dan berfungsi dalam banyak proses biologis seperti komunikasi interseluler. Juga memiliki aktivitas antibakteri, antivirus dan antiinflamasi (Kole *et al.*, 2010).

c. Pigmen

Pigmen rumput laut dibagi menjadi tiga kelompok utama yaitu klorofil, karotenoid dan phycobiliprotein. Karotenoid adalah pigmen organik yang ada pada kloroplas dan kromoplas. Dimana karotenoid diproduksi oleh ganggang laut, tanaman jamur dan beberapa bakteri yang juga merupakan pigmen yang paling luas di alam. Pigmen merupakan poliena yang larut dalam lipid. Berbagai jenis alga mengandung karotenoid, yang merupakan antioksidan yang sangat kuat. Sifat ini didasarkan fakta bahwa karotenoid mampu menghilangkan oksigen singlet dan menangkalkan radikal bebas. Karotenoid yang paling penting adalah β -karoten,

fucoxhiantin dan tocopherol. Kandungan β -karoten pada alga dalam kondisi kering berkisar antara 36-4500 mg/kg. fucoxanthin terdiri dari 70% dari total karotenoid (Holdt et al., 2011). Phycobiliprotein adalah pigment yang larut dalam air yang dihasilkan oleh cyanobacteria (ganggang biru-hijau), ganggang merah dan cryptomonad. Phycobiliprotein tidak hanya memiliki antioksidan tapi juga sifat anti-inflamasi, antivirus dan neuroprotektif (Mihova et al., 1996).

d. Polifenol

Polifenol diproduksi oleh sebagian besar pada tanaman termasuk rumput laut. Rumput laut menghasilkan senyawa ini untuk melindungi dari kondisi eksternal seperti stress dan herbivora. Polifenol dapat menyumbangkan hydrogen pada radikal bebas dan menghasilkan radikal non-reaktif. Ekstrak rumput mengandung jumlah yang cukup besar dari polifenol, tapi kandungannya tergantung pada metode ekstraksi. *Ascophyllum* spp. memiliki polifenol yang jauh lebih banyak daripada rumput lainnya, sementara *Ulva* spp. memiliki kandungan terendah dari senyawa ini (Ghannam dan Gupta., 2011).

2.3 *Ulva* sp Sebagai Immunostimulan

Rumput laut hijau adalah salah satu tiga divisi utama pada makroalga yang mensintesis sulfat polisakarida. Polisakarida ini memegang structural penting pada rumput laut hijau yang terletak pada interseluler dan dinding matriks fibrillar yang mengikat selulosa, protein dan polisakarida jenis lainnya. Beberapa structural sulfat polisakarida dari rumput laut hijau dari *Ulva* seperti *Enteromorpha*, *rhamnans* dari *Monostroma*. *Ulva* dari polisakarida terbentuk dari beberapa senyawa yang terdiri dari rhamnase, xylose, glucuronic acid dan sulfat (Tabarsa et al., 2017).

Rumput laut hijau salah satunya jenis *Ulva lactuca* merupakan sumber senyawa bioaktif alami yang sering digunakan dalam bidang farmakologi dan

dalam meningkatkan sistem imun pada udang (Lerner et al., 1960) yang mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi, antivirus, antineoplastic, antimikroba, antibakteri dan antihipertensi karena mengandung senyawa polisakarida sulfat, fenolat, terpenoid, laktone, sterol dan asam lemak (El-Baky et al., 2008).

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak *watersoluble* yang diperoleh dari beberapa jenis rumput laut memiliki potensi yang kuat sebagai stimulator pada *respiratory* dan meningkatnya aktivitas fagositosis (Castro et al., 2004). Salah satu jenis rumput laut yang memiliki aktivitas utama yang berperan pada stimulator ini adalah polisakarida yang diambil dari rumput laut *Ulva rigida*, dimana berdasarkan hasil analisis mengandung asam polisakarida sekitar 90%. Kelompok sulfat yang terkandung pada polisakarida *Ulva rigida* dari hasil fraksi sekitar 95% dari ramnose.

Hal ini menunjukkan bahwa kandungan polisakarida yang terkandung pada rumput laut *Ulva* mampu menjadi stimulasi untuk meningkatkan imun pada suatu organisme. Hasil ekstrak *Ulva intestinalis* menunjukkan bahwa hasil ekstrak tersebut mampu meningkatkan sel makrofag (Tabarsa et al., 2018). Castro et al. (2006); Castro et al. (2004) menambahkan bahwa kandungan polisakarida berhasil meningkatkan *respiratory burst* dan aktivitas fagositosis. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa jenis rumput laut hijau jenis *Ulva* dapat dijadikan sebagai imunostimulan.

2.4 Mekanisme Pertahanan Tubuh Pada Udang

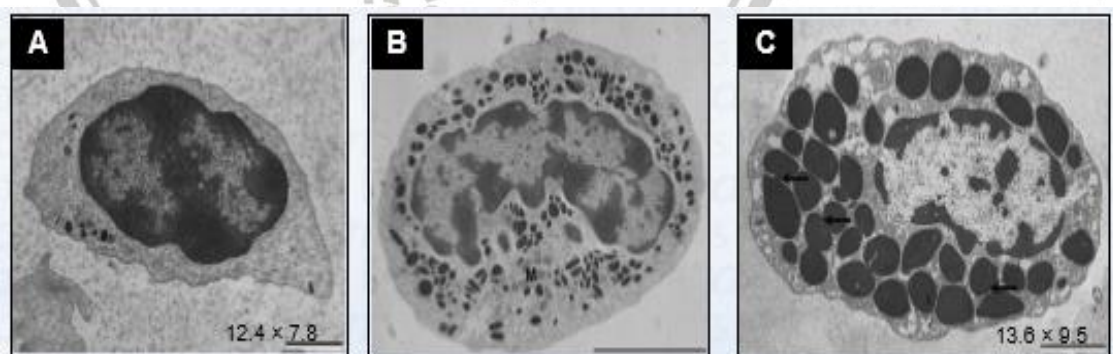
Darah udang disebut hemolim yang memiliki 2 komponen utama yaitu plasma dan sel darah. Darah udang tidak memiliki Hemoglobin oleh karena itu darah udang tidak berwarna merah, tetapi jika berikatan dengan oksigen maka akan berubah menjadi biru muda. Fungsi Hb pada udang digantikan oleh

hemosianin sebagai transport oksigen. Hemosianin berfungsi dalam transport oksigen, sebagai penyangga dalam darah krustasea dan berperan penting dalam osmotik darah (Maynard, 1960).

Hal yang menentukan suatu tingkat kekebalan tubuh udang terhadap serangan pathogen yaitu dengan adanya hemosit dalam darah *crayfish* (arthropoda). Hemosit penting dalam melawan partikel asing yang ke rongga krustasea. Fungsi hemosit hewan krustase tidak berbeda dengan hewan lainnya yang dapat melakukan fagositosis dan juga menghilangkan partikel asing untuk diinternalisasi dengan reaksi enkapsulasi (Soderhall dan Cerenius, 1992).

Secara umum bentuk hemosit *penaeid* dibedakan menjadi 3 (tiga) bentuk dapat dilihat pada Gambar 3. (Bauchau, 1990) yaitu:

- sel hyaline : tipe hemosit yang mempunyai ukuran kecil dengan rasio nukleus/sitoplasma tinggi dan sedikit atau tidak ada sitoplasmik granular.
- sel granular : tipe hemosit yang ukurannya besar dan mempunyai nukleus relatif lebih kecil dan terbungkus oleh granules.
- sel semi granular: tipe sel yang mempunyai ukuran dan karakteristik berada diantara keduanya yaitu sel hyaline dan sel granular.



Gambar 3. Klasifikasi hemosit; (A) Hyaline, (B) Semi granular, dan (C) Granular (Foto dimodifikasi dari Giulianini et al., 2007)

Menurut Owens dan O'Neill (1996) menyatakan bahwa persentase hialin pada udang windu yang normal terdiri 60-93% dari total hemosit, sedangkan granular berjumlah 17-40% dari analisa flow cytometer. Berdasarkan analisa Cell-Dyn 3000, total hemosit rata-rata berjumlah $2,1 \times 10^7$ sel hialin bersifat fagositik, yakni memiliki kemampuan untuk menangkap partikel-partikel asing seperti bakteri dan virus. Apabila hialin masuk ke dalam jaringan, hialin berkembang menjadi fagosit yang lebih besar yang disebut makrofag. Granular mengandung granula di dalam sitoplasma yang merupakan jaringan pertama untuk sistem pertahanan seluler melawan infeksi dengan berpindah ke daerah yang sedang mengalami infeksi, menembus dinding pembuluh dan memfagosit partikel asing untuk dihancurkan.

Hemosit memegang peran penting pada sistem pertahanan pada krustasea. Respon seluler pada sel hemosit yakni pertama, hemosit mengeluarkan partikel asing dalam *hemocoel* melalui fagositosis, enkapsulasi dan agregasi nodular. Kedua, hemosit berperan dalam penyembuhan luka melalui *cellular clumping* serta membawa dan melepaskan *prophenoloxidase sistem* (proPO). Hemosit juga berperan dalam sintesa dan pelepasan molekul penting hemolim seperti α_2 -macroglobulin (α_2 M), agglutinin, dan peptide antibakteri. Sel-sel pada hemosit memiliki tipe masing-masing dalam reaksi kekebalan tubuh, sel hyaline terlibat dalam fagositosis sel, sel semi granular aktif dalam enkapsulasi dan sel granular aktif dalam penyimpanan dan pelepasan sistem proPO dan sitotoksitas (Rodrigues and Moullac, 2000).

Mekanisme efektor pada respon imun avertebrata termasuk koagulasi yang menghindari hilangnya hemolim dan merangsang metabolit oksidatif dan produksi melanin untuk mengaktifkan sistem proPO. Aktivasi proPO merangsang

proses penting lainnya pada respon imun seperti fagositosis, enkapsulasi dan nodular. Aktivasi seperti proses munculnya glikosilasi pathogen yang terkait pola molekul (PAMPs) oleh protein krustasea (Vazquez *et al.*, 2009). Beberapa mekanisme efektor pada respon imun krustasea dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini:

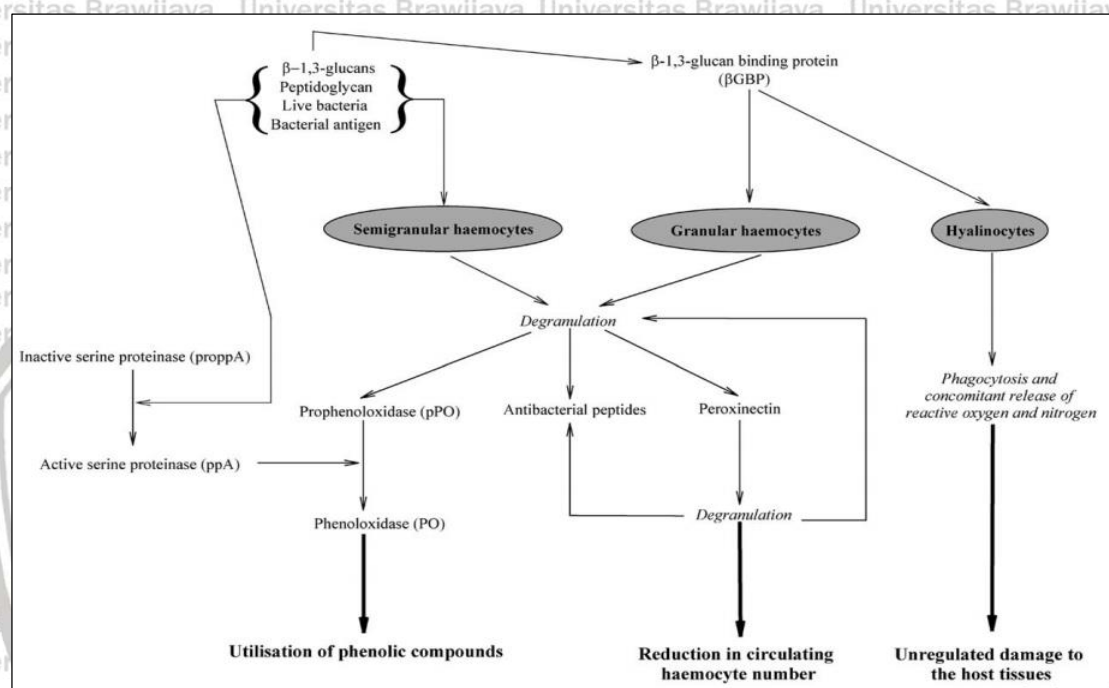
Tabel 1. Mekanisme Efektor Pada Respon Imun Krustasea

Sistem respon imun	Sel yang terlibat	Target
proPO	Semigranular, hemosit	Bakteri dan jamur
Antimikrobal protein	dengan granula refraktil besar	
Fagositosis	Hemosit dengan granula	Bakteri dan jamur
Enkapsulasi	Hyalin, semigranular	Bakteri dan mikroorganisme <10 μ m
Lektin	Semigranular, hemosit dengan granular refraktil besar	Spora jamur dan ragi, organisme >10 μ m
Clottable protein	Hyalin, semigranular dan hemosit dengan granular refraktil	Membedakan antara partikel diri dan bukan diri, merangsang aglutinasi dan fagositosis
	Clottable protein dari hemosit	Bakteri dan jamur

Langkah pertama dalam proses kekebalan adalah mengenali mikroorganisme. Proses ini dilakukan oleh hemosit melalui molekul yang memiliki kemampuan mengenali struktur pada dinding sel yang menyerang organisme seperti protein dan mengenali β -1,3-glukan, lipopolisakarida dan peptidoglikan. Setelah menyerang organisme yang terdeteksi, maka hemosit dapat mengaktifkan seluruh rangkaian mekanisme untuk dipicu mengontrol dan menghilangkan partikel asing (Vargas *et al.*, 2000).

Sistem phenoloxidase telah diakui sebagai mekanisme pertahanan efisien terhadap melawan *non-self*. Sistem ini disimpan dan diproduksi hemosit oleh semi-granular dan granular, dan dapat diaktifkan oleh kehadiran mikroba yang minimum. Aktivasi proPO hasil dari produksi melanin, pigmen berwarna coklat bertanggungjawab terhadap proses lainnya serta untuk proses menonaktifkan

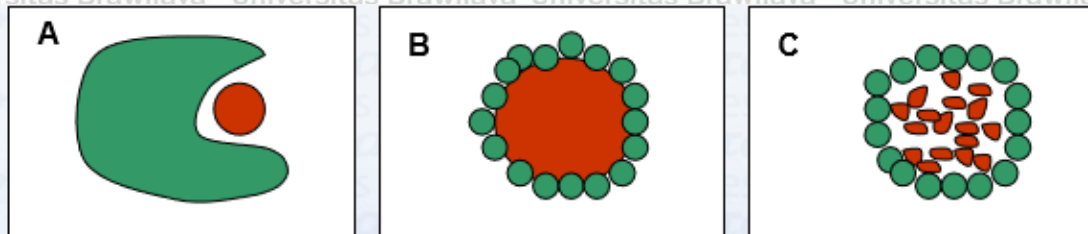
partikel asing, dan mencegah penyebaran ke seluruh tubuh inang dan untuk penyembuhan kerusakan kutikula (Martinez, 2007). Smith *et al.* (2003) menambahkan transformasi proPO menjadi PO melibatkan beberapa reaksi dikenal sebagai *proPO activating system* (sistem aktivasi proPO). Alur diagram sistem pertahanan tubuh pada krustase (udang) dapat dilihat pada Gambar.4 dibawah ini :



Gambar 4. Diagram Alir Sistem Pertahanan Tubuh Pada Krustasea (Smith *et al.*, 2003)

Fagositosis merupakan reaksi paling umum pada mekanisme pertahanan sel. Oleh karena proses ini, sel-sel (hemosit) menelan dan menghancurkan, menyerang pathogen, partikel asing atau diubah oleh sel-sel tubuh itu sendiri. Enkapsulasi dan pembentukan nodul adalah proses dimana beberapa hemosit bekerja sama dengan satu sama lain yang bertujuan untuk menghentikan aksi menyerang organisme, ketika *host* diserang oleh partikel-partikel yang sangat besar atau partikel kecil yang banyak dan kemudian ditelan lalu dihancurkan oleh sel-sel individu. (Soderhall dan Cerenius, 1992). Martinez, 2007 menambahkan

ilustrasi proses pembentukan pertahanan sel dapat dilihat pada Gambar 5 dibawah ini:



Gambar 5. Proses Pertahanan Sel termasuk (A) Fagositosis, (B) Enkapsulasi, dan (C) Pembentukan nodul. Hemosit digambarkan yang berwarna hijau sedangkan penyerangan organisme asing digambarkan berwarna merah.

2.5 Imunostimulan

Dalam Budidaya udang penggunaan antibiotik untuk menghambat bakteri saat ini sudah tidak efektif lagi, dikarenakan beberapa bakteri telah memiliki sifat resistensi terhadap beberapa antibiotik (Muliani, 2002). Selain itu penggunaan antibiotik memiliki dampak terhadap lingkungan akuatik dan residunya dapat membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsinya (Reed *et al.*, 2003).

Itami *et al.* (1996) mengatakan bahwa pemberian imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas fagosit hemosit dan meningkatkan aktivitas proPO sehingga mencegah infeksi dari *vibrio*. Taslihan (1991), menambahkan terdapat penyebaran hemosit diasumsikan sebagai bentuk dari mekanisme respon seluler terhadap masuknya benda asing ke dalam tubuh udang terutama pada hepatopankreas pasca larva udang windu setelah dilakukan vaksinasi. Sejauh ini diketahui bahwa pemberian imunostimulan tidak mempunyai efek samping dan sangat baik untuk diterapkan pada organisme yang tidak mempunyai sel memori dalam sistem kekebalannya, seperti golongan krustase dengan cara merangsang atau memaksimalkan respon pertahanan non-spesifiknya (Kwang, 1996).

Menurut Maftuch *et al.* (2012) menyatakan bahwa pemberian imunostimulan *Gracilaria verrucosa* pada udang windu (*Penaeus monodon* fabr)

menunjukkan adanya peningkatan total hemosit melalui perendaman selama 3 jam dengan dosis terbaik 2 ppm kemudian 1,5 ppm dan 1 ppm. Yeh *et al.*, (2005) juga menambahkan bahwa terjadi peningkatan jumlah hemosit pada udang vaname (*Litopenaeus vanamei*) pasca pemberian ekstrak *sargassum duplicatum* baik melalui perendaman maupun injeksi.

2.6 Mekanisme Kerja Imunostimulan

Sebuah penelitian mengenai ekstrak kasar *Ulva rigida* menyatakan bahwa ikan yang direndam menggunakan ekstrak *Ulva rigida* tersebut mampu meningkatkan aktivitas *respiratory burst* (RB) dan aktivitas fagositosis. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa polisakarida menstimulasikan menjadi sistem imun yang prinsip kerjanya sama dengan β -glukan yang berfungsi sebagai imunostimulan. Meskipun terdapat perbedaan kecepatan dalam menstimulasi, ekstrak dari *Ulva rigida* menghasilkan respon yang sama dengan glukan (Castro *et al.*, 2004).

Sebuah penelitian dengan perlakuan perendaman β -1,3 glukan pada larva Atlantic *Hippoglossus hippoglossus* (L) menunjukkan bahwa makromolekul tersebut secara efektif masuk melalui saluran pencernaan. Kemudian diabsorpsi oleh usus. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa terjadi absorpsi yang dilakukan oleh sel epitel pada permukaan kulit, walaupun mempunyai kapasitas terbatas (Strand dan Dalmo, 1997). Pada saluran pencernaan pascalarva, β -1,3 glukan akan mengalami degradasi. Degradasi tersebut dilakukan oleh β -glukanase yang dihasilkan oleh kelenjar pencernaan. Hasil dari degradasi tersebut adalah polisakarida rantai pendek, yang kemudian diubah menjadi glikogen melalui jalur UDP-glukose. Kelebihan β -glukan yang tidak terdegradasi akan diabsorpsi oleh usus dan bergabung bersama hemolim sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh udang (Lopez *et al.*, 2003). Saat terjadi

antigen yang masuk, misalnya struktur β -1,3 glucan, maka plasma dalam hemolim akan segera mengikat antigen tersebut. Ikatan tersebut dilakukan oleh *agglutinin* atau sering disebut *lectin*. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah introduksi β -1,3 glucan akan terjadi penurunan terhadap jumlah hemosit yang beredar (Johansson *et al.*, 1999).

Lectin merupakan bagian pertahanan humoral, berfungsi untuk melakukan pengenalan terhadap benda asing (*non self recognition*). Ikatan antara antigen dengan glikoprotein tersebut terjadi dalam bentuk β glucan *Binding protein*. Molekul *lectin*, pada sisi lain terikat pada lapisan permukaan hemosit, termasuk sel semi granular dan granular. Saat β glucan masuk ke dalam hemolim, maka sel semi granular dan granular akan mengalami degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut (Rodriguez dan Le Moullac, 2000). Dengan demikian, jumlah sel semi granular dan sel granular yang beredar dalam hemolim akan terlihat menurun. Hasil proses degranulasi adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya *phagocytosis* (Johansson *et al.*, 2000). Pasca penurunan jumlah hemosit, akan terjadi peningkatan yang sangat signifikan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah introduksi β glucan akan terjadi penurunan terhadap jumlah hemosit yang beredar, dan akan terjadi perubahan balik secara perlahan-lahan (*slow recovery*). Pasca perubahan balik, akan terjadi kenaikan hemosit secara drastis (Johansson *et al.*, 2000).

Peningkatan tersebut diduga merupakan respon dari munculnya *peroxinectin* yang dihasilkan oleh degranulasi oleh sel semi granular dan sel granular. Produksi sel hyaline dilakukan untuk melakukan fagositosis terhadap antigen. Hemosit disintesa oleh jaringan *hematopoitic* yang merupakan sepasang *epigastric nodule*. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis pasca introduksi β glucan. Jaringan tersebut terletak tepat dibagian dorsal pada lambung bagian depan (*anterior stomach*), tempat sintesa

hemocyanin. Bila β glucan dapat meningkatkan sintesa terhadap haemocyanin, maka secara langsung akan terjadi pula peningkatan hemosit, termasuk produksi sel granular, semi granular dan sel hyalin. Peningkatan sel hyaline memberikan kontribusi yang besar terhadap peningkatan total hemosit (Johansson *et al.*, 2000).

2.7 *Vibrio harveyi*

Hingga saat ini beberapa penyakit yang sering ditemukan pada udang seperti *whitespot* yang menyerang udang putih atau penyakit vibriosis. Penyakit vibriosis dikenal pembudidaya udang sebagai penyakit yang menyerang bagian kulit udang. Penyakit ini disebabkan oleh spesies-spesies dari jenis *vibrio* yang berbeda-beda, dan setiap spesies *vibrio* memiliki intensitas parasitas yang berbeda-beda. Penularan penyakit vibriosis ini tergolong cepat sehingga dapat meningkatkan nilai mortalitas pada suatu tambak. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini dapat menyebabkan kematian pada udang sampai 100% dalam waktu 1-2 hari (Feliatra *et al.*, 2014).

Salah satu spesies bakteri *vibrio* yang sering dijumpai menimbulkan penyakit pada udang yaitu *Vibrio harveyi*, selanjutnya sifat serangan bakteri *vibrio* adalah infeksi sekunder yaitu infeksi terjadi setelah adanya luka atau stress berat.

Ciri-ciri udang yang terserang ditandai dengan gejala klinis dimana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antenna dan kaki renang berwarna merah (Feliatra *et al.*, 2014).

Menurut Taslihan *et al.*, 2004, ambang batas minimal keberadaan bakteri *vibrio* sp. dalam air adalah 10^4 CFU/ml, sedangkan batas minimal bakteri umum di perairan adalah 10^6 CFU/ml. Jika ambang batas ini dilampaui maka kematian massal udang budidaya dalam tambak dapat terjadi. Jenis bakteri ini akan berkembang melimpah jika didukung oleh faktor pendukung utama seperti bahan organik yang tinggi dalam air (Agung, 2007).

2.8 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer Inframerah (FT-IR)

Spektrofotometer inframerah (FTIR) merupakan bagian dari spektrum elektromagnetik antara daerah gelombang cahaya tampak dan gelombang microwave. Penggunaan terbesar terhadap kimia organik adalah panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Frekuensi radiasi IR kurang dari 100 cm^{-1} diabsorpsi dan diubah oleh molekul organik menjadi energi rotasi molekul organik. Serapan ini diukur. Radiasi IR dalam daerah panjang gelombang 10000-100 cm^{-1} diabsorpsi dan diubah oleh sebuah molekul organik ke dalam energi vibrasi molekul. Serapan ini juga dihitung. Tapi, spektrum vibrasi muncul sebagai tanda lebih baik karena sebuah perubahan energi rotasi. Absorpsi frekuensi atau panjang gelombang tergantung pada massa relatif atom, gaya konstan ikatan dan geometri atom (Mukhriani, 2014).

FT-IR (spektrofotometer inframerah) berfungsi untuk mengetahui gugus fungsional dan ikatan yang terdapat dalam suatu senyawa dari bioaktif ekstrak, pada alat spektrofotometer inframerah juga dilengkapi oleh dengan transformasi *fourier* yang berguna untuk mendeteksi dan analisa hasil spektrumnya misalnya jika suatu senyawa memiliki ikatan -OH, maka senyawa tersebut dapat berupa asam karboksilat (RCOOH), alcohol (ROH) atau senyawa fenol (ArOH) (Fessende and Fesseden, 1997). Posisi tanda dalam spektrum IR disajikan dalam jumlah gelombang yang memiliki satuan cm^{-1} . Jenis ikatan yang ditunjukkan pada daerah serapan (Silverstain, 1998).

Menurut Anam et al., (2007), analisa spektrofotometer inframerah dilakukan dengan membandingkan gugus fungsi sampel, pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui.

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Setelah merebaknya isu dunia yaitu sindrom kematian awal (*Early mortality syndrome*, EMS) yang disebabkan oleh penyakit nekrosis akut pada hepatopankreas (*acute hepatopankreas necrosis disease*, AHPND), di Indonesia saat ini juga dikenal penyakit udang yaitu penyakit vibriosis yang berasal dari bakteri kelompok *Vibrionaceae* yang merupakan salah satu pathogen utama pada udang. Beberapa spesies vibrio pathogen telah banyak dilaporkan menyebabkan tingkat kematian yang sangat tinggi di wilayah Asia Tenggara dan Selatan baik segmen pembenihan maupun pembesaran. Beberapa spesies *Vibrio* yang sering dilaporkan yang menyebabkan infeksi vibriosis diantaranya *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. vulnificus* (Bintari et al., 2016).

Upaya alternatif yang tidak menyebabkan terjadinya resistensi dan ramah lingkungan untuk mengatasi ataupun mengurangi penyebab terjadinya vibriosis yang disebabkan oleh salah satu vibrio yaitu *V. harveyi* adalah menggunakan imunostimulan dari rumput laut yang mengandung senyawa aktif seperti polisakarida suflat yang terkandung pada rumput laut *Ulva fasciata* (Tabarsa et al., 2012). Selvin et al. (2011) menambahkan bahwa senyawa aktif yang dihasilkan oleh alga hijau (*Chlorophyta*) dari *Ulva fasciata* dapat meningkatkan sistem pertahanan non-spesifik pada udang untuk melawan serangan pathogen. Dari beberapa jenis *Ulva* sp yang telah diteliti, *Ulva lactuca* belum pernah diteliti lebih lanjut sebagai imunostimulan khususnya pada udang.

3.2 Kerangka Konsep Penelitian

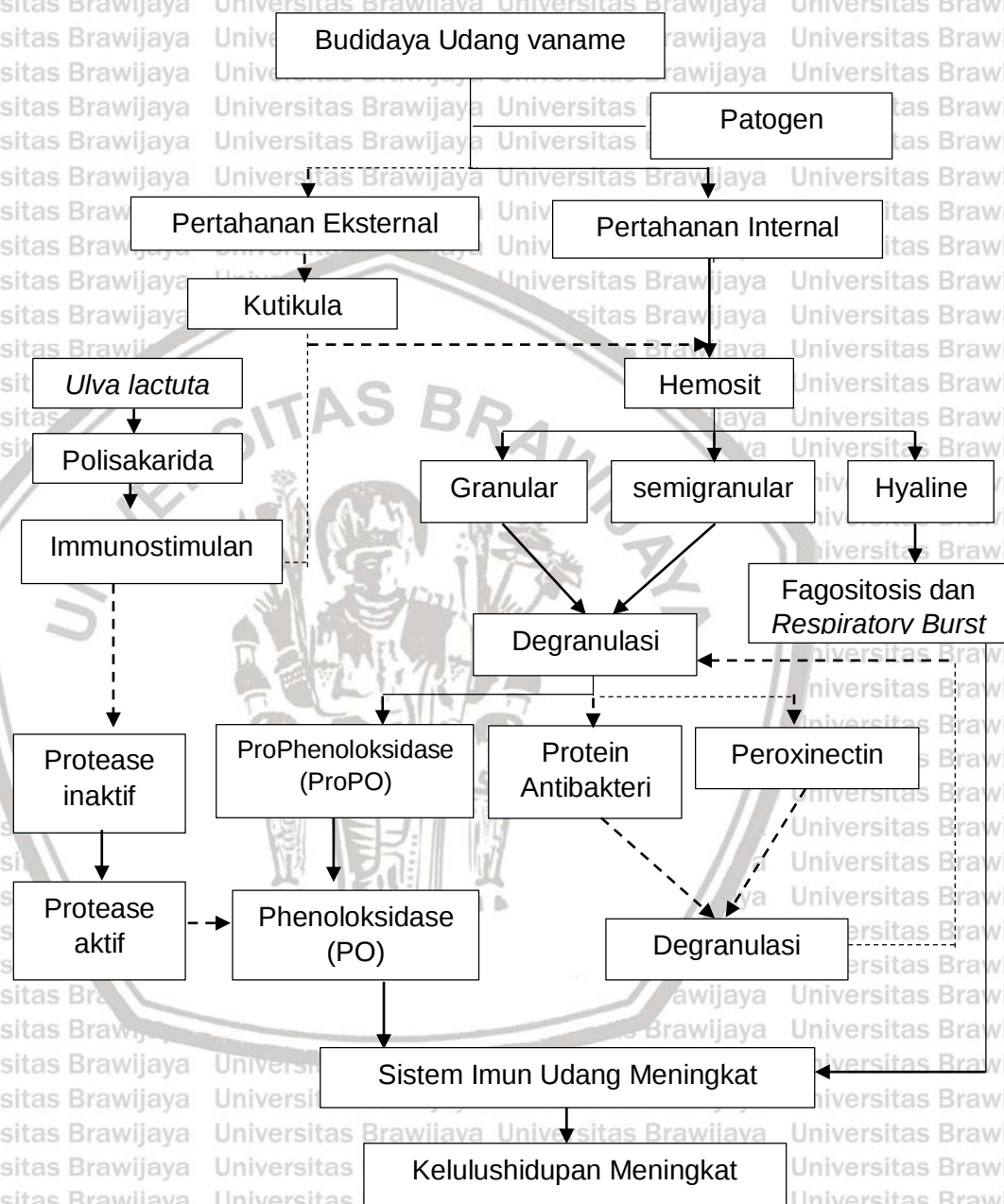
Dasar pemikiran yang mendasari dilakukannya penelitian ini adalah sebagaimana terlihat pada Gambar 6. Pada saat terjadi serangan pathogen, kutikula udang yang keras merupakan pertahanan fisik pertama yang menghambat masuknya pathogen. Apabila pathogen tersebut dapat melewati pertahanan eksternal ini maka pertahanan internal pada tubuh udang akan menjadi pertahanan kedua melalui respon selular dan humoralnya (Van de Braak, 2002).

Hemosit memiliki peranan yang penting dalam sistem pertahanan internal udang. Udang memiliki 3 tipe hemosit, yaitu sel hyaline yang berperan dalam proses fagositosis serta sel granula dan semi granula yang berperan dalam proses aktivitas enzim phenoloksidase, pembentukan substansi antibakteri dan *reactive oxygen* seperti anion superoksida dan hydrogen peroksida.

Substansi tersebut diatas tersimpan pada sel granula dan semi granula dalam keadaan tidak aktif. Untuk mengaktifkannya, diperlukan bahan stimulan yang berasal dari luar tubuh yang disebut imunostimulan. Ketika terdapat imunostimulan yang masuk ke dalam tubuh udang maka hemosit akan meresponnya sebagai bahan asing melalui mekanisme *non self recognition*. Akibat dari pengenalan tersebut, hemosit khususnya sel granula dan semigranula, akan melakukan proses degranulasi untuk mengaktifkan substansi yang berperan dalam sistem pertahanan humoral.

Enzim Phenoloksidase akan teroksidasi menjadi enzim phenoloksidase dengan bantuan enzim protease yang juga diaktifkan akibat adanya imunostimulan tersebut. Peroxinectin yang terdapat pada granula akan memicu *respiratory burst* (RB) sehingga terbentuk *reactive oxygen*. Baik enzim phenoloksidase maupun

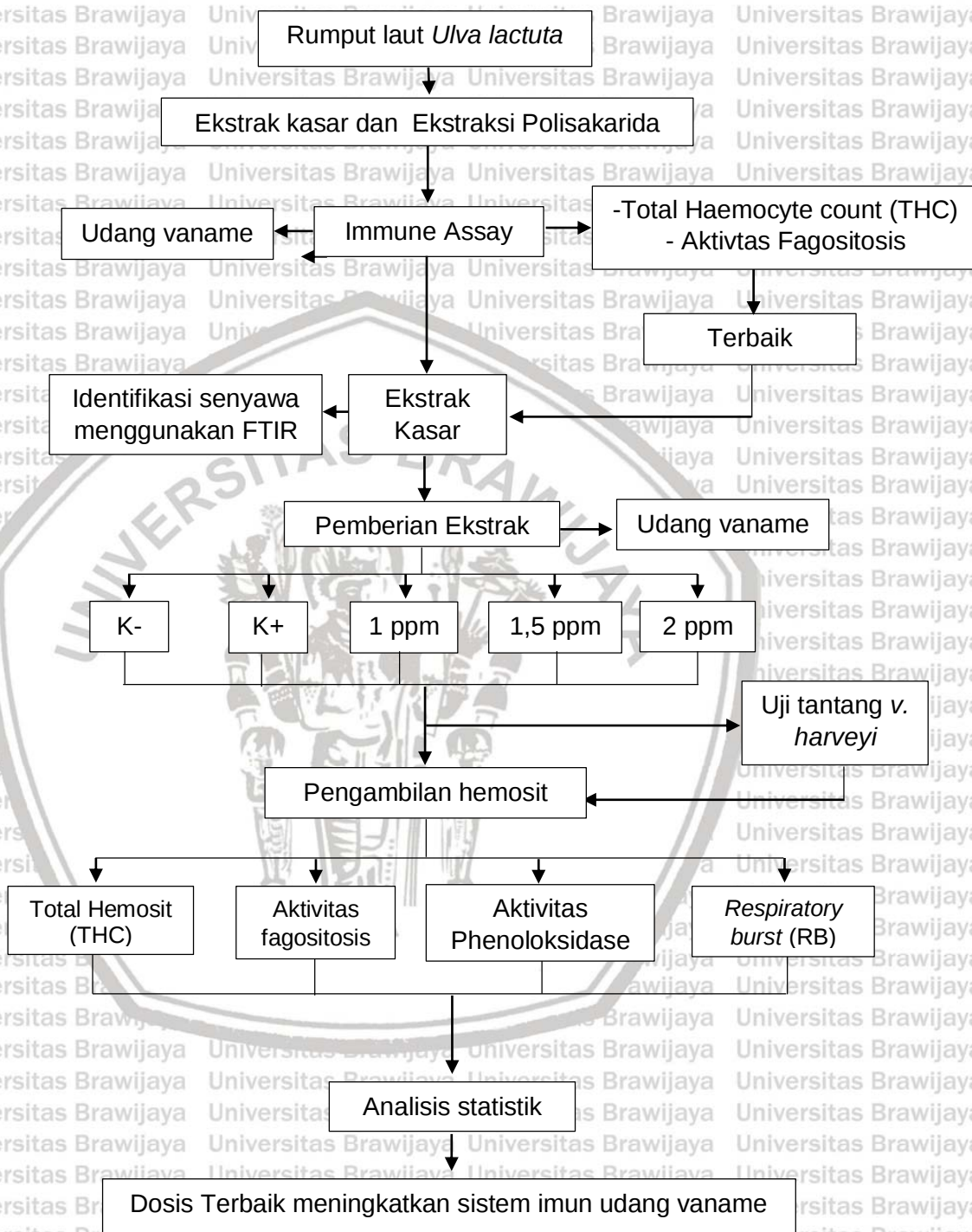
reactive oxygen tersebut akan mendukung proses fagositosis dalam membunuh pathogen yang masuk ke dalam tubuh. Kerangka konsep penelitian ditampilkan pada Gambar 6 dibawah ini:



Gambar 1. Kerangka Konsep Penelitian

3.3 Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional penelitian ini ditampilkan pada Gambar 7.



Gambar 2. Kerangka Operasional Penelitian

3.4 Kebaruan Penelitian

Daftar penelitian terdahulu yang menggunakan ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* terdapat pada Tabel 2.

Tabel 1. Penelitian Terdahulu Yang Menggunakan Ekstrak Rumput Laut *Ulva* sp

No	Penulis/Jurnal	Judul	Hasil
1.	Tabarsa et al. (2017). Journal of food and drug analysis. 1-10	Water-soluble polysaccharides from <i>Ulva intestinalis</i> : molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory	Hasil ekstrak <i>Ulva</i> menunjukkan bahwa kandungan polisakarida yang terdapat pada kandungan senyawa hasil ekstrak <i>Ulva</i> berhasil meningkatkan sel makrofag.
2.	Ghaednia et al. (2011). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 10(4) 616-630	Effect of hot water extract of brown seaweed <i>Sargassum glaucescens</i> via immersion route on immune responses of <i>Fenneropenaeus indicus</i>	Perendaman ekstrak <i>Sargassum galucescens</i> selama 2 jam dengan dosis 300 dan 500 mg/L mampu meningkatkan aktivitas fagositosis.
3.	Castro et al. (2006). Aquaculture. 245:9-20	Stimulation of turbot phagocytes by <i>Ulva rigida</i> C. Agardh polysaccharides	Acid sugar mendominasi dari kandungan polisakarida sulfat hasil ekstrak <i>Ulva rigida</i> yang sangat berperan meningkatkan <i>respiratory burst</i> dan aktivitas fagositosis
4.	Castro et al. (2004). Aquaculture:67-78	Water-soluble seaweed extracts modulate the respitoty burst activity of turbot phagocytes	Hasil ekstrak rumput laut <i>Ulva rigida</i> (polisakarida) mampu meningkatkan <i>respiratory burst</i> dan fagositosis pada ikan Turbot.
5.	Maftuch et al. (2012) Journal of Applied Research:8(2):10 52-1058	Administration of marine algae (<i>Gracilaria verrucosa</i>) immunostimulant enhances some innate immune parameters in black tiger shrimp (<i>Penaeus monodon</i> Fabricus) against <i>Vibrio harveyi</i> infection	Dengan pemberian imunostimulan <i>Gracilaria verrucosa</i> yang optimal untuk meningkatkan jumlah hemosit, kandungan anion peroksida dan aktivitas enzim protease udang windu adalah 2 ppm, kemudian 1,5 ppm dan 1 ppm.

Berdasarkan dari beberapa penelitian diatas menunjukkan bahwa kandungan polisakarida yang terkandung pada rumput laut mampu meningkatkan sistem imun pada ikan dan udang yang ditandai dengan meningkatnya jumlah hemosit, aktivitas fagositosis dan *respiratory burst* (RB). Pada beberapa jenis *Ulva* sp yang telah diteliti juga menunjukkan bahwa kandungan polisakarida pada *Ulva* sp juga memiliki peran yang sama sebagai imunostimulan. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, *Ulva lactuta* belum pernah dilakukan penelitian yang digunakan sebagai imunostimulan, terutama pada udang vaname. Sehingga perlu dilakukan penelitian lanjut, mengenai kandungan polisakarida yang terkandung pada *Ulva lactuta* untuk meningkatkan sistem imun pada udang vaname.

3.5 Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah diduga pemberian dosis ekstrak rumput laut *Ulva lactuta* yang berbeda dapat meningkatkan sistem imun pada udang vaname (*Litopenaeus vanameii*) yang diinfeksi bakteri *V.harveyi*.

3.6 Strategi Publikasi

Publikasi dari hasil penelitian ini telah dipublikasikan pada salah satu jurnal internasional yang bekerja sama dengan Universitas Brawijaya yaitu Research Journal of Life Science (RJLS) pada bulan Agustus 2018.

4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2018 di Laboratorium Budidaya Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang), Laboratorium Agrokimia (Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya), Laboratorium Kimia Organik (Fakultas Sains dan Teknologi (Saintek) Universitas Islam Negeri Malang).

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Udang vaname ukuran 20 gram
- Rumput laut jenis *Ulva lactuta*
- Bakteri *Vibrio harveyi*
- Air laut untuk media pemeliharaan
- Bahan-bahan kimia untuk analisis laboratorium

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

A. Ekstraksi *Ulva lactuta*

- Erlenmeyer 250 mL
- Timbangan digital
- Freezer
- Sentrifuse
- Gelas ukur
- Penyaring vacuum

B. Pengujian Hemosit udang

- Haemocytometer

- Mikroskop cahaya
- Mikropipet
- Syringe 1 mL
- sentrifuse

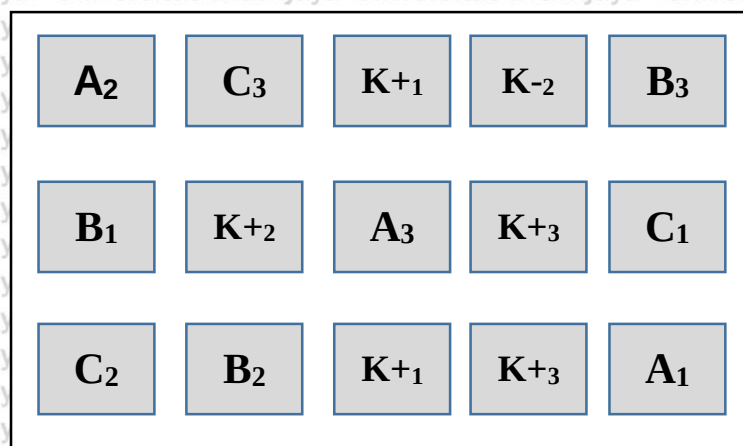
4.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang merupakan salah satu metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Berdasarkan pendapat Atmojo (2011), menyatakan bahwa penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasi satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi. Singarimbun dan Effendi (1983), menambahkan penelitian dengan metode eksperimental biasanya dilakukan di laboratorium karena alat-alat khusus dan lengkap tersedia, untuk mencegah pengaruh dari luar.

4.4 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan dengan 1 faktor pada perlakuan penentuan dosis ekstrak rumput laut *Ulva lactuca* untuk meningkatkan sistem imun pada udang. RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media percobaan yang sama/homogen, sehingga RAL banyak dilaksanakan pada skala laboratorium, serta media tidak mempengaruhi respon yang akan diamati

(Sastrosupadi, 2000). Denah penelitian yang digunakan sebagaimana terlihat pada Gambar 8.



Gambar 1. Denah Penelitian

Keterangan:

- K_{+n} : Kontrol infeksi (tanpa pemberian ekstrak *Ulva lactuta*) pada ulangan ke-n
- K_{-n} : Kontrol tanpa infeksi dan ekstrak pada ulangan ke-n
- A_n : Perlakuan dosis ekstrak *Ulva lactuta* 1 ppm pada ulangan ke-n
- B_n : Perlakuan dosis ekstrak *Ulva lactuta* 1,5 ppm pada ulangan ke-n
- C_n : Perlakuan dosis ekstrak *Ulva lactuta* 2 ppm pada ulangan ke-n

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak *Ulva lactuta* yaitu 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm serta kontrol sebagai pembanding, dimana setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Variabel terikat yang diamati adalah peningkatan total hemosit, diferensial hemosit, aktivitas fagositosis, aktifitas phenoloksidase dan *Respiratory burst*. Pengamatan parameter tersebut dilakukan dalam 4 tahapan yaitu 3 jam (waktu terbaik) pasca pemberian imunostimulan *Ulva lactuta* (sebelum infeksi bakteri *Vibrio harveyi*), 24 jam, 3 hari pasca pemberian ekstrak dan 6 hari pasca infeksi bakteri *Vibrio harveyi* (setelah diberi imunostimulan).

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Penelitian Tahap 1

4.5.1.1 Sampel Rumput Laut *Ulva lactuta*

Sampel rumput laut *Ulva lactuta* dikumpulkan dari sekitar pantai Benoa, Bali. Rumput laut kemudian dicuci menggunakan air laut lalu dibilas air tawar untuk menghilangkan garam, *epiphyte*, mikroorganisme, pasir dan bahan lainnya (Paulert *et al.*, 2007).

4.5.1.2 Ekstraksi Rumput Laut *Ulva lactuta*

Ekstrak Kasar

Rumput laut yang telah dikering-anginkan, dipotong kecil-kecil. Sebanyak 500 gram rumput laut *Ulva lactuta* direbus sampai mendidih dengan 2 liter aquades selama 2 jam, lalu disaring. Ampas direbus kembali, kemudian disaring dan filtratnya digabung dengan hasil ekstraksi pertama. Larutan hasil ekstraksi dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50°C sampai kering. Metode yang digunakan sesuai dengan metode yang telah dilakukan oleh Ridlo dan Pramesti (2009).

Ekstraksi Polisakarida

Ekstraksi polisakarida ini didapatkan dengan melakukan ekstraksi polisakarida rumput laut menggunakan 4 macam pelarut, yaitu air, air panas, H₂SO₄ 0,05% dan NaOH 0,05% (Tabarsa *et al.*, 2018). Pada sampel dilakukan ekstraksi bertingkat untuk mendapatkan rendemen terbesar pada masing-masing pelarut. Sebanyak 2 gram *Ulva lactuta* direndam menggunakan air sebanyak 100 ml selama 1 jam pada suhu 30°C, kemudian disaring. Hasil saringan kemudian disimpan (filtrat 1) dan ampas dari hasil saringan direndam pada pelarut yang kedua yaitu air panas. Pencampuran dan pemanasan dilakukan selama 1 jam pada suhu 100°C, lalu disaring (filtrat 2). Ampas dari filtrat 2 ini kemudian dilanjutkan menggunakan pelarut yang ke 3 yaitu H₂SO₄ 0,05% sebanyak 100 ml.

pencampuran dan pemanasan dilakukan selama 1 jam pada suhu 100°C, kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Ampas dari hasil penyaringan ini kemudian dilanjutkan untuk pelarut yang ke 4 dengan menggunakan NaOH 0,05% sebanyak 100 ml, lalu dicampur dan dipanaskan pada suhu 100°C, lalu disaring.

Filtrat dari hasil penyaringan dari keempat pelarut sebanyak 5 ml dicampurkan dengan methanol 100 ml dan etanol 100 ml dan diendapkan selama 24 jam. Setelah 24 jam kemudian disaring. Fraksinasi yang digunakan pada penelitian ini menggunakan hasil penyaringan filtrat dari pengendapan polisakarida *Ulva lactuta*. Kegiatan penelitian dapat dilihat pada lampiran 1a.

4.5.1.3 Persiapan Hewan Uji

Ukuran udang yang digunakan yaitu berkisar antara 20 gram sebanyak 90 ekor. Kemudian diaklimatisasi selama 24 jam dan dipelihara didalam akuarium dengan ukuran 30x30x60 cm³. Masing-masing akuarium diisi 10 ekor udang yang telah diadaptasikan selama 24 jam pada salinitas 35 ppt sesuai dengan kondisi salinitas pada tambak. Setelah diaklimatisasi, udang direndam ekstrak *Ulva lactuta* selama penelitian (24 jam) dengan 5 ppm dan kontrol sebagai pembanding. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan.

4.5.1.4 Uji Patogenitas *V.harveyi* dengan Uji *Lethal Dossage* 50% (LD₅₀)

Uji LD₅₀ ini digunakan untuk menentukan seberapa padat dan berapa lama bakteri *V.harveyi* dapat membunuh udang yang diuji sebanyak 50% dari jumlah awal. Dimana bakteri *V.harveyi* awal dengan kepadatan 10¹¹ sel/ml (media TSB) diencerkan kedalam media air sebanyak 20 liter/perlakuan, sehingga menjadi kepadatan 10⁵ sel/ml, 10⁶ sel/ml, 10⁷ sel/ml, 10⁸ sel/ml dan 10⁹ sel/ml. konsentrasi diukur berdasarkan kepadatan optikal (*optical density*) dengan menggunakan

spektrofotometer. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus pengenceran, sebagai berikut :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media TSB (sel/ml)

N_2 : kepadatan populasi bakteri yang dicari (sel/ml)

V_1 : Volume bakteri dalam TSB yang dibutuhkan

V_2 : Volume media air dalam wadah perendaman

Kemudian udang vaname sebanyak 10 ekor setiap perlakuan direndam dalam air sebanyak 20 liter dengan kepadatan bakteri 10^5 sel/ml, 10^6 sel/ml, 10^7 sel/ml, 10^8 sel/ml dan 10^9 sel/ml dan diamati selama 24 jam. Hasil uji LD_{50} diketahui berdasarkan hasil uji probit test ditemukan $1,3 \times 10^6$ dibulatkan menjadi kepadatan 10^6 sel/ml. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.5.1.5 Uji Respon Imun

Pada penelitian tahap 1 dilakukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui bahan imunostimulan yang efektif yang digunakan pada penelitian berikutnya. Imunostimulan yang digunakan adalah ekstrak kasar *Ulva lactuta* dan ekstraksi polisakarida *Ulva lactuta*. Untuk mengetahui bahan mana yang paling efektif maka dilakukan pengamatan parameter imun udang vaname yaitu *total haemocyte count* (THC) dan aktivitas fagositosis. Desain penelitian dari uji respon ini menggunakan dua perlakuan (ekstrak kasar dan polisakarida) dan kontrol sebagai pembandingan, serta ulangan sebanyak 3 kali. Pengambilan hemolim dilakukan pada awal pemeliharaan, 3 jam setelah pemberian imunostimulan dan 24 jam setelah pemberian imunostimulan, untuk mengetahui fluktuasi peningkatan dari parameter imun udang vaname tersebut.

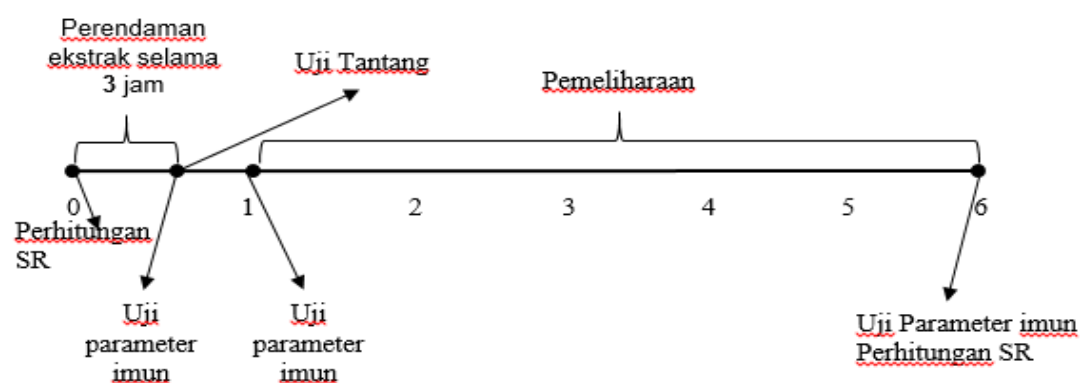
4.5.2 Penelitian Tahap 2

4.5.2.1 Persiapan Hewan Uji

Udang vaname yang digunakan berasal dari Tambak di kabupaten Situbondo. Ukuran udang yang digunakan yaitu berkisar antara 20 gram sebanyak 150 ekor. Kemudian diaklimatisasi selama 24 jam dan dipelihara didalam akuarium dengan ukuran 30x30x60 cm³. Masing-masing akuarium diisi 10 ekor udang yang telah diadaptasikan selama 24 jam. Setelah diaklimatisasi, udang diberikan ekstrak *Ulva lactuta* selama penelitian dengan konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm dan kontrol sebagai pembanding. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan.

4.5.2.2 Parameter sistem imun

Skema bagan jadwal sampling parameter uji selama penelitian dari kelulusanhidupan awal, kualitas air, uji tantang, pengambilan hemolim maupun hingga kelulusanhidupan akhir ditampilkan pada Gambar 9 dibawah ini serta dokumentasi pengamatan dan pengukuran parameter imun terdapat pada Lampiran 1b:



Gambar 2. Skema Bagan Jadwal Sampling Pengambilan Parameter Uji Selama Penelitian

Total Hemosit

Total hemosit dihitung sesuai dengan metode Liu dan Chen (2004).

Pengambilan hemolim udang dilakukan pada bagian pangkal pleopod pada segmen abdominal dekat lubang genital dengan menggunakan syringe 1mL yang telah diberi larutan antikoagulan (10% sodium citrate, pH 7,2). Selanjutnya ditempat dalam mikrotube steril dan disimpan dalam *coolbox*. Perhitungan jumlah total hemosit (THC), dilakukan dengan menggunakan haemocytometer:

$$\text{THC} = \text{Rata - rata } \sum \text{Sel terhitung} \times \frac{1}{\text{Volume kotak besar}} \times \text{Fp} \times 1000$$

Aktivitas Fagositosis

Hemolim udang dimasukkan ke dalam efendrof sebanyak 0,1 mL dan dicampur secara merata dengan 25 μL bakteri *V.harveyi* dan diinkubasi selama 20 menit. Kemudian sebanyak 5 mL ditetaskan pada gelas objek dan dibuat preparat ulas. Selanjutnya difiksasi dengan methanol 100% selama 5 menit dan diwarnai dengan giemsa (10%) selama 15 menit. Preparat kemudian dialiri air secara perlahan selama kurang lebih 5 menit untuk membuang sisa warna giemsa. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Aktivitas fagositosis dihitung berdasarkan persentase sel-sel yang menunjukkan proses fagositosis (Cheng et al., 2005).

$$\text{Aktivitas fagositosis} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit yang melakukan fagositosis}}{\text{Jumlah Sel Fagosit}} \times 100\%$$

Aktifitas Phenoloxidase (PO)

Untuk mengukur aktivitas phenoloxidase secara spektrofotometer oleh perekaman pembentukan dopachrome yang dihasilkan dari L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Liu dan Chen, 2004), hemolim yang diencerkan disentrifugasi pada 700 x g pada 4 °C selama 4 menit, cairan supernatant dibuang dan pellet dibilas, disuspensikan kembali secara perlahan

dalam cacodylate-citrate buffer (0.01 M Sodium cacodylate, 0.45 M sodium chloride, 0.10 M trisodium citrate, pH 7.0) dan disentrifugasi ulang. Pellet kemudian di *resuspended* dengan 200 μ L aliquot diinkubasi dengan 50mL trypsin (1 mg/mL) sebagai aktivator selama 10 menit pada suhu 25-26 °C, 50 mL L-DOPA ditambahkan, diikuti oleh 800 mL cacodylate buffer 5 menit kemudian. *Optical density* aktivitas PO udang diekspresikan sebagai pembentukan dopachrome dalam 50 mL hemolim.

Respiratory Burst (RB)

Respiratory burst dari hemosit diukur berdasarkan reduksi NBT (*nitroblue tetrazolium*) sebagai ukuran *superoxideanion* (O_2^-) (Cheng *et al.*, 2004). Sebanyak 50mL campuran hemolim-antikoagulan diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan supernatan dibuang. Ditambahkan 100 mL NBT dalam larutan HBSS (*hank's buffered salt solution* dengan konsentrasi 0,3%) dan didiamkan selama 2 jam pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan 100 mL metanol absolut untuk selanjutnya disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit (supernatan dibuang). Pellet yang terbentuk kemudian dibilas sebanyak 2 kali metanol 70%. Selanjutnya 120 mL KOH 2M dan 140 mL DMSO (*dimethylsulfoxide*) ditambahkan untuk melarutkan pellet. Pellet yang larut kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* untuk diukur densitas optikal (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm. RB dinyatakan sebagai reduksi NBT per 10 mL hemolim.

4.5.2.3 Kualitas Air

Pengamatan dan pengukuran kualitas air selama penelitian dilakukan setiap hari. Pengambilan data kualitas air dilakukan pada pagi hari (07.00 WIB) dan sore hari (15.00 WIB). Parameter kualitas air yang diambil adalah suhu

dengan menggunakan thermometer raksa, DO (*Dissolved oxygen*) menggunakan DO meter, pH menggunakan pH meter dan salinitas menggunakan refraktometer.

4.5.2.4 Kelulushidupan (SR)

Kelulushidupan dihitung sebelum diuji tantang dan setelah diuji tantang dengan menggunakan rumus Effendi (1997)

$$\text{Kelulushidupan (SR)} = \frac{\text{Jumlah Populasi akhir}}{\text{Jumlah populasi awal}} \times 100 \text{ dalam satuan persen (\%)}$$

4.5.3 Analisis Data

4.5.3.1 Analisis Data Respon Imun

Data total hemosit, diferensial hemosit, aktivitas fagositosis, aktivitas phenoloksidase dan respiratory burst dilakukan analisis data dengan menggunakan dua metode yaitu analisis ragam (ANOVA) pada selang kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT menggunakan software SPSS untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh non spesifik pada udang vaname (*Litopenaeus vanamei*).

4.5.3.2 Analisis Kelulushidupan Udang vaname (*Litopenaeus vanamei*)

Data kelulushidupan udang vaname (*Litopenaeus vanamei*) yang diperoleh, dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Kecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan.

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penelitian Tahap 1

5.1.1 Ekstraksi Rumput Laut *Ulva lactuta*

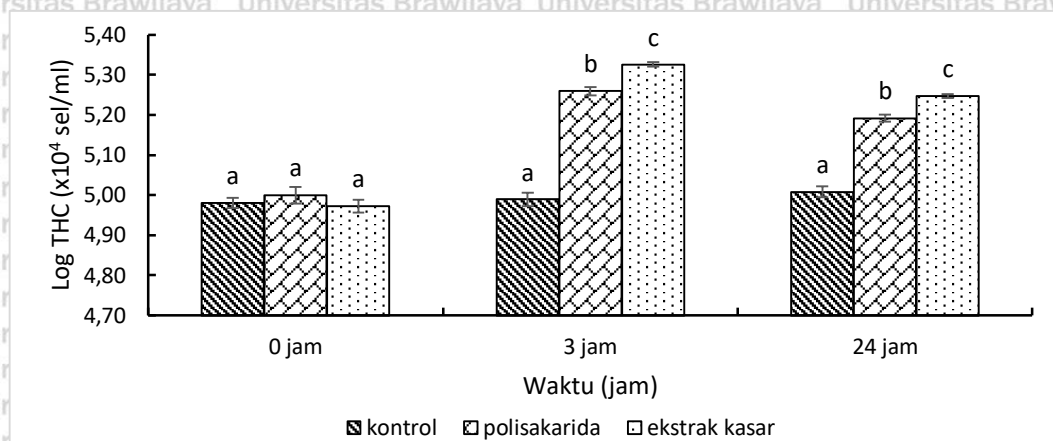
Hasil penelitian penelitian tahap 1 dari hasil ekstraksi rumput laut baik ekstrak kasar maupun menggunakan ekstraksi polisakarida didapatkan rendemen (%). Hasil ekstrak kasar rumput laut didapatkan rendemen sebesar 76,5% (382,gr) dari jumlah sampel sebanyak 500 gr, sedangkan hasil ekstraksi polisakarida didapatkan filtrat sebanyak 0,98 gr atau rendemen sebesar 49% dari jumlah sampel sebanyak 2 gr. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar mendapatkan hasil yang lebih banyak dibandingkan ekstraksi polisakarida, hal ini kemungkinan perbedaan jenis pelarut yang digunakan. Pada ekstrak kasar hanya menggunakan air sebagai pelarut sedangkan ekstraksi polisakarida menggunakan pelarut H_2SO_4 dan $NaOH$, dan dilakukan pemanasan berkali-kali.

5.1.2 Uji Respon Imun

Pengamatan uji respon imun udang dilakukan untuk mengetahui perlakuan yang digunakan pada penelitian tahap berikutnya. Ekstrak kasar dan fraksinasi polisakarida rumput laut *Ulva lactuta* merupakan bahan aktif senyawa imunostimulan yang digunakan pada penelitian tahap pertama ini. Nilai yang menunjukkan paling baik akan digunakan pada penelitian berikutnya. Sistem pertahanan tubuh non spesifik udang vaname terhadap aplikasi imunostimulan dari rumput laut ditunjukkan oleh gambaran hemosit, yaitu total hemosit dan aktivitas fagositosis. Pengamatan *total haemocyte count* (THC) dan aktivitas fagositosis dilakukan pada awal (0 jam), 3 jam dan 24 jam pasca pemberian imunostimulan.

5.1.3.1 Total Haemocyte Count (THC)

Adapun data perhitungan total hemosit udang selama penelitian disajikan melalui grafik pada Gambar 10 sebagai berikut.



Gambar 1. Hasil Pengamatan THC

Berdasarkan Gambar 10. Menunjukkan pada bahwa pada awal pengamatan memiliki nilai THC yang sama. Setelah diberi imunostimulan melalui pemberian pada media pemeliharaan selama 3 jam menunjukkan ekstrak kasar memiliki nilai THC yang paling tinggi dari $4,97 \pm 0,02 (\times 10^4)$ sel/ml menjadi $5,33 \pm 0,01 (\times 10^4)$ sel/ml atau meningkatkan THC sebesar 6,75% dan berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan pemberian imunostimulan menggunakan polisakarida ($5,26 \pm 0,01 (\times 10^4)$ sel/ml). Ekstrak polisakarida hanya mampu meningkatkan nilai THC sebesar 4,9% setelah pemberian imunostimulan. Hal ini menjelaskan bahwa pemberian imunostimulan ekstrak kasar mampu memberi efek yang baik kelangsungan hidup udang, yang berkaitan dengan ketahanan tubuh udang. Selain itu nilai THC yang tinggi dapat didukung oleh kondisi udang yang sehat dan tidak stress, sehingga pemberian imunostimulan dengan cara pemberian pada media pemeliharaan bereaksi dengan baik bagi tubuh udang.

Setelah 24 jam pasca pemberian imunostimulan kemudian dilakukan pengamatan THC, untuk mengetahui fluktuasi nilai THC. THC menunjukkan mengalami penurunan pada semua perlakuan. Pemberian imunostimulan ekstrak

kasar memiliki nilai THC yang tertinggi ($5,25 \pm 0,00 \times 10^4$ sel/ml) meskipun mengalami penurunan dan berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap perlakuan polisakarida ($5,19 \pm 0,01 \times 10^4$ sel/ml) dan kontrol. Hal ini memungkinkan kondisi ketahanan tubuh udang akan kembali seperti kontrol atau bahkan lebih rendah. Hal ini sesuai dengan pola reaksi respon imun yang dilaporkan oleh Novriadi (2015), bahwa ketahanan tubuh alami udang akan mengalami peningkatan setelah pemberian imunostimulan dan akan kembali mengalami penurunan. Berdasarkan hasil THC tersebut didapatkan bahwa perlakuan yang terbaik adalah menggunakan ekstrak kasar setelah dilakukan pemberian selama 3 jam dengan nilai THC $5,33 \pm 0,01 \times 10^4$ sel/ml ($p < 0,05$), data hasil pengamatan dapat dilihat pada Lampiran 3.

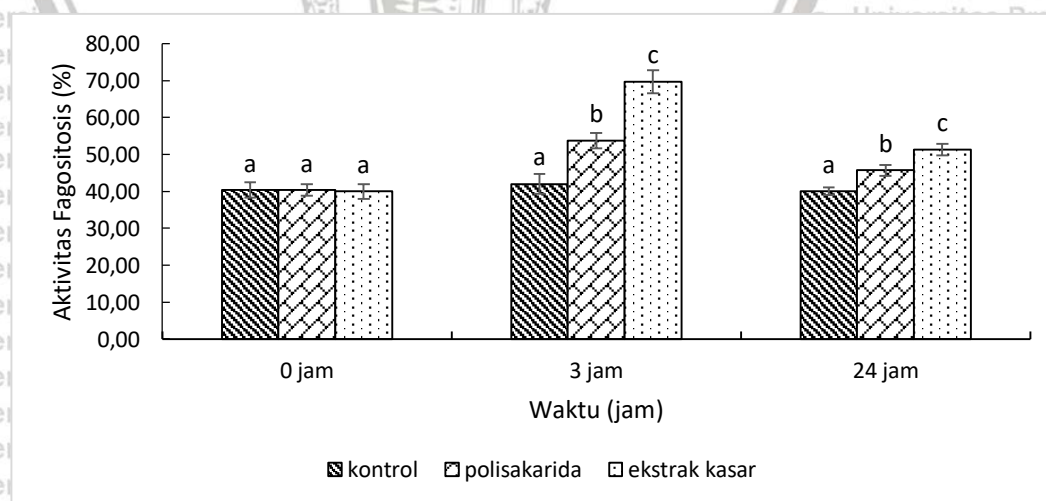
Berdasarkan Gambar 10 menunjukkan bahwa ekstrak kasar lebih efektif meningkatkan THC dibandingkan polisakarida, hal tersebut disebabkan oleh kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak kasar lebih baik dalam meningkatkan sistem imun udang dibandingkan polisakarida. Hal ini disebabkan kemungkinan adanya senyawa yang hilang pada saat dilakukan fraksinasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Basir *et al.*, (2017) menyatakan bahwa hasil dari fraksinasi memungkinkan ada senyawa yang terpisah melalui penguapan dengan pelarut yang digunakan, dimana memiliki efek sinergitas terhadap senyawa lainnya yang berfungsi sebagai imunostimulan. Prasetyaningsih dan Rahardjo, (2018) menambahkan bahwa karena ekstrak kasar masih mengandung seluruh bahan organik dan bahan-bahan lain yang terekstrak, sedangkan hasil fraksinasi hanya mengandung beberapa senyawa aktif saja.

Hemosit merupakan salah satu bentuk pertahanan tubuh secara seluler. Hemosit mampu mematikan agen penyebab infeksi melalui sintesis dan eksositosis molekul bioaktif protein mikrobisidal (Smith *et al.*, 2003). Faktor-faktor imunoreaktif seperti peroxinextin, peptide antibakteri dan clotting components

disimpan dalam hemosti, sehingga peningkatan jumlah hemosit merupakan ukuran kemampuan suatu zat untuk menstimulasi sistem pertahanan tubuh udang. Hemosit disintesis oleh jaringan hematopoietic yang merupakan sepasang jaringan epigastric. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis setelah introduksi imunostimulan, jaringan ini terletak tepat dibagian dorsal pada lambung bagian depan (anterior stomach), yang merupakan tempat sintesa hemocyanin. Bila imunostimulan dapat meningkatkan hemocyanin, maka secara otomatis hemosit akan mengalami peningkatan (Effendi *et al.*, 2004).

5.1.3.2 Aktivitas Fagositosis

Berdasarkan Gambar 11 diketahui bahwa hasil aktivitas fagositosis menunjukkan setelah 3 jam pemberian imunostimulan perlakuan ekstrak kasar berbeda signifikan terhadap perlakuan polisakarida ($p < 0,05$). Namun setelah 24 jam pasca pemberian imunostimulan pada perlakuan ekstrak kasar menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas fagositosis. Pada 24 jam pasca pemberian imunostimulan ekstrak kasar menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan polisakarida ($p < 0,05$). Adapun hasil pengamatan aktivitas fagositosis ditampilkan pada Gambar 11 sebagai berikut :



Gambar 2. Hasil Pengamatan Aktivitas Fagositosis

Berdasarkan Gambar 11, setelah pemberian imunostimulan pada jam ke-3, ekstrak kasar meningkatkan nilai fagositosis paling besar dari $40,00 \pm 2,00\%$ menjadi $69,67 \pm 3,06\%$ atau sel fagosit mengalami peningkatan sebesar $42,5\%$ sebelum pemberian ekstrak *Ulva lactuca*. Sedangkan polisakarida hanya mampu meningkatkan sel fagosit sebesar $24,8\%$ dari $40,33 \pm 1,53\%$ menjadi $53,67 \pm 2,08\%$. Setelah 24 jam pasca pemberian imunostimulan, terlihat semua perlakuan mengalami penurunan. Ekstrak kasar menunjukkan hasil yang lebih baik untuk mempertahankan nilai fagositosis sebesar $51,33 \pm 1,53\%$, dalam hal ini ekstrak kasar mampu mempertahankan sel fagosit sebesar 22% setelah 24 jam. Sedangkan polisakarida menunjukkan nilai fagositosis lebih rendah sebesar $45,67 \pm 1,53\%$ atau hanya mampu mempertahankan sel fagosit sebesar $12,2\%$ setelah 24 jam pemberian imunostimulan.

Aktivitas fagositosis mengalami peningkatan setelah pemberian imunostimulan. Salah satu respon imun seluler pada udang dalam menanggapi benda asing adalah mekanisme fagositosis. Penurunan tingkat aktivitas fagositosis dapat disebabkan oleh faktor internal udang seperti kesehatan udang. Pope *et al.*, (2011), melaporkan bahwa perubahan nilai aktivitas fagositosis berkaitan dengan adanya pemberian vaksinasi atau imunostimulan karena hemolim memiliki aktivitas perlawanan terhadap benda asing secara alami. Hasil pengamatan selama penelitian telah disajikan pada Lampiran 3.

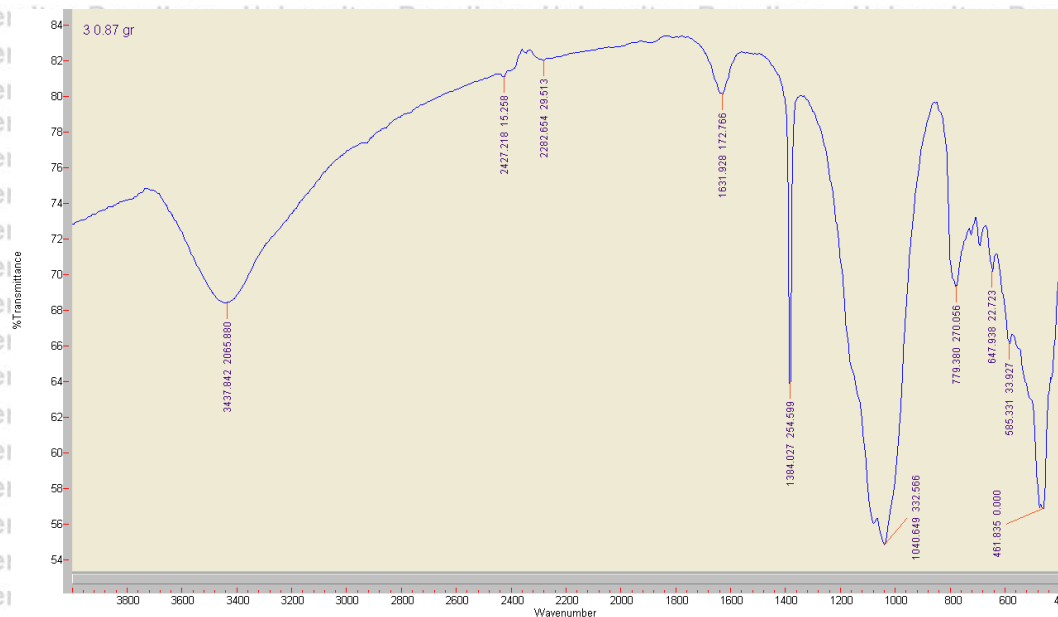
Pengukuran aktivitas fagositosis bertujuan untuk mengetahui tingkat fagositosis yang terjadi melalui beberapa perlakuan yang diberikan. Albores *et al.*, (1998) menyatakan bahwa masuknya komponen microbial di dalam tubuh dapat mengaktifasi respon pertahanan tubuh secara seluler, hal dapat diamati melalui aktivitas fagositosis yang mana merupakan aktivitas utama dalam proses

pertahanan tubuh udang terhadap infeksi benda asing. Aktivitas fagositosis merupakan salah satu cara yang sangat penting dalam mengendalikan dan menghancurkan partikel asing. Proses pertahanan melalui fagositosis ini dibagi menjadi beberapa proses yaitu kemotaksis, *recognition* dan *internalization* (Bachere, 2000). Menurut Smith *et al.*, (2003), hemosit melakukan *inflammatory-type reaction* seperti fagositosis, *haemocyte clumping*, produksi metabolit yang reaktif terhadap oksigen dan pelepasan mikrobisidal protein.

5.1.3 Identifikasi Senyawa Rumput Laut

Berdasarkan hasil penelitian tahap 1 ekstrak kasar menunjukkan peningkatan nilai total hemosit dan aktivitas fagositosis yang paling tinggi atau berbeda signifikan dengan ekstraksi polisakarida setelah pemberian imunostimulan selama 3 jam. Hasil pengamatan total hemosit ekstrak kasar sebesar $5,33 \pm 0,01$ ($\times 10^4$) sel/ml dan ekstraksi polisakarida sebesar $5,26 \pm 0,01$ ($\times 10^4$) sel/ml dan aktivitas fagositosis pada ekstrak kasar sebesar $69,67 \pm 3,06\%$ dan ekstraksi polisakarida sebesar $53,67 \pm 2,08\%$. Maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar mampu meningkatkan nilai hemosit dan aktivitas fagositosis lebih baik.

Untuk mengetahui kandungan senyawa dari ekstrak kasar *Ulva lactuta* ini maka dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) pada panjang gelombang $4000-500 \text{ cm}^{-1}$. Uji FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi sehingga dapat dicari senyawa yang tergolong dalam gugus fungsi tertentu. Identifikasi ini bertujuan untuk memberikan informasi bahwa terdapat beberapa senyawa yang terkandung pada ekstrak kasar *Ulva lactuta* yang berfungsi sebagai imunostimulan pada udang vaname. Adapun hasil uji FTIR dapat dilihat pada Gambar 12 sebagai berikut:



Gambar 3. Gugus Fungsi Senyawa Pada Ekstrak Kasar *Ulva lactuta* melalui uji FTIR dengan panjang gelombang 4000-500 cm^{-1}

Berdasarkan grafik diatas menunjukkan kandungan senyawa kimia yang terbaca melalui gugus fungsinya antara lain penyerapan panjang gelombang $3437,042 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan hidroksilat (-OH) dan ditunjang dengan adanya vibrasi tekuk C-O alkohol pada gelombang $1040,649 \text{ cm}^{-1}$. Kedua serapan tersebut mengindikasikan adanya gugus OH alkohol yang terikat pada atom karbon (Ekawati *et al.*, 2017). Pada puncak $1631,928 \text{ cm}^{-1}$ merupakan uluran vibrasi -C-O dari asam uronat dan xylose (Robic *et al.*, 2009), panjang gelombang ini hampir mendekati dengan panjang gelombang hasil uji FTIR pada *Gracillaria* sp yaitu 1644 cm^{-1} (Malle *et al.*, 2014). Sependapat dengan Ale, *et al.*, (2011) menambahkan bahwa asam uronat tersebut merupakan salah satu komponen sulfat polisakarida serapan panjang gelombang pada $1384,027 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan alkil, serta pada serapan panjang gelombang $1200-800 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan *fingerpint* dari serapan ikatan polisakarida. Hal ini sependapat dengan Sandapare *et al.*, (2017) menyatakan hasil identifikasi FTIR pada rumput laut *Sargassum duplicatum* menunjukkan serapan pada 3419 cm^{-1} (-OH), ikatan polisakarida pada serapan 1249 cm^{-1} (S=O) yang didukung oleh

serapan 875 cm^{-1} dan 785 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan adanya kesamaan kandungan dan serapan frekuensi pada ekstrak kasar rumput laut *Sargassum duplicatum*. Berdasarkan panjang gelombang serapan dari ikatan polisakarida tersebut, sesuai penelitian yang dilakukan oleh Robic *et al.*, (2009) melakukan identifikasi senyawa polisakarida yang terkandung pada rumput laut *Ulva* spp. menggunakan FTIR dan *Chemotrics* bahwa terdapat dua utam penyusun gula yaitu rhamnase dan asam glukuronat. Frekuensi tersebut dapat dilihat gugus fungsinya berdasarkan karakterisasi Sivakumar *et al.*, (2014) seperti yang terlihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Karakterisasi Panjang Gelombang Gugus Fungsi Ekstrak *Ulva lactuta*

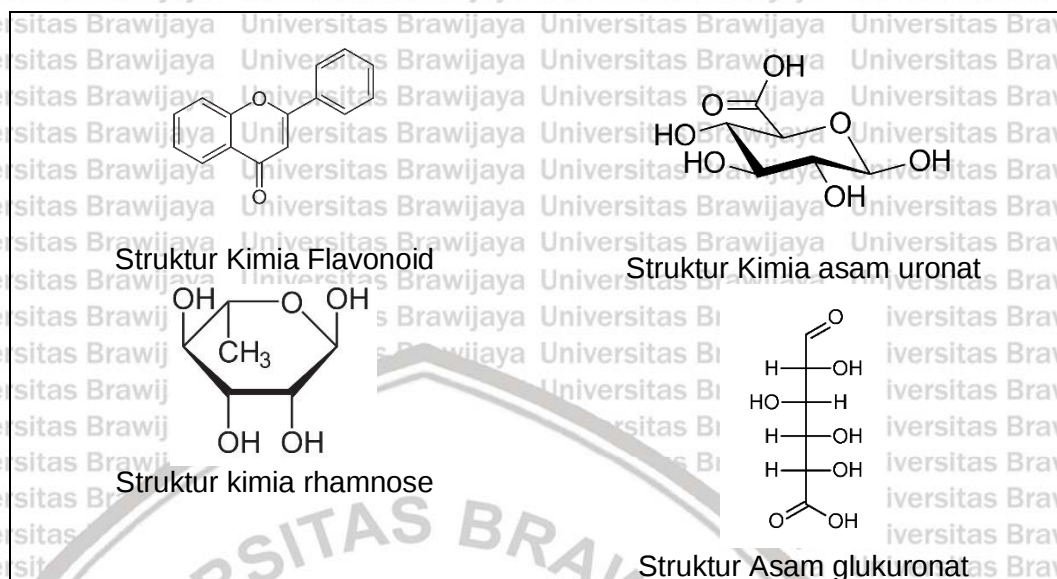
Frekuensi Pita Serapan ekstrak rumput laut <i>Ulva lactuta</i> (cm^{-1})	Gugus Fungsi	Kelompok Fungsional	Frekuensi pita serapan (Sivakumar <i>et al.</i> , 2014)
3437	-OH	Alkohol, Fenol, Asam Karboksilat	3300-3500
1631	C-H alifatik	Alkana	1600-1750
1384	-CH ₃ (bending)	Alkil	1370-1465
1200-800	Ikatan Polisakarida	Aromatik	1200-800

Berdasarkan data hasil identifikasi FTIR menunjukkan adanya kandungan senyawa fenolik (gugus -OH), C-H alifatik, C-O alkohol yang mana gugus fungsi ini merupakan gugus fungsi yang dimiliki senyawa flavonoid (Sastromidjojo, 1996).

Fenolik memiliki cincin aromatik satu atau lebih gugus hidroksil (-OH) dan gugus-gugus lain penyertainya. Ribuan senyawa fenolik yang telah diketahui strukturnya antara lain flavonoid, fenol monosiklik, polifenol, kuinon fenolik dan tannin.

Berdasarkan hasil identifikasi FTIR yang telah dilakukan pada penelitian Radhika dan Mohaiden (2015) bahwa pada ekstrak *Ulva lactuta* terdapat senyawa fenolik pada panjang serapan $3406,60\text{ cm}^{-1}$. Preethi *et al.*, (2011) menyatakan kandungan aktif yang berperan dalam peningkatan sistem imun adalah flavonoid, steroid dan saponin. Middleton *et al.*, (2000) menambahkan senyawa flavonoid dan saponin mampu meningkatkan sistem imun dengan mengaktifasi makrofag sehingga

meningkatkan pula fagositosis. Struktur kimia yang terkandung pada *Ulva lactuta* dapat dilihat pada Gambar 13 berikut:



Gambar 4. Struktur Kimia pada *Ulva Lactuta*

Salah satu bahan yang digunakan sebagai imunostimulan adalah senyawa polisakarida (Sakai, 1999). Polisakarida adalah klasifikasi dari karbohidrat yang merupakan gabungan molekul-molekul monosakarida yang terbentuk oleh lebih dari 6 molekul monosakarida, dan senyawa ini dapat dihidrolisis kembali menjadi banyak molekul monosakarida. Senyawa polisakarida memiliki kemampuan untuk menstimulasi sistem ketahanan tubuh udang, dimana pemberian polisakarida dapat meningkatkan imunitas tubuh udang yang ditandai dengan peningkatan total hemosit udang (Manilal *et al.*, 2009).

5.2 Penelitian Tahap 2

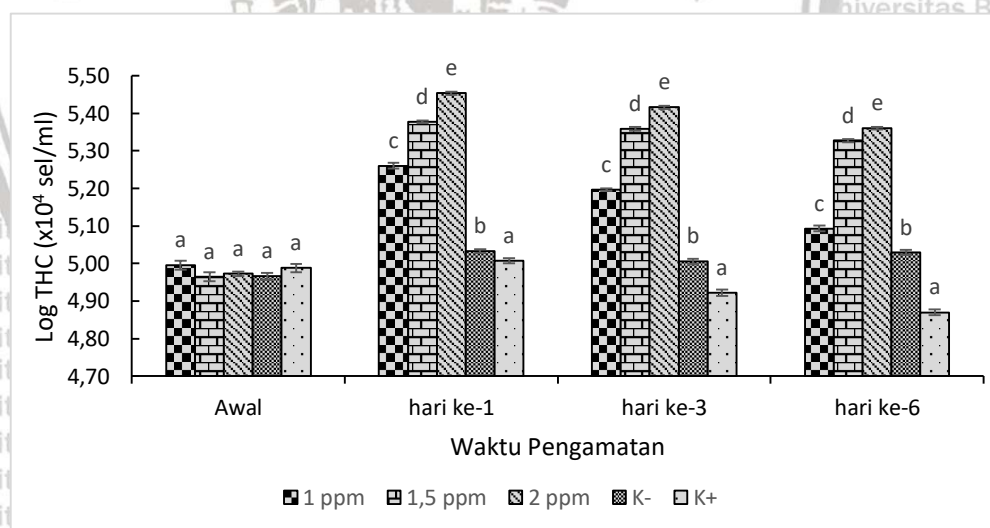
Penelitian tahap 2 bertujuan untuk mengetahui dosis terbaik untuk meningkatkan sistem imun udang vaname yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* dengan menggunakan imunostimulan. Imunostimulan yang digunakan yaitu ekstrak kasar *Ulva lactuta*. Pemilihan ekstrak kasar sebagai imunostimulan pada penelitian tahap 2 berdasarkan hasil penelitian tahap 1 dimana ekstrak kasar paling efektif meningkatkan hemosit dan aktivitas fagositosis. Pada penelitian

tahap 2, pengamatan dilakukan selama 6 hari. Pengamatan parameter imun dilakukan sebanyak 4 kali, yaitu pada awal pemeliharaan (sebelum infeksi dan pemberian imunostimulan), hari ke-1 setelah pemberian imunostimulan dan infeksi *vibrio harveyi*, 3 dan 6 hari setelah pemberian imunostimulan dan infeksi *vibrio harveyi*. Dosis yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Maftuch *et al.*, (2012) yaitu 1 ppm, 1,5, dan 2 ppm.

5.2.1 Respon Imun

5.2.1.1 Total Haemocyte Count (THC)

Perhitungan jumlah hemosit dilakukan dalam 4 tahapan yaitu sebelum dilakukan pemberian imunostimulan, hari ke-1 pasca pemberian imunostimulan, 3 hari dan 6 hari pasca pemberian imunostimulan dan infeksi bakteri. Adapun data perhitungan total hemosit udang selama penelitian disajikan pada Gambar 14 sebagai berikut:



Gambar 5. Pengamatan THC selama Penelitian

Berdasarkan grafik diatas menunjukkan bahwa setelah pemberian ekstrak kasar pada hari ke-1 menunjukkan terjadinya peningkatan THC pada semua perlakuan kecuali K+. pada waktu pengamatan hari ke-1 perlakuan 2 ppm menunjukkan nilai THC yang paling tinggi dan berbeda signifikan ($p < 0,05$)

terhadap semua perlakuan. Nilai THC pada perlakuan 2 ppm pada hari ke-1 meningkat menjadi $5,45 \pm 0,004$ ($\times 10^4$) sel/ml atau mampu meningkatkan THC yang paling tinggi sebesar 8%, kemudian 1,5 ppm meningkatkan THC menjadi $5,333 \pm 0,00$ ($\times 10^4$) sel/ml dalam hal ini mampu dengan konsentrasi 1,5 ppm mampu meningkatkan THC sebesar 7,4% dan 1 ppm hanya meningkat THC menjadi $5,206 \pm 0,01$ ($\times 10^4$) sel/ml atau hanya mampu meningkatkan THC sebesar 4,8% apabila diberi ekstrak *Ulva lactuta* 1 ppm dibandingkan dengan K+. Hal ini diindikasikan bahwa setelah pemberian imunostimulan mampu menstimulasi senyawa aktif pada ekstrak rumput laut menjadikan sistem pertahanan tubuh udang menjadi meningkat.

Pada hari ke-3, setelah infeksi dan pemberian imunostimulan, THC mengalami penurunan pada semua perlakuan. Hal ini diindikasikan karena adanya upaya pertahanan pada tubuh udang. Pada akhir pengamatan di hari ke-6 pemberian imunostimulan menunjukkan penurunan THC pada semua perlakuan. Pada perlakuan 2 ppm menunjukkan mampu mempertahankan nilai THC yang paling tinggi yaitu sebesar $5,36 \pm 0,00$ ($\times 10^4$) sel/ml atau sebesar 9,2% jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif. Sedangkan perlakuan 1,5 ppm menunjukkan nilai THC sebesar $5,32 \pm 0,00$ ($\times 10^4$) sel/ml dan 1 ppm sebesar $5,09 \pm 0,01$ ($\times 10^4$) sel/ml. Berdasarkan data diatas menunjukkan bahwa perlakuan 2 ppm berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan.

Berdasarkan hasil penelitian pada THC mengalami peningkatan yang signifikan setelah dilakukan pemberian ekstrak rumput laut *Ulva lactuta*. Perlakuan 2 ppm selama pengamatan menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan dan kontrol. Adapun data hasil perhitungan THC dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Ulva lactuta* dapat meningkatkan total hemosit udang. Hemosit merupakan sel yang memainkan peran sentral dalam pertahanan kekebalan krustasea, karena

berperan dalam respon imun seluler maupun humoral (Xu et al., 2014). Perubahan jumlah hemosit merupakan salah satu indikator stress dan status kesehatan pada udang. Selain itu, hemosit juga terlibat dalam sintesis dan pelepasan molekul penting, seperti α -2-macroglobulin (α 2M), aglutinin dan peptide antibakteri sebagai reaksi pertahanan tubuh krustasea (Rodriguez and Moullac 2000).

Hemosit disintesis oleh jaringan *hematopoietic* yang merupakan sepasang *epigastric 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 (Effendy et al., 2004).

Peningkatan total hemosit penelitian tahap dua terjadi pada udang yang diberi ekstrak pada semua perlakuan, peningkatan ini signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak *Ulva lactata* mampu merangsang pembentukan sel-sel hemosit. Peningkatan total hemosit ini mengindikasikan bahwa meningkatnya reaksi pertahanan tubuh karena adanya partikel asing yang masuk kedalam tubuh udang. Partikel asing yang masuk ke dalam tubuh udang, akan dikenali oleh reseptor sel hemosit hingga menghasilkan respons seluler seperti *intercellular signaling cascade*, fagositosis, enkapsulasi, dan agregasi nodular (Rodriguez dan Moullac 2000). Johansson et al., (2000) menambahkan bahwa hemosit udang memegang peranan penting dalam respon imun diantaranya melalui *recognition, phagocytosis, melanization, cytotoxicity* dan komunikasi antar sel.

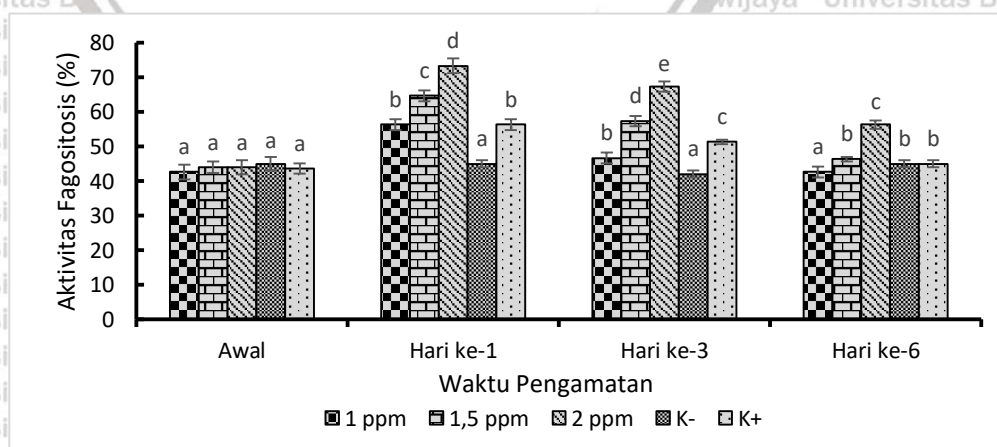
Setelah diuji tantang dengan bakteri *V.harveyi* terjadi penurunan jumlah hemosit pada semua perlakuan dengan rerata perlakuan pemberian ekstrak rumput laut *Ulva lactata* lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dengan total hemosit sebesar $5,42 \pm 0,04$ sel/ml. Hal ini sesuai dengan penelitian Van de Braak et al., (2002) bahwa total hemosit menurun setelah diinfeksi bakteri *Vibrio*

anguillarum. Selama periode pembersihan bakteri dari sirkulasi, THC lebih rendah, hal ini menandakan adanya aktifitas pertahanan pada sistem imun udang tersebut.

Jumlah hemosit udang dapat menurun apabila kondisi lingkungan memburuk, misalnya rendahnya kandungan oksigen terlarut, suhu dan salinitas atau terdapatnya serangan pathogen (Supamattaya *et al.*, 2005). Selanjutnya hemosit baru perlu pengganti dan diproduksi secara proporsional, dan diyakini bahwa hemosit dikeluarkan secara kontinyu, walau pada laju yang bervariasi dari jaringan hematopoeietik. Jaringan tersebut telah diidentifikasi pada beberapa krustase.

5.2.1.2 Aktivitas Fagositosis

Peningkatan total hemosit pada penelitian ini juga diikuti dengan peningkatan aktivitas fagositosis. Aktivitas mengalami peningkatan setelah pemberian ekstrak *Ulva lactuca* dan diuji tantang. Pada hari ke-1 setelah diberi ekstrak semua menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis. Pada perlakuan 2 ppm, 1,5 dan 1 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan semua perlakuan kontrol. Perlakuan 1,5 ppm dan K+ tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$), data hasil pengamatan aktivitas fagositosis selama pengamatan dapat dilihat pada Lampiran 5. Adapun hasil pengamatan dari aktivitas fagositosis selama penelitian disajikan dalam grafik pada Gambar 15 sebagai berikut :



Gambar 6. Pengamatan Aktivitas fagositosis Selama Penelitian

Pada hari ke-1 setelah pemberian imunostimulan dan infeksi bakteri menunjukkan bahwa perlakuan 2 ppm meningkatkan sel fagosit sebesar 23,2% dalam hal mampu meningkatkan fagosit menjadi $73,33 \pm 2,08\%$, sedangkan 1,5 ppm hanya bisa meningkatkan sel fagosit sebesar 12,9% atau hanya mampu meningkatkan fagosit menjadi $64,67 \pm 1,53\%$ dan 1 ppm jika dibandingkan dengan perlakuan K+ (perlakuan infeksi tanpa pemberian imunostimulan) tidak memberikan efek, meskipun mengalami peningkatan setelah pemberian imunostimulan.

Setelah 3 dan 6 hari pasca pemberian ekstrak *Ulva lactuta* dan di uji tantang, aktivitas fagositosis mengalami penurunan pada semua perlakuan. Pada hari ke-3 perlakuan 2 ppm berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan semua perlakuan dan menunjukkan nilai aktivitas yang tertinggi. Dimana Hal ini diduga karena kandungan dari ekstrak *Ulva lactuta* masih memberikan reaksi terhadap hemosit. Setelah 3 hari infeksi dan pemberian imunostimulan, perlakuan 2 ppm masih mampu mempertahankan fagositosis sebesar $67,33 \pm 1,53\%$ lebih tinggi dibandingkan perlakuan 1,5 ppm sebesar $57,33 \pm 1,53\%$ dan perlakuan 1 ppm hanya sebesar $46,67 \pm 1,53\%$.

Hal ini juga terjadi setelah hari ke-6 pasca pemberian imunostimulan dari ekstrak *Ulva lactuta* semua perlakuan mengalami penurunan aktivitas fagositosis, namun pada perlakuan 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan. Pada perlakuan 2 ppm menunjukkan masih mampu meningkatkan sel fagosit sebesar 20,1% dengan mempertahankan fagosit menjadi $56,33 \pm 1,15\%$. Perlakuan 1,5 ppm masih mampu meningkatkan sel fagosit sebesar 2,87% atau mampu mempertahankan fagosit sebesar $46,33 \pm 0,58\%$, dan pada perlakuan 1 ppm tidak menunjukkan adanya peningkatan fagositosis di hari ke-6 pengamatan jika dibandingkan dengan perlakuan K+ (infeksi tanpa pemberian imunostimulan). Hal ini diduga karena dosis yang digunakan masih terbilang cukup untuk menstimulasi terbentuknya sel-sel hemosit, sehingga masih mampu

melawan infeksi bakteri yang diberikan. Pope *et al.*, (2011), melaporkan bahwa hemolim udang memiliki aktivitas perlawanan terhadap infeksi bakteri *vibrio harveyi* secara alami bahkan dengan tanpa adanya pemberian vaksinasi atau imunostimulan sebelumnya. Aktivitas fagositosis berkaitan erat dengan peningkatan jumlah sel hyaline, karena sel yang melakukan proses fagositosis adalah sel hyalin dan sedikit oleh semi granular (Ermantianingrum *et al.*, 2013).

Salah satu respon imun seluler pada udang dalam menanggapi benda asing adalah melalui mekanisme fagositosis. Pada beberapa penelitian peningkatan aktivitas fagositosis pada udang setelah uji tantang sebagai mekanisme pertahanan udang (Jasmindar 2009, Febriani *et al.*, 2013). Selama proses fagositosis, partikel bakteri akan dikenali oleh reseptor pada permukaan sel, kemudian ditelan oleh sel yang melakukan penyusunan kembali cytoskeleton untuk pembentukan fagosom. Pembentukan pertama, fagosom mengalami pematangan (maturase) oleh pembelahan dan fusi dengan lisosom, dan menjadi fagolisosom yang matang. Bakteri yang berada di dalam fagolisosom akan dihancurkan oleh kondisi pH yang rendah, proses hidrolisis dan radikal (Xu *et al.*, 2014).

Pengukuran aktivitas fagositosis bertujuan untuk mengetahui tingkat fagositosis yang terjadi melalui beberapa perlakuan yang diberikan. Albores *et al.*, (1998) mengemukakan bahwa masuknya komponen microbial di dalam tubuh dapat mengaktifasi respon pertahanan tubuh secara seluler, hal ini dapat diamati melalui aktivitas fagositosis yang mana merupakan aktivitas utama dalam proses pertahanan tubuh udang terhadap infeksi benda asing. Saat terjadinya serangan pathogen, sel hemosit akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity*, dan lisis terhadap material tersebut. Dengan demikian jumlah hemosit yang beredar dalam hemosit akan terlihat menurun. Hasil proses degranulasi adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis (Effendy *et al.*, 2004).

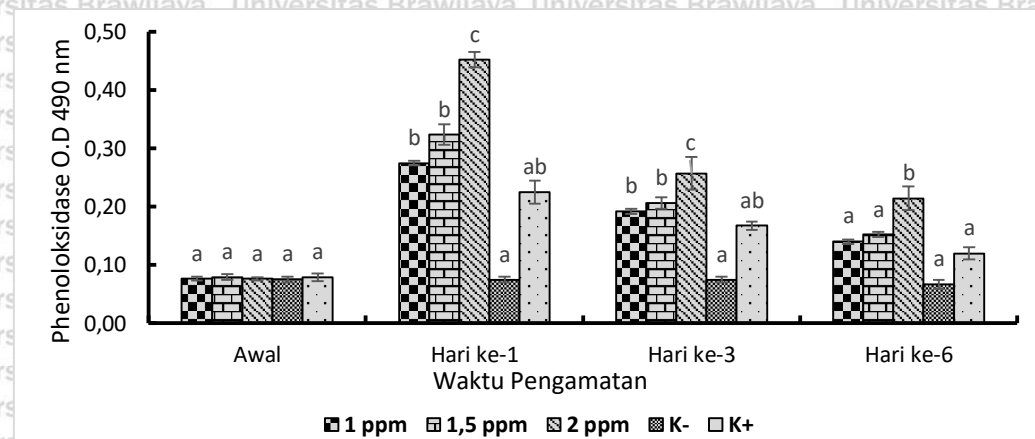
5.2.1.3 Aktivitas Phenoloksidase (PO)

Aktivitas PO udang uji mengalami peningkatan pada hari ke-1 setelah pemberian imunostimulan dan infeksi. Dimana nilai PO tertinggi pada perlakuan 2 ppm sebesar $0,452 \pm 0,014$, perlakuan tersebut menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan. Pada perlakuan 1 dan 1,5 ppm menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Pada perlakuan 2 ppm mampu meningkatkan PO hingga 50%, sedangkan 1,5 ppm dengan nilai PO $0,324 \pm 0,018$ mampu meningkatkan PO sebesar 30,5% dan 1 ppm dengan nilai PO $0,2747 \pm 0,004$ menunjukkan hasil yang paling kecil meningkatkan PO sebesar 18% terhadap perlakuan K+ (infeksi bakteri tanpa pemberian imunostimulan).

Aktivitas PO mengalami penurunan setelah pemberian imunostimulan selama 3 dan 6 hari. Sama halnya pada hasil sebelumnya, pada pengamatan hari ke-3 menunjukkan bahwa perlakuan 1 ppm dengan nilai PO sebesar $0,192 \pm 0,004$ dan 1,5 ppm dengan nilai PO sebesar $0,206 \pm 0,01$ tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Pada perlakuan 2 ppm dengan nilai PO sebesar $0,257 \pm 0,029$ menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap ($p < 0,05$) semua perlakuan, meski mengalami penurunan aktivitas PO.

Setelah 6 hari pasca pemberian imunostimulan dan infeksi bakteri perlakuan 2 ppm menunjukkan hasil yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Berdasarkan hasil analisa statistik menunjukkan perlakuan 2 ppm berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan semua perlakuan, dan perlakuan 1 ppm, 1,5 ppm dan semua kontrol tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Pada hari ke-6 pengamatan PO, perlakuan 2 ppm meningkatkan PO sebesar 44% dengan nilai PO $0,214 \pm 0,021$. Pada perlakuan 1,5 ppm meningkatkan PO sebesar 21% dengan nilai $0,152 \pm 0,004$, dan perlakuan 1 ppm hanya meningkatkan PO sebesar 14,5% dengan nilai PO $1,403 \pm 0,004$. Berdasarkan data diatas menunjukkan bahwa hingga akhir pengamatan pada hari ke-6, perlakuan 2 ppm mampu mempertahankan aktivitas phenoloksidase yang paling

tinggi dibandingkan perlakuan yang lainnya. Data selama penelitian dapat dilihat pada Lampiran 6. Hasil pengukuran phenoloksidase selama penelitian ditampilkan pada Gambar 16 berikut:



Gambar 7. Pengamatan Aktivitas Phenoloksidase (PO) Selama Penelitian

Pemberian ekstrak *Ulva lactuta* diasumsikan mampu meningkatkan kemampuan koordinasi dan komunikasi antar sel imun udang vaname sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname yang telah diinfeksi bakteri. Dimana, selama infeksi bakteri patogen (*V.harvey*), bakteri ini dikenal kemudian hemosit semi granular dan granular melepaskan sistem proPO yang diaktifkan. Selanjutnya dilepaskannya peroxinectin yang dapat menstimulasi peningkatan aktivitas fagositosis oleh sel hyaline atau enkapsulasi oleh sel semi granular. Selain itu juga dihasilkan sejumlah protein antimikroba (Cerenius dan Soderhall, 2004). Yeh *et al.*, (2006) menambahkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas phenoloksidase pada udang vaname pasca pemberian imunostimulan.

Peningkatan ini diduga sebagai akibat meningkatnya aktivitas enzim protease yang merupakan activator pembentukan enzim phenoloksidase tersebut.

Dalam sistem imun udang, protease dikenal sebagai enzim aktivasi prophenoloksidase (PPA) yang berperan dalam aktivasi prophenoloksidase menjadi enzim phenoloksidase. Enzim phenoloksidase dihasilkan melalui sistem ProPO yang dapat diaktifkan oleh adanya imunostimulan dan enzim ini berperan

dalam proses melanisasi. Melanin merupakan senyawa antimikroba yang akan membunuh pathogen yang masuk kedalam tubuh udang (Van de Braak, 2002). Pemberian ekstrak *Ulva lactuta* mampu meningkatkan aktivitas PO menunjukkan bahwa ekstrak dapat menstimulasi hemosit udang hingga aktivitas PO terbentuk. Dengan meningkatnya aktivitas phenoloksidase maka kemampuan udang vaname mengenali partikel asing yang masuk kedalam tubuh semakin baik dan untuk selanjutnya lebih meningkatkan proses fagositosis. Proses ini akan mengurangi partikel asing dalam tubuh sehingga daya tahan tubuh udang dapat meningkat.

Aktivasi proPO merangsang proses penting lainnya pada respon imun seperti fagositosis, enkapsulasi dan nodular. Aktivasi seperti proses munculnya glikosilasi pathogen yang terkait pola molekul (PAMPs) oleh protein krustasea (Li and Xiang, 2013).

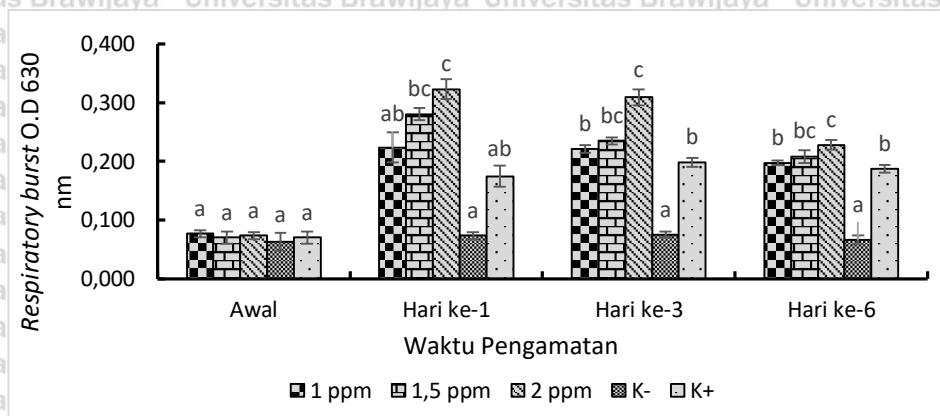
Glukan, LPS, bakteri dan *non-self agents* lainnya diketahui dapat merangsang aktivitas prophenoloksidase (proPO) dan reaksi melanisasi. Aktifnya proPO akan merangsang aktifnya phenoloksidase untuk memanfaatkan senyawa *phenolic* sehingga terbentuknya *quinones* yang pada akhirnya terbentuknya melanin (Smith *et al.*, 2003). Selain itu pula dengan aktifnya phenoloksidase maka menyebabkan pula aktivitas dari gen *immunoactive* lainnya, misalnya *peroxinectin* dan *reactive oxygen species* (Soderhall and Cerenius, 1992).

5.2.1.4 Respiratory burst (RB)

Konsentrasi pemberian ekstrak yang berbeda memberikan pengaruh peningkatan RB. Perlakuan 2 ppm menunjukkan nilai RB yang paling tinggi dibanding perlakuan lainnya. pada hari ke-1 setelah pemberian ekstrak dan infeksi bakteri menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap perlakuan lainnya. Pola yang sama pada hari ke-3 dan hari 6, dimana perlakuan 2 ppm menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap perlakuan 1,5 ppm dan 1 ppm. Hasil pengamatan RB pada awal, (sebelum pemberian imunostimulan dan infeksi) hari

ke-1, ke-3 dan ke-6 setelah pemberian imunostimulan dan infeksi disajikan pada

Gambar 17.



Gambar 8. Hasil Pengamatan Respiratory Burst (RB) Selama Pengamatan

Berdasarkan gambar diatas, pada hari ke-1 setelah pemberian imunostimulan menunjukkan bahwa perlakuan 2 ppm meningkatkan RB paling besar yaitu sekitar 45,8% atau nilai RB sebesar $0,323 \pm 0,02$, kemudian diikuti oleh dosis 1,5 ppm dimana mampu meningkatkan RB sebesar 37,5% dengan nilai RB sebesar $0,280 \pm 0,01$ dan yang paling rendah meningkatkan RB yaitu perlakuan dosis 1 ppm sebesar 21,8% dengan nilai RB $0,224 \pm 0,03$.

Setelah pada 6 hari pengamatan, nilai RB mengalami penurunan pada semua perlakuan. Hal ini sesuai dengan pengamatan pada fagositosis yang saling berkaitan. Nilai RB terbesar diperoleh dari perlakuan 2 ppm sebesar $0,214 \pm 0,021$ atau masih mampu meningkatkan RB sebesar 44%, kemudian 1,5 ppm dengan nilai RB sebesar $0,152 \pm 0,004$ dimana mampu mempertahankan RB sebesar 21% dan 1 ppm menunjukkan peningkatan RB paling kecil sebesar 14,5% dengan nilai RB sebesar $0,1403 \pm 0,004$.

Perlakuan 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua perlakuan selama pengamatan, namun mengalami penurunan terus menerus setelah 3 hari pemberian. RB diamati dengan tujuan untuk mengetahui tingkat pertahanan tubuh yang berkaitan dengan aktivitas superoxide anion (O_2^-) yang ditandai dengan kemampuan sel darah untuk mereduksi NBT (nitroblue

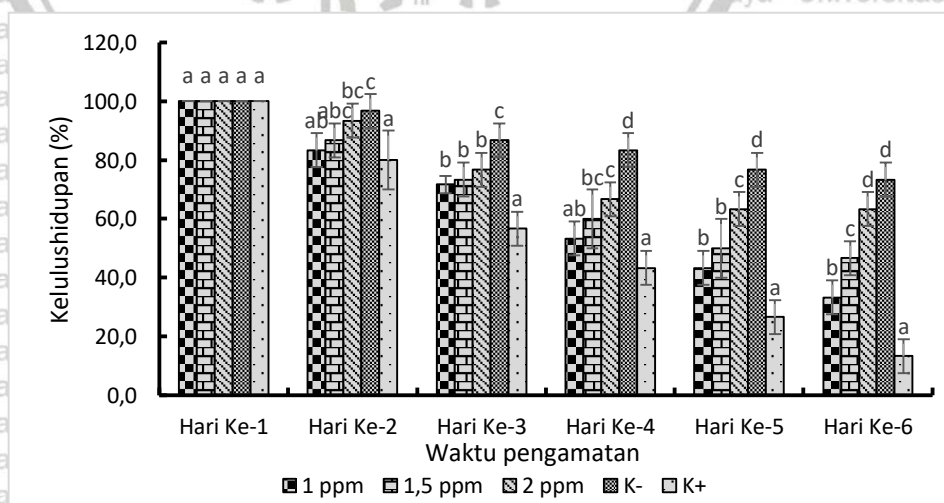
tetrazolium). Selain itu, nilai RB berkaitan dengan tingkat fagositosis sehingga semakin tinggi nilai RB, diduga semakin baik pula sistem pertahanan tubuh udang (Rodriguez and Le Moullac, 2000). Hasil pengamatan selama penelitian dapat dilihat pada Lampiran 7. RB merupakan aktivitas lanjutan dari proses fagositosis, dimana partikel yang tertanam di dalam fagolisosom akan dihancurkan dengan enzim pencernaan RB, hingga terjadi pelepasan radikal bebas ke dalam fagolisosom (Yulinery dan Nurhidayat, 2012). Fagositosis merupakan proses penting pada sistem pertahanan seluler udang vaname. Saat terjadinya penelanan mikroorganisme oleh hemosit akan diikuti dengan dihasilkannya beberapa bahan antimikroba. Salah satu substansi tersebut adalah *reactive oxygen* yang terdiri atas anion superoksida. Anion superoksida merupakan substansi yang pertama kali dihasilkan pada saat terjadi lonjakan respirasi yang dikatalis oleh enzim NADPH oksidase sehingga pengukurannya dapat dijadikan dasar untuk menentukan intensitas RB (Campa-Córdova *et al.*, 2002).

Pada akhir penelitian menunjukkan hampir semua perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) selain pada perlakuan 2 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa tidak perbedaan dengan semua perlakuan (kecuali 2 ppm) setelah dilakukan perendaman selama 6 hari terhadap kemampuan hemosit dalam mereduksi NBT, yang menunjukkan tingkat ketahanan tubuh terhadap reaksi oksidan didalam tubuh udang. Ketika pathogen masuk kedalam hemolim, NADPH-oksidas pada host yang akan diaktivasi, yang akan bereaksi untuk mengurangi molekul oksigen dan sesudah itu akan memproduksi beberapa *reactive oxygen intermediates* (ROIs), seperti superoxide anion, single oxygen ($1O_2$), hydroxyl radical (ROH) dan hydrogen peroxide (H_2O_2) (Munoz *et al.*, 2000).

5.2.2 Kelulushidupan (SR)

Berdasarkan hasil pengamatan kelulushidupan menunjukkan bahwa pada akhir masa pemeliharaan pada perlakuan K- memiliki nilai kelulushidupan yang tertinggi, hal ini disebabkan tidak adanya pemberian infeksi bakteri. Namun pada

perlakuan 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan perlakuan lainnya setelah diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. Pada perlakuan K+ diakhir pengamatan menunjukkan hasil yang paling rendah hanya mampu mempertahankan kelulushidupan sebesar 13,3%. Perlakuan dosis 2 ppm menunjukkan nilai kelulushidupan yang paling tinggi sebesar 63,3%, kemudian 1,5 ppm sebesar 46,7% dan 1 ppm hanya sebesar 33,3%. K- menunjukkan kelulushidupan tertinggi karena tidak adanya perlakuan infeksi. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak *Ulva lactuca* mampu mempertahankan kelulushidupan lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lainnya. Lebih tingginya kelulushidupan perlakuan yang diberi ekstrak *Ulva lactuca* dibandingkan K+ mengindikasikan pemberian ekstrak pada udang mampu mengendalikan penyakit *Vibrio harveyi*, dimana hal ini didukung juga dengan peningkatan sistem imun pada udang, baik seluler maupun humoral. Hal ini sependapat dengan penelitian yang dilakukan Sarjito *et al.*, (2015) menyatakan bahwa penambahan ekstrak daun binahong sebagai imunostimulan yang telah diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* mampu mempertahankan kelulushidupan hingga 90%. Kelulushidupan udang vaname selama penelitian ditampilkan pada Gambar 18 berikut :



Gambar 9. Kelulushidupan udang vaname selama penelitian.

Kelulushidupan diduga berkaitan dengan fungsi bahan aktif yang terkandung pada ekstrak *Ulva lactuta* yang berfungsi sebagai antibakteri dan imunostimulan. Kandungan bahan aktif yang berfungsi sebagai imunostimulan, dan antibakteri pada ekstrak *Ulva lactuta* berdasarkan uji FTIR yaitu adanya senyawa fenolik dan turunannya, seperti saponin, flavonoid dan alkaloid. Menurut Sarjito et al.,2015 menyatakan bahwa flavonoid berfungsi sebagai antimikroba, antivirus dan sebagai imunostimulan, sedangkan saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membrane sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteristik. Mekanisme alkaloid diduga adalah mekanisme mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1991).

Perbandingan antara jumlah individu yang hidup pada akhir penelitian dengan jumlah invidu pada awal penelitian atau peluang hidup dalam suatu saat tertentu merupakan pengertian dari kelulushidupan. Baik faktor biotik maupun abiotik mempengaruhi sintasan ikan. Parasit, kompetitor, predasi, umur, kemampuan adaptasi, penanganan manusia, dan kepadatan populasi merupakan beberapa faktor biotik, sedangkan sifat kimia dan fisika dari suatu lingkungan air dipengaruhi oleh faktor abiotik. Hasil pengamatan kelulushidupan udang vaname selama pengamatan dapat dilihat pada Lampiran 8.

5.2.3 Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup udang vaname. Sehingga untuk menjaga agar pertumbuhan dan SR tetap optimal perlunya menjaga agar parameter kualitas air tetap terjaga dan terkontrol. Beberapa parameter yang diamati selama penelitian adalah suhu, pH, DO dan salinitas. Selama penelitian didapatkan hasil pengukuran kualitas air sebagai berikut :

Tabel 2. Hasil Pengukuran Kualitas air selama penelitian.

No	Parameter	Hasil pengamatan	Kisaran Optimal
1	Suhu (°C)	24-26	24-29 (Fuady <i>et al.</i> , 2013)
2	pH	7,5-7,8	7,39-8,3 (Dede <i>et al.</i> , 2014)
3	DO (mg/L)	4,55-5,63	3,9-7,8 (Fuady <i>et al.</i> , 2013)
4	Salinitas (ppt)	35 ppt	30-36 (Arsad <i>et al.</i> , 2017)

Hasil pengamatan harian kualitas air selama penelitian disajikan pada Lampiran 9. Hasil pengukuran suhu pada media pemeliharaan udang vaname selama penelitian menunjukkan pada kisaran 24-26 °C. Nilai ini menunjukkan lebih rendah, hal ini dipengaruhi oleh kondisi geografis pada lokasi penelitian yang memiliki suhu relative lebih rendah dibanding pada lokasi pemeliharaan yang seharusnya pada tambak. Namun nilai tersebut masih pada kisaran yang baik untuk pemeliharaan udang selama penelitian. Berdasarkan Fuady *et al.*, 2013 melaporkan bahwa pada suhu 24-29 °C selama pemeliharaan pada tambak intensif mampu mendukung pertumbuhan dan kelulusanhidupan yang cukup tinggi yaitu sebesar 84%.

Derajat keasaman (pH) selama penelitian menunjukkan pada kisaran 7,5-7,8. Nilai pH ini masih sangat baik untuk mendukung kelangsungan dan pertumbuhan udang vaname, mengingat udang vaname yang berasal dari laut sehingga sangat sesuai dengan pH yang cenderung lebih tinggi. Selama penelitian menunjukkan tidak ada fluktuasi pH secara signifikan. Berdasarkan Dede *et al.*, (2014) melakukan penelitian terhadap kualitas air tambak dan diperoleh nilai pH berkisar antara 7,3-8,27, kisaran nilai tersebut masih mampu mendukung pertumbuhan udang dengan baik.

Selama penelitian dissolved oxygen (DO) menunjukkan pada kisaran 4,55-5,63 mg/L. hal ini menunjukkan bahwa pemberian aerasi selama penelitian cukup sehingga mampu mencukupi dan mempertahankan proses difusi oksigen di dalam media pemeliharaan udang vaname. Fuady *et al.*, (2013) melaporkan berdasarkan hasil penelitiannya pada tambak intensif menunjukkan nilai DO pada kisaran 3,9-

7,8 mg/L. kisaran DO yang optimal sangat baik untuk pertumbuhan dan SR udang vaname yaitu sebesar 84%.

Selama penelitian air yang digunakan adalah air yang didapatkan langsung dari tambak untuk mengurangi terjadinya stress pada udang jika terjadi perbedaan salinitas. Selama penelitian hasil pengukuran salinitas menunjukkan 35 ppt. Hal ini sependapat dengan Arsad *et al.*, (2017) mengemukakan bahwa salinitas yang optimal untuk pertumbuhan udang vaname berkisar pada 30-36 ppm.



6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Terdapat beberapa kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

1. Berdasarkan hasil Uji FTIR menunjukkan terdapat beberapa senyawa pada ekstrak kasar rumput laut *Ulva lactuca* adanya senyawa fenolik dan ikatan polisakarida.
2. Pemberian imunostimulan ekstrak kasar *Ulva lactuca* mampu merangsang aktivitas non spesifik udang vaname pada dosis 1, 1,5 dan 2 ppm. Aktivitas imun tersebut ditandai dengan peningkatan nilai THC, aktivitas fagositosis, aktivitas Phenoloksidase, dan *Respiratory burst* yang didukung dengan SR yang tinggi. Setelah diinfeksi bakteri *V.harveyi* menunjukkan dosis 2 ppm menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap semua parameter imun.

6.2 Saran

Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penentuan waktu yang optimal setelah mengalami penurunan THC, AF, PO dan RB untuk menentukan penambahan booster.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, M.U.K. 2007. Penelusuran Efektifitas Beberapa Bahan Alam sebagai kandidat Antibakteri dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis pada Udang. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjajaran. Jatinangor
- Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H, Mikkelsen, J.D and A.S. Meyer. 2011. Fucose-containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of MELanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 *in vitro*. Mar. Drug. 9:2605-2621
- Anam, C., Sirojudina, K. dan F. Sofjan. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. Berkala Fisika. Vol.10(1):79-85
- Arsad, S., Afandy, A., Purwadhi, A.P., Maya, B.V., Saputra, D.K dan N.R.Buwono. 2017. Studi Kegiatan Budidaya Pembesaran Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan penerapan Sistem Pemeliharaan Berbeda. Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan. Vol.9(1).
- Aslan, L. M. 1991. Seri Budidaya Rumput Laut. Kanisius. Yogyakarta
- Atmojo, J.T. 2011. Jenis Metode Penelitian. Universitas Mercubuana. Jakarta. Hlm.19
- Austin and Austin. 2007. Bacterial Fish Pathogen. Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer. Fourth Edition
- Bachere, E. 2000. Shrimp Immunity and Disease Control. Aquaculture. 3-11
- Basir, A., Tarman, K. dan Desniar. 2017. Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Alga Hijau (*Halimeda gracilis*) dari Kabupaten Kepulauan Seribu. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 20(2):211-218
- Baratawidjaja, K.G. 2006. Imunologi dasar. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm 6-7
- Bauchau, A.G. 1990. Invertebrata Blood Cell. Academic Press. Vol.2:385-420
- Bintari, N. W. D., Kawuri, R., and A. A G. R. Dalem. 2016. Identification of Vibrio Bacteria Caused Vibriosis on Freshwater Prawn Larvae (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)). Jurnal Biologi. 20(2):53-63
- Boone, H. 1980. FAO Species Catalogue, Shrimps and prawns of the world, An Annotated catalogue of species of Interest to fisheries. No.125, vol.1
- Brotowidjoyo, M. D., Tribawono, D., dan E. Mulbyantoro. 1984. Pengantar Lingkungan dan Budidaya Air. Penerbit Liberty. Yogyakarta.

Castro, R.I. Zarrab, and J. Lamas. 2004. Water-soluble Seaweed Extracts Modulate the *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunology*, 10:555-558

Castro, R. Piazzon, M.C. Zarra, I. Leiro, J. Noya, M. and J. Lamas. 2006. Stimulation of Turbot Phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh Polysaccharides. *Aquaculture*. 254:9-20

Cavallo, R. A., M. I. Acquaviva., L. Stabili., E. Cecere., A. Petrocelli and M. Narracci. 2013. Antibacterial Activity of Marine Macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Central European Journal of Biology*. 8(7):646-653

Chang, R. 2004. *Kimia Dasar - Konsep-konsep Inti*. Penerbit Erlangga. Edisi Ketiga. 325 hlm

Cheng, W. Liu, C.H. Yeh, S.T. and J.C. Chen. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and shellfish immunology*. Vol.17:41-51

Cheng, W. Wang, L and J. Chen. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 250:592-601

Chojnacka, K. Saeid, A. Witkowska, Z and L. Tuhy. 2012. Biologically active compounds in seaweed extracts – the prospects for the application. *The Open Conference Proceedings Journal*. Hal. 20-28

David, G. W. 2005. *Analisis Farmasi*. Edisi Kedua. Jakarta

Dede, H., Aryawati R dan G. Diansyah. 2014. Evaluasi Tingkat Kesesuaian Kualitas Air Tambak Udang Berdasarkan Produktivitas Primer PT. Tirta Bumi Nirbaya Teluk Hurun Lampung Selatan (Studi Kasus). *Maspuri Journal*. Universitas Sriwijaya. Vol.6(1), hal.32-38.

Drozd, J. 1975. Chemical Derivatization in Gas Chromatography. *Journal of Chromatography Library*. 113:303-356

Effendi, I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara. Yogyakarta

Effendy, S. Alexander, R dan T. Akbar. 2004. Peningkatan hemosit benur udang windu (*Penaeus monodon* Fab) pasca perendaman ekstrak ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) pada konsentrasi yang berbeda. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 14(2):46-53

El-Baky, H.H.A., El-Baz, F.K., and G.S. El-Baroty. 2008. Evaluation of marine algae *Ulva lactuca* L as a source of natural preservative ingredient. *American Eurasian Journal of Agricultural Policy and Research*, 2:373-378

Endarini, L.H. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pusat Pendidikan Sumberdaya Manusia

- Kesehatan, Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumberdaya Manusia Kesehatan. Hlm.215
- Ermantianingrum, A.A., Sari, R., dan S.B. Prayitno. 2013. Potensi *Chlorella* sp. Sebagai Imunostimulan untuk Pencegahan Penyakit Bercak Putih (*White Spot Syndrome Virus*) pada Udang Windu (*Penaeus monodon*). Journal of Aquaculture Management and Technology. Vol.1(1),206-221.
- Farchan, Mochammad. 2007. Teknik Budidaya Udang Vaname. BAPPL-STP Serang. Banten
- Febriani, D., Sukenda dan S.Nuryati. 2013. Kappa-Karagenan sebagai imunostimulan untuk pengendalian Penyakit *Infectious myonecrosis* (IMN) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Jurnal Akuakultur Indonesia. 12(1):70-78.
- Feliatra, Zainuri dan D. Yoswaty. 2014. Pathogenitas Bakteri *Vibrio* sp Terhadap Udang Windu (*Penaeus monodon*). Jurnal Sungkai. Vol.2(1):23-36
- Ferreira, L. G., Nosedá, M. D. Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R. B., Fujii, M. T. and M. E. R. Duarte. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agarans from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). Carbohydrate Resource. 347:83-94
- Fessende, R.J dan J.S Fesseden.1997. Kimia Organik. Alih Bahasa: A.H. Pudjaatmaka. Erlangga: Jakarta
- Fuady, M.F, Supardjo, M.N dan Haeruddin. 2013. Pengaruh Pengelolaan Kualitas Air Terhadap Tingkat Kelulushidupan dan Laju Pertumbuhan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Indokor Bangun Desa, Yogyakarta. Diponegoro Journal of Maquares. Universitas Diponegoro. Vol 2 (4). Hal 155-162.
- Ghaednia, B. Mehrabi M. R. Mirbaksh, M. Yeganeh, V. Hoseinkhezri. Garibi, G and J. A .Gahfar. 2011. Effect of Hot Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum glaucescens* via Immersion route on Immune Responses of *Fenneropenaeus indicus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 10:616-630
- Ghannam, N. A and Gupta, S. 2011. Recent Developments in The Application of Seaweeds or Seaweed Extracts as a means for Enhancing the safety and Quality attributes of Foods. Innovative Food Science and Emerging Tecnologies. Elsevier. 12:600-609
- Giulinanini, P. G., M. Berti, S. Lorenzon, S. Battistella and E. A. Ferrero. 2007. Ultrastructural and Functional Characterization of Circulating Hemocytes from the Crayfish *Astacus leptodactylus*: cell Types and Their Role After in Vivo Artificial non-self Challenge. Micron. 38:49-57
- Greenwood. 1995. Antibiotics Susceptibility (sensitivity) Test, Antimicrobial and Chemoteraphy. Mc. Graw Hill Company. USA. Hlm.12-17

Guiry, M. 2007. *Ulva lactuta* Linnaeus, <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=8416>. National University of Ireland Galway. Irlandia. Diakses pada 11 april 2018

Guenther, E. 1987. Minyak Astiri Jilid I. Penerjemah: Ketaren S. Cetakan I. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm.240-242

Hadie, W dan L. E. Hadie. 2017. Analisis Sistem Budidaya untuk Mendukung Kebijakan Keberlanjutan Produksi Udang. Jurnal Kebijakan Perikanan Indonesia. Vol.9(1):51-60

Haliman R.W dan D. Adijaya, 2005. *Udang Vannamei*. Penebar Swadaya. Jakarta

Hanaa, H., A. El-Baky., K. Farouk, and G.S.E Baroty. 2009. Potencial Biological Properties of Sulphated Polysaccharides extracted from Macroalgae *Ulva Lactuta* L. Academic Journal of Cancer Research. (1): 01-11.

Hatmanti, A. 2003. Penyakit Bakterial Pada Budidaya Krustasea serta Cara Penanganannya. Oceana. Vol. XXVIII, No.3:1-10

Holdt, S. L and S. Kraan. 2011. Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food application and Legislation. Journal of Applied Phycology. 23:543-597

Itami, T. 1994. Body Defense System of Penaied Shrimp. Paper Presented on Seminar in Fish Physiology and Prevention of Epizootic. Dept. Of Aquaculture and Biology. Shimonoshei University of Fisheries. Japan

Jasmindar, Y. 2009. Penggunaan Ekstrak *Gracillaria verrucosa* untuk meningkatkan system ketahanan Udang vaname *Litopenaeus vannamei*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, and K. Soderhall. 2000. Crustacean Haemocytes and Haematopoiesis. Aquaculture 191:45-52.

Johny, F. Roza, D. K. Mahardika. Zafran dan A. Prijono. 2005. Penggunaan Immunostimulan Untuk Meningkatkan Kekebalan nonspesifik Benih Ikan Kerapu Lumpur, *Epinephels coiodes* Terhadap infeksi Virus Irido. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. XI(5):75-83

Julyasih, K. S. M., I. G. P. Wirawan, W. S. Harijani dan W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumpun Laut Komersil di Bali. Katalog Perpustakaan Republik Indonesia. Surabaya.

Justino, C.I.L. Duarte, K. Freitas, A.C. Duarte, A.C and T.R. Santos. 2014. Classical methodologies for preparation of extracts and fractions. Analysis of Marine samples in search of bioactive compounds. Chapter 3. 35-57

Khopkar, S.M. 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press

Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2015. Kelautan dan Perikanan dalam Angka 2015. Pusat Data, Statistik dan Informasi. 300 hlm

Kole, C., Michler, C., Abbott, A.G and T. C .Hall. 2010. Transgenic Crop Plants. Vol.1 Principles and Development. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Page. 807

Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M. dan B. Kurniadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Surabaya: Airlangga University Press.

Kwang, L.C. 1996. Immune Enhancer in The kontrol of Disease in Aquaculture. Encap Technology Pte Ltd., Singapura. Hlm. 7-15

Lay, B.W. 1994. Analisis mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta

Leonard, S. G., Sweeney, T., Pierce, K. M., Bahar, B., Lynch, B. P and J. V. O'Doherty. 2010. The Effects of Supplementing the diet of the Sow with Seaweed Extracts and Fish Oil On Aspects of Gastrointestinal Health and Performance of The Weaned Piglet. Livestock Science. 134:135-138

Lerner, A., James, D., and T. Yoshiyata. 1960. Isolation of Melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. The Journal of Biological Chemistry. 7:235

Li, F and J. Xiang. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in Shrimp. Fish and Shellfish Immunology. 34:973-980.

Limsuwan, C. 2010. White Feces Disease in Thailand. Boletines nicovita. Faculty of Fisheries Kasetsart University, Thailand. Hlm. 1-7

Littler, D. S., Littler, M. M., Bucher, K. E., and J.N. Norris. 1989. Marine Plants of The Carribean, A Field Guide from Florida to Brazil. Smithsonian Institution Press, Washington D. C.

Liu, C.H and J.C. Chen. 2004. Effect of Ammonia on the Immune response of White shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 16: 321-334

Liu, P. C and K. K. Lee. 1999. Cysteine Protease is a Major Exotoxin of Pathogenic Luminous *Vibrio harveyi* in the Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology. Vol.28:428-430

Maftuch. Toban, M. H and Y. Risjani. 2012. Administration of marine algae (*Gracilaria verrucosa*) immunostimulant enhances some innate immune parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus) against *Vibrio harveyi* infection. Journal of Applied Research. 8(2):1052-1058

Malle, D. Fransina, E.G and F. Jansen. 2014. Extraction and Identification of Sulfated Polysaccharides from *Gracillaria* sp. Indian Journal Chemistry Research. No.1 83-87.

Manillal, A., Sujith, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimati R., and A.P. Lipton. Antimicrobial potential and Seasonality of Red Algae Collected from Southwest Coast of India Tested Against Shrimp, Human and Phytopathogens. *Annals of Microbiology*. 59(2), 207-219.

Martosudarmo dan Ranoemihardjo. 1983. *Pembenihan Udang Penaeid*. Ditjenkan, Jakarta

Maynard, D.M. 1960. Circulation and health function in physiology of crustacean. Academic Press, New York, San Fransisco, London. Hlm.160-182

Martinez, F.S., 2007. The Immune System of Shrimp. Boltines nicovita. Faculty of Fisheries Kasetsart University, Thailand. Hlm 1-6

Mihova, S. G., Georgiev, D. I., Minkova, K. M and A.A. Tchenov. 1996. Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and Photoregulatory Effects on Their Content. *Journal Of Biotechnology*. 48:251-257

Middleton E, Kaswandi C and T.C. Theoharides. 2000. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *The Americans Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Pharmacological Reviews*. 52 (1): 673-751

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. Vol. 7:361-367

Muliani. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asal Laut Sulawesi untuk Biokontrol Penyakit Vibriosis pada Udang Windu, *Penaeus monodon* F (Tesis). Bogor. SPs, Institut Pertanian Bogor.

Munoz, V., Sauvin, M., Bourdy. D and J. Callapa. 2000. A Search for Natural Bioactive Compounds in Bolivia Through a Multidisciplinary Approach. Part I. Evaluation of the Antimalarial activity of Plants Used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. 69(2)127-137.

Nitimulyo, K. H., A. Isnanstyo, Triyanto, I. Istiqomah dan M. Murdjani. 2005. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen Penyebab vibriosis pada Kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan*. Vol VII (2):80-94

Novriadi, R. 2015. Meneropong Sistem Kekebalan Tubuh Udang. *Researchgate. Akuatekno*

Nybakken, J. W. 1988. Biologi Laut Sebagai Pendekatan ekologi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

Owen, L and A. O'Neill. 1996. Flow cytometry tool to characterise prawn (*P.monodon*) haemocytes. Dept. Of Biomedical and tropical Veterinary Science James Cook University of North Quenland.

Paulert, R. Junior, A.S. Stadnik, M.J and M.G. Pizzolatti. 2007. Antimicrobial properties of extract from the green seaweed *Ulva fasciata* Delile against pathogenic bacteria and fungi. *Algological Studies*. 123-130

Pavia, Donal L., Gary, M.L., George, S.K and G.E. Randall. 2006. Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole. Hlm.797-817

Prasetyaningsih, A. dan D. Rahardjo. 2018. Potensi Pemanfaatan *Ulva lactuca* dan *Sargassum* sp di Tiga Pantai Kabupaten Gunung Kidul. Seminar Nasional Biologi dan Pendidikan Biologi, UKSW.

Preethi L, Magesh KT, Rajkumar K, and R. Karthik. 2011. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Maxillofacial Pathology*. 15 (3): 252-256

Priyadharshini, S., S. Bragadeeswaran. K, Prabhu., and S. S. Ran. 2012. Antimicrobial and Hemolytic activity of Seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast Coast of India. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*. Elsevier. 37-39

Pope, E.C, Powell, A., Roberts, E.C., Shields, R.J., Wardle, R., and A.F. Rowley. 2011. Enhanced Cellular immunity in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. *PLoS ONE* 6.

Radhika, D and A. Mohaideen. 2015. Fourier Transform Infrared Analysis of *Ulva Lactuca* and *Gracilaria corticata* and Their Effect on Antibacterial activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol 8,(2):209-212.

Reed, L. A., T. C. Siewicki and J. C. Shah. 2004. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture*. Elsevier. 232:11-28

Reed, M. J and M. Muench. 1938. A Simple method for estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 27(3):493-497

Reine, W. F. P. van and G. C. T. Junior. 2002. Plant Resource of South-East Asia No.15(1) Cryptogams: Algae. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia.

Ridlo, A dan R. Pramesti. 2009. Aplikasi ekstrak rumput laut sebagai agen immunostimulan sistem pertahanan non spesifik pada udang (*Litopenaeus vannamei*). *Ilmu Kelautan*. Vol.14:133-137

Robic, A., Bertrand, D., Sassi, J.F., Lerat, Y and M. Layahe. 2009. Determination of the Chemical Composition of Ulvan, a Cell Wall Polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and Chemometrics. *Journal of Applied Phycology*. 21:451-456

Robinson, T.1991. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi. Penerbit ITB. Bandung

- Rodrigues, J. and G. L. Moullac. 2000. State of the art if immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119
- Sakai, M. 2000. Current Research Status of Fish Immunostimulants. *Aquaculture*. 172(1):63-92.
- Sandapare, M. Ahmad, A dan S. Dali. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Kasar Polisakarida yang Diisolasi dari Alga Coklat (*Sargassum duplicatum*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*.
- Sarita, K., Aswati, E. M., M. Priyalaxmi and P. Jamila. 2013. Antibacterial Activity and Biochemical Constituents of Seaweed *Ulva lactuta*. *Global Journal of Phamcology*. 7(3):276-282
- Sarjito, Apriliani, M. Afriani dan D. A. C. Haditomo. 2015. Agensi Penyebab Vibriosis Pada Udang Vanname (*Litopenaeus gariepinus*) yang Dibudidayakan secara Intensif di Kendal. *Jurnal Kelautan Tropis*. Vol 18(3):189-196
- Sastrohamidjojo, H. 1996. Sintesis Bahan Alam. Cetakan ke-1. Liberty. Yogyakarta
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Selvin, J. Huxley, A. J. and A.P. Lipton. 2004. Immunomodulatory Potential of Marine Secondary Metabolites against bacterial diseases of Shrimp. *Aquaculture*. 230:241-248
- Selvin, J. Manilal, A. Sujith, S. Kiran, G.S and A.P. Lipton. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Latin American Journal of Aquatic Research*. Vol. 39:197-204
- Silverstain, R.M., and F.X. Webster. 1998. Spectrometric Identification Of Organic Compound, sixth edition, John Wiley & Sons, Inc, US
- Simamora, S.D. 2014. Market Brief Langkah dan Strategi Ekspor ke uni Eropa: Produk Udang. *Advancing Indonesia's Civil Society in Trade and Investment Climate*. APINDO
- Singarimbun, M. dan S. Effendi. 1983. Metodologi Penelitian Survey. Edisi Kedua. LP3S. Jakarta.
- Sivakumar, K., Sudalayandi, K., Masilamani, D and K.P. Prasanna. 2014. Evaluation of Marine Macroalga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 8: 803-813
- Smith, V.J. Janet, H.B. and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustacea: does it really protect against infection. *Fish & Shelfish Immunology*. 15:71-90

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annual. Rev.of Fish Diseases. Hlm.3-23

Somboon, M. Purivirojkul, W. Limsuwan, C and N. Chuchird. 2012. Effect of *Vibrio* spp.in white feces infected shrimp in Chanthaburi, Thailand. Kasetart University Fisheries research Bulletin. Vol.36 (1)

Sung, H.H., Wu, P.Y., and Y.L. Song. 1999. Characterisation of monoclonal antibodies to Haemocyte subpopulations of three major haemocytes types. Fish & Shellfish Immunology. 9:167-179

Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratopalin, M. and L. Borowitzka. 2005. Effect of a Dunaliella Extract on Growth Performance, Health Condition, Immune Response and Disease resistance in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 248(1):207-216

Supito, Gunarso, A. dan I. Rizkiyanti. 2015. Teknik Pengendalian Penyakit Kotoran Putih (*White Feces Syndrome*) pada Budidaya Udang Vanname di Tambak. Report BBPBAP Jepara.

Susanto, W.H. 1999. Teknologi Lemak dan Minyak Makan. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang

Suyanto, R dan A. Mudjiman. 2002. *Budidaya Udang Windu*. Penebar Swadaya. Jakarta

Synytsya, A., Kim, W. J and S. M. Kim. 2010. Structure and Antitumor Activity of Fucoidan isolated From Sporophyll of Korean Brown Seaweed *Undaria Pinnatifida*. Carbohydrate Polymer. 81:41-48

Tabarsa, M. Lee, S.J and S.G. You. 2012. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. Carbohydrate Research. Vol.36:141-147

Tabarsa, M., You, S.G., Dabaghian, E.H., and U. Surayot. 2018. Structural analysis of Immunostimulating Sulfated Polysaccharides from *Ulva pertusa*. Carbohydrate. 361:141-147

Tamat, S.R. Wikanta, T. dan L.S. Maulina. 2007. Aktivitas antioksidan dan toksisitas sebyawa bioaktif dari ekstrak rumput laut hijau *Ulva reticulata* Forsskal. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Vol.5:31-36

Taslihan, A. 1991. Jenis Penyakit yang Menyerang udang Windu, Makalah yang disampaikan pada Workshop Penetapan hama dan Penyakit Ikan karantina, Bogor. Hlm.7-17

Taslihan, A, Ani, W. Retna H, S.M. dan Astuti. 2004. Pengendalian Penyakit Pada Budidaya Ikan Air Payau, Direktorat Jenderal Perikanan Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara.

Treve-brown, KM. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publisher, London. Hlm. 251-259

Tompo, A. 2016. Kajian Populasi Bakteri *Vibrios* sp. Pada Tambak Budidaya Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) Sistem Semi Intensif dengan Persentase Pemberian Pakan Yang Berbeda. *Octopus Jurnal Ilmu Perikanan*. Vol. 5. No.1:470-475

Van de Braak K. 2002. Haemocytic Defence in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Thesis. Wageningen. Belanda. Hal.159

Vargas-Albores F., and Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191:13-21

Verdegem, M and E. Edding. 2010. *Aquaculture Production System*. Lecture Note. Aquaculture and Fisheries Wageningen University

Vogel, A.I. 1987. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Revisi oleh B.S Fourniss dkk., Edisi Keempat. Longmans London. New York

Wyban, J. A dan J. Sweeney. 1991. *Intensif Shrimp Production Technology*. Honolulu, Hawaii, USA 96825.

Widyaningsih, W., Sugiyanto, Pramono, S. dan Widyarini. 2016. Skrining Fitokimia Ekstrak Ethanol *Ulva lactuta* L. Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Media Farmasi*. Vol.13:199-211

Xu D., Liu, W., Alvarez A. and T.Huang. Cellular Immune responses against viral Pathogens in Shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*. 47:287-297.

Yeh, S.T, Chiu S. Lee and C.C. Jiann. 2006. Administration of Hot Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum duplicatum* Via Immersion and Injection Enhances The Immune Resistance of White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 20:332-345

Yulinery, T dan N. Nurhidayat. 2012. Analisis Viabilitas Probiotik *Lactobacillus* terenkapsulasi dalam Penyalut Dekstrin dan Jus Markisa (*Passiflora edulis*). *Jurnal Teknologi Lingkungan*. Vol.13(1):109-121

Zonneveld, N., E.A. Huismann., dan J. H. Boon. 1991. *Prinsip-prinsip Budidaya Ikan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hlm.318

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian

1a. Proses Ekstraksi



Proses Pengeringan



Pengendapan Polisakarida



Penyaringan Filtrat



Hasil Ekstraksi

1b. Proses Pengamatan Parameter Imun



Kultur Bakteri *vibrio harveyi*



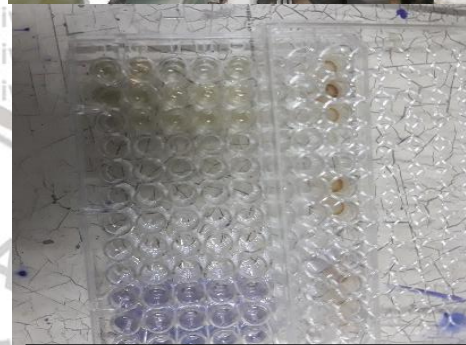
Proses pengambilan Hemolimf



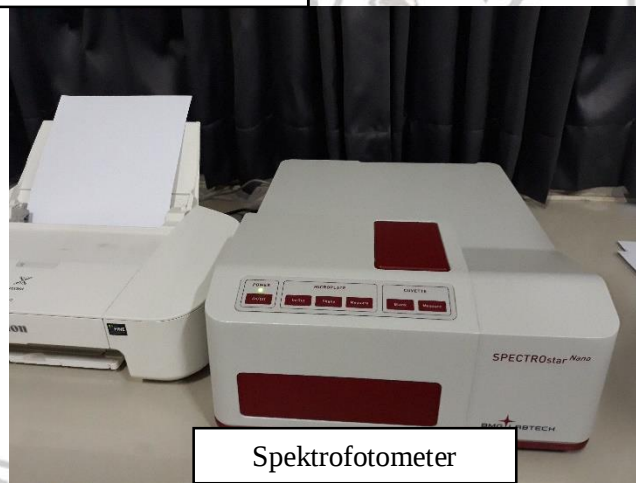
Hemolim

Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi*

Hemolim telah diberi Triplan blue



Samnel uii PO dan RB



Spektrofotometer

Lampiran 2. Uji Patogenitas *V.harveyi* dengan Uji Lethal Dossage 50% (LD₅₀)

KEPADATAN BAKTERI	TOTAL UDANG MATI (EKOR)	TOTAL UDANG UJI (EKOR)
10 ⁵	3	10
10 ⁶	5	10
10 ⁷	7	10
10 ⁸	7	10
10 ⁹	9	10

Analisis Probit test

Cell Counts and Residuals							
	Number	kepadatan	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
Probit	1	5.000	10	3	3.246	-.246	.325
	2	6.000	10	5	4.802	.198	.480
	3	7.000	10	7	6.389	.611	.639
	4	8.000	10	7	7.765	-.765	.777
	5	9.000	10	9	8.781	.219	.878

Confidence Limits							
Probability	95% Confidence Limits for kepadatan			95% Confidence Limits for log(kepadatan) ^a			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
Probit	.010	2.402	.	.381	.	.	
	.020	11.308	.	1.053	.	.	
	.030	30.219	.	1.480	.	.	
	.040	63.304	.	1.801	.	.	
	.050	115.519	.	2.063	.	.	
	.060	192.752	.	2.285	.	.	
	.070	301.962	.	2.480	.	.	
	.080	451.346	.	2.655	.	.	
	.090	650.523	.	2.813	.	.	
	.100	910.740	.	2.959	.	.	
	.150	3667.925	.	3.564	.	.	
	.200	11098.797	.	4.045	.	.	
	.250	28695.052	.	4.458	.	.	
	.300	67339.937	.	4.828	.	.	
	.350	148444.591	.	5.172	.	.	
	.400	314278.451	.	5.497	.	.	
	.450	649354.297	.	5.812	.	.	
	.500	1326331.174	.	6.123	.	.	
	.550	2709082.533	.	6.433	.	.	
	.600	5597438.754	.	6.748	.	.	
	.650	11850579.197	.	7.074	.	.	
	.700	26123493.189	.	7.417	.	.	
	.750	61305147.262	.	7.787	.	.	
	.800	158499557.552	.	8.200	.	.	
	.850	479604722.710	.	8.681	.	.	
	.900	1931565055.448	.	9.286	.	.	
	.910	2704216311.708	.	9.432	.	.	
	.920	3897571519.193	.	9.591	.	.	
	.930	5825740774.847	.	9.765	.	.	
	.940	9126495599.572	.	9.960	.	.	
	.950	15228209676.859	.	10.183	.	.	
	.960	27789156863.799	.	10.444	.	.	
	.970	58213025639.797	.	10.765	.	.	
	.980	155570137622.003	.	11.192	.	.	
	.990	732458511558.932	.	11.865	.	.	

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 3. Data Hasil Pengamatan THC dan Aktivitas Fagositosis Penelitian Tahap 1

Perlakuan	Waktu	THC	Log THC (sel/ml)	Aktivitas Fagositosis (%)
kontrol	0	123	4,99	41
kontrol	0	119	4,98	42
Kontrol	0	116	4,97	38
Kontrol	4	118	4,97	43
Kontrol	4	127	5,01	44
Kontrol	4	121	4,99	39
Kontrol	24	123	4,99	40
Kontrol	24	128	5,01	41
Kontrol	24	131	5,02	39
Polisakarida	0	125	5,00	42
Polisakarida	0	119	4,98	39
Polisakarida	0	131	5,02	40
Polisakarida	4	221	5,25	52
Polisakarida	4	231	5,27	53
Polisakarida	4	229	5,26	56
Polisakarida	24	198	5,20	46
Polisakarida	24	195	5,19	44
Polisakarida	24	190	5,18	47
Ekstrak Kasar	0	122	4,99	38
Ekstrak Kasar	0	116	4,97	40
Ekstrak Kasar	0	114	4,96	42
Ekstrak Kasar	4	267	5,33	67
Ekstrak Kasar	4	261	5,32	73
Ekstrak Kasar	4	266	5,33	69
Ekstrak Kasar	24	221	5,25	51
Ekstrak Kasar	24	218	5,24	53
Ekstrak Kasar	24	223	5,25	50

Rata-rata Total haemocyte Count (THC) (mean±SD)

Perlakuan	Waktu pengamatan		
	0 jam	3 jam	24 jam
kontrol	4,98±0,01 ^a	4,99±0,02 ^a	5,01±0,01 ^a
polisakarida	5,00±0,02 ^a	5,26±0,01 ^c	5,19±0,01 ^b
ekstrak kasar	4,97±0,02 ^a	5,33±0,01 ^d	5,25±0,00 ^c

Lanjutan Lampiran 3.

Rata-rata Aktivitas Fagositosis (mean $\pm$ SD)

Perlakuan	Waktu pengamatan		
	0 jam	3 jam	24 jam
kontrol	40,33 $\pm$ 2,08 ^a	42,00 $\pm$ 2,65 ^a	40,00 $\pm$ 1,00 ^a
polisakarida	40,33 $\pm$ 1,53 ^a	53,67 $\pm$ 2,08 ^c	45,67 $\pm$ 1,53 ^b
ekstrak kasar	40,00 $\pm$ 2,00 ^a	69,67 $\pm$ 3,06 ^d	51,33 $\pm$ 1,53 ^c

Analisa Anova

Descriptives								
Log THC								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol awal	3	4.9797	.01276	.00737	4.9480	5.0114	4.97	4.99
Polisakarida awal	3	4.9997	.02086	.01205	4.9478	5.0515	4.98	5.02
Ekstrak awal	3	4.9723	.01530	.00883	4.9343	5.0103	4.96	4.99
Kontrol jam ke-3	3	4.9892	.01623	.00937	4.9489	5.0296	4.97	5.01
Polisakarida jam ke-3	3	5.2590	.01018	.00588	5.2337	5.2843	5.25	5.27
Ekstrak kasar jam ke-3	3	5.3258	.00529	.00306	5.3126	5.3389	5.32	5.33
Kontrol jam ke-24	3	5.0079	.01384	.00799	4.9735	5.0423	4.99	5.02
Polisakarida jam ke-24	3	5.1916	.00906	.00523	5.1691	5.2141	5.18	5.20
Ekstrak Kasar jam ke-24	3	5.2468	.00496	.00286	5.2345	5.2591	5.24	5.25
Total	27	5.1080	.13932	.02681	5.0529	5.1631	4.96	5.33

Test of Homogeneity of Variances

Log THC			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.930	8	18	.516

ANOVA

Log THC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.502	8	.063	369.976	.000
Within Groups	.003	18	.000		
Total	.505	26			

Lanjutan Lampiran 3.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Log THC

LSD	(I) Perlakuan	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	Kontrol awal	Polisakarida awal	-.01994	.01063	.077	-.0423	.0024
		Ekstrak awal	.00740	.01063	.495	-.0149	.0297
		Kontrol jam ke-3	-.00952	.01063	.382	-.0319	.0128
		Polisakarida jam ke-3	-.27931*	.01063	.000	-.3016	-.2570
		Ekstrak kasar jam ke-3	-.34604*	.01063	.000	-.3684	-.3237
		Kontrol jam ke-24	-.02816*	.01063	.016	-.0505	-.0058
		Polisakarida jam ke-24	-.21185*	.01063	.000	-.2342	-.1895
		Ekstrak Kasar jam ke-24	-.26708*	.01063	.000	-.2894	-.2447
	Polisakarida awal	Kontrol awal	.01994	.01063	.077	-.0024	.0423
		Ekstrak awal	.02734*	.01063	.019	.0050	.0497
		Kontrol jam ke-3	.01042	.01063	.340	-.0119	.0328
		Polisakarida jam ke-3	-.25937*	.01063	.000	-.2817	-.2370
		Ekstrak kasar jam ke-3	-.32610*	.01063	.000	-.3484	-.3038
		Kontrol jam ke-24	-.00822	.01063	.449	-.0306	.0141
		Polisakarida jam ke-24	-.19191*	.01063	.000	-.2142	-.1696
		Ekstrak Kasar jam ke-24	-.24714*	.01063	.000	-.2695	-.2248
	Ekstrak awal	Kontrol awal	-.00740	.01063	.495	-.0297	.0149
		Polisakarida awal	-.02734*	.01063	.019	-.0497	-.0050
		Kontrol jam ke-3	-.01692	.01063	.129	-.0392	.0054
		Polisakarida jam ke-3	-.28671*	.01063	.000	-.3090	-.2644
		Ekstrak kasar jam ke-3	-.35344*	.01063	.000	-.3758	-.3311
		Kontrol jam ke-24	-.03555*	.01063	.004	-.0579	-.0132
		Polisakarida jam ke-24	-.21924*	.01063	.000	-.2416	-.1969
		Ekstrak Kasar jam ke-24	-.27448*	.01063	.000	-.2968	-.2521
	Kontrol jam ke-4	Kontrol awal	.00952	.01063	.382	-.0128	.0319
		Polisakarida awal	-.01042	.01063	.340	-.0328	.0119
		Ekstrak awal	.01692	.01063	.129	-.0054	.0392
		Polisakarida jam ke-3	-.26979*	.01063	.000	-.2921	-.2475
		Ekstrak kasar jam ke-3	-.33652*	.01063	.000	-.3589	-.3142
		Kontrol jam ke-24	-.01864	.01063	.097	-.0410	.0037
		Polisakarida jam ke-24	-.20233*	.01063	.000	-.2247	-.1800
		Ekstrak Kasar jam ke-24	-.25756*	.01063	.000	-.2799	-.2352
Polisakarida jam ke-4	Kontrol awal	.27931*	.01063	.000	.2570	.3016	
	Polisakarida awal	.25937*	.01063	.000	.2370	.2817	
	Ekstrak awal	.28671*	.01063	.000	.2644	.3090	
	Kontrol jam ke-3	.26979*	.01063	.000	.2475	.2921	
	Ekstrak kasar jam ke-3	-.06673*	.01063	.000	-.0891	-.0444	
	Kontrol jam ke-24	.25115*	.01063	.000	.2288	.2735	
	Polisakarida jam ke-24	.06746*	.01063	.000	.0451	.0898	
	Ekstrak Kasar jam ke-24	.01223	.01063	.265	-.0101	.0346	
Ekstrak kasar jam ke-4	Kontrol awal	.34604*	.01063	.000	.3237	.3684	
	Polisakarida awal	.32610*	.01063	.000	.3038	.3484	
	Ekstrak awal	.35344*	.01063	.000	.3311	.3758	
	Kontrol jam ke-3	.33652*	.01063	.000	.3142	.3589	
	Polisakarida jam ke-3	.06673*	.01063	.000	.0444	.0891	
	Kontrol jam ke-24	.31788*	.01063	.000	.2956	.3402	
	Polisakarida jam ke-24	.13419*	.01063	.000	.1119	.1565	
	Ekstrak Kasar jam ke-24	.07896*	.01063	.000	.0566	.1013	
Kontrol jam ke-24	Kontrol awal	.02816*	.01063	.016	.0058	.0505	
	Polisakarida awal	.00822	.01063	.449	-.0141	.0306	
	Ekstrak awal	.03555*	.01063	.004	.0132	.0579	
	Kontrol jam ke-3	.01864	.01063	.097	-.0037	.0410	
	Kontrol jam ke-24	Polisakarida jam ke-3	-.25115*	.01063	.000	-.2735	-.2288
		Ekstrak kasar jam ke-3	-.31788*	.01063	.000	-.3402	-.2956

Lanjutan Lampiran 3.

Polisakarida jam ke-24	Polisakarida jam ke-24	-.18369*	.01063	.000	-.2060	-.1614
	Ekstrak Kasar jam ke-24	-.23892*	.01063	.000	-.2613	-.2166
	Kontrol awal	.21185*	.01063	.000	.1895	.2342
	Polisakarida awal	.19191*	.01063	.000	.1696	.2142
	Ekstrak awal	.21924*	.01063	.000	.1969	.2416
	Kontrol jam ke-3	.20233*	.01063	.000	.1800	.2247
	Polisakarida jam ke-3	-.06746*	.01063	.000	-.0898	-.0451
	Ekstrak kasar jam ke-3	-.13419*	.01063	.000	-.1565	-.1119
	Kontrol jam ke-24	.18369*	.01063	.000	.1614	.2060
	Ekstrak Kasar jam ke-24	-.05523*	.01063	.000	-.0776	-.0329
Ekstrak Kasar jam ke-24	Kontrol awal	.26708*	.01063	.000	.2447	.2894
	Polisakarida awal	.24714*	.01063	.000	.2248	.2695
	Ekstrak awal	.27448*	.01063	.000	.2521	.2968
	Kontrol jam ke-3	.25756*	.01063	.000	.2352	.2799
	Polisakarida jam ke-3	-.01223	.01063	.265	-.0346	.0101
	Ekstrak kasar jam ke-3	-.07896*	.01063	.000	-.1013	-.0566
	Kontrol jam ke-24	.23892*	.01063	.000	.2166	.2613
	Polisakarida jam ke-24	.05523*	.01063	.000	.0329	.0776

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

Homogeneous Subsets

		Log THC						
		N	Subset for alpha = 0.05					
Waktu			1	2	3	4	5	6
Duncan ^a	Ekstrak awal	3	4.9723					
	Kontrol awal	3	4.9797	4.9797				
	Kontrol jam ke-3	3	4.9892	4.9892	4.9892			
	Polisakarida awal	3		4.9997	4.9997			
	Kontrol jam ke-24	3			5.0079			
	Polisakarida jam ke-24	3				5.1916		
	Ekstrak Kasar jam ke-24	3					5.2468	
	Polisakarida jam ke-3	3					5.2590	
	Ekstrak kasar jam ke-3	3						5.3258
	Sig.		.148	.091	.113	1.000	.265	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 4. Data Hasil Perhitungan

Data Pengamatan THC

Perlakuan	Waktu Pengamatan											
	Awal	Hari ke-1				Hari-3			Hari ke-6			
1 ppm	120	126	125	226	232	225	198	196	195	155	152	158
1,5 ppm	118	112	116	301	297	297	285	289	283	263	268	266
2 ppm	119	117	116	352	355	358	322	327	328	284	287	288
K-	116	118	113	135	133	136	126	129	125	132	136	133
K+	121	125	119	125	127	129	102	105	106	91	94	93

Log THC

Perlakuan	Waktu Pengamatan											
	awal		Hari ke-1			Hari ke-3			Hari ke-6			
1 ppm	4,98	5,00	5,00	5,26	5,27	5,26	5,20	5,20	5,19	5,09	5,08	5,10
1,5 ppm	4,97	4,95	4,97	5,38	5,38	5,38	5,36	5,36	5,35	5,32	5,33	5,33
2 ppm	4,98	4,97	4,97	5,45	5,45	5,46	5,41	5,42	5,42	5,36	5,36	5,36
K-	4,97	4,97	4,96	5,03	5,03	5,04	5,00	5,01	5,00	5,02	5,04	5,03
K+	4,99	5,00	4,98	5,00	5,01	5,01	4,91	4,92	4,93	4,86	4,88	4,87

Hasil Perhitungan nilai THC (mean $\pm$ SD)

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	4,9952 $\pm$ 0,01 ^a	5,2603 $\pm$ 0,01 ^c	5,1961 $\pm$ 0 ^c	5,0934 $\pm$ 0,01 ^c
1,5 ppm	4,9649 $\pm$ 0,01 ^a	5,3778 $\pm$ 0 ^d	5,3589 $\pm$ 0 ^d	5,3274 $\pm$ 0 ^d
2 ppm	4,9725 $\pm$ 0,01 ^a	5,4533 $\pm$ 0,004 ^e	5,4158 $\pm$ 0 ^e	5,3600 $\pm$ 0 ^e
K-	4,9662 $\pm$ 0,01 ^a	5,0323 $\pm$ 0 ^b	5,0057 $\pm$ 0,01 ^b	5,0291 $\pm$ 0,01 ^b
K+	4,9882 $\pm$ 0,01 ^a	5,0069 $\pm$ 0,01 ^a	4,9215 $\pm$ 0,01 ^a	4,8700 $\pm$ 0,01 ^a

Uji ANOVA

Descriptives								
Log THC								
Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 ppm	3	5.2603	.007	.004	5.2424	5.2782	5.2553	5.2686
1,5 ppm	3	5.3778	.003	.002	5.3694	5.3861	5.3758	5.3817
2 ppm	3	5.4533	.004	.002	5.4441	5.4624	5.4496	5.4570
K-	3	5.0323	.005	.003	5.0200	5.0445	5.0269	5.0366
K+	3	5.0069	.007	.004	4.9898	5.0238	5.0000	5.0137
Total	15	5.2261	.1860392	.0480351	5.123101	5.329151	5.0000	5.4570

Test of Homogeneity of Variances

Log THC			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.776	4	10	.566

Lanjutan Lampiran 4.

ANOVA

Log THC	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.484	4	.121	4101.916	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.485	14			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Log THC

LSD	(I) Perlakuan	(J) Hari ke-1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	1 ppm	1,5 ppm	-.1174335*	.004	.000	-.127317	-.107550
		2 ppm	-.1929584*	.004	.000	-.202842	-.183075
		K-	.2280182*	.004	.000	.218135	.237902
		K+	.2534918*	.004	.000	.243608	.263375
	1,5 ppm	1 ppm	.1174335*	.004	.000	.107550	.127317
		2 ppm	-.0755249*	.004	.000	-.085408	-.065641
		K-	.3454517*	.004	.000	.335568	.355335
		K+	.3709253*	.004	.000	.361042	.380809
	2 ppm	1 ppm	.1929584*	.004	.000	.183075	.202842
		1,5 ppm	.0755249*	.004	.000	.065641	.085408
		K-	.4209766*	.004	.000	.411093	.430860
		K+	.4464502*	.004	.000	.436567	.456334
	K-	1 ppm	-.2280182*	.004	.000	-.237902	-.218135
		1,5 ppm	-.3454517*	.004	.000	-.355335	-.335568
		2 ppm	-.4209766*	.004	.000	-.430860	-.411093
		K+	.0254736*	.004	.000	.015590	.035357
K+	1 ppm	-.2534918*	.004	.000	-.263375	-.243608	
	1,5 ppm	-.3709253*	.004	.000	-.380809	-.361042	
	2 ppm	-.4464502*	.004	.000	-.456334	-.436567	
	K-	-.0254736*	.004	.000	-.035357	-.015590	

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

Log THC

	Hari ke-1	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	K+	3	5.006858				
	K-	3		5.032331			
	1 ppm	3			5.260350		
	1,5 ppm	3				5.377783	
	2 ppm	3					5.453308
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. Data Hasil Perhitungan aktivitas fagositosis (%)

Data Pengamatan Aktivitas Fagositosis (%)

Perlakuan	Waktu Pengamatan											
	Awal			Hari ke-1			Hari ke-3			Hari ke-6		
1 ppm	45	42	41	56	58	55	48	47	45	41	43	44
1,5 ppm	43	43	46	63	66	65	59	57	56	46	47	46
2 ppm	46	44	42	71	74	75	67	66	69	57	55	57
K-	45	47	43	45	44	46	43	42	41	46	45	44
K+	44	45	42	58	56	55	51	52	51	44	46	45

Hasil perhitungan (mean $\pm$ SD)

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	42,67±2,08 ^a	56,33±1,53 ^b	46,67±1,53 ^b	42,67±1,53 ^a
1,5 ppm	44,00±1,73 ^a	64,67±1,53 ^c	57,33±1,53 ^d	46,33±0,58 ^b
2 ppm	44,00±2,00 ^a	73,33±2,08 ^d	67,33±1,53 ^e	56,33±1,15 ^c
K-	45,00±2,00 ^a	45,00±1,00 ^a	42,00±1,00 ^a	45,00±1,00 ^b
K+	43,67±1,53 ^a	56,33±1,53 ^a	51,33±0,58 ^c	45,00±1,00 ^b

Uji SPSS

Pengamatan jam ke-4

		AF				
	Hari ke-1	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	K-	3	45.00			
	1 ppm	3		56.33		
	K+	3		56.33		
	1.5 ppm	3			64.67	
	2 ppm	3				73.33
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Pengamatan hari ke-3

		AF					
	Hari ke-3	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Duncan ^a	K-	3	42.00				
	1 ppm	3		46.67			
	K+	3			51.33		
	1.5 ppm	3				57.67	
	2 ppm	3					66.33
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lanjutan Lampiran 5.

Pengamatan Hari ke-6

	Hari ke-6	N	AF		
			Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	1 ppm	3	42.67		
	K-	3		45.00	
	K+	3		45.00	
	1.5 ppm	3		46.33	
	2 ppm	3			56.33
	Sig.		1.000	.185	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 6. Data hasil perhitungan Aktivitas Phenoloksidase (PO)

Data Pengamatan PO

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	0,078	0,27	0,188	0,136
	0,073	0,277	0,192	0,142
	0,079	0,277	0,196	0,143
1,5 ppm	0,082	0,311	0,199	0,147
	0,074	0,316	0,202	0,154
	0,082	0,344	0,218	0,155
2 ppm	0,073	0,44	0,229	0,173
	0,079	0,45	0,286	0,202
	0,077	0,467	0,257	0,268
K-	0,07	0,144	0,138	0,109
	0,08	0,162	0,141	0,109
	0,076	0,165	0,156	0,112
K+	0,076	0,211	0,16	0,114
	0,074	0,216	0,167	0,114
	0,086	0,248	0,175	0,132

Hasil Perhitungan PO (mean $\pm$ SD)

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	0,0767 $\pm$ 0,0032	0,2747 $\pm$ 0,004	0,192 $\pm$ 0,004	0,1403 $\pm$ 0,004
1,5 ppm	0,079 $\pm$ 0,005	0,324 $\pm$ 0,018	0,206 $\pm$ 0,010	0,152 $\pm$ 0,004
2 ppm	0,076 $\pm$ 0,003	0,452 $\pm$ 0,014	0,257 $\pm$ 0,029	0,214 $\pm$ 0,021
K-	0,075 $\pm$ 0,005	0,157 $\pm$ 0,011	0,145 $\pm$ 0,010	0,110 $\pm$ 0,002
K+	0,079 $\pm$ 0,006	0,225 $\pm$ 0,020	0,167 $\pm$ 0,008	0,120 $\pm$ 0,010

Uji SPSS

Pengamatan Hari ke-1

		PO			
	Hari ke-1	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K-	3	.157000		
	K+	3	.225000	.225000	
	1 ppm	3		.274667	
	1.5 ppm	3		.323667	
	2 ppm	3			.522333
	Sig.		.163	.063	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lanjutan Lampiran 6.

Pengamatan Hari ke-3

		PO				
		Hari ke-3	N	Subset for alpha = 0.05		
				1	2	3
Duncan ^a	K-		3	.145000		
	K+		3	.167333	.167333	
	1 ppm		3		.192000	
	1.5 ppm		3		.206333	
	2 ppm		3			.280667
	Sig.			.266	.077	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Pengamatan Hari ke-6

		PO		
		N	Subset for alpha = 0.05	
Hari ke-6			1	2
Duncan ^a	K-	3	.110000	
	K+	3	.120000	
	1 ppm	3	.140333	
	1.5 ppm	3	.152000	
	2 ppm	3		.214333
	Sig.		.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 7. Data hasil perhitungan *Respiratory Burst* (RB) selama penelitian

Data Pengamatan RB

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	0,08	0,194	0,213	0,194
	0,07	0,238	0,224	0,197
	0,08	0,239	0,225	0,201
1,5 ppm	0,06	0,269	0,229	0,201
	0,08	0,283	0,235	0,203
	0,07	0,289	0,24	0,221
2 ppm	0,07	0,341	0,324	0,223
	0,08	0,319	0,307	0,223
	0,07	0,308	0,297	0,237
K-	0,08	0,07	0,07	0,065
	0,06	0,08	0,08	0,075
	0,05	0,075	0,075	0,06
K+	0,08	0,16	0,192	0,18
	0,06	0,17	0,196	0,191
	0,07	0,194	0,207	0,191

Hasil Perhitungan RB (mean $\pm$ SD)

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	Awal	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
1 ppm	0,077 $\pm$ 0,00 ^a	0,224 $\pm$ 0,00 ^{ab}	0,221 $\pm$ 0,00 ^b	0,197 $\pm$ 0,00 ^b
1,5 ppm	0,070 $\pm$ 0,00 ^a	0,280 $\pm$ 0,02 ^{bc}	0,235 $\pm$ 0,01 ^{bc}	0,208 $\pm$ 0,00 ^{bc}
2 ppm	0,073 $\pm$ 0,00 ^a	0,323 $\pm$ 0,01 ^c	0,309 $\pm$ 0,03 ^c	0,228 $\pm$ 0,02 ^c
K-	0,063 $\pm$ 0,01 ^a	0,073 $\pm$ 0,01 ^a	0,075 $\pm$ 0,01 ^a	0,067 $\pm$ 0,01 ^a
K+	0,070 $\pm$ 0,01 ^a	0,175 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,198 $\pm$ 0,01 ^b	0,187 $\pm$ 0,01 ^b

Uji SPSS

Pengamatan Hari ke-1

		RB			
	Hari ke-1	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K-	3	.121000		
	K+	3	.174667	.174667	
	1 ppm	3	.223667	.223667	
	1.5 ppm	3		.280333	.280333
	2 ppm	3			.400667
	Sig.		.133	.123	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lanjutan Lampiran 7.

Pengamatan Hari ke-3

	Hari ke-3	N	RB		
			Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K-	3	.113333		
	K+	3		.198333	
	1 ppm	3		.220667	
	1.5 ppm	3		.234667	.234667
	2 ppm	3			.298667
	Sig.		1.000	.276	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Pengamatan hari ke-6

	Hari ke-6	N	RB		
			Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K-	3	.154333		
	K+	3		.187333	
	1 ppm	3		.197333	
	1.5 ppm	3		.208333	.208333
	2 ppm	3			.227667
	Sig.		1.000	.096	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 8. Data Kelulushidupan/ SR (%) Udang vaname Selama Penelitian

Data Pengamatan SR (%)

Perlakuan	Hari ke-																	
	1			2			3			4			5			6		
1 ppm	100	100	100	80	90	80	70	75	70	50	60	50	40	50	40	30	40	30
1,5 ppm	100	100	100	90	80	90	80	70	70	60	70	50	50	40	60	50	40	50
2 ppm	100	100	100	90	100	90	80	80	70	60	70	70	60	70	60	60	70	60
K-	100	100	100	100	100	90	90	90	80	90	80	80	80	70	80	80	70	70
K+	100	100	100	70	80	90	50	60	60	40	50	40	20	30	30	10	10	20

Rata-rata SR (%)

Perlakuan	Hari Ke-1	Hari Ke-2	Hari Ke-3	Hari Ke-4	Hari Ke-5	Hari Ke-6
1 ppm	100,0	83,3	71,7	53,3	43,3	33,3
1,5 ppm	100,0	86,7	73,3	60,0	50,0	46,7
2 ppm	100,0	93,3	76,7	66,7	63,3	63,3
K-	100,0	96,7	86,7	83,3	76,7	73,3
K+	100,0	80,0	56,7	43,3	26,7	13,3

Uji SPSS

Hari ke-2

		SR			
	Hari ke 2	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K+	3	80.000		
	1 ppm	3	83.333	83.333	
	1.5 ppm	3	86.667	86.667	86.667
	2 ppm	3		93.333	93.333
	K-	3			96.667
	Sig.		.280	.117	.117

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Hari Ke-3

		SR			
	Hari ke 3	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	K+	3	56.667		
	1 ppm	3		71.667	
	1.5 ppm	3		73.333	
	2 ppm	3		76.667	
	K-	3			86.667
	Sig.		1.000	.298	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lanjutan Lampiran 8.

Hari Ke-4

	Hari ke 4	N	SR			
			Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	K+	3	43.333			
	1 ppm	3	53.333	53.333		
	1.5 ppm	3		60.000	60.000	
	2 ppm	3			66.667	
	K-	3				83.333
	Sig.		.103	.260	.260	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Hari ke-5

	Hari ke 5	N	SR			
			Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	K+	3	26.667			
	1 ppm	3		43.333		
	1.5 ppm	3		50.000		
	2 ppm	3			63.333	
	K-	3				76.667
	Sig.		1.000	.260	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Hari ke-6

	Hari ke-6	N	SR			
			Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	K+	3	13.3333			
	1 ppm	3		33.3333		
	1.5 ppm	3			46.6667	
	2 ppm	3				63.3333
	K-	3				73.3333
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 9. Data Pengamatan Kualitas Air selama Penelitian

Suhu Pagi (°C)

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	25	24	26	26	27	24	27	24	24	26	27	26	26	24	24
28-Sep	26	25	24	24	24	26	25	24	25	24	25	25	24	27	25
29-Sep	27	27	26	24	26	27	25	26	26	24	25	24	27	26	26
30-Sep	24	26	25	25	24	24	27	26	26	24	25	24	26	24	25
01-Oct	27	27	27	24	27	24	25	27	24	25	26	27	26	26	26
02-Oct	25	26	25	25	25	26	25	27	26	24	27	25	25	27	26
rata-rata	25,7	25,8	25,5	24,7	25,5	25,2	25,7	25,7	25,2	24,5	25,8	25,2	25,7	25,7	25,3

Suhu Sore (°C)

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	25	26	24	27	26	27	27	24	24	25	25	26	24	24	25
28-Sep	26	25	25	25	26	25	25	24	24	26	24	27	25	25	26
29-Sep	24	25	26	24	27	26	26	25	27	25	27	25	26	26	24
30-Sep	26	24	26	25	25	27	25	25	26	26	26	25	25	27	26
01-Oct	26	24	27	27	26	25	27	27	27	25	25	26	25	24	27
02-Oct	27	24	24	26	27	27	24	26	26	25	24	27	27	24	26
rata-rata	25,7	24,7	25,3	25,7	26,2	26,2	25,7	25,2	25,7	25,3	25,2	26,0	25,3	25,0	25,7

pH pagi

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	8	7,1	7,2	7,1	6,9	7,1	7,1	7,3	7	7,1	7	7,2	7,3	7,1	7,7
28-Sep	7,5	7,7	7,3	7,5	7,4	7,7	7,5	7,4	7,3	7,5	7,5	7,2	7,2	7,2	7,9
29-Sep	7,4	7,3	7,7	7,6	7,8	7,7	7,6	7,5	7,4	7,4	7,2	7,9	7,8	7,2	7,2
30-Sep	7,8	7,4	7,3	7,1	7,7	7,1	7,3	7,2	7,2	7,9	7,8	7,1	7,6	7,2	7,1
01-Oct	7,3	7,1	7,2	7,3	7,6	7,2	7,1	7,3	7,3	7,3	7,2	7,2	7,1	7,2	7,1
02-Oct	7,7	7,2	7,9	7,3	8,7	7,2	7,4	7,8	7,2	7,2	7,9	7,1	7,8	7,2	7,2
RATA-RATA	7,62	7,3	7,43	7,32	7,68	7,33	7,33	7,42	7,23	7,4	7,43	7,28	7,47	7,18	7,37

pH sore

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	7	7,3	7,3	7,3	7,1	7,4	7,4	7,3	7	7,2	7,2	7,3	7,1	7,4	7,4
28-Sep	7	7,1	7,3	7,2	7,2	7,2	7,1	7,2	7	7,1	7,9	7,2	7,2	7,1	7,2
29-Sep	7,7	7,5	7,3	7,7	8	7	7,2	7,7	7,7	7,5	7,5	7,2	7,1	7,2	7,2
30-Sep	7,9	7,1	7,2	7,7	7,8	7,4	7,4	7	7,3	7,3	7,2	7,7	7,2	7,1	7,3
01-Oct	7,1	7,2	7,8	7,5	7,1	7,8	7,5	7,1	7,9	7,5	7,8	7,5	7,2	7,3	7,7
02-Oct	7,4	7,1	7,2	7,1	7,1	7,2	7,1	7,2	7,2	7,1	7,2	7,1	7,1	7,2	7,2
RATA-RATA	7,35	7,22	7,35	7,42	7,38	7,33	7,28	7,25	7,35	7,28	7,47	7,33	7,15	7,22	7,33

DO pagi (mg/L)

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	4,2	4,4	5,2	5,2	5,4	5,5	4,0	4,3	5,4	4,0	5,5	4,0	4,5	5,4	4,5
28-Sep	4,4	5,4	4,8	4,1	5,3	5,1	5,3	5,4	4,8	5,4	4,4	4,5	5,5	4,8	4,0
29-Sep	5,5	4,5	5,8	4,5	4,5	5,4	4,5	5,3	4,4	4,1	4,1	4,0	5,3	4,4	5,8
30-Sep	5,4	4,4	4,1	5,2	4,8	4,8	5,4	5,5	4,4	4,4	5,4	4,4	5,8	5,4	4,8
01-Oct	5,3	4,4	5,8	5,1	4,4	5,5	4,8	4,0	5,4	4,1	4,9	5,1	5,3	4,5	4,8
02-Oct	4,1	4,4	4,0	5,8	5,4	4,8	5,0	4,8	5,8	4,4	4,5	4,9	5,3	5,5	4,0
RATA-RATA	4,8	4,6	5,0	5,0	4,9	5,2	4,8	4,9	5,0	4,4	4,8	4,5	5,3	5,0	4,7

Lanjutan Lampiran 9.

DO Sore (mg/L)

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	5,5	4,4	5,5	5,1	4,4	4,9	4,1	4,8	4,4	5,4	5,8	5,0	4,4	4,0	5,2
28-Sep	5,0	4,0	4,4	5,4	4,1	4,8	4,4	5,3	4,2	4,3	4,4	4,3	5,5	4,0	5,3
29-Sep	5,8	5,2	4,5	5,4	5,8	5,2	5,3	5,5	5,2	5,5	4,4	5,4	5,2	5,8	5,1
30-Sep	4,4	4,9	4,5	5,4	4,0	5,8	5,4	4,0	5,3	5,5	5,3	4,0	5,5	4,0	5,3
01-Oct	5,5	5,4	5,5	4,9	4,2	5,1	5,4	5,3	5,4	5,4	4,5	4,2	4,4	4,5	4,5
02-Oct	5,2	5,4	5,5	5,5	4,2	4,5	5,2	5,3	5,4	4,4	4,4	5,4	4,1	4,4	5,3
RATA-RATA	5,23	4,88	4,98	5,28	4,45	5,05	4,97	5,03	4,98	5,08	4,80	4,72	4,85	4,45	5,12

Salinitas

TGL	PERLAKUAN														
	k-1	k-2	k-3	k+1	k+2	k+3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
27-Sep	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
28-Sep	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
29-Sep	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
30-Sep	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
01-Oct	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
02-Oct	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0

